

Analyse der Todesrezeptor-Signalwege und deren Modifikationen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Master of Science Fabian Wohlfromm

geb. am 19.07.1992 in Gummersbach

Gutachter: Prof. Dr. Inna Lavrik

Prof. Dr. Markus Morrison

eingereicht am: 31.01.2024

verteidigt am: 15.07.2024

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse (1877-1962)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
EINHEITENVERZEICHNIS.....	XII
ABSTRACT	XIII
ZUSAMMENFASSUNG.....	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der programmierte Zelltod	2
1.2 Apoptose	2
1.2.1 Caspasen.....	8
1.2.2 Caspase-8.....	9
1.3 Posttranslationale Modifikationen von Apoptose-Proteinen	15
1.3.1 PTM von Caspase-8.....	15
1.3.2 Methylierung	17
1.4 Autophagie	19
1.4.1 Gruppen der Autophagie	19
1.4.2 Mitophagie	21
1.5 Lactaptin/ RL2.....	24
1.6 Zielstellung	25
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Material für Zellkultur und Experimente	26

2.1.2	Medien und Chemikalien für die Zellkultivierung.....	27
2.1.3	Zelllinien	27
2.1.4	Liganden und Inhibitoren zur Zellstimulation	28
2.1.5	Material für SDS-PAGE und Western Blot	28
2.1.6	Antikörper für Western Blot	31
2.1.7	Färbesubstanzen für zellspezifischen Zelltod.....	33
2.1.8	Kits, Assays und Reagenzien für Zellkompartimentsanalyse	33
2.1.9	Puffer für die Fraktionierung	34
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Zellkultivierung	35
2.2.2	Zellviabilitäts-Assays	37
2.2.3	Caspase-Aktivitäts-Assays	38
2.2.4	Bestimmung der OCR.....	39
2.2.5	LDH-Assay	39
2.2.6	Protein-Analyse.....	40
2.2.7	IP (Immunpräzipitation).....	43
2.2.8	Massenspektrometrische Analyse	45
2.2.9	Quantitative Zelltod-Analyse durch bildgebende Durchflusszytometrie	45
2.2.10	Caspase-8-Transfektion in HeLa-CD95-C8-KO Zellen	46
2.2.11	Statistische Auswertung	47
2.2.12	Berechnung des IC ₅₀ -Wertes und CI (Combinatorial Index)	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Untersuchung von Caspase-8 auf eine bisher nicht identifizierte PTM	49
3.1.1	Potenzielles Zusammenspiel zwischen Caspase-8 und dem PRMT5-Komplex	49
3.1.2	Potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8.....	52
3.1.3	Hemmung der Caspase-8-Aktivität als Resultat der PRMT5 Inhibierung	55
3.1.4	Reduktion der Caspase-8-Kaskade durch Mutationen an möglichen Methylierungsstellen	58
3.1.5	Lokalisierung der Procaspasen-8a-R233H, -R435Q und -WT.....	63
3.1.6	Mutiertes Procaspase-8 kann nicht an SYM-10-IP erfasst werden	64
3.2	Dekodierung des RL2-Mechanismus in Mammakarzinomzellen.....	67
3.2.1	RL2-Translokation an die Mitochondrien.....	67
3.2.2	Induzierung von Mitophagie in MDA-MB-231 Zellen durch RL2	69
3.2.3	Wechselhaftes Zusammenspiel von TRAIL und RL2 Co-Stimulationen.....	71
3.2.4	Inhibierung der TRAIL-induzierten Caspase-8-Kaskade durch RL2	74
3.2.5	Gegenseitige Behinderung von RL2 und TRAIL.....	77
3.2.6	Einfluss von RL2 auf unterschiedliche Mammakarzinomzelllinien	79
3.2.7	DXR Co-Stimulation mit RL2 führt zu einem erhöhten Effekt in BT549 Zellen.....	82
3.2.8	RL2- und DXR-Co-Stimulationen erhöhen die LDH-Ausschüttung in BT549 Zellen.....	85
3.2.9	RL2- und DXR-Co-Stimulationen führen zu synergetischen Effekten	86
4	DISKUSSION	90
4.1	Die Bedeutung einer möglichen Methylierung für Procaspase-8.....	90
4.1.1	Interaktion von Procaspase-8 mit dem PRMT5-Komplex	90
4.1.2	Reduktion der Caspase-8-Aktivität durch Inhibierung von PRMT5	93

4.1.3	Potenzielle Methylierungsstellen bei Procaspase-8 und Auswirkungen auf die Spaltung und Aktivität von Caspase-8.....	94
4.1.4	Die potenzielle Rolle der Caspase-8-Methylierung bei Zelltod und Krankheiten	96
4.2	Dekodierung des RL2-Signalweges und sein Einfluss auf die extrinsische Apoptose.....	98
4.2.1	Translokation von RL2 zu den Mitochondrien	98
4.2.2	Induzierung von Mitophagie in Mammakarzinomzelllinien durch RL2	99
4.2.3	Inhibierung des TRAIL-induzierten Zelltodes durch RL2	101
4.2.4	RL2 als potenzielles Therapeutikum	103
5	AUSBLICK.....	106
5.1	Bedeutung der potenziellen Methylierung von Caspase-8	106
5.2	Dekodierung des RL2-Mechanismus und dessen Potenzial für Karzinom-Therapien	107
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	XV
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	XLVII
8	ANHANG	XLVIII
	EHRENERKLÄRUNG.....	LI

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Beispiel für vorherrschende Caspase-8-Punktmutationen in ALPS-Erkrankungen	14
Tabelle 2 Beispiele der vorherrschenden Caspase-8-Punktmutationen in Karzinom-Erkrankungen	14
Tabelle 3 Materialien für die Zellkultivierung und Experimente	26
Tabelle 4 Medien und Chemikalien für die Zellkultivierung	27
Tabelle 5 Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 6 Liganden und Inhibitoren zur Zellstimulation	28
Tabelle 7 Materialien für SDS PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) und Western Blot	28
Tabelle 8 Zusammensetzung des Lyse-Puffers	29
Tabelle 9 Zusammensetzung des 20x PBS-T-Puffers	30
Tabelle 10 Zusammensetzung der SDS-Gele und Konzentrationen der verwendeten Chemikalien	30
Tabelle 11 Blockade-Puffer für Western Blot Membranen	30
Tabelle 12 CHAPS/HEPES-Puffer für Caspase-8-Aktivitäts-Assays	31
Tabelle 13 LDH-Ladepuffer	31
Tabelle 14 Primärantikörper für Western Blots	31
Tabelle 15 Sekundärantikörper für Western Blot	33
Tabelle 16 Färbesubstanzen und Puffer für zellspezifischen Zelltod	33
Tabelle 17 Kits, Assays und Reagenzien für die Zellkompartimentsanalyse	33
Tabelle 18 Zusammensetzung des Puffer A für die Fraktionierung	34
Tabelle 19 Zusammensetzung des Puffer C für die Fraktionierung	34
Tabelle 20 Verwendete Konzentrationen von NP-40 für die Zellfraktionierung bezüglich der Zelllinien	34
Tabelle 21 Namen der verwendeten transient-transfizierten Zellen	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Unterteilung der Apoptose in extrinsisch und intrinsisch	3
Abbildung 2 Allgemeiner Aufbau der intrinsischen Apoptose	5
Abbildung 3 Unterteilung der Todesrezeptor-Familie	7
Abbildung 4 Einteilung der verschiedenen Caspasen	9
Abbildung 5 Spaltprodukte von Caspase-8	10
Abbildung 6 Beteiligung von Caspase-8 an den genannten Zellprozessen	13
Abbildung 7 Unterteilung der Arginin-Methylierungen	17
Abbildung 8 Unterteilung der verschiedenen PRMT5-Komplexe	18
Abbildung 9 Allgemeine Autophagie-Initiierung und wichtigste Schritte der beiden Signalwege	20
Abbildung 10 Signalwege der Mitophagie	22
Abbildung 11 Aufbau und Unterteilung von RL2, RL1 und Lactaptin verglichen mit K- Casein	24
Abbildung 12 Interaktion zwischen Procaspase-8 und dem PRMT5-Komplex	51
Abbildung 13 Caspase-8 ist potenziell symmetrisch di-methyliert	53
Abbildung 14 Caspase-8 ist potenziell symmetrisch di-methyliert	54
Abbildung 15 EPZ reduziert die CD95L induzierte Caspase-Spaltung	56
Abbildung 16 PRMT5-Inhibierung reduziert die potenzielle Methylierung von Caspase- 8a-WT	57
Abbildung 17 Caspase-8 Mutation an potenziellen Methylierungsstellen reduziert Caspase-8-Aktivität	59
Abbildung 18 Mutation an potenzielle Methylierungsstellen reduziert CD95L-induzierte Caspase-3/7-Aktivität	60
Abbildung 19 Caspase-8 Mutationen verhindern die Reduzierung der Zellviabilität durch CD95L-Stimulation	61
Abbildung 20 Caspase-8-R233H und R435Q verhindern den CD95L induzierten Zelltod	63
Abbildung 21 Procaspase-8-R233H, R435Q und WT sind im Zytosol lokalisiert	64
Abbildung 22 Mögliche Signale der Caspase-8-Mutationen werden innerhalb der Methylierungs-IP detektiert	66
Abbildung 23 RL2 transloziert nach der Stimulation an die Mitochondrien	68
Abbildung 24 RL2 induziert Mitophagie	70
Abbildung 25 RL2 inhibiert die TRAIL-induzierte Reduzierung der Zellviabilität in den ersten Stunden, sensitiviert die Zellen jedoch bei längerer Stimulationsdauer.	72
Abbildung 26 RL2 inhibiert TRAIL induzierten Zelltod, verstärkt ihn jedoch über längere Zeit	73
Abbildung 27 RL2 inhibiert die TRAIL-induzierte DISC-Formierung	74
Abbildung 28 RL2 reduziert die TRAIL-induzierte Caspase-8 Spaltung und Aktivierung	75
Abbildung 29 RL2 inhibiert die TRAIL-induzierte Caspase-3-Aktivität	77
Abbildung 30 RL2 und TRAIL hindern sich gegenseitig in ihren zellulären Prozessen	79
Abbildung 31 RL2 reduziert die Zellviabilität in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien	80
Abbildung 32 RL2 reduziert die metabolische Aktivität in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien	81
Abbildung 33 Induzierung von Mitophagie in verschiedenen Zellen	82

Abbildung 34 DXR Co-Stimulation sensitiviert SKBR3 Mammakarzinomzellen nicht für eine RL2-Behandlung	83
Abbildung 35 RL2 verstärkt teilweise die DXR-induzierte Caspase-Kaskade	84
Abbildung 36 Induzierung der Caspase-Kaskade in BT549 und SKBR3 Zellen	85
Abbildung 37 RL2 und DXR führen zu einer Erhöhung des Zelltodes in BT549 Zellen	86
Abbildung 38 Berechnung des IC₅₀-Wertes und Überprüfung der Effekte innerhalb von Co-Stimulationen	87
Abbildung 39 RL2- und DXR-Co-Stimulation führt zu synergetischen Effekten	89
Abbildung 40 Mögliche Interaktion zwischen Procaspase-8 und dem PRMT5-Komplex	92
Abbildung 41 PRMT5-Inhibierung reduziert die Caspase-8-Aktivität	94
Abbildung 42 Mögliche Methylierungsstellen an Procaspase-8	95
Abbildung 43 Potenzielle Methylierungsstellen an Caspase-8	96
Abbildung 44 Potenzielle Auswirkungen von PRMT5 und c-FLIP auf Caspase-8	97
Abbildung 45 RL2 transloziert innerhalb der Zelle an das Mitochondrium	98
Abbildung 46 RL2 kann durch die mögliche TOM70-Interaktion Mitophagie innerhalb der Zelle induzieren	100
Abbildung 47 Inhibierung des Zelltodes innerhalb einer RL2-TRAIL-Co-Stimulation	102
Abbildung 48 Sensitivierung des Zelltodes innerhalb einer RL2-TRAIL-Co-Stimulation	103
Abbildung 49 Separate Signalwege der DXR- und RL2-induzierten Zelltode	105

Abkürzungsverzeichnis

1 E1b 19K	engl. <i>Adenovirus E1A and E1B-19K Protein</i>
aDMA	asymmetrische Dimethylierung an Arginin
AIF	engl. <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
ALPS	engl. <i>Autoimmune lymphoproliferative syndrome</i>
Ambra1	engl. <i>Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein1</i>
Apaf-1	engl. <i>Apoptotic protease activation factor-1</i>
APS	engl. <i>Ammoniumpersulfat</i>
APO-1	engl. <i>Apoptosis antigen 1</i>
ATG	engl. <i>Autophagy-related protein</i>
Bad	engl. <i>Bcl-2 antagonist mediator of cell death</i>
Bak	engl. <i>Bcl-2 antagonist killer</i>
Bax	engl. <i>Bcl-2 associated x protein</i>
Bcl-2	engl. <i>B cell lymphoma-2</i>
Bcl-w	engl. <i>Bcl-2-like protein 2 w</i>
Bcl-xL	engl. <i>B cell lymphoma-extra large</i>
Bid	engl. <i>Bcl-2 interacting domain death agonist</i>
Bim	engl. <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BH	Bcl-2 Homologie-Domäne
BNIP3	engl. <i>Bcl-1/ adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3</i>
BNIP3L	engl. <i>Bcl-1/ adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3-like</i>
Br.	engl. <i>Bright Field/ dt. Hellfeld</i>
BSA	engl. <i>bovin serum albumin</i>
Bok	engl. <i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
CALCOCO2	engl. <i>Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2</i>
CARD	engl. <i>caspase recruitment domain</i>
Caspase	engl. <i>Cysteine-specific aspartate protease</i>
CCCP	Carbonyl cyanide m-chloropheny hydrazone
CD95	engl. <i>Cluster of Differentiation 95</i>
CD95L	CD95 Ligand
CED9	engl. <i>Cell death abnormality gene 9</i>
c-FLIP	engl. <i>cellular FLICE (FADD-like IL1β-converting enzyme) - inhibitory protein</i>

c-FLIP _L	engl. <i>c-FLIP Long</i>
c-FLIP _S	engl. <i>c-FLIP short</i>
c-FLIP _R	engl. <i>c-FLIP Raji</i>
CI	engl. <i>combinatorial index</i>
CK1 α	engl. <i>Casein kinase 1 alpha</i>
CK2	engl. <i>Casein kinase 2</i>
CMA	engl. <i>Chaperone mediated autophagy</i> / dt. Chaperonvermittelte Autophagie
COPR5	engl. <i>Coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CRD	engl. <i>cysteine rich domain</i>
D	Asparaginsäure
DD	engl. <i>death domain</i> / dt. Todesdomäne
DED	engl. <i>death effector domain</i>
Den.-IP	Denaturierungs-Immunpräzipitation
DISC	engl. <i>death-inducing signalling complex</i> / dt. Todesinduzierender Signal-Komplex
DL	engl. <i>death ligand</i> / dt. Todesligand
DMA	Dimethylarginin
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> / dt. Desoxyribonukleinsäure
DR	engl. <i>Death Receptor</i> / dt. Todesrezeptor
dt.	deutsch
EBV BHRF4	engl. (<i>Epstein-Barr virus (strain B95-8) (Human herpesvirus 4)</i>)
EDAR	engl. <i>ectodysplasin A receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>Epidermal growth factor</i>
EPZ	EPZ015666 (GSK3235025)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	engl. <i>extracellular-signal regulated kinases</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FADD	engl. <i>fas associated death domain</i>
FAS	engl. <i>FS-7-associated surface antigen</i>
FBS	engl. <i>Fetale Bovine Serum</i>

FIP200	engl. <i>FAK-family interacting protein of 200kDa</i>
Foxo3	engl. <i>Forkhead-Box-Protein O3</i>
GSDMD	Gasdermin D
HECTD3	engl. <i>Homologous to the E6-AP carboxalTerminus3</i>
Hip	Hsc70 interagierendes Protein
Hopfen	hsc70-hsp90-organisiertes Protein
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
Hsp40	Hitzeschockprotein 40kDa
Hsp70	Hitzeschockprotein 70kDa
IAPs	engl. <i>Inhibitors of Apoptosis</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IKK	engl. <i>Inhibitor of nuclear factor KB (IKB) kinase</i>
IL18	Interleukin18
IL1 β	Interleukin-1 beta
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
LAMP-2A	engl. <i>lysosomal membrane-associated protein 2a</i>
LC	Liquid-Chromatographie
LC3	engl. <i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
LCD	engl. <i>Large catalytic domain</i>
LCS	engl. <i>Large catalytic subunit</i>
LDH	engl. <i>lactate dehydrogenase</i>
LMNA	Lamin A
LPS	Lipopolysaccharide
Mcl-1	engl. <i>myeloid cell leukemia 1</i>
MEP50	engl. <i>methylosome protein 50</i>
MLKL	engl. <i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MMA	Mono-Methylarginin
MS	Massenspektometrie
MOM	engl. <i>Mitochondrial outer membrane/ dt. äußere mitochondriale Membran</i>
MOMP	engl. <i>mitochondrial outer membrane permeabilisation/ dt. Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran</i>
mTOR	engl. <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>

N4BP1	engl. <i>NEDD4-binding protein 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBR1	engl. <i>neighbour of BRCA1 gene 1</i>
NF-KB	engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGFR	engl. <i>nerve growth factor receptor</i>
NLRP3	engl. <i>NOD-like receptor protein 3</i>
NRF2	engl. <i>nuclear factor (erythroid –derived 2)-like 2</i>
NUMA1	engl. <i>Nuclear mitotic apparatus 1</i>
OCR	engl. <i>Oxygen Consumption Rate</i> / dt. Sauerstoffverbrauchsrate
OPTN	Optineurin
p53	Protein 53
PAGE	engl. <i>Polyachrylamide gel electrophoresis</i>
PARL	engl. <i>Presenilins-associated rhomboid-like protein, mitochondrial</i>
PARP1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PARP2	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 2
PBS	engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
P/S	Penicilin / Streptavidin
PIDD1	engl. <i>p53-induced deathdomain 1</i>
PINK1	engl. <i>phosphatase and tensin homolog-induced kinase-1</i>
PKC	engl. <i>protein kinase C</i> / dt. Proteinkinase C
PI3K	engl. <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
Plk1	engl. <i>Polo-like kinase 1</i>
pCln	engl. <i>chloride channel nucleotide sensitive 1A</i>
Puma	engl. <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
PRMT5	engl. <i>Protein arginine methyltransferase 5</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
PYD	Pyrimidomäne
ra	engl. <i>response additivity</i>
RAIDD/ CRADD	engl. <i>receptor-interacting protein (RIP) associated ICH-1/ CED-3 homologous protein</i>
RIOK1	Protein Kinase RIO1
RIPK1	engl. <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>

RIPK3	engl. <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RL2	engl. <i>recombinant Lactaptin analogon 2/ dt. rekombinantes Lactaptin Analogon 2</i>
ROS	engl. <i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
sDMA	symmetrische Di-Methylarginin
SCD	engl. <i>Short catalytic domain</i>
SCS	engl. <i>Short catalytic subunit</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMAC	engl. <i>second mitochondria derived activator of caspases</i>
SOD2	engl. <i>Superoxid Dismutase 2</i>
SQSTM1	engl. <i>Sequestosome-1</i>
STRAP	engl. <i>Serine-threonine kinase receptor-associated protein</i>
SUMO-1	engl. <i>Small ubiquitin-related modifier 1</i>
TAK1	engl. <i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TAB1	engl. <i>TGF-beta activated kinase 1</i>
TAB2/3	engl. <i>TGF-beta –activated kinase 1 and MAP3k7-binding protein 2/3</i>
TBK1	engl. <i>serine/threonine-protein kinase 1</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIM	engl. <i>Translocase of the Inner Membrane</i>
TGF	engl. <i>Transforming growth factor</i>
TNF-R1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TRAF2	engl. <i>TNF Receptor associated Factor-2</i>
TRIM13	engl. <i>Tripartite motif 13</i>
TOM	engl. <i>Translocase of the Outer Membrane</i>
TRAIL-R	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
UVRAG	engl. <i>UV radiation resistance-associated gene protein</i>
VPS15	engl. <i>Vacuolar protein sorting associated protein</i>
WDR77	engl. <i>WD repeat containing protein</i>
WT	Wild-Typ
XIAP	engl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
zVAD	zVAD-fmk

Einheitenverzeichnis

Σ	Coverage
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molare Masse
ml	Milliliter
mol	Mol/ Stoffmenge
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
n.u.Z.	nach unserer Zeitrechnung
pH	Potential des Wasserstoffs/ <i>potentia hydrogenii</i>
RU	engl. <i>relative unit</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
x g	relative Zentrifugalkraft

Abstract

The death receptor-induced signalling pathway is one of the most important pathways to activate the programmed cell death in defective or infected cells. A number of different signalling pathways could lead to the programmed cell death in multicellular organisms. Normally, organisms are in a state of equilibrium between proliferation and cell death. Cancer as well as other diseases are associated to the deregulation of programmed cell death. Cell death could be induced via different programmes, which are specifically defined by the cellular location, the type of induction or the execution. Decoding the cell death mechanisms is essential to uncover and establish more harmless and targeted therapies.

One type of cell death, which is in the focus of research, is the extrinsic apoptosis. A main protein of extrinsic apoptosis is caspase-8, which plays an important role as the core component of the DISC (death-inducing signalling complex) and the subsequent caspase cascade. In addition to the induction of DISC by DLs (death ligands), PTM (posttranslational modifications) could have an important function in the activation and stabilization of caspase-8. In previous studies, caspase-8 has been shown to undergo several PTM. Methylation of caspase-8 has not been reported so far. In this thesis, first insights into a potential link between caspase-8 methylation and the PRMT5 methyltransferase complex could be observed. Furthermore, the influence of PRMT5 inhibition on the activity of caspase-8 could be detected. In addition, a possible link between the mutations of potential methylation sites of caspase-8 and the reduction of DL-induced caspase cascade as well as cell viability could be uncovered.

In addition to gathering initial evidence for a potential methylation of caspase-8, in this dissertation, the molecular mechanism of the cell death induced by the peptide RL2 in breast carcinoma cells was uncovered. Previous studies have shown that RL2 administration leads to cell death in breast cancer cells. Mitophagy was shown to play the major role in RL2-mediated effects in this dissertation. Furthermore, the interplay between RL2-induced mitophagy and extrinsic apoptosis was investigated. This analysis has shown how these two cell death signalling pathways interact with each other and how this can be used for translational applications.

Both projects of this dissertation are devoted to decoding the extrinsic apoptosis mechanisms, as well as the potential development of new therapeutic approaches.

Zusammenfassung

Der Todesrezeptor-induzierte Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege um den programmierten Zelltod in defekten, überflüssigen oder infizierten Zellen zu ermöglichen. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalwegen kann zu einer gezielten Induzierung des Zelltodes in mehrzelligen Organismen führen. Dabei befindet sich der mehrzellige Organismus in einem Gleichgewicht aus Proliferation und Zellsterben. Krebserkrankungen sowie weitere Krankheitsarten können zu einer molekularen Inhibierung des Zelltodes führen, sodass der Zelltod in defekten oder überschüssigen Zellen kaum bzw. gar nicht erfolgen kann.

Innerhalb des Zelltodes kann zwischen unterschiedliche Arten differenziert werden, bei denen die Unterteilung anhand von Morphologien oder zellulären Prozessen erfolgt. Eine Zelltodart, die im Fokus der Forschung steht, ist die extrinsische Apoptose. Ein Hauptprotein der extrinsischen Apoptose ist Caspase-8, welches als Bestandteil des DISC (*death inducing signaling complex/ Todesinduzierender Signal-Komplex*) und der anschließenden Caspase-Kaskade eine bedeutende Rolle spielt. Neben der Induzierung des DISC durch Todesliganden können PTM (Posttranslationale Modifikationen) eine wichtige Funktion für die Aktivierung und Stabilität von Caspase-8 besitzen. In früheren Studien konnten erste PTM an Caspase-8 nachgewiesen werden. Methylierungen wurden bisher nicht in einen Zusammenhang mit Caspase-8 gebracht. In dieser Dissertation konnten erste Erkenntnisse über eine potenzielle Verbindung zwischen Caspase-8 und dem Methyltransferase-Komplex PRMT5 erfasst werden. Darüber hinaus wurde die Bedeutung einer PRMT5-Inhibierung auf die Spaltung von Caspase-8 verdeutlicht. Zusätzlich konnte eine mögliche Verbindung zwischen Mutationen der potenziellen Methylierungsstellen von Caspase-8 mit der Reduzierung der Caspase-Kaskade und der Reduzierung der Zellviabilität erstellt werden. Darüber hinaus stehen Einzelmutationen der potenziellen Methylierungsstellen im Verdacht an Karzinomerkrankungen beteiligt zu sein.

Neben der Erfassung erster Hinweise auf eine potenzielle Methylierung von Caspase-8 konnte in dieser Dissertation der Mechanismus des Peptids RL2 innerhalb von Mammakarzinomzellen entschlüsselt werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass RL2 in Mammakarzinomzellen Zelltod auslöst. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Screenings, Western Blot Analysen und IP konnte Mitophagie als wichtigster Mechanismus entschlüsselt werden. Darüber hinaus konnte das Zusammenspiel zwischen RL2-induzierter Mitophagie und extrinsischer Apoptose, also potenzielle Co-Stimulation, in Mammakarzinomzelllinien beobachtet werden. Dieses Zusammenspiel zeigt, wie unterschiedliche Zelltodsignalwege miteinander agieren können und welche Effekte es für eine potenzielle Therapie geben kann.

Beide Projekte dieser Dissertation beruhen auf einer Entschlüsselung der extrinsischen Apoptosemechanismen sowie der potenziellen Nutzung innerhalb von Stimulationen für mögliche Therapeutika.

1 Einleitung

Die Anzahl der von verschiedenen Krebserkrankungen neu betroffenen Patienten ist in den letzten Jahren auf einem stabilen Niveau geblieben. Während die häufigsten Karzinomerkrankungen bei Männern Prostata- und Lungen- bzw. Darmkrebs sind, ist die häufigste Erkrankung bei Frauen Brustkrebs. Etwa 233.000 Frauen und 265.000 Männer erkranken jedes Jahr an Krebs [1]. Eine Untersuchung neuer Therapeutika ist in diesem Feld daher besonders notwendig und dringend.

Neben der Erforschung neuer potenzieller Therapeutika ist die Untersuchung der Grundlagen von Störungen der Protein-Signalkaskaden, Mutationen und weiteren Abnormalitäten in Karzinomzellen für ein besseres Verständnis von großer Bedeutung. Nur die genaue Erforschung, wodurch Karzinomerkrankungen entgegen Zelltodsignalen wirken, womit die Unterbrechung der Todessignale umgangen werden können und welche Unterschiede es zu gesunden Zellen gibt, ermöglicht geeignete und zielgerichtete Therapien.

Ein weiterer wichtiger Forschungsschwerpunkt sind die Untersuchungen verschiedener Zelltodarten, wie diese miteinander verbunden sind und welche Effekte eine Induzierung des einen Zelltodtypus auf den anderen hat. Das Verständnis des Zusammenspiels unterschiedlicher Zelltodarten ermöglicht neue Therapieformen mit niedrigeren Konzentrationen, die zu einer sanfteren Therapie führen können, bei welcher der Patient einer mildereren Belastung ausgesetzt wird.

Neben zielgerichteten und sanfteren Therapieformen ist die Charakterisierung von Karzinomerkrankungen ein wesentlicher Faktor für eine erfolgreiche Krebsbehandlung. Die Untersuchung von potenziellen Patienten mit einem erhöhten Risiko durch genetische Faktoren oder Mutationen ist dabei eine Möglichkeit. So können Mutationen von Proteinen, Todesrezeptoren oder Liganden zu einer Unterbrechung der Zelltod-Kaskade führen und dadurch Krebserkrankungen fördern [2]. Das Verständnis dieser inhibitorischen Faktoren als Bestandteil der Zelltod-Grundlagenforschung kann als Ausgangspunkt weiterer potenzieller Therapien dienen.

1.1 Der programmierte Zelltod

Der programmierte Zelltod ist ein Regulationsmechanismus für die Entfernung von defekten oder nicht benötigten Zellen in mehrzelligen Organismen [3]. Die bekanntesten Arten des programmierten Zelltods sind Apoptose, Autophagie und regulierte Nekrose [4] [5] [6] [7] [8]. Diese Zelltodarten werden auch Typ I, Typ II und Typ III Zelltode genannt. Zu Typ I Zelltod gehören unter anderem Apoptose, aber auch Anoikis [9]. Die Autophagie zählt hingegen zu den Typ II Zelltoden [10] [11]. Zu dem dritten Klassifizierungstypen (Typ III) des Zelltodes gehört die regulierte Nekrose. Lange galt die Nekrose als unkontrollierte Art des Zelltodes. Jedoch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Nekrose kontrolliert auftreten kann (Nekroptose) [9] [12] [13] [14] (zusammengefasst in [15] [16]). Weitere Arten der kontrollierten Nekrose sind Pyroptose sowie Ferroptose [17] (zusammengefasst in [15] [16] [18]). Die Unterteilung der Zelltod-Typen erfolgt anhand der verschiedenen Morphologien, welche durch die Zelltode verursacht werden.

Der Erhalt der Homöostase in mehrzelligen Organismen wird durch ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod erzeugt (zusammengefasst in [19] [20] [21] [22]). Der programmierte Zelltod wirkt dabei als zielgerichteter Mechanismus, an dessen Ende im Idealfall der Tod der defekten bzw. unnötigen Zelle steht. Eine Beeinträchtigung des programmierten Zelltods durch Inhibition (weniger Zelltod, aber mehr Zellproliferation) oder unkontrollierter Übersteuerung zu mehr Zelltod, kann im Zusammenhang mit schwerwiegenden Erkrankungen stehen [7].

1.2 Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, an dessen Ende die Eliminierung von überschüssigen bzw. defekten Zellen erfolgt [20] [23]. Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 verwendet [24]. Jedoch sind Teilprozesse bereits früher beobachtet, dokumentiert und veröffentlicht worden [24] [25]. Erste Beobachtungen reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. Eine der ersten Beobachtungen der anfangs als Schrumpfungsnekrose genannten Apoptose konnten in Rattenleberzellen erfolgen. Ein Jahr später erfolgte die Untersuchung an Basalzellkarzinomen und dadurch der erste Nachweis innerhalb von Karzinomzellen [25] [26].

Die Apoptose durchläuft verschiedene charakteristische Schritte, die sich unter anderem in der Morphologie der Zelle unterscheiden [24] [25] [27]. Dabei finden die Ereignisse sowohl auf molekularer Ebene als auch auf morphologischer Ebene statt. Innerhalb der ersten Phase (Initiationsphase) werden Signalwege durch einen pro-apoptotischen Reiz ausgelöst (nähere Beschreibung siehe nächste Seiten) [28]. Anschließend erfolgt die sogenannte Effektorphase, in der die Initiationssignale weitergeleitet werden [28] [29]. In diesen beiden Phasen können keine bzw. kaum morphologische Effekte beobachtet werden. Erst in der dritten Phase, der Abbauphase, können Veränderungen an der Zellmembran und dem Nukleus durch DNA (engl. *Desoxyribonucleic acid*/ dt. Desoxyribonukleinsäure) -Fragmentierungen beobachtet werden. Nach der Übermittlung der Signalkaskade wird Phosphatidylserin an der Zelloberfläche exprimiert [27]. Anschließend erfolgt die Zellschrumpfung, wodurch das Zytoplasma verdichtet wird und die Organellen enger aneinander liegen [24]. Die Pyknose erfolgt gleichzeitig, dabei wird der Zellkern geschrumpft und das Chromatin verdichtet, sodass eine einheitliche Masse entsteht (zusammengefasst in [30]). Zusätzlich kommt es zu der Bildung von apoptotischen Körpern, auch *Bodies* genannt (zusammengefasst in [3]). Diese *Bodies* bestehen aus Zellmembran und im Inneren aus Zytoplasma sowie dicht gepackten Organellen. Es können

auch Nukleus Fragmente in die Apoptosekörper aufgenommen werden. Dieser Prozess wird Knospung (auch *budding*) genannt. Die apoptotischen Körper lösen sich von der Zellmembran und können anschließend von Makrophagen, Parenchymzellen oder neoplastischen Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden, um sie mit Hilfe des Lysosoms abzubauen (zusammengefasst in [3]).

Die wichtigste Unterteilung der Apoptose beläuft sich auf extrinsische und intrinsische Apoptose (siehe Abbildung 1) [20] [23]. Der Signalweg der intrinsischen Apoptose kann durch genotoxischen Stress, übermäßige UV- oder Gamma-Bestrahlung oder Fehlfunktionen der Wachstumsfaktoren induziert werden [31]. Diese Induzierung führt zu verschiedenen Prozessen innerhalb der Zelle. Unter anderem wird MOMP (engl. *mitochondrial outer membrane permeabilisation/ dt. Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran*) ausgelöst, wodurch pro-apoptotische Faktoren aus dem Inneren der Mitochondrien in das Zytosol gelangen (siehe Abbildung 2) [32] [33] [34] [35]. Die Freigabe der Faktoren ermöglicht wiederum eine Initiierung von Signalkaskaden, an deren Ende der Zelltod durch Apoptose erfolgt.

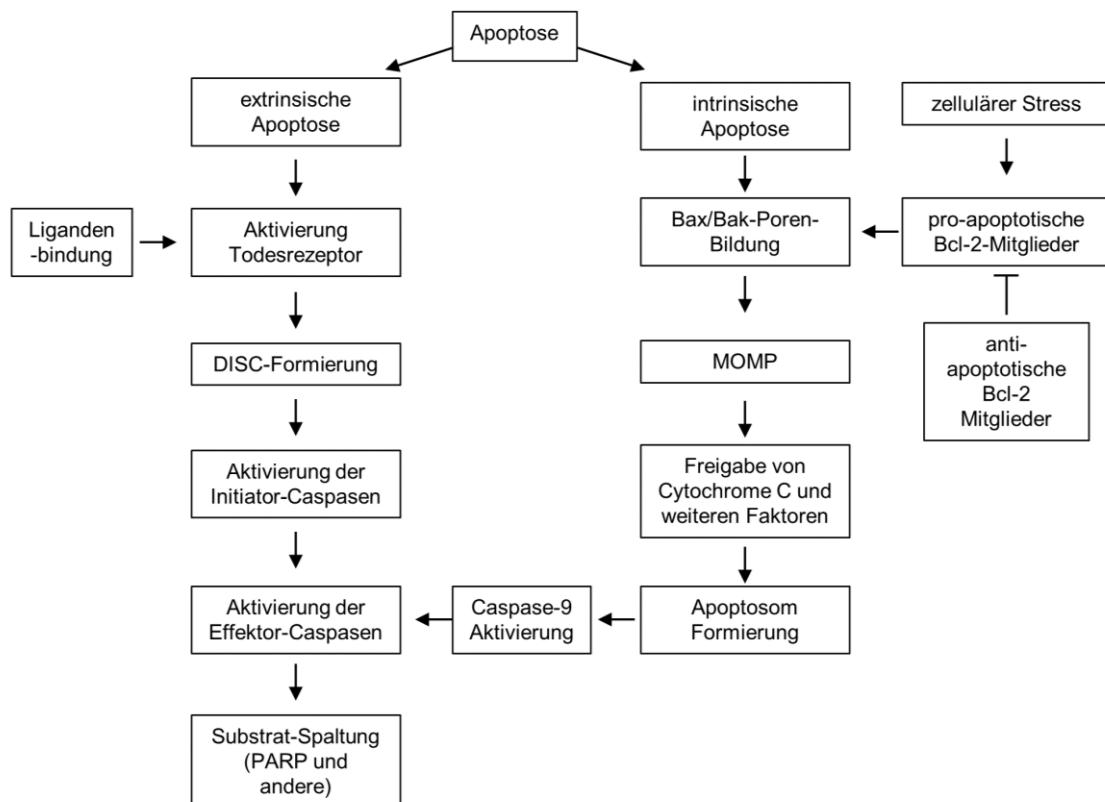


Abbildung 1 Unterteilung der Apoptose in extrinsisch und intrinsisch: In der extrinsischen Apoptose erfolgt die Komplex-Bildung nach Liganden-Bindung an den spezifischen Todesrezeptor und dessen Aktivierung. Anschließend erfolgt die molekulare Signalkaskade bis hin zum Zelltod durch Substratspaltung. Die intrinsische Apoptose wird unter anderem durch zellulären Stress ausgelöst. Dies führt zu Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, was wiederum pro-apoptotische Proteine wie z.B. Cytochrome C und SMAC freisetzt und eine Zelltod-Kaskade initiiert.

Wichtiger Bestandteil der intrinsischen Apoptose sind die Mitglieder der Bcl-2 (engl. *B-cell-lymphoma-2*) Protein-Familie, die eine BH (Bcl-2 Homologie) Domäne besitzen [36] [37] [38]. Insgesamt gibt es vier verschiedene BH Domänen [36] [37] [38]. Zusätzlich lässt sich die Proteinfamilie in drei Untergruppen aufteilen: pro-apoptotische Effektor-Proteine, anti-apoptotische Proteine (auch Apoptose-inhibitorische Proteine genannt) und pro-apoptotische

bzw. Initiator- *BH3-only* Proteine. Anti-apoptotische Proteine weisen alle vier verschiedenen BH Domänen auf. Effektor-Proteine besitzen keine BH4 Domäne, eine weitere Gruppe ist die *BH3-only* Proteingruppe, die nur eine BH3 Domäne besitzen [39].

Zur Gruppe der Apoptose-inhibitorischen Proteine gehören unter anderem Mcl-1 (engl. *myeloid cell leukemia 1*), Bcl-2, Bcl-w (engl. *Bcl-2-like protein w*) und Bcl-xL (engl. *B cell lymphoma-extra large*) [40] [41] [42] [43]. Die BH-Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4 formen gemeinsam eine hydrophobe BH-Tasche. In diese Tasche kann die BH3-Domänen der pro-apoptotischen Proteine gebunden werden, wodurch die gebundenen Proteine inhibiert werden [37].

Die zweite Gruppe der Bcl-2 Protein-Familie, ist die Gruppe der pro-apoptotischen Effektor-Proteine. Zu dieser Gruppe gehören Bax (engl. *Bcl-2 associated x protein*), Bak (engl. *Bcl-2 antagonist killer*) und Bok (engl. *Bcl-2 related ovarian killer*). Durch die Aktivierung der intrinsischen Kaskade werden aus den freien Protein-Monomeren Homo-Oligomere gebildet, wobei die Oligomere proteinspezifisch sind: Bax formiert nur Bax-Oligomere und Bak nur Bak-Oligomere [44] [45] [46] [47]. Diese Komplex-Bildung ermöglicht eine anschließende mitochondriale Porenbildung.

Die dritte Bcl-2 Familien-Gruppe ist die pro-apoptotische oder Initiator- *BH3-only* Gruppe, zu der unter anderem Bim (engl. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*), Bid (engl. *Bcl-2 interacting domain death agonist*), Bad (engl. *Bcl-2 antagonist of cell death*), Puma (engl. *p53-upregulated modulator of apoptosis*) und Noxa gehören [48] [49] [50] [51] [52]. Diese Proteine besitzen als homologische Gemeinsamkeit die α -helikale BH3 Region [49] [53] [54]. Über diese Domäne erfolgt die Interaktion mit weiteren Mitgliedern der Bcl-2 Familie. Sie können sowohl mit pro-apoptotischen, als auch mit anti-apoptotischen Proteinen interagieren.

Durch pro-apoptotische Stimulationen kann es zu Veränderungen der Expression von Bax und Bak kommen. Diese Veränderungen ermöglichen die Bindung der Proteine an die MOM [55] [56]. Daraus folgt die Oligomerisierung weiterer Proteine, die zu MOMP führen. Die Permeabilisierung der Membran erfolgt durch die Integration und Konformationsänderung der aktivierten Bax/ Bak-Proteine [57]. Durch das Anheften der Proteine können hydrophobe Kompartimente innerhalb der Lipiddoppelschicht zu einer Erhöhung der Membranspannung führen und so eine Krümmung ermöglichen. Dies führt zur Permeabilisierung der Membran [57]. Eine weitere Theorie geht von der direkten Bildung von Poren aus, bei der die Proteine den Rand der Poren bilden [58].

Die Induzierung von MOMP führt zu der Freisetzung verschiedener Proteine aus dem Inneren der Mitochondrien in das Zytosol. Unter anderem werden zelltodfördernde Proteine wie zum Beispiel Cytochrom C oder SMAC (engl. *second mitochondria derived activator of caspases*), freigesetzt. Cytochrom C kann innerhalb des Zytosols an Apaf-1 (engl. *Apoptotic Protease-activating Factor-1*) binden und so das Apoptosom bilden [59] [60]. Das Apoptosom besteht zusätzlich noch aus mehreren Procaspase-9 (Caspase: engl. *Cysteine-specific aspartate protease* Proteinen, die Bindung erfolgt über die CARD (*caspase recruitment domain*)). Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen. An dem Komplex wird Procaspase-9 aktiviert, wodurch Caspase-9 selbst zu einer Aktivierung von Procaspase-3/7 fähig ist (siehe Abbildung 2) [59] [60]. Die Freisetzung von SMAC hingegen führt zu einer Inhibierung der XIAPs (engl. *x-linked inhibitors of Apoptosis*) [61]. Dadurch wird die Aktivität von Caspase-9 und der darauffolgenden Aktivierung von Effektor-Caspasen verstärkt (siehe Abbildung 2) [61].

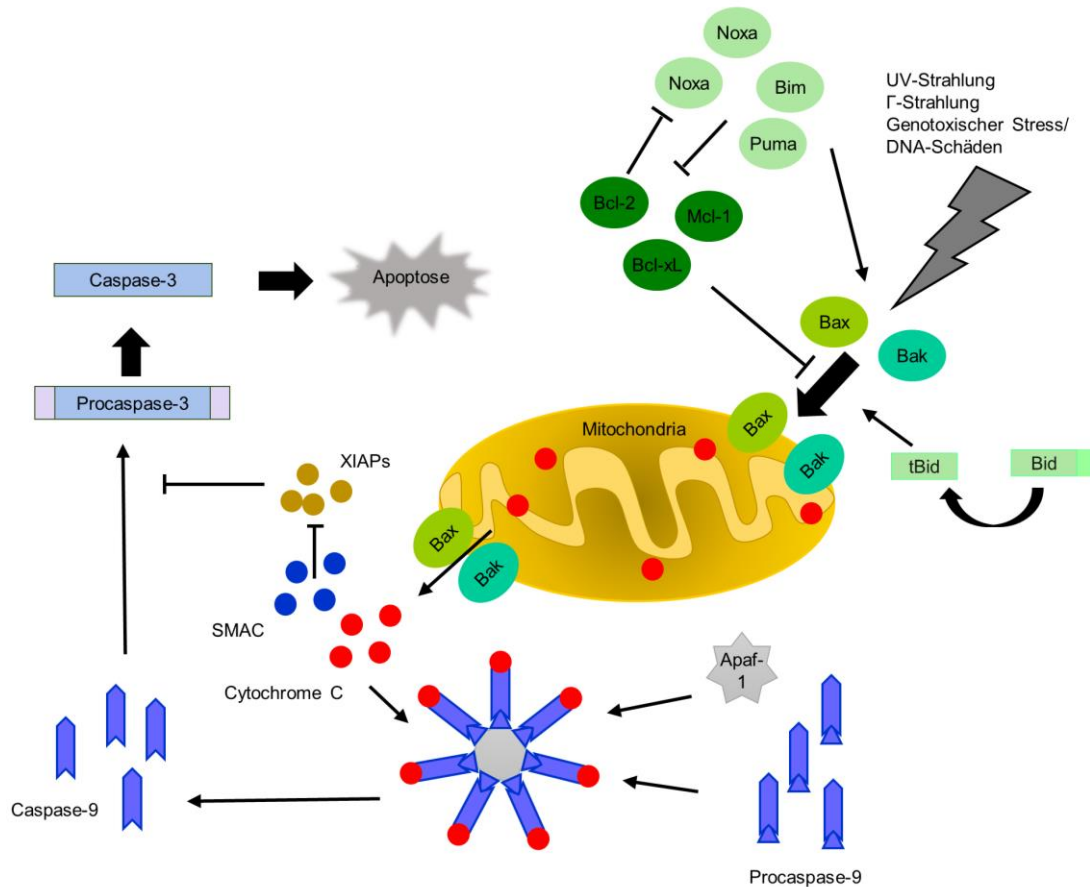


Abbildung 2 Allgemeiner Aufbau der intrinsischen Apoptose: UV-Strahlung, genotoxischen Stress beispielsweise. Therapeutika oder Gamma-Strahlung induzieren die intrinsische Apoptose. Anti-apoptotische Proteine werden durch pro-apoptotische Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder inhibiert, wodurch Bax und Bak nicht mehr gehemmt werden. Dadurch können diese aktiviert und oligomerisiert werden und an die Mitochondrien binden. Dort formieren sie Poren und ermöglichen einen Cytochrom C sowie SMAC Austritt. Der Cytochrom C Austritt ermöglicht die Bildung des Apoptosoms mit Apaf-1 und Procaspase-9, wodurch Caspase-3 aktiviert wird und zum Zelltod führt. Neben dem Cytochrom C-Austritt kommt es auch zu der Freisetzung von SMAC. Dieses Protein inhibiert XIAPs (*x-linked IAP*), welches ansonsten Caspasen-9 und -3 inhibieren würde.

Der intrinsischen Apoptose gegenüber steht die extrinsische Apoptose, welche durch eine Stimulation extrazellulärer Rezeptoren initiiert wird, auch DR (engl. *death receptor/ dt. Todesrezeptor*) genannt. Die Familie der DR besteht bis jetzt aus acht charakterisierten Mitgliedern: TNF-R1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1), CD95 (engl. *Cluster of differentiation 95*) auch FAS (engl. *FS-7-associated surface antigen*) bzw. APO-1 (engl. *apoptosis antigen 1*) genannt, DR3, TRAIL-R1/ DR4 (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1*), TRAIL-R2/ DR5, DR6, EDAR (engl. *ectodysplasin A receptor*) und NGFR (engl. *nerve growth factor receptor*) [62] [63] [64] [65] [66].

Die Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Bereich an den der DL (engl. *Death ligand/ dt. Todesligand*) anbinden kann. Dieser Bereich besitzt je nach Rezeptor eine unterschiedliche Anzahl an CRD (engl. *cysteine rich domains*). Beispielsweise besitzt der CD95 3 CRDs, der TNFR besitzt 4 CRD. Die CRD bilden die Liganden-Interaktionsstellen indem die entsprechenden Domänen des Liganden an die Interaktionsdomäne des Rezeptors binden [67].

Neben dem extrazellulären Bereich besitzt der Rezeptor einen intrazellulären/ cytoplasmatischen Bereich, sowie eine Transmembrandomäne. Die Transmembrandomäne verbindet den extrazellulären Bereich mit dem zytosolischen Bereich. Neben der Ligandenbindung an den Rezeptor ist die Transmembrandomäne ein wichtiger Bestandteil der

Signalübermittlung in den intrazellulären Bereich [68]. Die Zusammensetzung der Transmembran besitzt einen essentiellen Einfluss auf die Signalweiterleitung. Je nach Zusammensetzung können Signale teilweise oder vollständig in den intrazellulären Bereich übermittelt werden. Durch eine fehlerhafte Struktur der Transmembrandomäne kann es zu einer Reduzierung bis hin zu einer kompletten Unterbindung des Signals kommen [69]. Der intrazelluläre Bereich weist ein etwa 80 AS (Aminosäuren) langes Motiv auf, die sogenannten DD (engl. *death domain*/ dt. Todesdomäne). Diese DD sind essentiell für spätere homologe Interaktionen. [3] [70] [71].

Die DD ist Mitglied der DD-Superfamilie, die aus den Unterfamilien der DD, der DED (engl. *death effector domain*) -Familie, der CARD-Familie und der PYD (Pyrindomäne)-Familie besteht (zusammengefasst in [72] [73]). Das verbindende Element aller Superfamilien-Mitglieder ist eine Bündelstruktur aus sechs α -Helices, die jeweilige Funktion der Domänen sind dabei sehr vielfältig [74] [75] [76] [77]. Im Folgenden wird besonders auf die für diese Arbeit wichtigen DEDs und DDs eingegangen.

Die DED ist eine Domäne, bestehend aus etwa 60-80 AS und dient dazu, makromolekulare Komplexe bilden zu können, die eine wichtige Rolle in der Induzierung des Zelltodes besitzen können [78] [79]. Die DED besitzt große Ähnlichkeiten mit der hexahelikalen Gruppierung von DD und CARD [75]. Das wichtigste Strukturmerkmal der DED ist ihre markante Grundstruktur aus sechs α -Helices die antiparallel sind [75]. Die α -Helices sind durch kurze Schleifen verbunden, die aus unregelmäßigen Strukturen bestehen. Nur zwischen den Helices α_4 und α_5 ist eine β -Schleife vorhanden [75].

Die DL-Bindung führt zu einer Trimerisierung der Rezeptor-Monomere. Es wird eine Konformationsänderung innerhalb des intrazellulären Bereichs der Rezeptoren ermöglicht, wodurch die DD zugänglich wird. Das Adapterprotein FADD (engl. *fas associated death domain*) kann dadurch an den intrazellulären Rezeptorbereich binden [80] [81]. Eine weitere Proteinbindung erfolgt durch die Rekrutierung von Procaspase-8a/b, -10a/d oder den verschiedenen Isoformen von c-FLIP (engl. *cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*), L (*Long/ c-FLIP_L*), S (*Short/ c-FLIP_S*) oder R (*Raji/ c-FLIP_R*) an die DED von FADD [82] [83] [84]. Der Komplex, bestehend aus den genannten Proteinen, wird DISC (engl. *death-inducing signaling complex*/ dt. Todesinduzierender Signal-Komplex) genannt [82] [85] [86] (siehe Abbildung 3). Durch die Bildung des DISC kann Procaspase-8 oligomerisieren, indem die DED-Domäne zusammen assoziieren und DED-Filamente formen [87] [88] [89]. Die genauen Details werden auf den folgenden Seiten erklärt.

Die DED-Filamentbildung ermöglicht eine Konformationsänderung des Aktivitätszentrums von Caspase-8 und resultiert in der Aktivierung des Proteins (siehe Abbildung 3). Anschließend werden die aktivierten Caspase-8 Proteine stabilisiert, indem sie Heterotetramere bilden und somit die Effektor-Caspase-Kaskade initiieren (siehe Abbildungen 1 und 3) [87] [89] [90] [91]. Am Ende der Caspase-Kaskade erfolgt die Spaltung verschiedener zellulärer Enzyme, z.B. PKC (engl. *protein kinase C*/ dt. Protein Kinase C), Gelsolin, Fodrin oder PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1) durch Effektoren [87] [90] [91].

1.2.1 Caspasen

Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein Proteasen, Initiator- und Effektor-Moleküle sowie Teil der apoptotischen Signalwege [97]. Sie gehören zu den Zymogenen. Ihre inaktive Enzymvorstufe wird Procaspase genannt. Sie benötigen einen externen Eintrag, um biochemisch verändert zu werden. Dies ermöglicht die Aktivierung, Spaltung und Stabilisierung der Caspasen. Neben einer N-terminalen Prodomäne bestehen Caspasen aus einer 20 kDa großen katalytische Domäne (p20), sowie einer kleineren 10 kDa katalytische Domäne (p10) [98] [99]. Aus den Untereinheiten p20 und p10 entstehen darauffolgend Heterotetramere, die für die Weiterleitung der Signalkaskaden dienen [100].

Nach ihrer Funktion werden Caspasen in drei Hauptgruppen unterteilt (siehe Abbildung 4): Inflammatorische Initiator-Caspasen (Gruppe I) besitzen eine große Prodomäne, Apoptose Initiator-Caspasen (Gruppe II) besitzen ebenfalls eine große Prodomäne und initiieren vorwiegend die Apoptose-Signalkaskade und Effektor-Caspasen (Gruppe III) weisen eine kurze, 20-30 AS lange Prodomäne auf (siehe Abbildung 4).

Mitglieder der Gruppe I Caspasen sind Caspase-1, -4 und -5. Diese Inflammatorischen Initiator-Caspasen sind an der Initiierung und Signalkaskade von Pyroptose involviert [101]. Darüber hinaus ist Caspase-1 an Entzündungsprozessen beteiligt, beispielsweise an der Spaltung der Interleukinzytokine IL-1 β (Interleukin-1 beta) und IL-18 (Interleukin-18) durch Teilnahme an der Inflammosom-Komplex-Bildung [101]. Weitere Komponenten sind die Caspasen-4 und -5, deren Beteiligung jedoch erst später entdeckt wurde [102]. Prodomänen der Inflammatorischen Initiator-Caspasen enthalten ausschließlich CARD Domänen und sind Mitglieder der DD-Superfamilie [79] [103].

Zu der Caspase-Gruppe II gehören Caspase-8, -10, -9 sowie -2. Während Caspase-8 und -10 DEDs besitzen, weisen Caspase-9 und -2 CARDs auf. Die DEDs dienen zur Bindung und Formierung des DISC. Dort werden Procaspase-8 und -10 aktiviert. Die Aktivierung von Caspase-8 ermöglicht anschließend die Aktivierung von Effektor-Caspasen. Die inaktiven Zymogene Procaspase-3/7 können beispielsweise durch Caspase-8 gespalten und somit aktiviert werden [104] [105] [106]. Weitere Apoptose Initiator-Caspasen sind Caspase-9 und Caspase-2. Caspase-9 ist ebenfalls Bestandteil des Apoptose-Signalweges, jedoch bei der intrinsischen Apoptose und dient zur Aktivierung von Caspase-3 (siehe Kapitel 1.2) [59] [60]. [87] [91].

Dem gegenüber steht Caspase-2, das zusammen mit den Proteinen PIDD1 (engl. *p53-induced death domain protein1*) und RAIDD (engl. *receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH-1/ CED-3 homologous protein with a death domain/* auch CRADD genannt) an der Bildung des PIDDosomes beteiligt ist und dadurch aktiviert wird [107]. Neben der Aktivität bezüglich des PIDDosomes besitzt Caspase-2 weitere Funktionen. Caspase-2 induziert z.B. eine Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen aus den Mitochondrien [108].

Zu Gruppe III gehören die Caspasen-3, -6 und -7. Die Effekte der Caspasen-3 und -7 wurden bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.2). Caspase-6 kann dabei in den Nukleus translozieren und führt dort zur Spaltung von Nukleus-Struktur-Proteinen wie NUMA1 (engl. *Nuclear mitotic apparatus protein 1*) oder LMNA (Lamin A). Dies führt nach der eigenen Aktivierung zu einer anschließenden Nukleus-Fragmentierung [109] [110] [111].

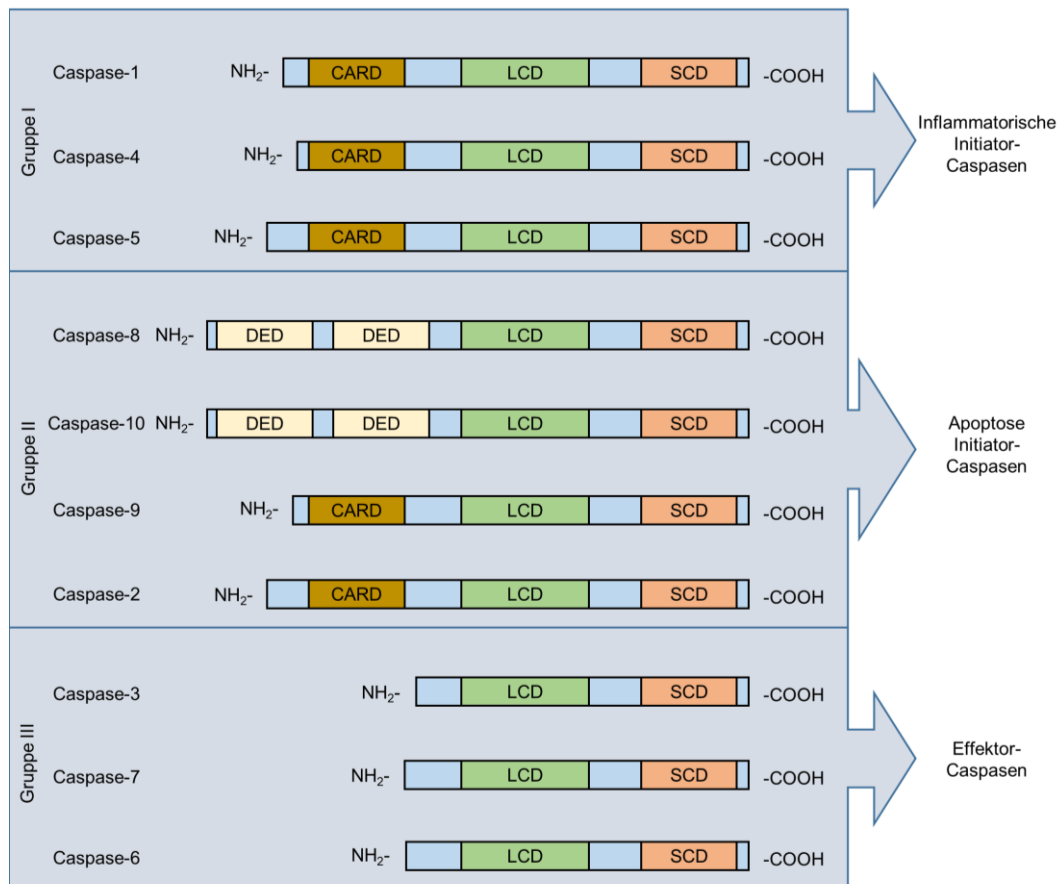


Abbildung 4 Einteilung der verschiedenen Caspasen: Einteilung der Caspasen in Inflammatorische Initiator-Caspasen (Gruppe I), Apoptose Initiator-Caspasen (Gruppe II) und Effektor-Caspasen (Gruppe III). Alle Caspasen besitzen LCD (*Large catalytic domain*/ große katalytische Domäne) und SCD (*Small catalytic domain*/ kleine katalytische Domäne). Zusätzlich verfügen Inflammatorische Caspasen über CARD (*caspase-recruitment domain*/ Todeseffektordomäne), die ebenfalls in zwei Initiator-Caspasen vorhanden sind. Nur Caspase-8 und -10 (Initiator-Caspasen) besitzen zwei DED (*death effector domain*/ Todeseffektordomäne). Abbildung modifiziert nach [87].

1.2.2 Caspase-8

1.2.2.1 Aufbau von Procaspase-8 und Caspase-8

Caspase-8 ist ein essentieller Teil des Todessignalweges, der durch Rezeptor-Aktivierung initiiert werden kann [112]. Bis heute sind acht verschiedene humane Isoformen von Procaspase-8 bekannt, die jeweils unterschiedliche molekulare Massen besitzen [112] [113] [114] [115] [116]. Jedoch sind nur Procaspase-8a/b an der Formierung des DISC beteiligt [112] [117]. Diese Isoformen von Procaspase-8 besitzen eine molekulare Masse von 55 kDa bzw. 53 kDa [116] [117]. Unterschieden werden die Isoformen nur durch eine kurze Aminosäuresequenz, die zwischen den DED2 und der p18 Domäne vorhanden ist. Die Procaspase-8a ist etwa 2 kDa schwerer als Procaspase-8b, ansonsten gibt es keine weiteren strukturellen Unterschiede [118].

Wie alle Caspasen besitzt auch Caspase-8 lange und kurze katalytische Domänen. Die größere Protease-Domäne beinhaltet die katalytische Stelle (p18). Zusätzlich gibt es noch die vergleichsweise kürzere Domäne (p10) [117].

Die N-terminale Prodomäne umfasst zusätzlich zwei DEDs, auch Tandem DEDs genannt (siehe Abbildung 5) [119]. Über DED1 erfolgt die Bindung von Caspase-8 an FADD und darüber die Bildung des DISC. Eine wichtige Spaltstelle von Caspase-8 liegt oberhalb von D210 und kann somit eine Abspaltung der Tandem-DED ermöglichen [120].

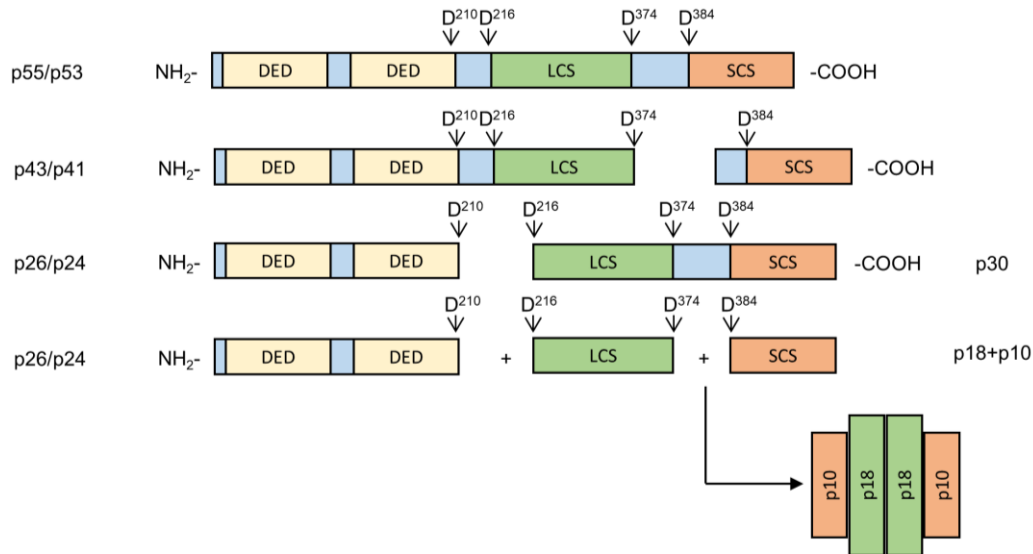


Abbildung 5 Spaltprodukte von Caspase-8: Procaspase-8 kann in mehrere Untereinheiten mit unterschiedlichen Längen gespalten werden (p43/ p41; p26/ p24; p30). Caspase-8 besitzt LCS (*Large catalytic subunit*) und SCS (*Small catalytic subunit*). Die Spaltungen erfolgen zwischen der großen katalytischen Untereinheit, der kleineren katalytischen Untereinheit sowie am Ende der Prodomäne bei D210, welche aus zwei Todeseffektordomänen besteht (DED).
Abbildung modifiziert nach [87].

Nur zwei Isoformen von Procaspase-8 (-8a/ p55; -8b/ p53) werden an den DISC rekrutiert und dadurch aktiviert [112] [117]. Durch die Dimerisierung der Procaspase-8 Monomere werden die Procaspase-8 Proteine aktiviert und gespalten [121] [122]. Dabei können die Spaltprodukte p43/ p41 und p26/ p24 durch Spaltung entstehen sowie p30, p18 und p10 (siehe Abbildung 5) [119]. Die genaue Aktivierung von Caspase-8 wird in Kapitel 1.2.2.2. beschrieben.

Beispielsweise erfolgt die erste Spaltung an D³⁷⁴ (Asparaginsäure) und erzeugt die Spaltzwischenprodukte p43/ p41 und p12. Anschließend wird p12 direkt durch eine Spaltung an AS 384 in p10 umgewandelt. Danach erfolgt die zweite Spaltung, diese ist an Asparagin²¹⁶ und ermöglicht die Freilegung der aktiven Enzymuntereinheit p18. Gleichzeitig entsteht die inaktive Prodomäne p26/ p24 [123] [100]. Anschließend erfolgt die Formierung von Heterotetrameren aus jeweils zwei p18 und p10 Untereinheiten [100]. Bei der Bildung des DISC wurde neben Procaspase-8 ebenfalls Procaspase-10 in verschiedenen Isoformen (-10a, -10b, -10c) detektiert [124].

1.2.2.2 Aktivierung von Caspase-8 in DED-Filamenten

Nur durch die DED kann es zu einer Bindung von Folgeproteinen an FADD kommen. Dies geschieht über Wechselwirkungen der DEDs von Procaspase-8/ 10 und FADD [117] [114] [125]. Diese Wechselwirkungen werden auch Typ-I, -II und -III Wechselwirkungen genannt [120]. Unterschieden wird zwischen Ketten- und Filamentbildung der DEDs. Dabei entspricht das Modell der DED-Kettenbildung einer linearen Struktur, bei der ein Protein mit dem nächsten durch sequenzielle DED-Interaktion verbunden ist. Somit werden Ketten von Proteinen gebildet [87] [88]. Eine Modifikation des Kettenmodells ist das Filamentmodell. Bei dem Filamentmodell wird mit Hilfe von Wechselwirkungen eine Struktur in drei Richtungen gebildet [120]. Dabei bestehen die Filamente nicht aus reinen Caspasen, sondern sind mit c-FLIP durchsetzt (siehe Kapitel 1.2.2.3) [126]. Die Filamentordnung basiert auf der Wechselwirkung von Ia/ Ib-, IIa/ IIb und IIIa/ IIIb-Grenzflächen [120]. Typ-I Wechselwirkung ist die Interaktion zwischen zwei Proteinen durch das kanonische FL-Motiv [88]. Die DED2 (Typ Ib) einer Caspase-8 interagiert mit dem DED1 (Typ Ia) -Taschenbereich einer benachbarten

Caspase-8 bzw. DED1 (Typ Ib) mit DED2 (Typ Ia) [120]. Diese Interaktion ermöglicht einen einzelnen Strang (Interstrang). Allerdings gibt es ebenfalls Typ-II und Typ-III Wechselwirkungen. Sowohl Typ-II als auch Typ-III Wechselwirkungen finden dabei mit dem Interstrang statt. Es sind vier verschiedene Wechselwirkungen möglich: DED1:DED1, DED1:DED2, DED2:DED1, DED2:DED2. Innerhalb von Dreifachsträngen kommen die Typ-II Wechselwirkungen nur homotypisch vor: DED1:DED1 und DED2:DED2. Gleichzeitig sind Typ-III Wechselwirkungen heterotypisch, demnach DED1:DED2 und DED2:DED1. Die Wechselwirkungen in benachbarten Dreifachsträngen wirken dagegen konträr, sodass Typ-II Wechselwirkungen heterotypisch und Typ-III Wechselwirkungen homotypisch sind [120] [126]. Insgesamt ermöglichen die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den DEDs eine Formation von Filamenten, die als Plattform für die Aktivierung von Caspase-8 dienen [120] [126] [127].

Als Initiierungsschritt erfolgt eine Procaspase-8-Bindung über eine Tasche innerhalb seines eigenen DED1s mit der exponierten FADD-DED [120]. DED1 ist die Domäne, die näher zum N-Terminus liegt, während sich DED2 näher an der p18-Domäne befindet [120]. Anschließend können weitere Procaspase-8-Proteine rekrutiert werden, indem an eine zweite Procaspase-8 DED1-Tasche ein weiteres DED2-Motiv durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet [87] [120]. So können die bereits beschriebenen DED-Filamente geformt werden, zu denen mehrere Procaspase-8-Moleküle gehören und die eine dreifache Helix-Struktur annehmen [87] [88] [89] [120] [126] [127]. Die DED ist somit ein Schlüsselfragment zur Aktivierung von Caspase-8 sowie der daraus resultierenden Caspase-Kaskade.

1.2.2.3 Das Protein c-FLIP als Caspase-8 Antagonist

C-FLIP Proteine gehören zu den Hauptinhibitoren der Procaspase-8-Aktivierung und binden mit Hilfe der eigenen DED-Motive an dem DISC und den DED-Filamenten [87] [88] (zusammengefasst in [128]). Wie bereits erwähnt, unterscheidet man c-FLIP in drei unterschiedliche Isoformen: c-FLIP_L, c-FLIP_S oder c-FLIP_R. Jede dieser drei Isoformen besitzt die charakteristischen DEDs an dem jeweiligen N-Terminus. Aufgrund seiner Isoformen sowie in Abhängigkeit der Konzentration kann c-FLIP das von Caspase-8 ausgehende Apoptose-Signal blockieren [126]. Zusätzlich können kürzere Isoformen von c-FLIP in die formierenden DED-Ketten eingebaut werden [129]. Diese kürzeren c-FLIP Proteine können nicht die Procaspase-8-Filamentbildung hemmen, sondern führen ihrerseits zu einer Filament- bzw. Ketten-Bildung [129]. In jüngsten Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass kurze Isoformen von c-FLIP die Filamente verändern können, wodurch die Bildung unterbunden wird [130]. Einen bedeutenderen Einfluss hat die Zusammensetzung der DED-Filamente. Ein höherer Anteil von kurzen c-FLIP reduziert den CD95L induzierten Zelltod, indem mehr inaktive Heterodimere gebildet werden [120] [129]. C-FLIP_L kann jedoch pro-apoptotisch wirken, falls ein niedriges Expressionsniveau vorliegt [89] [126] [131] [132]. Anti-apoptotische Effekte durch c-FLIP_L wirken bei einem höheren Expressionsniveau [126] [132].

Je nach Level von c-FLIP sowie dessen Isoformen kommt es zu unterschiedlichen Anteilen der Proteine in den Filamenten. In HeLa CD95 überexprimierenden Zellen beispielsweise, ist das Verhältnis von Caspase-8 zu c-FLIP zu FADD 4:1:1, es befinden sich also viermal mehr Caspase-8 Proteine innerhalb der Filamente als die jeweils anderen Proteine. Eine Überexpression von c-FLIP_L senkt das Verhältnis der Proteine auf 1:1:1. Somit gibt es genauso viele c-FLIP Proteine in den Filamenten wie Caspase-8 oder FADD. Eine Überexpression von c-FLIP_S resultiert in einem Verhältnis von 1:2:1, wobei zweimal mehr c-FLIP in den Filamenten

vorhanden ist, verglichen mit Caspase-8 oder FADD [126]. Die Veränderung der Verhältnisse kann zu einer Reduzierung der Länge der Filamente führen [126].

1.2.2.4 Caspase-8 vermittelte nicht-apoptotische Signalwege

Caspase-8 besitzt ein breites Spektrum an Funktionen und Wirkungsbereichen (siehe Abbildung 6). Neben der wichtigen Funktion von Caspase-8 in Zelltodsignalen (siehe Kapitel 1.2), übernimmt das Protein auch in weiteren Zellprozessen Funktionen. So besitzt Caspase-8 einen Einfluss auf den p53 (Protein 53)-abhängigen G2/ M-Kontrollpunkt des Zellzyklus [133] [134]. Caspase-8 ist innerhalb des Zyklus nicht nur im Zytosol lokalisiert, sondern interagiert ebenfalls im Nukleus [133] [134] [135]. Neben der Caspase-8 Beteiligung an der Liganden-induzierten Apoptose, kann Caspase-8 auch an der NF-KB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) -abhängigen Entzündungsreaktionen beteiligt werden [87]. Unter anderem ist Caspase-8 Teil des sogenannten „FADDosomes“, welches außerdem aus FADD, RIPK1 (engl. *Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 1*), TAK1 (engl. *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*), TAB1 (*TGF-beta activated kinase 1*), TAB2/3 (engl. *TGF-beta –activated kinase 1 and MAP3k7-binding protein 2/3*) und dem IKK (engl. *Inhibitor of nuclear factor KB (IKB) kinase*) -Komplex besteht. Mit Hilfe dieses Komplexes kann IKB α aktiviert werden und anschließend können mit Hilfe von NF-KB inflammatorische Gene exprimiert werden [136].

In den vorherigen Kapiteln wurde die bedeutende Rolle von Caspase-8 innerhalb der Apoptose genauer beschrieben. Ein weiterer Zelltod, an dem Caspase-8 beteiligt ist, ist die Nekroptose (siehe Abbildung 6). Die Nekroptose ist ein RIPK3 (engl. *Receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 3*) –abhängiger Zelltod, der ebenfalls über einen TNF-Rezeptor initiiert werden kann. Nach der TNFR1 Aktivierung durch Ligandenbindung kommt es zu einer Signalweiterleitung und der daraus resultierenden Nekrosom-Formierung [137] [138]. Die Komplexbildung mit RIPK1 und RIPK3 ermöglicht unter der Phosphorylierung von RIPK3 die Oligomerisierung mit dem Protein MLKL (engl. *Mixed lineage kinase domain-like protein*). MLKL kann dadurch stabilisiert und in die Plasmamembran eingebaut werden. Dies führt zu einer Porenbildung und Ruptur der Zellmembran [138] [139] [140]. Sollte es jedoch zu einer Bindung von Procaspase-8 an den Komplex kommen, so führt dies zu einer Spaltung von RIPK1 und RIPK3 [141] [142]. Somit wird die Nekroptose durch Caspase-8 gehemmt, sollte Caspase-8 seinerseits nicht inhibiert werden.

Ein weiterer Zelltod, auf den Caspase-8 Einfluss nimmt, ist die Pyroptose (siehe Abbildung 6). Die Pyroptose ist ein Zelltod, der vor allem bei Entzündungsreaktionen durch virale oder bakterielle Infektionen auftritt und an dessen Endprozess ebenfalls eine Art Aufplatzen der Zellen durch Porenbildung steht [143] [144]. Auch bei diesem Zelltod spielen Caspasen eine wichtige Rolle für die Signalweiterleitung beispielsweise nach einer Detektion von intrazellulärem LPS (Lipopolysaccharide) [145] [146]. Ein Hauptakteur der Pyroptose ist GSDMD (Gasdermin D). Dieses Protein ermöglicht durch Oligomerisierung eine Porenformation der Zellmembran [147] [148]. Aktives Caspase-8 kann GSDMD in TAK1-defizienten Zellen spalten. Die Spaltung kann ebenfalls erfolgen, wenn TAK1 aktiv durch Pathogene blockiert wird [149] [150]. Durch diese TAK1-Reduzierung kann GSDMD selber oligomerisieren und anschließend Zellmembran-Poren bilden (zusammengefasst in [151] [152]).

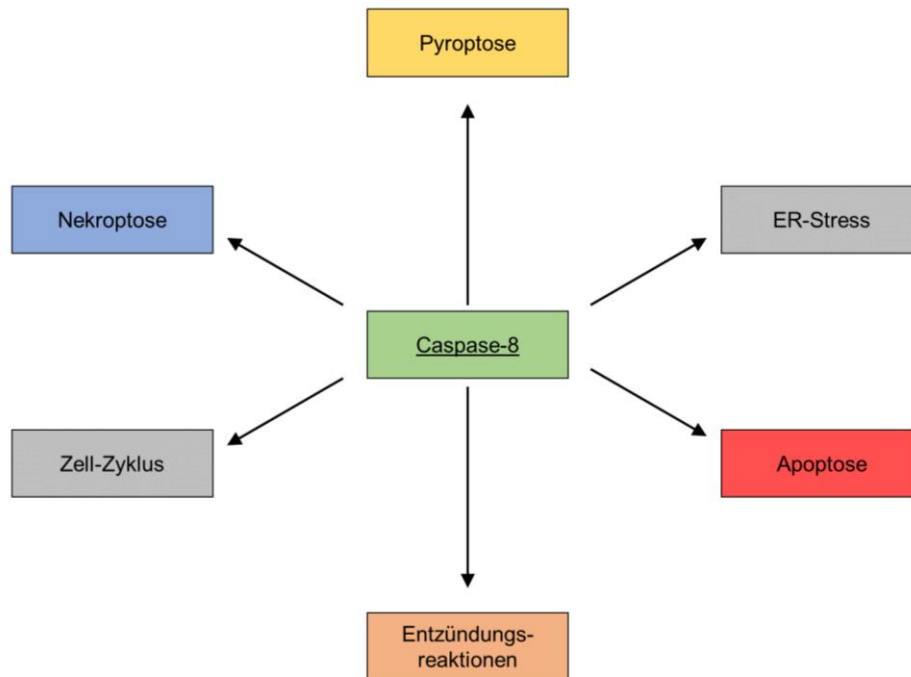


Abbildung 6 Beteiligung von Caspase-8 an den genannten Zellprozessen: Zellprozesse, an denen Caspase-8 direkt beteiligt ist.

Darüber hinaus ist Caspase-8 ebenfalls an dem induzierten Zelltod infolge von Stress des ER (Endoplasmatischen Retikulums) beteiligt [153]. Dauerhafter Stress des ER führt zur Erhöhung der Autophagie-Signalwege, an denen das Protein p62 (auch SQSTM1 genannt/ engl. *Sequestosome-1*) beteiligt ist. Der Anstieg dieses Proteins in der Zelle ermöglicht eine Stabilisierung von Caspase-8 durch Interaktion miteinander [153]. Zuvor wird die Caspase-8 Ubiquitylierung von TRIM13 (engl. *Tripartite motif 13*) reguliert bzw. durch den Cullin3 E3-Ligasen-Komplex initiiert [153].

Neben den beschriebenen Beteiligungen an verschiedenen Zelltod-Signalwegen, besitzt Caspase-8 Einfluss auf Entzündungsreaktionen [154]. Unter anderem spaltet Caspase-8 den Cytokine-Suppressor N4BP1 (engl. *NEDD4-binding protein1*), wodurch die Cytokin-Produktion gesteigert wird [154]. Des Weiteren kann es einen indirekten Einfluss von Caspase-8 auf das NLRP3 (engl. *NOD-like receptor protein3*) -Inflammasom durch die intrinsische Apoptose geben [155]. Auch die Caspase-8-induzierte Pyroptose kann einen Einfluss auf inflammatorische Reaktionen und die Cytokin-Ausschüttung haben [149] [150]. Eine verstärkte und übermäßige Cytokin-Ausschüttung kann zu diversen Erkrankungen führen [156]. Somit besitzt auch Caspase-8 einen vielfältigen Einfluss auf diverse Erkrankungen.

1.2.2.5 Mutationen in Caspase-8

Caspase-8 ist ein Protein mit multifunktionellen und essentiellen Eigenschaften innerhalb der Zelltodsignalwege. Wie in allen Proteinen kommen auch in Caspase-8 Mutationen vor. In seltenen Fällen von Immunschwächeerkrankungen wurden Mutationen von Caspase-8 detektiert [157] [158] [159]. Außerdem finden sich Punktmutationen von Caspase-8 in ALPS (engl. *Autoimmune lymphoproliferative syndrome*) -Erkrankungen wieder (siehe Tabelle 1). Defektes Caspase-8 führt zu einer Reduzierung der Apoptose-Effektormechanismen sowie einer Beeinträchtigung der Aktivierung von T-, B- und NK-Zellen [157].

In Krebserkrankungen können verschiedene Mutationen detektiert werden. So tritt in etwa 10% der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Tumore eine Mutation von Caspase-8 auf [160] [161]. Insgesamt konnte an 21 verschiedenen Punktmutationen innerhalb der Sequenz von Caspase-8 ein Zusammenhang zu Erkrankungen nachgewiesen werden [162] [163]. An weiteren 198 AS sind Punktmutationen, die unter Verdacht stehen ebenfalls an Erkrankungen beteiligt zu sein. Dies verdeutlicht, dass Caspase-8 potenziell an vielen Erkrankungen beteiligt sein kann, weshalb es ein potenzieller Therapieangriffspunkt ist.

Tabelle 1 Beispiel für vorherrschende Caspase-8-Punktmutationen in ALPS-Erkrankungen

Modifiziert nach [157] [158] [159] [164] [165].

Caspase-8 Stelle	Aminosäure	Mutation	Caspase-8 Stelle	Aminosäure	Mutation
32	Glutamin	Q>E	237	Leucin	L>V
40	Asparaginsäure	D>E	248	Arginin	R>W
53	Methionin	M>I	254	Leucin	L>R
201	Glutaminsäure	E>D	350	Glycin	G>E
219	Serin	S>T	368	Glycin	G>A
220	Glutamin	Q>R	389	Threonin	T>M
233	Arginin	R>Q; R>W	435	Arginin	R>*
234	Glycin	G>E	437	Asparaginsäure	D>V

Tabelle 2 Beispiele der vorherrschenden Caspase-8-Punktmutationen in Karzinom-Erkrankungen

Modifiziert nach [162] [163] [164] [165].

Caspase-8 Stelle	Aminosäure	Gewebe des Karzinoms	Positionsveränderung
209	Serin	Dickdarm, Eierstock, oberer Verdauungstrakt	S>L
233	Arginin	Brust, Gebärmutterhals, Endometrium, oberer Verdauungstrakt, Harnweg, Dickdarm, Lunge, Haut	R> Q R>W
379	Prolin	hämatopoetisches und lymphatisches Gewebe	P>T
432	Arginin	Endometrium, Magen-Darm-Trakt, hämatopoetisches und lymphatisches Gewebe, Dickdarm, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Haut	R>*
435	Arginin	Gebärmutterhals, Endometrium, Dickdarm, Lunge, Prostata, Magen, Mund, Kopfhals, Blase	R>*

1.3 Posttranslationale Modifikationen von Apoptose-Proteinen

PTM (Posttranslationale Modifikationen) sind Veränderungen und Modifikationen, die nach der Proteintranslation erfolgen. Neben Abspaltungen bestimmter Proteinbereiche und Bestandteile, sind vor allem die Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung, Sumoylierung, Acetylierung, Methylierung oder Ubiquitylierung besonders häufig. Protein-PTM ermöglichen eine Erhöhung der funktionalen Vielfalt des Proteoms, z.B. durch das Hinzufügen weiterer funktioneller Gruppen und/ oder Proteine, durch die proteolytische Abspaltung regulativer und überschüssiger Protein-Untereinheiten oder durch den Abbau ganzer Proteine.

Somit kann die Phosphorylierung zu einer Inhibierung des intrinsischen Apoptose-Signalweges führen. Die Bcl-2 inhibitorische Aktivität agiert solange, bis Bcl-2 phosphoryliert wird. Eine Bcl-2-Deaktivierung führt zu einer Unterbrechung der inhibitorischen Wirkung auf pro-apoptische Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder und ermöglicht dadurch eine Stärkung der Apoptose Signale (siehe Kapitel 1.2) [166].

PTM spielen auch bei der DISC-Formierung eine entscheidende Rolle. Innerhalb der DD von FADD befinden sich die Ubiquitylierungsstellen K149 und K153 [167]. Beide Stellen können daher Einfluss auf die DISC-Formierung nehmen [167]. Des Weiteren gibt es bei FADD Phosphorylierungsstellen die nicht innerhalb der DED oder DD vorhanden sind [168]. Als Phosphorylierungsstellen konnten S194, S200 und S203 von FADD identifiziert werden [169] [170] [171]. Die Phosphorylierungs-Kinasen Plk1 (engl. *Polo-like Kinase 1*) und CK1 α (engl. *Casein kinase 1 alpha*) agieren für die FADD-AS S191 und CK2 (*Casein kinase 2*) für S200 [170] [172]. Diese Phosphorylierungsstellen nehmen Einfluss auf Apoptose-unabhängige Funktionen von FADD [168]. Die dritte PTM von FADD ist die Sumoylierung, welche an der mitochondrialen Translokation beteiligt ist [173]. Auch das Protein c-FLIP ist phosphoryliert. An den AS T166, S193 und S273 konnten Phosphorylierungen erfasst werden [174]. Vor allem eine Phosphorylierung bei T166 dient für eine anschließende Ubiquitylierung bei K167. Damit ist diese PTM die Voraussetzung für den proteosomalen Abbau von c-FLIP und besitzt einen verstärkenden Effekt auf den Zelltod [174]. Einen schützenden Effekt vor einem proteosomalen Abbau von c-FLIP hat die Phosphorylierung von S193, die eine Ubiquitylierung blockiert [175].

1.3.1 PTM von Caspase-8

Neben dem Einfluss der DISC-Formierung und DED-Filamentbildung spielen PTM eine bedeutende Rolle innerhalb der Aktivierung von Caspase-8 (zusammengefasst in [176]). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die DEDs während der DED-Filamentbildung keinen PTM ausgesetzt sind [176] [177]. So sind beispielsweise verschiedene Caspasen phosphoryliert [177] [178] [179]. Procaspase-8 kann an den AS T273, S347, Y380 und Y448 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung Y380 steht unter Verdacht, an der Freisetzung von Caspase-8 von dem DISC in das Zytosol beteiligt zu sein und damit auch einen Einfluss auf die Apoptose zu haben [180]. Y380 findet sich innerhalb der Linkerschleife zwischen den Untereinheiten von p18 und p10 von Procaspase-8. Eine Phosphorylierung dieser Stelle kann die Spaltung von Procaspase-8 in p43/ p41 blockieren und somit auch die Abspaltung von p18 [180]. Insgesamt führt somit die Phosphorylierung von Procaspase-8 zu einem inhibitorischen Effekt auf die Todessignal-Kaskade, was mit mehreren Malignomen in Verbindung gebracht werden kann [180] [181] [182] [183]. Inhibitorische Effekte auf die Apoptose sind bei einer Phosphorylierung

von Y448 beobachtet worden, beide AS werden durch die Tyrosinkinase Lyn phosphoryliert [184]. Die Phosphorylierung S347 befindet sich in der p18-Untereinheit und führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Viabilität in Krebszellen, wird jedoch durch p38-MAPK reguliert [185]. Die weitere dokumentierte Phosphorylierungsstelle von Caspase-8 ist T263. Eine Phosphorylierung an dieser AS steht unter dem Verdacht, den proteosomalen Abbau von Caspase-8 einzuleiten [186]. Außerdem könnte diese Aminosäurestelle für eine Interaktion mit einem Protein der Src-Kinase-Familie dienen, welches ebenfalls hemmende Effekte hätte [184].

Besonders häufig werden DED1 und DED2 durch SUMO-1 (engl. *Small ubiquitin-related modifier 1*) modifiziert. Anschließend erfolgt eine Sumoylierung von K156 des DED2 [135]. Der Einfluss der Sumoylierung beläuft sich jedoch nur auf die nukleare Translokation, ein Einfluss auf die apoptotische Funktion von Caspase-8 konnte bisher nicht dokumentiert werden [135].

Neben den beschriebenen inhibitorischen und hemmenden Effekten auf den induzierten Zelltod durch Caspase-8-PTM, kann es auch zu stabilisierenden Effekten von Komplexen oder Enzymen mit Hilfe von Ubiquitynlierungen des Proteins kommen [180] [187]. Die Stabilisierung von Caspase-8 und der daraus folgenden Aktivitätssteigerung erfolgt mit Hilfe einer ersten Ubiquitynlierung der p10-Untereinheit an AS K461 durch Cullin3 [187]. Anschließend kann p62 binden, was zu einer Stabilisierung und Aggresome-Formierung führt. Durch Stress des ER kommt es zu einer Erhöhung der Caspase-8-Aktivität, wobei Caspase-8 durch TRIM13 ubiquityniliert wird [153]. Eine weitere Ubiquitynlierung von Caspase-8 kann an K63 vorkommen. Die Polyubiquitynlierung kann dort durch HECTD3 (*Homologous to the E6-AP carboxalTerminus3*) erfolgen, wodurch die Caspase-8-Aktivität gesenkt werden kann. Eine Überexpression von HECTD3 wurde in Mammakarzinomzellen detektiert [188]. Jedoch kann auch eine Caspase-8-Ubiquitynlierung einen hemmenden Effekt auf den induzierten Zelltod haben.

Als zusätzliche Caspase-8-PTM konnte eine Nitrosylierung festgestellt werden. Allerdings ist kaum etwas über diese PTM bekannt, abgesehen von einem hemmenden Effekt auf die Caspase-8-Aktivität und damit auf die DR-induzierte Apoptose [189]. Eine Nitrosylierung ist die Proteinmodifikation durch Bindung eines Stickstoffmonoxids [189]. Caspase-8 kann selber zu einer PTM führen. Dabei erfolgt die Modifikation vorallem durch die Spaltung zahlreicher Substrate wie z.B. c-FLIP, Caspase-3, BID oder RIPK1. Eines der wichtigsten Caspase-8 Substrate ist das Bcl-2-Proteinfamilienmitglied BID. BID kann durch aktiviertes Caspase-8 an den Stellen ⁵⁷LQTDG⁶¹ und ⁷²IEADS⁷⁶ in tBID gespalten werden. Diese Spaltung ist für die proapoptotische Aktivität von BID essentiell [190]. Darüber hinaus kann Caspase-8 RIPK1 spalten und dadurch Nekroptose unterbinden. D³²⁵ von murinem RIPK1 besitzt dabei eine entscheidende Bedeutung. Mutationen an dieser Stelle reduzierten die RIPK1 Spaltung durch Caspase-8 und erhöhten dadurch den Zelltod in den Versuchstieren [191]

Das nukleus-lokalisierte Caspase-8 ist an der Spaltung des DNA-Reparatur Proteins PARP2 (*Poly (ADP-ribose) polymerase 2*) innerhalb von apoptotischen Neuronen beteiligt. Dabei kann die PARP2-Spaltung an zwei potenziellen Spaltstellen (¹¹⁶LEDD¹¹⁹ und ¹⁸³LQMD¹⁸⁶) stattfinden. Diese Bereiche stimmen außerdem mit bevorzugten Spaltstellen von Caspase-8 überein. Die Spaltung von PARP2 durch Caspase-8 führt dabei zu der Inaktivierung [192] [193]. Neben einer Vielzahl an PTM für Caspase-8 gibt es ein paar, die bisher nicht in Verbindung mit Caspase-8 gesetzt werden konnten. Dies ist neben der Acetylierung die Methylierung, die beide nicht in direktem Zusammenhang stehen.

1.3.2 Methylierung

Bei einer Methylierung von Proteinen werden Methylgruppen (-CH₃) an Arginin oder Lysin Seitenketten des Proteins transferiert [194] [195]. Vor allem Arginin-Methylierungen sind an verschiedenen Protein-Prozessen innerhalb der Zellen beteiligt. Die Arginin-Methylierung gehört dabei zu den wichtigsten Bestandteilen von Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Lokalisierungen innerhalb der Zelle und der Protein-Stabilität [196]. Diese Vielseitigkeit führt zu einem genaueren Blick der Forschenden auf Protein-Methylierungen (zusammengefasst in [197] [198]). Während die Methylierung in Lysin-Abhängigkeit in Form von Mono-, Di- oder Tri-Methylierung vorkommt, werden Arginin-Motive Mono- (MMA/ Mono-Methylarginin) oder Di-Methyliert (DMA/ Di-Methylarginin) (zusammengefasst in [199]). Zusätzlich kommen Di-Methylierungen in asymmetrischer (aDMA) und symmetrischer (sDMA) Form vor (siehe Abbildung 7) [199].

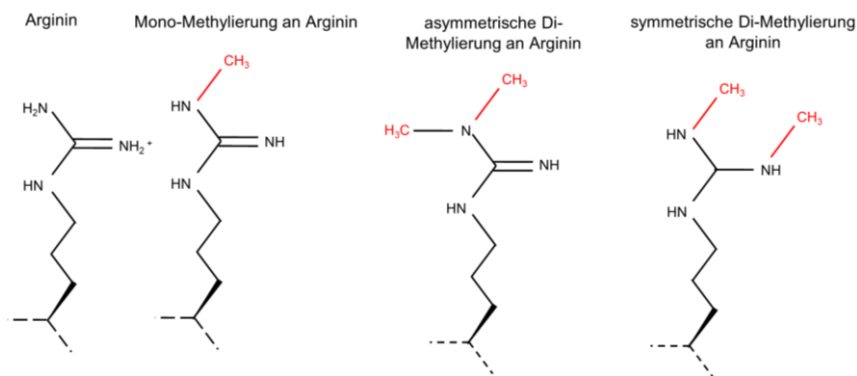


Abbildung 7 Unterteilung der Arginin-Methylierungen: Arginin (Schwarz) kann in verschiedenen Formen methyliert werden. Dabei werden ein oder zwei Methylgruppen (Rot) an Arginin gebunden. Unterschieden wird von links nach rechts in reines Arginin, Mono-Methylierung, asymmetrischer Di-Methylierung und symmetrischer Di-Methylierung. Modifiziert nach [200].

Unterschieden wird zwischen Methyltransferasen, bei denen Proteine als Mittler für eine aktive Methylierungsmodifikation an andere Proteine dienen und De-Methyltransferasen, die eine aktive Entfernung von Methylierungen hervorrufen. Zu den Methyltransferasen gehören die Mitglieder der PRMT (engl. *Protein arginine methyltransferase*) -Protein-Familie.

Basierend auf der Art ihrer ausführenden Modifikationen kann die PRMT-Protein-Familie in zwei verschiedene Typen unterteilt werden: Typ I-Mitglieder, zu denen die PRMT1-4, 6 und 8 gehören, erzeugen MMA oder aDMA; Typ-II-Mitglieder hingegen erzeugen ebenfalls MMA, jedoch zusätzlich auch sDMA. Mitglieder dieses Typs sind PRMT5, PRMT7 und PRMT9 [201] [202] [203]. Eine der Methyltransferasen ist PRMT5 (engl. *Protein arginine methyltransferase 5*). PRMT5 kann unterschiedliche Komplexe bilden, die als Grundlage PRMT5 und WD45 (auch MEP50 (engl. *methylosome protein 50*) oder WDR77 (engl. *WD repeat containing protein 77*) genannt) besitzen [204]. Der Komplex kann aus den Proteinen PRMT5, WD45 und pICln (engl. *chloride channel nucleotide sensitive 1A*) bestehen (siehe Abbildung 8) [205] [206]. Die Methylierung durch aktives PRMT5 erfolgt bei sogenannten RG-Motiven (Arginin/ Glycin-Motiven), zum Beispiel bei Sm-Proteinen [207] [208] [209]. Beispielsweise ist PRMT5 für die Methylierung von p53 mitverantwortlich [210] [211]. Darüber hinaus kann PRMT5 den Rezeptor von EGF (engl. *Epidermal Growth Factor*) mono-methylieren, dadurch die Phosphorylierung regulieren und somit indirekt die ERK (engl. *extracellular-signal regulated kinases*) -Aktivität [212]. Dieser Komplex befindet sich fast ausschließlich innerhalb des Nukleus.

Eine weitere Zusammensetzung des PRMT5-Komplexes besteht aus WD45, PRMT5 und RIOK1 (Protein Kinase RIO1) (siehe Abbildung 8) [213]. RIOK1 ist ein zytosolisches Protein, welches ebenfalls an der Reifung der 40S ribosomalen Untereinheiten und somit auch an der ribosomalen Biogenese als Adapterprotein beteiligt ist [214].

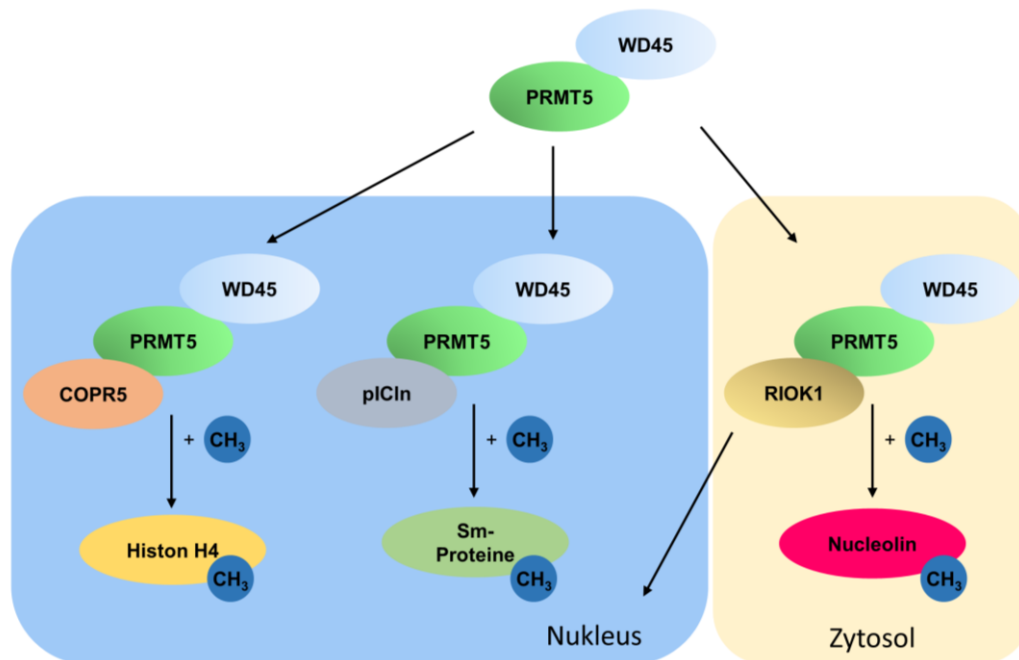


Abbildung 8 Unterteilung der verschiedenen PRMT5-Komplexe: Die Basis des PRMT5-Komplexes besteht aus den Proteinen PRMT5 und WD45. In Konkurrenz zueinander und Abhängigkeit der Lokalisation innerhalb der Zelle können Komplexe mit zusätzlichen Proteinen gebildet werden. Innerhalb des Nucleus (blauer Bereich) ist eine Rekrutierung von COPR5 oder pICln möglich. Die Rekrutierung von COPR5 ermöglicht die Methylierung des Histons H4 und weiterer Komplexe, eine pICln Rekrutierung führt beispielsweise zu einer Methylierung verschiedener Sm-Proteine. Innerhalb des Zytosols (gelber Bereich) kann RIOK1 an das Kernstück rekrutiert werden, wodurch eine Methylierung von Nucleolin und anderen Komplexen möglich ist. Der PRMT5-Komplex mit RIOK1 kann jedoch zusätzlich auch in den Nucleus detektiert werden (siehe Pfeil). Abbildung modifiziert nach [213].

Allerdings konnte bisher kein PRMT5-Komplex mit RIOK1 und pICln detektiert werden, beide Komponenten dienen daher als Adapterproteine [213]. Zudem besteht jeder Komplex aus dem Verhältnis von jeweils einem Protein PRMT5, WD45, RIOK1 oder pICln [205] [207] [213]. Beide Proteine interagieren mit PRMT5 über dessen N-Terminus, weshalb ein konkurrierendes Verhältnis angenommen wird [213] [215]. Durch die Bindung an den N-Terminus von PRMT5 ist eine Funktion als Bindeglied und Rekrutierungsplattform möglich [213]. Des Weiteren interagiert der RIOK1-PRMT5-Komplex mit dem Protein Nucleolin, welches an der Reifung von Ribosomen beteiligt ist. RIOK1 ermöglicht die Methylierung von Nucleolin und der zuvor erfolgten Rekrutierung an den PRMT5-Komplex [213]. Der dritte PRMT5-Komplex wurde erst in den letzten Jahren entdeckt. Er besteht neben WD45 und PRMT5 aus COPR5 (*Coordinator of PRMT5 and differentiation stimulator*) (siehe Abbildung 8). COPR5 ist dabei für die Rekrutierung an das Histon 4 verantwortlich [216].

Weitere Beispiele für Methylierungen sind die Modifikation der DNA und besonders die Proteinmodifikation der DNA-nahen Histon-Proteine ist von großer Bedeutung [217] [218]. Eine herausragende Bedeutung bei der Histon-Modifikation nimmt die Methylierung ein [219]. Neben der hohen Wichtigkeit der DNA-Methylierung, ist die RNA-Modifikation ein besonders essentieller Aspekt der Modifikation. Methylierungen nehmen etwa 50 % der RNA-Modifikationen ein und besitzen unterschiedlichste Funktionen, beispielsweise innerhalb der Genexpression (zusammengefasst in [220]).

1.4 Autophagie

Autophagie, auch Autophagozytose genannt, ist ein zellulärer Prozess, welcher Bestandteile oder ganze Zellen abbaut und als Typ II Zelltod definiert wird [10] [221]. Bereits 1962 wurde der Prozess der Autophagie beschrieben, ein Jahr später konnte die Wiederverwendung zellulärer Bestandteile in Lysosomen detektiert werden [6] [222]. Unterschieden wird die Autophagie in Makroautophagie, Mikroautophagie und die CMA (*Chaperone mediated autophagy/ dt. Chaperon-vermittelte Autophagie*).

1.4.1 Gruppen der Autophagie

Die wichtigste, umfassendste und am meiste untersuchte Gruppe der Autophagie ist die Makroautophagie (fortlaufend als Autophagie bezeichnet), die zu einem Abbau und einer Entfernung von großen Zytoplasmenbestandteilen, abnormalen Proteinaggregaten und überschüssigen bzw. defekten Zellorganellen dient. Wichtigste Komponenten der Autophagie sind die Proteine der ATG (engl. *Autophagy-related protein*) -Familie, die insgesamt 16 Mitglieder umfasst (zusammengefasst in [8]) [223] [224]. Weitere wichtigen Bestandteile sind mTOR (engl. *mechanistic Target of Rapamycin*), ULK1, PI3K (engl. *phosphatidylinositol-3 kinase*) -Komplex, Beclin-1, das UVRAG Gen und LC3 (engl. *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*). Diese Bestandteile haben entweder inhibitorische oder aktivierende bzw. strukturelle Auswirkung auf die Autophagie-Kaskade [225].

Die Initiierung der Autophagie resultiert aus Nährstoffmangel, Stress, Infektionen oder Defekten innerhalb der Zelle (Schritt 1) (zusammengefasst in [8]). Nachfolgend erfolgt die Phagophorenbildung über verschiedene Proteine (Schritt 2). Ein Mechanismus ist der ATG 5/7 unabhängige Signalweg, bei dem durch Inhibierung von mTOR und Aktivierung von AMPK der ULK1/2 (engl. *unc-51-like kinase*) -Komplex initiiert wird [226]. Zu diesem Komplex gehören zusätzlich noch FIP200 (engl. *FAK-family interacting protein of 200kDa*), ATG13 sowie ATG101 (zusammengefasst in [227]) [226]. Anschließend transloziert der ULK1/2-Komplex zum zuvor gebildeten PI3K-Komplex und hilft diesen zu aktivieren. Dem PI3K-Komplex gehören unter anderem Beclin-1, ATG14, VPS15 (engl. *Vacuolar protein sorting associated protein*), VPS34 und NRF2 (engl. *nuclear factor (erythroid –derived 2) -like 2*) an [228]. An den PI3K-Komplex werden weitere Proteine gebunden, unter anderem interagieren UVRAG (engl. *UV radiation resistance-associated gene protein*) sowie Ambra-1 direkt mit Beclin-1 [229] [230]. Mitglieder des PI3K-Komplexes dienen als Plattform für die weitere Phagophorbildung [231]. Demgegenüber steht ein aus ATG16L1, ATG12 und ATG5 bestehender Komplex [232]. Mit Hilfe von ATG7 und ATG10 wird dieser Komplex gebildet, er unterstützt die spätere Anheftung des aktivierten LC3-II. Dieser Signalweg ist abhängig von ATG5/7 (siehe Abbildung 9) [233] [234].

Nach der Phagophorenbildung erfolgen die Sequestrierung, Phagophorenexpansion und Bildung des Autophagosoms. Die defekten oder unbrauchbaren Zellkompartimente werden in das Innere des Autophagosoms gelagert. An diesem Prozess der Bildung sind neben ATG-Familienmitgliedern vor allem die Proteine p62 und LC3 beteiligt. ATG4 spaltet LC3 zu LC3-I, welches anschließend durch ATG5/7 zu LC3-II gespalten werden kann [232]. Mit Hilfe der Interaktionen von Phosphatidylethanolamin kann LC3-II an die Membran des Phagophors gebunden werden. Dies ermöglicht die Erkennung und das Umschließen der defekten Kompartimente durch die Bindung mit p62 [235]. LC3 dient neben der Unterstützung und Formierung der autophagosomalen Membran auch der Rekrutierung von Kompartimenten in

das Innere des Autophagosoms (siehe Abbildung 9) [236]. Das daraus entstehende Autophagosom wird zu einem Lysosom transportiert, vereinigt sich mit diesem und führt zu einem Verdau des Inhalts [237] [238] [239]. Dadurch kann der Inhalt degradiert und für neue Proteine wiederverwendet werden [240].

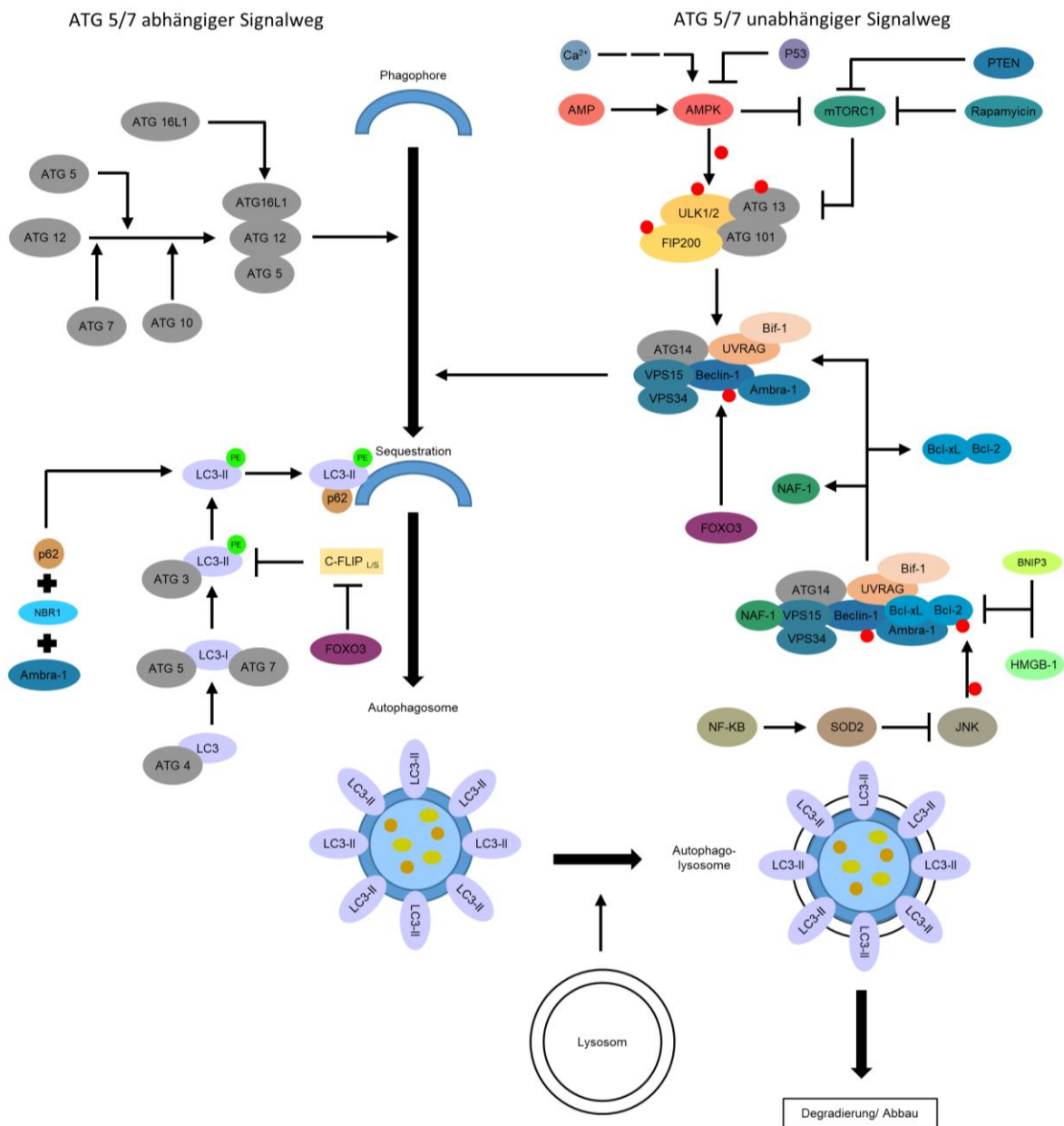


Abbildung 9 Allgemeine Autophagie-Initiierung und wichtigste Schritte der beiden Signalwege: Ablauf der Autophagie-Signalkaskaden. Autophagosombildung kann entweder ATG5/7-abhängig oder –unabhängig erfolgen. Bei der ATG5/7-unabhängigen Signalkaskade wird der ULK1/2-Komplex durch die Aktivierung von AMPK sowie Inhibierung von mTORC1 initiiert. Dieser Komplex unterstützt die Aktivierung des PI3K-Komplexes und weiterer angehefteter Proteine. Dies ermöglicht die Rekrutierung von Ambra-1, UVRAG sowie Beclin-1 und unterstützt die Phagophorenbildung. Der ATG5/7-abhängige Signalweg erfolgt mit Hilfe eines aktivierten Komplexes aus ATG16L1, ATG12 und ATG5. Dieser Komplex bindet an das Phagophor und unterstützt die LC3-II Bindung. LC3-II wird aus LC3 gebildet. Für die Spaltung erfolgen Bindungen mit ATG4, ATG5 und ATG3. Durch die LC3-II Bindung kommt es zur Autophagosombildung, bei der die defekten Kompartimente in das Innere gelagert werden. Nach der Translokation zu einem Lysosom kommt es zur Vereinigung und anschließendem Verdau des Inneren des Autophagosoms. Zusätzliche Regulatoren der Autophagie werden gezeigt. Phosphorylierungen sind in dieser Abbildung mit roten Punkten dargestellt. Modifiziert nach [8].

Bei einer Mikroautophagie werden die defekten oder überzähligen Bestandteile durch die lysosomale Membran direkt in das Lysosom internalisiert. Es können Zytosolbestandteile sowie komplette Organellen bis hin zu Zellkernkompartimenten aufgenommen und verarbeitet werden [241]. Während die Mikro- und Makroautophagie vornehmlich fehlerbehaftete oder

überflüssige Zellbestandteile durch Vesikel transportiert, werden bei der CMA spezielle zytosolische Proteine molekülweise an das Lysosom abgegeben [242]. Die Proteine werden durch den Chaperon-Komplex erkannt und zum Lysosom transportiert. Ausgelöst wird die CMA durch anhaltenden Substrat- und Nährstoffmangel [243]. Substratproteine, die eine sogenannte KFERQ-Peptidsequenz aufweisen, binden den Chaperon-Komplex, bestehend aus hsp70 (Hitzeschockprotein 70-kDa), hsp40 (Hitzeschockprotein 40kDa), hsp90, hip (hsp70-interagierendes Protein) und Hopfen (hsp70-hsp90-organisiertes Protein) [244]. Anschließend gelangt der Komplex unter Hilfe des Proteins LAMP-2A (engl. *lysosomal membrane-associated protein 2a*) in das Lysosom und wird dort abgebaut [244].

1.4.2 Mitophagie

Eine weitere Untergruppe der Mikroautophagie ist die Mitophagie. Dieser Typ der Autophagie ist spezifisch durch einen Bezug auf die Mitochondrien und ihre Funktion definiert [11]. Erstmals wurde diese Art der Autophagie 1966 beobachtet [245]. Seit 2006 wird dieser Autophagie-Typus auch als Mitophagie definiert, bereits 1998 wurde der Begriff Mitophagie das erste Mal verwendet [246] [247]. Ziel der Mitophagie ist der Erhalt eines mitochondrialen Gleichgewichts, bei dem die Anzahl der Mitochondrien begrenzt ist und zusätzlich defekte Mitochondrien entfernt werden (zusammengefasst in [248]). Es handelt sich im Gegensatz zur Makroautophagie um einen deutlich selektiveren Prozess (zusammengefasst in [249]).

Unterteilt wird die Mitophagie in zwei unterschiedliche Signalwege: den PINK1 (engl. *phosphatase and tensin homolog-induced kinase-1*)-Parkin-abhängigen Signalweg sowie den PINK1-Parkin-unabhängigen Signalweg (siehe Abbildung 10). Innerhalb des PINK1-Parkin-unabhängigen Signalweges sind die beiden Rezeptoren BNIP3 (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*) und BNIP3L (engl. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like*), auch NIX genannt, essentielle Bestandteile (siehe Abbildung 9b) [250] [251] [252]. Normalerweise werden die Rezeptoren BNIP3 und NIX nicht übermäßig in der mitochondrialen Membran exprimiert, jedoch kommt es zu einem starken Proteinanstieg in Folge von hypoxischen Bedingungen [253] [254]. Auch ein Hungern der Zelle durch Nährstoffmangel kann eine erhöhte Expression von BNIP3 und NIX auslösen. In Muskelzellen konnte unter Nährstoffmangel eine erhöhte Aktivität von Foxo3 (engl. *Forkhead-Box-Protein O3*) detektiert werden, welches an den Promotorregionen von BNIP3 und NIX bindet und ebenfalls zu einer erhöhten Expression der Rezeptoren führt [255]. Nach der vermehrten Ansiedlung und Bindung der Rezeptoren an die Mitochondrien, können diese mit dem LC3 interagieren [256]. LC3 selber dient unter anderem für die Erkennung und Rekrutierung von Kompartimenten in das Lysosom sowie der Förderung des autophagosomalen Membranaufbaus [236]. Ähnlich wie bei NIX erfolgt die Mitophagie-Induzierung bei FUNDC1, das ebenfalls in der OMM lokalisiert ist. Unter hypoxischen Bedingungen steigt das FUNDC1-Proteinlevel und dadurch auch eine Rekrutierung von LC3-II, was somit zu Mitophagie führt [257]. Nach der Rekrutierung der Mitochondrien in das Innere des Autophagosoms und der Vereinigung mit einem Lysosom, können die Fragmente in Doppelmembranstrukturen verarbeitet und verdaut werden (siehe Kapitel 1.4.1).

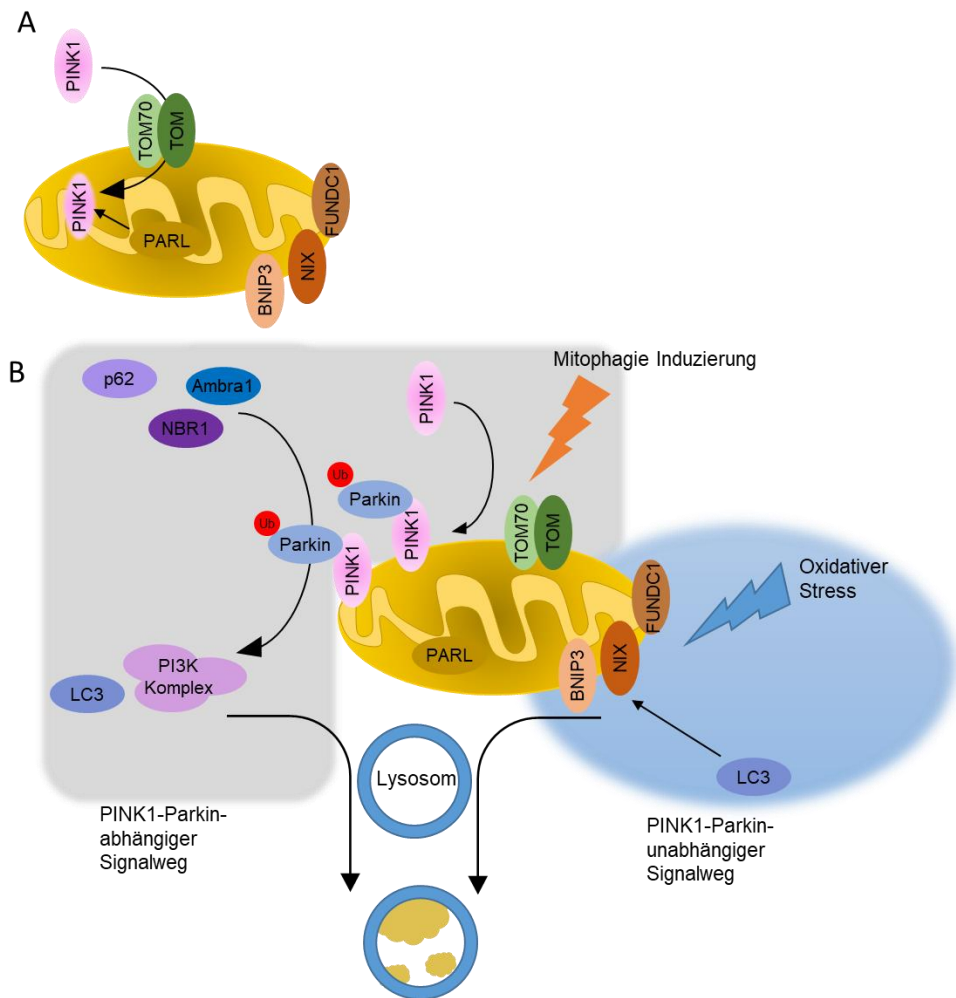


Abbildung 10 Signalwege der Mitophagie: **A:** Internalisierung und Abbau von PINK1 in Mitochondrien. PINK1 wird durch den TOM-Komplex in das Mitochondrium geleitet. Dort wird PINK1 durch PARL abgebaut. Die Proteine NIX, FUNDC1 und BNIP3 sind innerhalb der OMM in einem regulierten Maße gebunden. **B:** Einteilung der Mitophagie-Signalwege in Parkin-abhängige und Parkin-unabhängige Weiterleitung. Der Parkin-abhängige Signalweg (grauer Bereich) umfasst eine Zunahme und Agglomeration von PINK1 durch Störung des Imports. Dadurch kann Parkin an PINK1 rekrutiert und ubiquityniert (Ub) werden. Anschließend werden p62, Ambra1 und NBR1 ebenfalls rekrutiert und ermöglichen zusammen mit LC3 eine PI3K-Komplex-Bildung. Diese hilft bei der Aufnahme von mitochondrialen Fragmenten in das Lysosom. Der PINK1-Parkin-unabhängige Signalweg (blauer Bereich) wird beispielsweise durch oxidativen Stress hervorgerufen und erhöht die Expression von BNIP3, NIX und FUNDC1 an der OMM. Anschließend wird LC3 rekrutiert und ermöglicht ebenfalls die Fragment-Aufnahme in das Lysosom. Modifiziert nach [258].

Der zweite Signalweg der Mitophagie ist von PINK1-Parkin-abhängig. Eine Erhöhung des Parkin-Proteinlevels führt zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und einer Co-Lokalisation mit dem Autophagie-Marker LC3 [256] [259].

In gesunden Mitochondrien wird PINK1 über ständigen Import durch das Protein PARL (engl. *Presenilins-associated rhomboid-like protein, mitochondrial*) abgebaut und dadurch auf einem niedrigen Niveau gehalten (siehe Abbildung 10A) [260]. Durch eine Beeinträchtigung des Imports von PINK1 durch Fehlfunktionen des Mitochondriums (z.B. durch Blockade des TOM (engl. *Translocase of the Outer Membrane*)-Komplexes) kommt es zu einer Reduzierung der Proteinspaltung und gleichzeitiger Steigerung des Proteinlevels [261] [260]. PINK1 bindet an der äußeren Mitochondrienmembran, rekrutiert anschließend Parkin und phosphoryliert dieses [260] [262] [263] [264]. Die Parkinrekrutierung induziert eine Ruptur der OMM in Abhängigkeit der Proteasomen [265] [266]. Eine gleichzeitige Parkin-Ubiquitynierung führt zur Rekrutierung weiterer Adapterproteine, wie z.B. p62 oder NBR1 (engl. *neighbor of BRCA1 gene 1 protein*) [267]. Parkin rekrutiert weiterhin das Protein Ambra1 (engl. *Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein1*), welches Autophagie fördert, indem der Klasse III PI3K-

Komplex aktiviert wird (siehe Abbildung 10B) [268]. Zusätzlich können weitere Autophagie-Rezeptoren auch direkt über PINK1 an die Mitochondrien gebunden werden. PINK1 rekrutiert die Proteine OPTN (Optineurin), CALCOCO2 (engl. *Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2*) und als weiteres Adapterprotein TBK1 (*serine/threonine-protein kinase 1*) an die Mitochondrien [269]. Diese Bindung erfolgt ohne Parkin bzw. unter Abwesenheit von Parkin. Parkin dient somit als Verstärker der PINK1-abhängigen Mitophagie [269].

Durch die Rekrutierung der Autophagie-Rezeptoren OPTN und CALCOCO2 sowie von LC3 kommt es wie bereits beschrieben zur Aufnahme des Mitochondriums in das Autophagosom [236].

Auch weitere mitochondriale Proteine sind essentiell für Mitophagie, wie beispielsweise der TOM-Komplex. Zusammen mit dem konträren Komplex TIM (engl. *Translocase of the Inner Membrane*) dient der TOM-Komplex mit seinen Familienmitgliedern (TOM5, TOM6, TOM7, TOM20, TOM22, TOM40, TOM70) dem Import von zytosolischen Proteinen in das Mitochondrium [270] [271] [272]. Der TOM-Komplex besitzt drei verschiedene Rezeptoren: TOM20 dient zu der Erkennung von N-terminalen und positiv geladenen Zielsequenzen, TOM22 bindet selektiv Präproteine mit spezifischer Pre-Sequenz und TOM70 erfasst Ziel-Sequenzen an der mitochondrialen Membran [273] [274].

Darüber hinaus ist TOM70 essentiell für den Import von PINK1 um Mitophagie vorzubeugen [261]. Eine Beeinträchtigung des TOM-Komplexes führt zu einer vermehrten Ansammlung von PINK1 und somit zu Mitophagie [260] [261].

Eine bedeutende Rolle in der Mitophagie-Induzierung spielt ROS (engl. *Reactive oxygen species*) [275]. Teilweise Hypoxie und Störung der Mitochondrien kann zu einem Anstieg von ROS innerhalb der Zellen führen [275]. Obwohl NIX als Gegenmaßnahme von ROS unter hypotoxischen Bedingungen exprimiert wird, kann es auch gegenteilig die ROS-Bildung verstärken und dadurch eine Stärkung der Mitophagie hervorrufen [267]. Darüber hinaus kann NIX zu einer mitochondrialen Depolarisation führen, was eine CCCP (engl. *Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*) –induzierte Rekrutierung von Parkin an das Mitochondrium ermöglicht [267].

1.5 Lactaptin/ RL2

Die verwendeten Krebstherapeutika weisen gravierende Nebeneffekte für Patienten auf. Aus diesem Grund wird an sanfteren und effizienteren Therapien geforscht. Eine potenzielle Strategie ist die Erforschung natürlich vorkommender Proteine, Peptide und Antikörper. Ein Peptid, das als potenzielles Therapeutikum erforscht wird, ist Lactaptin bzw. sein rekombinantes Analogon RL2 (engl. *recombinant Lactaptin analogon 2/ dt. rekombinantes Lactaptin Analogon 2*) [276] [277]. Lactaptin basiert auf dem humanen Milchprotein K-Casein. Es weist die AS 57 bis 134 von K-Casein auf, wohingegen RL2 eine Länge von den AS 23 bis 134 besitzt (siehe Abbildung 11) [277]. Bereits das natürlich vorkommende Peptid Lactaptin induziert Zelltod in Mammakarzinomzellen, genau wie das kürzere Lactaptin Analogon RL1 (AS 66-134 von K-Casein) [276] [277]. Auch bei dem längeren Analogon RL2 konnte Zelltod detektiert werden, verglichen mit der Zelltod-Induzierung durch RL1 oder Lactaptin sogar in einem stärkeren Verhältnis [277]. Darüber hinaus konnten hemmende bzw. zelltod-induzierende Effekte in Xenograft-Experimenten nachgewiesen werden [278]. Erste Hinweise auf den Zelltodtyp konnten mit der Spaltung und Aktivierung von apoptotischen Proteinen 2014 detektiert werden [279]. So konnte nachgewiesen werden, dass RL2-Stimulationen zu einer Aktivität von Caspase-3/7 führen, welches ein wichtiger Bestandteil der Apoptose-Kaskaden ist (siehe Kapitel 1.2) [278] [279]. Eine eindeutige Bestimmung des Zelltodtyps war jedoch nicht möglich, sodass der RL2-induzierte Zelltodmechanismus weiterhin unbekannt blieb. Aus diesem Grund ist die Dekodierung und Entschlüsselung des RL2-induzierten Zelltodes ein essentieller Bestandteil der Erforschung von RL2. Inwiefern es ein Zusammenspiel mit anderen Zelltodsignalwegen, wie dem extrinsischen Signalweg, gibt, wurde bisher nicht untersucht.

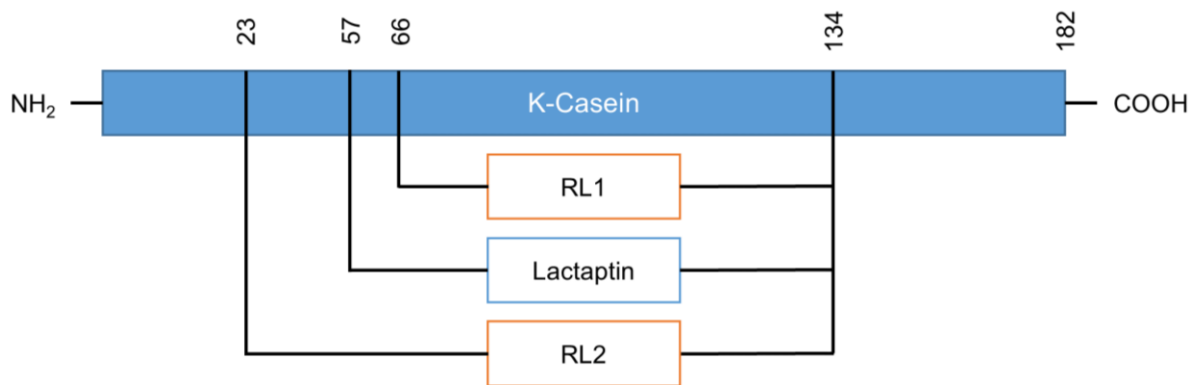


Abbildung 11 Aufbau und Unterteilung von RL2, RL1 und Lactaptin verglichen mit K-Casein: Modifiziert nach [277].

1.6 Zielstellung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Analyse von molekularen Mechanismen des DR-abhängigen Signalweges. Es wird die Bedeutung von unbekanntem PTM auf die Schlüsselkomponenten des DISC untersucht. Hauptaugenmerk liegt auf der Rolle der Initiator-Caspase Caspase-8. Dabei sollen die unbekanntem PTM, die potenziell an Procaspase-8 gefunden werden können, untersucht werden. Darunter fällt unter anderem die Methylierung als potenzielles PTM. Für die Untersuchung sollen biochemische Verfahren angewendet werden sowie die pharmakologische Inhibition der potenziellen Methylierungen. Aus den gegebenen Methoden und Hintergrundinformationen ergeben sich mehrere Fragestellungen:

- Welche potenziellen PTM gibt es an der DISC-Schlüsselkomponente Caspase-8, die zum derzeitigen Zeitpunkt nicht erfasst werden konnte?
- Welche Effekte besitzen diese potenziellen PTM auf die Aktivität von Caspase-8?
- An welchen Regionen von Caspase-8 können potenzielle PTM gefunden werden?
- Ist es möglich, dass die potenziellen PTM in Verbindung mit Erkrankungen stehen?

Neben der Untersuchung des Einflusses von PTM auf Caspase-8, beinhaltet die Dissertation einen zweiten Untersuchungsschwerpunkt. Der Zelltodsignalweg durch Induzierung des rekombinanten Analogons RL2 soll untersucht werden. In bisherigen Studien konnte die Art des Zelltodes durch RL2-Stimulation nicht dekodiert werden. Dazu soll in dieser Arbeit der Wirkort innerhalb der Zelle untersucht werden sowie die zellulären Effekte einer RL2-Behandlung auf diverse Mammakarzinomzelllinien. Dafür wird der Einfluss von RL2 auf die DISC-Formierung sowie der anschließenden Caspase-8-Aktivität untersucht. Für diese Untersuchung wird das Zusammenspiel von RL2 mit bereits etablierten extrinsischen Zelltodinduktoren wie TRAIL durchgeführt. Aufgrund der unbekanntem Effekte ergeben sich folgende Fragestellungen bezüglich RL2:

- Welche RL2-Effekte gibt es auf Mammakarzinomzellen?
- Was sind die potenziellen Interaktoren von RL2 in der Zelle?
- Welchen Einfluss besitzt RL2 auf die DISC-Formierung?
- Welchen Einfluss besitzt RL2 auf die Caspase-Kaskade?
- Welches Zusammenspiel gibt es mit dem DL TRAIL?
- Welche Auswirkungen gibt es auf intrinsische Zelltodinduktoren?

2 Material und Methoden

Alle beschriebenen Methoden wurden nach dem Standardprotokoll der Arbeitsgruppe Translationale Entzündungsforschung der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg erstellt und bei individuellen Änderungen modifiziert.

2.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien wurden unter höchster Reinheit nach der Qualität *pro analysi* verwendet und von den angegebenen Unternehmen bezogen.

2.1.1 Material für Zellkultur und Experimente

Tabelle 3 Materialien für die Zellkultivierung und Experimente

Materialien	Hersteller	Bestellnummer
75 cm ² Zellkulturflasche (T75-Flask) für adhärenente Zellen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	83.3911.002
175 cm ² Zellkulturflasche (T175-Flask) für adhärenente Zellen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	83.3912.002
75 cm ² Zellkulturflasche (T75-Flask) für Suspensionszellen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	83.3911.502
175 cm ² Zellkulturflasche (T175-Flask) für suspensions Zellen	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	83.3912.502
10 cm Zellkulturschale	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)	664160
6-Well Platte	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	83.3920.500
96-Well Platte	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	655098
1,5 ml Reaktionsgefäß	VWR International (Radnor, USA) Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)	700-5239 0030125150
15 ml Zentrifugenröhrchen	VWR International (Radnor, USA) Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)	525-0150 188 261
50 ml Zentrifugenröhrchen	VWR International (Radnor, USA) Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)	525-0156 227 270
Pipettenspitzen: 0,1-5 ml	VWR International (Radnor, USA)	613-0364 613-0240 613-0272 613-0830
5-25 ml serologische Pipette (steril)	Corning Incorporated (Corning, USA)	4487 4488 4489
10 ml serologische Pipette (unsteril)	neoLab Migge GmbH (Berlin, Deutschland)	7-4032
50 ml serologische Pipette (steril)	neoLab Migge GmbH (Berlin, Deutschland)	7-4036
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)	1450011
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG &Co (Nümbrecht, Deutschland)	67.742
Zellschaber	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)	EKX9.1

2.1.2 Medien und Chemikalien für die Zellkultivierung

Tabelle 4 Medien und Chemikalien für die Zellkultivierung

Name	Hersteller	Bestellnummer
DMEM/Ham's-F12 (1:1)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)	P04-41154
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)	A994.2
FBS (<i>Fetale Bovine Serum</i>)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	10270106
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>) Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)	L1825
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, USA).	15250-061
0,05 % Trypsin- EDTA (Ethyldiamintetra-essigsäure)(1x)	Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, USA).	25300096
RPMI (Roswell Park Memorial Institut)-Medium	Gibco/ Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, USA).	21875-034
Leibovitz –Medium	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	1839054
MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>) / NEAA (<i>non essential aminoacids</i>)	Gibco/ Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, USA).	11140-035
Natrium-Pyruvat	Gibco/ Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, USA).	11360-039
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)	A2213

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 5 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Typ	Kultivierungsmedium	Herkunft
BT549	Epitheliale Mammakarzinomzellen	RPMI-Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin	Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Dresden von Prof. Dr. Dagmar Kulms
Hela-CD95	Zervixkarzinomzellen	DMEM/Hams-F12 Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin +10 ng/ml Puromycin	[280]
Hela-CD95-C8-KO	Zervixkarzinomzellen mit einem <i>Knockout</i> von Caspase-8	DMEM/Hams-F12 Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin +10 ng/ml Puromycin	Erzeugung innerhalb des Labors durch Corinna König
MDA-MB-231	Mammakarzinomzellen, TGF (<i>Transforming growth factor</i>) und EGF (<i>Epidermal growth factor</i>) überexprimierend	Leibovitz-Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin	DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig
SKBR3	Epitheliale Mammakarzinomzellen	RPMI-Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin	Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Dresden von Prof. Dr. Dagmar Kulms
SKW 6.4	B-Zell-Lymphoma	RPMI-Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin	DKFZ, Heidelberg, von Prof. Dr. Peter H. Krammer

Zelllinie	Typ	Kultivierungsmedium	Herkunft
T47D	Epitheliale Mammakarzinomzellen	RPMI-Medium +10 % FBS +1 % Penicillin/Streptomycin	Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Dresden von Prof. Dr. Dagmar Kulms

2.1.4 Liganden und Inhibitoren zur Zellstimulation

Tabelle 6 Liganden und Inhibitoren zur Zellstimulation

Ligand	Stockkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller	Bestellnummer oder Referenz
CD95L	5000 ng/ml	200-1000 ng/ml	Hergestellt in der Arbeitsgruppe Translationale Entzündungsforschung / OVGU	[132]
DXR (Doxorubicin)	20 mM	0,5-3 µM	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)	10512955
EPZ015666 (GSK3235025)	500 µmol/ml	5 nmol/ml	Selleck Chemicals GmbH, Planeck, Deutschland	S7748
KillerTRAIL™	0,5 mg/ml	50 bis 100 ng/ml	Enzo Life Sciences, Inc. St. Louis, USA	ALX-201-073
RL2	2,8 bis 3,0 mg/ml	100 bis 300 µg/ml	Von Dr. Richter, Institut für biologische Chemie und fundamentale Medizin (Novosibirsk)	[276]
zVAD-fmk	50 mM	50 µM	Bachem Holding AG (Bubendorf, Schweiz)	N-1510.0005

2.1.5 Material für SDS-PAGE und Western Blot

Tabelle 7 Materialien für SDS PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*) und Western Blot

Name	Hersteller	Bestellnummer
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	A124.2
Bradford-Proteinassay Färbekonzentrat	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)	500-0006
APS (Ammoniumperoxidisulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9592.3
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	CN06.2
Dithiothreitol	OMNILAB-Laborzentrum GmbH & CO KG (Bremen, Deutschland)	APP A2948,0005
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3783.1
Glycin	OMNILAB-Laborzentrum GmbH & CO KG (Bremen, Deutschland)	APP A1067,1000
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	HN77.3
KCl (Kaliumchlorid)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6781.2

Name	Hersteller	Bestellnummer
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3904.1
4x Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)	1610747
Luminata™ Forte Western HRP Substrat	Merck Millipore (Billerica, USA)	WBLUF0500
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4227.2
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	T145.4
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	OMNILAB-Laborzentrum GmbH & CO KG (Bremen, Deutschland)	APP A3599,1000
NaN ₃ (Natriumazid)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	K305.1
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Thermo Fisher Scientific, Inc (Waltham, USA)	26616
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4326.1
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4360.2
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2367.3
Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit, Nitrocellulose Membrane	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)	1704159
Tris	AppliChem GmbH + Co. KG (Darmstadt, Deutschland)	A2264,1000
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3051.4
Tween® 20	OMNILAB-Laborzentrum GmbH & CO KG (Bremen, Deutschland)	APP A4974,1000

Tabelle 8 Zusammensetzung des Lyse-Puffers

Chemikalie	Stock	Zielkonzentration für einen Liter	Hersteller und Nummer
Tris HCl, pH 7,4	1,5 M	20 mM	AppliChem GmbH + Co. KG (Darmstadt, Deutschland) A2264,1000
NaCl (Natrium chlorid)	5 M	137 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #HN77.3
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	200 mM	2 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #CN06.2
Glycerin	100 %	10 %	3783.1
Triton X100	10 %	1 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) 3051.4

Chemikalie	Stock	Zielkonzentration für einen Liter	Hersteller und Nummer
PMSF	100 mM	1 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) 6367.3
PIC (Protease Inhibitor Cocktail)	100 %	4 %	Merck/ Millipore (Burlington, USA) 11836145001

Tabelle 9 Zusammensetzung des 20x PBS-T-Puffers

Chemikalie	Menge	Hersteller	Bestellnummer
NaCl	160 g/l	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3957.2
KCl	4 g/l	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6781.2
Na ₂ HPO ₄ ohne H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat)	28,4 g/l	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P030.3
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	4 g/l	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3904.1
Tween® 20	10 ml	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)	A4974

Tabelle 10 Zusammensetzung der SDS-Gele und Konzentrationen der verwendeten Chemikalien

Gel	Substanzen	Menge für 2 Gele [µl]
Trenngel (12,5 %)	ddH ₂ O	3280
	Tris 1,5 M pH 8,8	2500
	Acrylamide	4060
	10 % SDS	100
	10 % APS	100
	TEMED	7,5
Sammelgel	ddH ₂ O	3100
	Tris 1,5 M pH 6,8	1250
	Acrylamide	500
	10 % SDS	50
	10 % APS	25
	TEMED	7,5

Tabelle 11 Blockade-Puffer für Western Blot Membranen

Gel	Milch	g/l
PBS-T	5 %	50
TBS-T	5 %	50

Tabelle 12 CHAPS/HEPES-Puffer für Caspase-8-Aktivitäts-Assays

Chemikalie	Menge	Hersteller	Bestellnummer
HEPES	2 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6763.2
CHAPS	2 µl mit 10 mg/ml	AppliChem GmbH + Co. KG (Darmstadt, Deutschland)	A1099,0050
DTT	0,003085 g	AppliChem GmbH + Co. KG (Darmstadt, Deutschland)	A2948,0005

Tabelle 13 LDH-Ladepuffer

Chemikalie	Menge/ Konzentration	Hersteller
200 mM Tris-HcL (7.3 pH)	1 L	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	10 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #3783.1
BSA	1 %	AppliChem GmbH + Co. KG (Darmstadt, Deutschland) (A6588,0100)

2.1.6 Antikörper für Western Blot

Tabelle 14 Primärantikörper für Western Blots

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Actin	α-Rabbit IgG-HRP (<i>Horseradish peroxidase</i>)	1:4.000	Sigma-Aldrich	A2103
AIF	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	sc-5318
Bax	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	5023
Bcl-2	α-Mouse IgG-HRP	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	sc-7382
Bid	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	2002
BNIP3	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	44060S
BNIP3L/ NIX (D4R4B)	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	12396

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Caspase -3	α-Rabbit IgG-HRP	1:2.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	9662
Caspase -8	α-Mouse IgG _{2b} -HRP	1:10 (zuvor aufgereinigt)	[Scaffidi <i>et al</i> , 1998], Klon C15, Bereitgestellt durch Prof. Krammer (DKFZ)	-
Caspase -10	α-Mouse IgG ₁ -HRP	1:1.000	Biozol (Eching, Deutschland)	MBL-M095-3
DR4	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	42533
Endonuklease G	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	4969
FADD	α-Mouse IgG ₁ -HRP	1:10	[Scaffidi <i>et al</i> , 1998], Klon 1C4, Bereitgestellt durch Prof. Krammer (DKFZ)	-
GAPDH	α-Goat IgG-HRP	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	sc-48166
κ-Casein	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Abcam (Cambridge, UK)	Ab111406
LC3	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	3668
Mcl-1	α-Rabbit IgG-HRP	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-819
MonoMethyl Arginin/ MMA	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology	8711
PARP1	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	Sc-9542
PINK1	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology	6946
PRMT5	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	2252
RIOK1	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Novus Biologicals (Cambridge, UK)	NBP-30104
Dimethyl-Arginine, symmetric (SYM-10)	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Merck/ Millipore (Burlington, USA)	07-412
SOD2	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	sc-13194
TOM70	α-Rabbit IgG-HRP	1:400	Abcam (Cambridge, UK)	Ab89624
WD45 /MEP50	α-Rabbit IgG-HRP	1:1.000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	2823

Tabelle 15 Sekundärantikörper für Western Blot

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
α -Rabbit IgG-HRP	1:10.000	Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, Alabama, USA)	4030-05
α -Mouse IgG ₁ -HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	sc-2060
α -Mouse IgG _{2b} -HRP	1:10.000	Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, Alabama, USA)	1091-05
α -Goat IgG-HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)	sc-2768

2.1.7 Färbesubstanzen für zellspezifischen Zelltod

Tabelle 16 Färbesubstanzen und Puffer für zellspezifischen Zelltod

Färbung/ Fluoreszenz-Farbstoff	Excitation	Emission	Laser	Hersteller und Nummer
Annexin V FITC	488	519	488	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland) 31490013
Annexin V Binding Buffer	-	-	-	422201
PI (<i>propidium iodide</i>)	561	617	561	Sigma-Aldich (ST Louis, USA) 81845

2.1.8 Kits, Assays und Reagenzien für Zellkompartimentsanalyse

Tabelle 17 Kits, Assays und Reagenzien für die Zellkompartimentsanalyse

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega Corporation (Madison, USA)	G8090
Caspase-Glo® 8 Assay	Promega Corporation (Madison, USA)	G8201
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay	Promega Corporation (Madison, USA)	G9241
LDH-Glo® Cytotoxicity Assay	Promega Corporation (Madison, USA)	J2330
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	Promega Corporation (Madison, USA)	G9711
Sepharose-A-Beads	Abcam (Cambridge, UK)	Ab193256
Pierce Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc (Waltham, USA)	26149

2.1.9 Puffer für die Fraktionierung

Tabelle 18 Zusammensetzung des Puffer A für die Fraktionierung

Chemikalie	Zielkonzentration	Hersteller und Nummer
HEPES pH 7,6	10 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #HN77.3
KCl	10 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #6781.2
MgCl ₂	2 mM	Merck KGaA, Billerica, USA #8147330100
EDTA	0,1 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #CN06.2

Tabelle 19 Zusammensetzung des Puffer C für die Fraktionierung

Chemikalie	Zielkonzentration	Hersteller und Nummer
HEPES pH 7,8	50 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #HN77.3
KCl	50 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #6781.2
NaCl	300 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #HN77.3
EDTA	0,1 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #CN06.2
Glycerol	10 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) #3783.1

Tabelle 20 Verwendete Konzentrationen von NP-40 für die Zellfraktionierung bezüglich der Zelllinien

Zelllinie	NP40-Konzentration
HeLa-CD95-C8-KO	1,7 %
MDA-MB-231	0,3 %
SKW 6.4	0,43 %

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

2.2.1.1 Allgemeines Handling und Auftauen der Zelllinien

Die Handhabung und Kultivierung, sämtliche Experimente sowie das Aussähen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Die verschiedenen Zelllinien werden bei -150 °C in 90 % FBS und 10 % DMSO als Aliquots gelagert. Für das Auftauen wird 10 ml frisches Medium in ein 50 ml Falcon gegeben und auf 37 °C aufgewärmt. Die Zellen werden durch leichtes Schwenken in einem 37 °C warmen Wasserbad (GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)) aufgetaut und in das vorgewärmte Medium pipettiert. Anschließend werden die Zellen bei $500 \times g$ für fünf Minuten zentrifugiert (Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)): Centrifuge 5804 R) und das alte Medium entfernt. Das Zellpellet wird in 10 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend in einer T75 Zellkulturflasche in insgesamt 20 ml Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 (falls nicht anders in den folgenden Kapiteln beschrieben) in einem Thermo Scientific™ BBD 6220 CO_2 -Inkubator (Thermo FisherScientific Inc. Waltham, USA). Alle zwei bis drei Tage werden die Zellen neu gesplittet. Dazu wird das alte Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml (T175) oder 1 ml (T75) Trypsin bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden mit 5 ml Medium abgespült und in ein neues 50 ml Tube überführt. Die Zellen werden bei $500 \times g$ für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Eine Probe (200 μl) wird entnommen und mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (TC20 *automated cell counter* #145-0101, Bio-Rad Laboratories, Inc. Berkeley, USA) wird die Zellanzahl bestimmt. Dazu werden 10 μl der Zellsuspension mit 10 μl Trypanblau gemischt und auf einen Träger pipettiert. Die Zellen werden entsprechend ihres Types und Zwecks spezifisch ausgesät.

2.2.1.2 BT549 Mammakarzinomzellen

BT549 Zellen sind invasive Epithelzellen, die einer kaukasischen 72-jährigen Frau entnommen und aus deren duktalem Karzinom gezüchtet wurden. Zusätzlich verfügt die Zelllinie über Estrogenrezeptoren [281]. In der Regel beläuft sich die typische Verdopplungszeit auf 24-30 Stunden. Die Zellen werden in RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S unter den bereits beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Zellen werden für die Kultivierung mit Konzentrationen zwischen 2×10^6 Zellen in 20 ml (T75) und 3×10^6 Zellen in 30 ml (T175) Medium passagiert. Die Zellanzahl für die verschiedenen Versuche richtet sich spezifisch nach den jeweiligen Protokollen.

2.2.1.3 MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen

MDA-MB 231 ist eine Brustkrebszelllinie, die aus einer 51-jährigen europäischen Patientin isoliert wurde und keine Chromosomen N8 und N15 besitzt [282] [283]. Die Zellen exprimieren sowohl den EGF als auch den TGF alpha [284]. Des Weiteren vermehren sich die Mammakarzinomzellen stark invasiv in fibroblastoider, weit gestreckter Form, weshalb für die Kultivierung präparierte Zellkulturflaschen für adhärente Zellen verwendet werden.

Die Zellen werden in Leibovitz-Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S (Penicilin/Streptavidin) bei 37 °C kultiviert. Es findet währenddessen kein Gasaustausch statt, weshalb die Kulturflaschen keine Filter besitzen und die Deckel komplett verschlossen sind.

Für die Zellkultivierung werden die Zellen wie bereits beschrieben geerntet und transferiert. Die MDA-MB-231 Zellen werden mit einer Konzentration zwischen $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml (T75) und $1 \cdot 10^6$ Zellen in 30 ml (T175) passagiert. Die Zellanzahl für die verschiedenen Versuche richtet sich spezifisch nach den jeweiligen Protokollen.

2.2.1.4 HeLa-CD95 und HeLa-CD95-C8-KO Zellen

Die HeLa-CD95 (ursprünglich HeLa-12 genannten) Zellen sind epithelale Zervixkarzinomzellen und CD95 überexprimierende Zellen [280] [287]. Die verwendeten HeLa-CD95-C8-KO Zellen entstammen ursprünglich aus der Zelllinie HeLa-12, jedoch wurde das Gen für Caspase-8 mit Hilfe des Verfahrens CRISPR/ Cas aus den Zellen entfernt (Bearbeitung durch Corinna König). Beide HeLa-Zelllinien, HeLa-CD95 und HeLa-CD95-C8-KO, werden auf die gleiche Weise kultiviert. Dazu werden die Zellen mit Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml (T75) und $2 \cdot 10^6$ Zellen in 30 ml (T175) Medium ausgesät. Das Medium besteht aus DMEM/ HamsF12 Medium mit 10 % FBS, 1 % P/S und 10 ng/ml Puromycin. Die Zellanzahl für die verschiedenen Versuche richtet sich spezifisch nach den jeweiligen Protokollen.

2.2.1.5 SKBR3 Mammakarzinomzellen

SKBR3 Zellen sind Epithelzellen einer Brustkrebskrankung, die einer kaukasischen 43-jährigen Frau entnommen und aus deren Mammakarzinomzellen gezüchtet wurden. Die Zelllinie besitzt HER2 [281]. In der Regel beläuft sich die typische Verdopplungszeit auf 24-30 Stunden. Die Zellen werden in RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S unter den bereits beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Zellen werden für die Kultivierung mit Konzentrationen zwischen $2 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml (T75) und $3 \cdot 10^6$ Zellen in 30 ml (T175) Medium passagiert. Die Zellanzahl für die verschiedenen Versuche richtet sich spezifisch nach den jeweiligen Protokollen.

2.2.1.6 SKW 6.4 B-Lymphozytenzellen

SKW 6.4 Zellen sind maligne B-Lymphozyten, welche im Gegensatz zu den oben genannten Zelllinien Suspensionszellen sind. Für diese Zellen werden daher spezifische, nicht-gecodete Flaschen verwendet. Sie werden mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^4$ Zellen/ ml in 50 ml (T75) bis 200 ml (T175) ausgesät. Als Medium wird RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S verwendet. Die Zellen werden alle zwei bis drei Tage gesplittet. Für die Kultivierung werden die Zellen unter sterilen Bedingungen in 50 ml Tubes überführt. Anschließend werden sie bei $500 \times g$ für fünf Minuten abgefugt und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. 200 μ l der Zellsuspension werden als Probe genommen und wie oben beschrieben gemessen. Die Zellanzahl für die verschiedenen Versuche richtet sich spezifisch nach den jeweiligen Protokollen.

2.2.1.7 T47D Zellen

T47D Zellen sind Epithelzellen, die einer kaukasischen 54-jährigen Frau entnommen und aus deren duktalem Karzinom gezüchtet wurden. Innerhalb der Zelllinie wird der Progesteron Rezeptor nicht durch Estradiol reguliert [281]. In der Regel beläuft sich die typische Verdopplungszeit auf 24-30 Stunden. Die Zellen werden in RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S unter den bereits beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Zellen werden für die Kultivierung mit Konzentrationen zwischen $2 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml (T75) und $3 \cdot 10^6$ Zellen in 30 ml (T175) Medium passagiert. Die Zellanzahl für die verschiedenen Versuche richtet sich spezifisch nach den jeweiligen Protokollen.

2.2.2 Zellviabilitäts-Assays

2.2.2.1 ATP-Zellviabilitäts-Assay

Für die Bestimmung der Zellviabilität zu spezifischen Stimulationszeitpunkten wird die Menge von ATP innerhalb einer Zellpopulation bestimmt. Nach Zugabe des Substrats Luciferase wird zelluläres ATP und O_2 im Beisein von Mg^{2+} Luciferase oxidiert, wodurch AMP, PP_i , CO_2 und Licht entstehen. Die Menge des erfassten Lichts einer spezifischen Wellenlänge kann erfasst und gemessen werden. Die erfasste Menge Licht und oxidiertes Luciferase hängen dabei von der ATP-Menge und somit auch von der Zellzahl ab. Die erzeugte Lumineszenz bildet ein stabiles Signal, wodurch der ATP-Gehalt der Zellpopulation robust und präzise gemessen werden kann. Für die Durchführung werden $1,2 \cdot 10^4$ adhärenente Zellen/ 100 μl pro Vertiefung einer 96-Well-Platte am Vortag des Experiments ausgesät. Für die Suspensionszellen werden $2 \cdot 10^4$ Zellen/ 50 μl pro Vertiefung am selben Tag des Experiments ausgesät. Für alle Experimente werden für jede Bedingung Duplikate verwendet.

Die Zellen werden entsprechend der experimentellen Bedingungen in einem Gesamtvolumen von 50 μl stimuliert. Nach Ablauf der spezifischen Zeitpunkte werden 50 μl Luciferase Substrat in jedes Well pipettiert und das Lumineszenz-Signal mit einem Infintie M200 PRO (Tecan Group AG) nach zwei Minuten Schütteln und zehn Minuten Inkubation in Dunkelheit gemessen. Für die Bestimmung des experimentell bedingten ATP-Gehalts werden die Einzelwerte der Duplikate mit dem Mittelwert normalisiert. Zusätzlich wird die Standardabweichung der normalisierten Werte untereinander bestimmt. Die Zellviabilität wird in RU (engl. *relative unit*) angegeben.

2.2.2.2 MT Zellviabilitäts-Assay

Für die Bestimmung der Zellviabilität durch die metabolische Aktivität wird das RealTime-GLO MT Zellviabilitäts-Assay Kit von Promega (Madison USA) verwendet. Das Assay beruht auf der Erfassung des metabolischen Stoffwechsels nach der Zugabe eines zellpermanenten Pro-Substrats und der NanoLuc® Luziferase. Beide Stoffe zusammen ergeben das MT Zellviabilitätssubstrat. Das Pro-Substrat kann in die Zellen diffundieren, dort kann es gespalten und in den extrazellulären Raum transportiert werden. In diesem kann das NanoLuc® Enzym zusammen mit dem neuen Substrat agieren und ein Lumineszenz-Signal ermöglichen. Dieses Signal ist proportional zu dem Metabolismus der Zellen und somit auch proportional zu der Zellviabilität. Nur lebende Zellen können das Substrat intrazellulär spalten und in der Folge zu einem Lumineszenz-Signal führen. Dabei erfolgt die Messung durch das Zusammenspiel eines Enzyms und des Substrats. Das Substrat diffundiert von dem Medium in die Zelle hinein und wird durch das zugegebene Substrat unter Berücksichtigung der Aktivität der metabolischen Enzyme gespalten, sodass ein Lumineszenz-Signal freigesetzt wird. Dieses Lumineszenz-Signal kann detektiert und darüber die Viabilität der Zellpopulation bestimmt werden, da nur vitale Zellen das Substrat spalten und ein Signal erzeugen können. Die erzeugte Lumineszenz bildet ein stabiles Signal, wodurch die Viabilitätsrate der Zellpopulation robust und präzise gemessen werden kann. Für die Durchführung des Experiments werden $1,2 \cdot 10^4$ adhärenente Zellen/ 100 μl pro Well einer 96-Well-Platte am Vortag des Experiments ausgesät. Für die Suspensionszellen werden $2 \cdot 10^4$ Zellen/ 50 μl pro Vertiefung am selben Tag des Experiments ausgesät. Für jede Bedingung des Experiments werden Duplikate verwendet. Vor der Stimulation wird das Substrat mit dem Enzym wie in dem Herstellerprotokoll angegeben vorbereitet. Anschließend werden die Zellen spezifisch der experimentellen Einstellungen stimuliert. Die Messung der Lumineszenz-Signale erfolgt mit einem Infinitie M200 PRO (Tecan Group AG) nach jeweils 30 Sekunden Schütteln zu

spezifischen Zeitpunkten. Für die Bestimmung der experimentell bedingten Zellviabilitätsänderungen werden die Einzelwerte der Duplikate mit dem Mittelwert normalisiert. Zusätzlich wird die Standardabweichung der normalisierten Werte untereinander bestimmt. Die Metabolische-Aktivität wird in RU angegeben.

2.2.3 Caspase-Aktivitäts-Assays

2.2.3.1 Caspase-8-Aktivitäts-Assay mit Zellen

Die Bestimmung der Caspase-8-Aktivität wird durch die Spaltung des Assay-Substrats und der daraus hervorgehenden Lumineszenz in Abhängigkeit detektiert. Durch die Aktivierung von Caspase-8 wird das dazugegebene Assay-Substrat gespalten. Anschließend erfolgt eine Zelllyse, wodurch die aus der Spaltung entstandene Aminoluciferase in den extrazellulären Bereich gelangen kann. Dort kommt es im Beisein von ATP und O₂ zu einem Lumineszenz-Signal, das ausgehend von der Luciferase erzeugt wird. Dieses Lumineszenz-Signal kann von dem Detektor erfasst und dadurch die Menge des Signals bestimmt werden. Das erzeugte Signal ist proportional zu der Menge an vorhandener Caspase-8-Aktivität. Zur Durchführung des Versuchs werden 1,2*10⁵ adhärenente Zellen/ 100 µl pro Vertiefung einer 96-Well-Platte am Vortag des Experiments ausgesät. Für Suspensionszellen werden 2*10⁵ Zellen/ 50 µl pro Vertiefung am selben Tag des Experiments ausgesät. Bei sämtlichen dieser Experimente werden für jede Bedingung Duplikate verwendet. Das Experiment wird in 50 µl frischem Medium mit der spezifischen Stimulationskonzentration durchgeführt. Nach Ende der Stimulationszeit werden 50 µl des Substratgemischs zu jedem Well pipettiert, in dem Messgerät für zwei Minuten geschüttelt und für weitere 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Messung der Lumineszenz-Signale erfolgt mit einem Infinite M200 PRO (Tecan Group AG). Das Hinzufügen des Proteosom-Inhibitors MG132 dient zu der Reduzierung von Hintergrundsignalen. Für die Bestimmung der experimentell bedingten Caspase-8-Aktivität werden die Einzelwerte der Duplikate mit dem Mittelwert normalisiert. Zusätzlich wird die Standardabweichung der normalisierten Werte untereinander bestimmt. Die Caspase-8-Aktivität wird in RU angegeben.

2.2.3.2 Caspase-8-Aktivitäts-Assay mit IP (Immunpräzipitation)

Die IP wird wie in Kapitel 2.2.5.1 durchgeführt. Nachdem der restliche Überstand von den Beads entfernt wurde, werden diese jeweils mit 95 µl CHAPS/HEPES-Puffer versetzt. Der Puffer wird frisch vor der Verwendung angesetzt. Die Beads werden mit Hilfe des Puffers auf eine 96-Well-Platte übertragen. Eine IP entspricht dabei einer Vertiefung. In jede Vertiefung werden zusätzlich 100 µl Caspase-8-Substrat pipettiert und das Lumineszenz-Signal mit Hilfe eines Infinite M200 PRO (Tecan Group AG) gemessen. Die Caspase-8-Aktivität wird in RU angegeben.

2.2.3.3 Caspase-3/7-Aktivitäts-Assay

Die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wird durch die Spaltung des Assay-Substrats und der daraus hervorgehenden Lumineszenz in Abhängigkeit detektiert. Durch die Aktivierung von Caspase-3/7 wird das dazugegebene Assay-Substrat gespalten. Anschließend erfolgt eine Zelllyse, wodurch die aus der Spaltung entstandene Aminoluciferase in den extrazellulären Bereich gelangen kann. Dort kommt es im Beisein von ATP und O₂ zu einem Lumineszenz-Signal, das ausgehend von der Luciferase erzeugt wird. Dieses Lumineszenz-Signal kann von dem Detektor erfasst und dadurch die Menge des Signals bestimmt werden. Das erzeugte Signal ist proportional zu der Menge an vorhandener Caspase-3/7-Aktivität. Zur Durchführung

des Versuchs werden $1,2 \cdot 10^5$ adhärenente Zellen/ 100 μ l pro Vertiefung einer 96-Well-Platte am Vortag des Experiments ausgesäht. Für die Suspensionszellen werden $2 \cdot 10^5$ Zellen/ 50 μ l pro Vertiefung am selben Tag des Experiments ausgesäht. Bei sämtlichen dieser Experimente werden für jede Bedingung Duplikate verwendet. Das Experiment wird in 50 μ l frischem Medium mit der spezifischen Stimulationskonzentration durchgeführt. Nach Ende der Stimulationszeit werden 50 μ l des Substrats zu jedem Well pipettiert, in dem Messgerät für 30 Sekunden geschüttelt und für weitere 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Messung der Lumineszenz-Signale erfolgt mit einem Infitec M200 PRO (Tecan Group AG). Für die Bestimmung der experimentell bedingten Caspase-3/7-Aktivität werden die Einzelwerte der Duplikate mit dem Mittelwert normalisiert. Zusätzlich wird die Standardabweichung der normalisierten Werte untereinander bestimmt. Die Caspase-3/7-Aktivität wird in RU angegeben.

2.2.4 Bestimmung der OCR

$2,5 \cdot 10^6$ MDA-MB- 231 Zellen werden am Vortag in 10 ml Medium auf einer 10 cm-Platte ausgesäht. Am Tag des Experiments wird das alte Medium entfernt und durch 3 ml frischem Medium ersetzt. Die Zellen werden 200 μ g/ml RL2 für acht Stunden stimuliert. Während der Stimulation werden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das alte Medium entfernt und die Zellen mit warmen PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit 1000 μ l Trypsin für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und die gelösten Zellen in zwei neue Tubes transferiert. Durch ein zusätzliches Abwaschen mit 1000 μ l frischem Medium werden auch die restlichen Zellen überführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen für fünf Minuten bei 500 x g wird der Überstand entfernt und das Zellpellet in 500 μ l frischem Medium resuspendiert. Die Messung der OCR (engl. *oxygen consumption rate*/ dt. Sauerstoffverbrauchsrate) erfolgt mit der *Clark-type* Elektrode innerhalb eines *Oxytherm Systems* (Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). Die Messung erfolgt bei 37 °C, weshalb die Zellen dauerhaft temperiert werden müssen. Zellstimulation und -ernte wurden durch Fabian Wohlfromm durchgeführt. Die Messung der OCR wurde von Lado Otrin (Max-Planck-Institut für dynamische Komplexe in technischen Systemen) vorgenommen. Die OCR wird in RU angegeben.

2.2.5 LDH-Assay

Die Bestimmung der LDH (engl. *lactate dehydrogenase*) -Freisetzung wird durch die Spaltung des Assay-Substrats und der daraus hervorgehenden Lumineszenz in Abhängigkeit detektiert. LDH wird in beschädigten Zellen freigesetzt. Dadurch kann es die Oxidation von Laktat katalysieren, wobei gleichzeitig NAD^+ zu NADH durch eine Reduktase beeinflusst wird. Luciferin kann anschließend durch die Reduktase, NADH und das Reduktasesubstrat erzeugt werden. Daraufgehend wird unter Beisein der Ultra-Glo™ rLuciferase und ATP ein biolumineszenz-Signal mit Hilfe der Luciferase erzeugt.

Zur Durchführung des Versuchs werden $1,2 \cdot 10^5$ adhärenente Zellen / 100 μ l pro Vertiefung einer 96-Well-Platte am Vortag des Experiments ausgesäht. Bei sämtlichen dieser Experimente werden für jede Bedingung Duplikate verwendet. Das Experiment wird in 50 μ l frischem Medium mit der spezifischen Stimulationskonzentration durchgeführt. Nach Ende der Stimulationszeit werden 2 μ l Überstand jeder Probe mit 198 μ l LDH-Lagerpuffer vermengt. Der Lagerpuffer wird mit 0,01% BSA am Tag der Messung angereichert. 50 μ l des Gemischs werden mit 50 μ l LDH-Reaktionsgemischs in einem Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Das LDH-Reaktionsgemisch wird wie im Protokoll angegeben vorher zusammen pipettiert. Die 96-

Well-Platte wird danach 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Messung der Lumineszenz-Signale erfolgt mit einem Infitie M200 PRO (Tecan Group AG). Für die Bestimmung der experimentell bedingten LDH-Freisetzung werden die Einzelwerte der Duplikate mit dem Mittelwert normalisiert. Zusätzlich wird die Standardabweichung der normalisierten Werte untereinander bestimmt. Die LDH-Freisetzung wird in RU angegeben.

2.2.6 Protein-Analyse

2.2.6.1 Zellernte, Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Analyse von Proteinen in adhärenenten Zellen werden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in 2 ml frischem Medium auf einer 6-Well-Platte am Vortag ausgesäht. Die Stimulation erfolgt konzentrationsabhängig in einem Volumen von 500 μ l innerhalb eines Inkubators unter Zellkulturbedingungen.

Für die Analyse von Suspensions-Zellen werden am Tag des Experiment $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in 0,5 ml frischem Medium auf einer 6-Well-Platte ausgesäht. Die Stimulation erfolgt konzentrationsabhängig in einem Volumen von 1 ml innerhalb eines Inkubators unter Zellkulturbedingungen. Nach Ablauf der Stimulationszeit werden die Proben auf Eis gestellt und mit 500 μ l (Adhärenente Zellen) oder 1000 μ l (Suspensionszellen) eiskaltes PBS abgestoppt. Die Suspensionszellen können direkt in ein gekühltes 15 ml Tube überführt werden, die Plates werden jeweils mit 1000 μ l eiskaltem PBS nachgespült und ebenfalls in das Tube transferiert. Die adhärenenten Zellen werden durch das Schaben mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein 1,5 ml Tube überführt. Mit 500 μ l eiskaltem PBS wird das Well nachgespült und die Suspension anschließend ebenfalls in das Tube pipettiert.

Die Zellsuspensionen werden bei 500 x g und 4 °C für fünf Minuten gefugt. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein neues 1,5 ml Tube pipettiert und wieder bei 500 x g und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls verworfen und in 25 μ l Lyse-Puffer mit 4 % PIC resuspendiert. Die Zellen werden 30 Minuten auf Eis inkubiert und alle zehn Minuten resuspendiert. Nach der Inkubation wird das Lysat bei 17.000 x g und 4 °C für 15 Minuten abgefugt. Das Lysat wird in ein gekühltes, neues 1,5 ml Tube pipettiert und das Zellpellet verworfen.

Für die Proteinbestimmung wird das Protokoll nach Bradford verwendet. Dazu werden 2 μ l Zelllysat in eine Quarzküvette pipettiert und mit 1 ml Bradford-Substrat vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem Vortexen wird die Mischung in einem Gene Quant 1300 (General Electric) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Durch die Komplexbildung des enthaltenen Farbstoffs mit der Menge der Proteine kommt es zu einer Stabilisierung und Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm. Diese Verschiebung ist gekoppelt an die Menge der Proteine, worüber die Proteinkonzentration erfasst werden kann.

2.2.6.2 SDS-PAGE und Western Blot

Für die Protein-Analyse mit SDS-PAGE und anschließender Western Blot Analyse werden die Gesamtzell-Lysate mit 4x Laemmli-Puffer und Lyse-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 18 μ l gemischt, sodass die Proteinkonzentration 20 μ g/ μ l beträgt. Die Proben werden für fünf Minuten bei 95 °C aufgekocht (Denaturierung und Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur) und danach auf einem 0,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Bei Spannungen zwischen 80 V bis 120 V werden die Proben aufgetrennt, sodass die Proteine ausreichend separiert werden (90-130 Minuten). Durch die zuvor erfolgte Denaturierung ist es

möglich, die Proteine entlang des Spannungsverlaufs in ihr Masse-/ Ladungsverhältnis aufzutrennen. Die negativ geladenen Moleküle wandern dabei in Richtung der Anode entlang des Elektronenflusses. Proteine mit einer niedrigen molekularen Masse wandern in einer höheren Geschwindigkeit, wodurch sie eine größere Strecke innerhalb des Gels zurücklegen. Nach Abschluss der Elektrophorese erfolgt das Western Blot Verfahren nach *semi-dry* Technik mit einem Power Pac™ (HC Biorad laboratories Inc). Die Nitrozellulosemembrane werden vor Beginn in den Transferpuffer (1x aus 5x Tran-Blot Turbo Transfer Buffer, Bio Rad) durchgespült und auf Pufferpapier auf der Graphit-Platte des Geräts platziert. Der Transferpuffer wird wie in dem Protokoll des Kits von Bio Rad angesetzt (Trans-Blot Turbo RTA Mini Transfer Kit, #1704270). Das entnommene Gel wird ohne Luftblasen auf die Membran gelegt und mit Pufferpapier bedeckt. Nach dem Schließen der Kassette wird eine Stromstärke von 2,5 A für zwölf Minuten angelegt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine entlang des Feldes auf die Membran.

Nach Ende des Blot-Vorgangs wird die Membran für eine Stunde in 5 % Milch im PBS-T inkubiert, um die freien Stellen zwischen den Proteinen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wird die Membran dreimal mit 1x PBS-T gewaschen und kann für weitere Anwendungen genutzt werden.

2.2.6.3 Bestimmung der Signalstärke von Western Blot Aufnahmen

Für die Auswertung der Signalstärke wird das Programm ImageLab (Version 5.1) der Firma BioRad verwendet. Die zu quantifizierenden Signale werden auf der Rohaufnahme markiert, sodass nur das spezifische Signal gemessen wird. Die Signalstärke wird von dem Programm automatisch bei gleicher Belichtungszeit und ohne Überbelichtung gemessen. Anschließend werden die einzelnen Proben gegen die Kontrolle (unstimulierte Probe bei Pro-Formen der Proteine; stimulierte Probe bei Spaltprodukten) normiert. Darauffolgend werden die normierten Werte in eine weitere Tabelle übertragen und in das Verhältnis zu den Werten der Ladungskontrolle (z.B. Actin) gesetzt. Dadurch kann eine Tendenz der Signalstärke ermittelt werden.

2.2.6.4 Zelluläre Fraktionierung

Die Fraktionierung der Zellen erfolgt in mehreren Schritten:

1. Schwellschritt
2. Aufplatzen der Zellen
3. Entfernen des Zytosols
4. Entfernen des Nukleus
5. Auffangen der Mitochondrienfraktion

Am Vortag des Experiments werden $2,5 \cdot 10^6$ adhärenente Zellen in 10 ml Medium auf einer 10 cm Platte ausgesäht. Am Tag des Experiments wird das alte Medium entfernt und der Versuch in einem Gesamtvolumen mit 2 ml frischem Medium und der entsprechenden Stimulation durchgeführt. Für die Fraktionierung werden die Puffer frisch mit NP-40 und PIC angesetzt, sodass Puffer A und Puffer C jeweils 4 % PIC enthalten. Zusätzlich wird ein NP-40 auf 1 % durch die Zugabe von Puffer A verdünnt. Nach der Stimulationszeit wird das Medium entfernt. Die Zellen werden mit 5 ml Raumtemperatur warmem PBS gewaschen, welches danach entfernt wird. Danach werden die Zellen mit 1 ml Trypsin und einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C von der Platte gelöst. Anschließend werden die Zellen in ein 2 ml Tube überführt und die Platten mit 0,5 ml eiskaltem PBS nachgespült. Die weiteren Schritte der Fraktionierung erfolgen auf Eis bei 4 °C. Die Zellen werden bei 500 x g für fünf Minuten und 4 °C gefügt, der Überstand wird verworfen und die Zellen mit Hilfe von 0,5 ml eiskaltem PBS in ein 1,5 ml Tube

überführt. Darauffolgend werden die Zellen wieder bei 500 x g und 4 °C für fünf Minuten gefugt. Nach Entfernen des Überstandes erfolgt als erster Schritt das Anschwellen der Zellen. Dazu werden die Zellen mit 500 µl Puffer A (mit 4 % PIC) für fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden jeweils 6 µl des vorverdünnten NP-40 zu den Proben gegeben, durch Pipettieren vermischt und exakt eine Minute auf Eis inkubiert. Danach werden die Proben bei 17.000 x g für eine Minute gefugt und der Überstand in ein neues, vorgekühltes 1,5 ml Tube transferiert. Der Überstand entspricht der Zytosol-Fraktion. Das vorhandene Pellet wird mit 500 µl Puffer A (+4 % PIC) gewaschen und bei 17.000 x g für 15 Sekunden abgefugt. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 40 µl Puffer C (+ 4 % PIC) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wird die Zellsuspension alle zehn Minuten mit einer Pipette durchmischt. Anschließend werden die Proben fünf Minuten bei 4 °C und 17.000 x g gefugt. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Tube transferiert. Dieser Überstand ist die Zytosol-Fraktion. Das Pellet wird zweimal gewaschen indem es in 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert und anschließend bei 17.000 x g eine Minute abgefugt wird. Das Pellet entspricht der Mitochondrien-Fraktion und kann durch Zugabe von 50 µl 1x Laemmli-Puffer und anschließender zehnmütiger Renaturierung (95 °C) für die Western Blot-Analyse verwendet werden. Die Proteinkonzentrationen der fertigen Zytosol- und Nukleus-Fraktionen können durch das Bradford-Assay bestimmt werden (siehe Kapitel 2.2.4.1). Alle Fraktionen werden wie in Kapitel 2.2.4.2 und 2.2.4.4 beschrieben analysiert.

Die Fraktionierung von Suspensionszellen erfolgt nach dem gleichen Protokoll, jedoch werden am Tag des Experiments $2,5 \cdot 10^6$ Zellen pro 10 cm Platte in 10 ml Medium ausgesät. Eine Trypsinierung ist nicht erforderlich, stattdessen werden die Zellen in 50 ml Tubes transferiert und die Platten mit 10 ml eiskaltem PBS nachgespült. Die Zellen werden ebenfalls für fünf Minuten bei 4 °C und 500 x g abgefugt. Die darauffolgenden Schritte sind identisch zu dem Protokoll mit adhärenenten Zellen.

2.2.6.5 Protein-Detektion und -Analyse

Nach dem Blocken der Membran durch Blocking-Puffer (5 % Milch in PBS) wird die Membran dreimal mit 1x PBS-T gespült, wodurch der restliche Blocking-Puffer entfernt wird. Anschließend wird die Membran mit Primäantikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Je nach Protokoll werden die Antikörper spezifisch in PBS-T oder TBS-T mit 10 % NaNO₃ verdünnt. Vorbereitend werden die Membranen zuvor in 1x PBS-T oder 1x TBS-T gereinigt. Nach der Inkubation werden die überschüssigen Antikörper durch dreimaliges Spülen mit 1x TBS-T oder 1x PBS-T entfernt. Anschließend wird die Membran für ein bis zwei Stunden mit 5 % Milch (in TBS-T oder PBS-T) und dem spezifischen Sekundäantikörper inkubiert. Danach werden die Membranen wieder dreimal mit 1x PBS-T/ TBS-T gespült.

Für die Detektion der Proteine wird die Membran mit 1 ml Lumineszenz-Substrat (Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore™)) beträufelt.

Das Detektionsprinzip beruht auf der Immunmarkierung durch indirekte Chemolumineszenz. Über die spezifische Bindung des Primäantikörpers an das membrangebundene Protein durch dessen Epitop kann ein weiterer Antikörper an den Primäantikörper binden und dadurch auch indirekt an das Protein. Der Sekundäantikörper besitzt eine Kopplung für HRP (engl. *horseradish peroxidase*), wodurch das Substrat gespalten werden kann. Die Spaltung setzt unter einer Chemolumineszenzreaktion Licht frei, welches erfasst und detektiert werden kann. Dabei wird unter anderem die Intensität des Lichtsignals detektiert, wodurch sowohl qualitative als auch quantitative Analysen möglich sind. Die Lage der Signale wird über einen Lade-Marker bestimmt und die Masse in kDa (Kilo Dalton) angegeben.

2.2.7 IP (Immunpräzipitation)

2.2.7.1 Protokoll 1

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen bzw. von Peptid-Protein-Interaktionen werden IP verwendet. Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration wird gemessen. Anschließend wird die gleiche Proteinkonzentration für alle Proben in einem neuen 1,5 ml Tube pipettiert und mit Lysepuffer vermengt. Nachfolgend wird die spezifische Konzentration des Antikörpers und 10 µl Beads zu dem Lysat dazu pipettiert. Für die Kontrolle, ob die Interaktionen spezifisch sind, werden jeweils Proben mit reinen Beads und Lysat verwendet. Die Bindung unspezifischer Proteine kann dadurch überprüft werden. Alle Proben werden über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert, sodass die Beads an dem Grund des Tubes abgelagert werden. Das Lysat wird aspiriert und die Beads mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Durch das mehrfache Resuspendieren in 1x PBS-T und Abzentrifugieren werden leichtgebundene Proteine entfernt. Dieser Schritt wird insgesamt sechs Mal durchgeführt und die Beads anschließend durch das Entfernen des Rest-Puffer mit Hilfe einer 50 µl Hamilton Pipette trockengelegt. Anschließend werden die Proben bei -20 °C eingefroren, in 40 µl 1x Laemmli-Puffer aufgekocht und wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben für die Analyse verwendet.

2.2.7.2 Protokoll 2

Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben lysiert und die Proteinkonzentration wird bestimmt. Bei jeder Probe wird die gleiche Proteinkonzentration mit dem gleichen Volumen verwendet. Anschließend wird die spezifische Menge Antikörper zu dem Lysat pipettiert und die Proben über Nacht bei 4 °C und kontinuierlicher Rotation inkubiert. Zusätzlich werden Bead-Kontrollen erzeugt, die wie die übrigen Proben behandelt werden. Am nächsten Morgen werden 10 µl Beadlösung zu der Lysat-Antikörper-Suspension pipettiert und für zwei Stunden bei 4 °C und kontinuierlicher Rotation inkubiert. Anschließend werden die Proben fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert, sodass die Beads an dem Grund des Tubes abgelagert werden. Das Lysat wird aspiriert und die Beads mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Durch das mehrfache Resuspendieren in 1x PBS-T und Abzentrifugieren werden leichtgebundene Proteine entfernt. Dieser Schritt wird insgesamt sechs Mal durchgeführt und die Beads anschließend durch das Entfernen des Rest-Puffer mit Hilfe einer 50 µl Hamilton Pipette trockengelegt. Anschließend werden die Proben bei -20 °C eingefroren oder in 40 µl 1x Laemmli-Puffer aufgekocht und wie in Kapitel 2.2.4 dargestellt für die Analyse verwendet.

2.2.7.3 Protokoll 3/ Protein Pulldown

Mit Hilfe des Pierce™-Co-IP Kits können Antikörper und Peptide kovalent an Protein A-Sepharose Beads gebunden werden. Das Peptid wird wie im Protokoll des Kitsatzes beschrieben an die Protein A-Sepharose Beads gebunden. Dieser Schritt erfolgt am Vortag des Experiments. Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.3 dargestellt lysiert und die Proteinkonzentration wird bestimmt. Bei jeder Probe wird die gleiche Proteinkonzentration mit dem gleichen Volumen verwendet. Für die Kontrolle ob die Interaktionen spezifisch sind, werden jeweils Proben mit reinen Beads und Lysat verwendet. Die Bindung unspezifischer Proteine kann dadurch überprüft werden. Die Proben werden über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert, sodass die Beads an dem Grund des Tubes abgelagert werden. Das Lysat

wird aspiriert und die Beads mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Durch das mehrfache Resuspendieren in 1x PBS-T und Abzentrifugieren werden leichtgebundene Proteine entfernt. Dieser Schritt wird insgesamt sechs Mal durchgeführt. Innerhalb des letzten Wasch-Schrittes werden die Beads in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Die Beads werden abzentrifugiert und anschließend durch das Entfernen des Rest-Puffer mit Hilfe einer 50 µl Hamilton Pipette trockengelegt. Anschließend werden die Proben bei -20 °C eingefroren oder in 40 µl 1x Laemmli-Puffer aufgeköcht und wie in Kapitel 2.2.4 erläutert für die Analyse verwendet. Neben der Western Blot Analyse können die Proben auch massenspektrometrisch analysiert werden (siehe Kapitel 2.2.6).

2.2.7.4 Protokoll 4/ Co-IP (Co-Immunpräzipitation)

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen bzw. von Peptid-Protein-Interaktionen werden Co-IP verwendet. Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration wird gemessen. Anschließend wird die gleiche Proteinkonzentration für alle Proben in einem neuen 1,5 ml Tube pipettiert und mit Lysepuffer vermengt. Der Antikörper wird wie im Protokoll des Kitsatzes beschrieben an die Protein A-Sepharose Beads gebunden. Dieser Schritt erfolgt am Vortag des Experiments. Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.3 dargestellt lysiert und die Proteinkonzentration wird bestimmt. Bei jeder Probe wird die gleiche Proteinkonzentration mit dem gleichen Volumen verwendet. Für die Kontrolle, ob die Interaktionen spezifisch sind, werden jeweils Proben mit reinen Beads und Lysat verwendet. Die Bindung unspezifischer Proteine kann dadurch überprüft werden. Alle Proben werden über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Am nächsten Tag werden die Proben fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert, sodass die Beads an dem Grund des Tubes abgelagert werden. Das Lysat wird aspiriert und die Beads mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Durch das mehrfache Resuspendieren in 1x PBS-T und Abzentrifugieren werden leichtgebundene Proteine entfernt. Dieser Schritt wird insgesamt sechs Mal durchgeführt. Innerhalb des letzten Wasch-Schrittes werden die Beads in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Die Beads werden abzentrifugiert und anschließend durch das Entfernen des Rest-Puffer mit Hilfe einer 50 µl Hamilton Pipette trockengelegt. Anschließend werden die Proben bei -20 °C eingefroren oder in 40 µl 1x Laemmli-Puffer aufgeköcht und wie in Kapitel 2.2.4 erläutert für die Analyse verwendet. Neben der Western Blot Analyse können die Proben auch massenspektrometrisch analysiert werden (siehe Kapitel 2.2.6).

2.2.7.5 Protokoll 5/ Denaturierungs IP

Die IP erfolgt nach einer vorherigen Denaturierung der Proben. Nachfolgend werden diese IP Den.-IP genannt (Denaturierungs-IP). Für die Durchführung werden die Zellen wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben lysiert. Anschließend werden sie mit 10 % SDS versetzt, sodass eine finale Konzentration von 1 % SDS vorliegt. Darauf folgend werden die Proben fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Dadurch werden aneinanderbindende Proteine voneinander getrennt und PTM verbleibt an den Proteinen. Nach der Denaturierung erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentration. Bei jeder Probe wird die gleiche Proteinkonzentration mit dem gleichen Volumen verwendet. Anschließend wird die spezifische Menge Antikörper zu dem Lysat pipettiert und die Proben über Nacht bei 4 °C und kontinuierlicher Rotation inkubiert. Am nächsten Morgen werden 10 µl Beadlösung zu der Lysat-Antikörper-Suspension pipettiert und für zwei Stunden bei 4 °C und kontinuierlicher Rotation inkubiert. Für die Kontrolle, ob die Interaktionen spezifisch sind, werden jeweils Proben mit reinen Beads und Lysat verwendet. Diese Kontrollproben werden exakt wie die übrigen Proben behandelt. Anschließend werden die Proben fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert, sodass die Beads an dem Grund des

Tubes abgelagert werden. Das Lysat wird aspiriert und die Beads mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Durch das mehrfache Resuspendieren in 1x PBS-T und Abzentrifugieren werden leichtgebundene Proteine entfernt. Dieser Schritt wird insgesamt sechs Mal durchgeführt und die Beads anschließend durch das Entfernen des Rest-Puffer mit Hilfe einer 50 µl Hamilton Pipette trockengelegt. Anschließend werden die Proben bei -20 °C eingefroren oder in 40 µl 1x Laemmli-Puffer aufgekocht und wie in Kapitel 2.2.4 dargestellt für die Analyse verwendet.

2.2.8 Massenspektrometrische Analyse

Die in Kapitel 2.2.5 eingefrorenen Proben werden für die Analyse mit Hilfe von MS (Massenspektrometrie) verwendet. Die Durchführung der MS-Messung und -Analyse erfolgt durch Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Magdeburg, Massenspektrometrie).

Die MS-Analyse erfolgt durch die Bildung von Ionen aus der Probe, der Auftrennung der erzeugten Ionen und einer anschließenden Messung des Masse-/ Ladungsverhältnisses. Für die Analyse der Proben wurde das Verfahren der LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) mit nachgeschalteter Ionenfalle verwendet. Die Ionisation erfolgt anhand einer ESI (Elektrospray-Ionisation) und dabei innerhalb eines elektrischen Feldes unter atmosphärischem Druck, indem die Flüssigkeit der Proben durch eine Stahlkapillare in Mikrotröpfchen zerstäubt wird und das Lösungsmittel entlang des elektrischen Feldes verdampft. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Ladung innerhalb des Tröpfchens bis hin zur Stabilitätsgrenze, auch Rayleigh-Limit genannt. Dies ermöglicht die Abstoßung gleicher Ladungen, wodurch Coulomb-Explosionen hervorgerufen werden. Dabei werden die Tröpfchen immer weiter verkleinert, bis sie einen Durchmesser von wenigen Nanometern erreichen. Die gebildeten Ionen werden nachfolgend in der Ionenfalle analysiert. Eine Ionenfalle besteht aus zwei Ringelektroden und zwei Endkappen. Die Analyse erfolgt indem die Ionen durch das Anlegen einer Frequenz zu Schwingungen auf einer stabilen Kreisbahn entlang des elektrischen Feldes verleitet werden. Ein unterschiedlich großes Masse-/ Ladungsverhältnis führt dabei zu individuellen Kreisbahnen. Durch spezifische Frequenzänderungen können die Kreisbahnen verändert und dadurch die Ionen zielgerichtet isoliert werden.

Die nachfolgende Detektion führt zu genauer Erfassung des Masse-/ Ladungsverhältnisses. Anhand der *Coverage* Σ kann die Güte und Wertigkeit der erfassten Proteine bestimmt werden, indem der angegebene Wert die Übereinstimmung zwischen gemessenen Peptiden und einer Datenbank zeigt. Ein hoher Wert entspricht einer hohen Übereinstimmung der spezifischen Peptide mit der Datenbank.

2.2.9 Quantitative Zelltod-Analyse durch bildgebende Durchflusszytometrie

Am Vortag des Experiments werden $6,5 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Für das Experiment wird das alte Medium entfernt und der Versuch mit spezifischen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wird der Überstand in ein gekühltes 2 ml Tube transferiert, die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend ebenfalls in dasselbe Tube transferiert. Die Zellen werden durch die Zugabe von 500 µl Trypsin und fünfminütiger Inkubation bei 37 °C von der

Platte gelöst und ebenfalls in das Tube pipettiert. Anschließend werden die Zellen bei 4 °C behandelt und fünf Minuten bei 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird aspiriert und die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach fünfminütigem Abzentrifugieren bei 500 x g und Entfernen des Mediums werden die Zellen durch Zugabe von Zellfarbstoff und 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur eingefärbt. Die Färbung erfolgt dabei mit Hilfe der Färbesubstanzen aus Tabelle 15. Für die Färbung wird PI 1:30 vorverdünnt. Anschließend werden für jede Probe 1,4 µl der vorverdünnten PI-Färbung mit 5 µl Annexin V FITC in 70 µl Puffer vermengt. Für die Kompensationsproben werden 1,4 µl vorverdünnte PI-Färbung oder 5 µl Annexin V FITC mit 70 µl Puffer gemischt und wie beschrieben mit den Zellen inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen bei 500 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, der Überstand aspiriert und das Zellpellet in 100 µl *Binding Buffer* resuspendiert. Zuvor wird das Messgerät AMNIS (mittlerweile Luminex Corporation, Austin, USA) vorbereitet und kalibriert. Mit Hilfe des Programms FlowSight (mittlerweile Luminex Corporation, Austin, USA) werden die Zellen bzw. die Fluoreszenzsignale bei Wellenlängen von 488 nm und 541 nm detektiert. Pro Probe werden 10.000 Zellen gemessen, dabei bleiben die Einstellungen (z.B. Durchflussgeschwindigkeit, Laserintensität) nach der einmaligen Einstellung für die erste Probe unverändert. Die gemessenen Daten werden mit Hilfe des Programms IDEAS (Version 6.2) (Merck KGaA, Billerica, USA) analysiert, wobei eine Kompensationsprobe als Grundlage dient und danach die Einstellungen angepasst werden. Anschließend werden diese Einstellungen auf alle weiteren Proben übertragen und eine prozentuale Auswertung vorgenommen. Für die Analyse können die prozentualen Messwerte der Proben verwendet werden oder diese entgegen der unstimulierten Probe normiert werden, um die Effekte der Stimulation auf den Zelltod zu verdeutlichen.

Die Hinweise auf Zelltod-Prozesse werden mit Hilfe der beiden oben genannten Farbstoffe Annexin V FITC und PI erfasst. Dabei kann Annexin V FITC an das Phosphatidylserin binden, welches normalerweise an der Innenseite der Zellmembran angelagert ist. Annexin V FITC kann nicht in die Zelle gelangen. Durch die Induktion der Apoptose wird Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran freigelegt, Annexin V FITC kann dort binden und gemessen werden. Der Farbstoff PI hingegen bindet direkt an der DNA, kann allerdings nur durch Schäden an der Membran in die Zelle gelangen. Diese Membranschädigungen erfolgen vor allem in späten apoptotischen und frühen nekrotischen Ereignissen [27].

2.2.10 Caspase-8-Transfektion in HeLa-CD95-C8-KO Zellen

Für die Untersuchung der Caspase-8 werden pcDNA3-Caspase-8a (WT, R233H und R435Q) in HeLa-CD95-C8-KO Zellen transfiziert (HeLa-CD95-Caspase-8 *Knockout*). Die HeLa-CD95-C8-KO Zellen wurden von Corinna König (Translationale Entzündungsforschung, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg) mit Hilfe des CRISPR/ Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated*) -Verfahrens aus HeLa-12 Zellen modifiziert. Die AS wurden in silico durch Dr. rer. nat. Nikita Ivanisenko (Translationale Entzündungsforschung, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg) bestimmt. Die Mutationen wurden durch die Firma Genscript in der pcDNA3-Caspase-8a eingeführt.

Es handelt sich um Mutationen an potenziellen Stellen für die posttranslationale Modifikationen R233H und R435Q von Procaspase-8a. Als Kontrolle für den Einfluss der Transfektion wird ein Vektor verwendet, der keine Plasmide enthält. Die verwendeten Plasmide sind:

- pcDNA3 (Addgene, MA, USA), nachfolgend Vektor genannt
- Procaspase-8a-R233H (GenScript Biotech Corp; USA); nachfolgend R233H genannt
- Procaspase-8a-R435Q (GenScript Biotech Corp; USA); nachfolgend R435Q genannt
- Procaspase-8a WT (11816 *wild-type*) (Addgene, MA, USA); nachfolgend WT genannt

Für die Transfektion werden am Vortag $1 \cdot 10^6$ Zellen in 10 ml Medium auf einer 10 cm-Platte ausgesät. 24 μ l DreamFect-Gold (OZBIOSCIENCES, San Diego USA) werden mit 250 μ l OPTIMEM (Gibco™, USA) vorverdünnt. 2 μ g jedes Plasmids (Vektor, R233H, R435Q, WT) werden jeweils mit 250 μ l OPTIMEM vorverdünnt und anschließend mit dem DreamFect-Gold-Gemisch vermengt. Danach wird das DNA-DreamFect-Gold-OPTIMEM-Gemisch 20 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wird das verbrauchte Medium aspiriert und 8 ml frisches, antibiotikafreies Medium auf die Zellen pipettiert. Nach der 20-minütigen Inkubation wird das DNA-DreamFect-Gold-OPTIMEM-Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert, sodass es auf der ganzen Platte gleichmäßig verteilt wird. Die Zellen werden zwei Stunden inkubiert. Anschließend werden alle transfizierten Zellen jeweils mit 100 μ M zVAD stimuliert. Die Zellen werden weitere 22 Stunden kultiviert.

Für kleinere Versuche werden die Zellen innerhalb von 6-Well-Platten transfiziert. Am Vortag werden $0,25 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Medium pro Well ausgesät. 4 μ l DreamFect-Gold (OZBIOSCIENCES, San Diego USA) werden mit 100 μ l OPTIMEM (Gibco™, USA) vorverdünnt. 0,5 μ g jedes Plasmids (Vektor, R233H, R435Q, WT) werden jeweils mit 100 μ l OPTIMEM vorverdünnt und anschließend mit dem DreamFect-Gold-Gemisch vermengt. Danach wird das DNA-DreamFect-Gold-OPTIMEM-Gemisch 20 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wird das verbrauchte Medium aspiriert und 2 ml frisches, antibiotikafreies Medium auf die Zellen pipettiert. Anschließend werden die Zellen wie zuvor beschrieben weiter behandelt und verwendet. Sowohl in 6-Well-Platten, als auch in 10 cm-Platten wird die gleiche Menge Plasmid pro Zellpopulation verwendet (2 μ g / $1 \cdot 10^6$ Zellen).

Für die Überprüfung des KO wird eine Platte mit Hela-CD95-C8-KO nicht transfiziert, aber ansonsten gleichbehandelt. Nach Ablauf der restlichen Inkubation können die Zellen wie in den oberen Kapiteln beschrieben für Versuche verwendet werden.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 8.3.0). Für die statistische Überprüfung des gesamten Datensatzes wird ein ordinary one-way ANOVA Test durchgeführt. Die Überprüfung zweier Datensätze miteinander erfolgt anschließend anhand eines Tukey-Tests. Für den Vergleich eines Experiments mit nur zwei Variablen wird der unpaired student t-test verwendet. Die verwendeten Methoden werden in den einzelnen Abbildungen benannt. *p-Values* basieren auf der folgenden Einteilung: ns (not significant; $p > 0.05$), * (significant; $p \leq 0.05$), ** (significant; $p \leq 0.01$), *** (significant; $p \leq 0.005$), **** (significant; $p \leq 0.001$).

2.2.12 Berechnung des IC₅₀-Wertes und CI (Combinatorial Index)

Der Wert von IC₅₀ gibt die mittlere inhibitorische Konzentration einer Substanz an. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes wird eine Dosis-Wirkungskurve mit Hilfe einer Konzentrationsreihe bestimmt. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.3.0), dabei werden nicht logarithmierte Konzentrationen verwendet. Gleichzeitig wird der R²-Wert bestimmt, welcher die Güte der berechneten Dosis-Wirkungskurve angibt. Dabei liegt eine hohe Güte durch Annäherung an den Faktor 1 vor. Mit Hilfe des IC₅₀-Wertes können Isobogramme nach Loewe bestimmt werden [288]. Die jeweiligen IC₅₀-Werte zweier Stimulanzen werden auf die Achsen aufgetragen und erzeugen daher einen Grenzbereich in denen die Stimulanzen synergetische, additive oder antagonistische Effekte aufweisen. Darüber hinaus können die CI beider Stimulanzen bestimmt werden. Die Formel nach Loewe lautet:

$$\text{lautet: } \frac{\text{Dosis A}}{\text{IC}_{50} \text{ A}} + \frac{\text{Dosis B}}{\text{IC}_{50} \text{ B}} = 1$$

Zusätzlich kann der CI anhand von gemessenen Werten bestimmt werden. Dabei wird der CI anhand der *response additivity (ra)* berechnet und wie folgt klassifiziert: CI > 1 (antagonistisch); CI = 1 (additiv); CI < 1 (synergetisch) [288]. Dieser CI nach *response additivity* wird im folgenden CI_{ra} genannt. Die *response additivity* berechnet sich aus der Summe der Effekte der jeweiligen Einzeldosen in Kontrast zu dem Effekt aus der Co-Stimulation [288]. Die Berechnung wird mit folgender Formel durchgeführt:

$$\text{CI}_{\text{ra}} = \frac{\text{Effekt Dosis A} + \text{Effekt Dosis B}}{\text{Effekt Dosis AB}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Caspase-8 auf eine bisher nicht identifizierte PTM

An Caspase-8 konnten bereits diverse PTM entdeckt werden, die einen Einfluss auf das Protein und dessen Aktivität besitzen (siehe Kapitel 1.3). Jedoch konnten nicht alle PTM mit einem Bezug auf Caspase-8 erfasst werden. In diesem Kapitel soll daher ein weiteres potenzielles PTM dahingehend untersucht werden, ob es gegebenenfalls einen Einfluss auf Caspase-8 hat. Dazu wird zusätzlich die etwaige Caspase-8-Interaktion mit den entsprechenden Enzymen des potenziellen PTM untersucht. Diese Dissertation konzentriert sich auf den Einfluss von Caspase-8 auf den Zelltod, weshalb der Effekt des potenziellen PTM auf die Caspase-Kaskade untersucht wird.

3.1.1 Potenzielles Zusammenspiel zwischen Caspase-8 und dem PRMT5-Komplex

Zum Zweck der Interaktionsuntersuchung werden Caspase-8-Co-IP mit Lysaten von unstimulierten und CD95L-stimulierten Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 12) (siehe Kapitel 2.2.5.4). Die SKW 6.4 Zellen werden 15 Minuten mit 166 ng/ml CD95L stimuliert und anschließend lysiert. Das Lysat dient als Grundlage für die Co-IPs (siehe Abbildung 12A, 12C, Caspase-8-Co-IP). Zuvor wird der spezifische anti-Caspase-8-Antikörper an Beads des Co-IP-Kits nach dem beigefügten Protokoll gekoppelt. Zusätzlich werden CD95-Co-IP durchgeführt (siehe Abbildung 12B). Dabei wird sowohl für die Caspase-8-Co-IP als auch für die CD95-Co-IP das gleiche Lysat verwendet. Anschließend können die Co-IP mit verschiedenen Methoden analysiert werden.

Eine Methode der Co-IP-Analyse ist die MS (siehe Kapitel 2.2.8). Dabei können Peptide und Proteine erfasst werden, die mutmaßlich mit Caspase-8 interagieren. Da die massenspektrometrischen Analysen mit Hilfe einer Caspase-8-Co-IP durchgeführt werden, besitzt Caspase-8 als detektiertes Protein die höchste *Coverage* in unstimulierter und stimulierter Probe (siehe Abbildung 12A). Allerdings sind auch Proteine des PRMT5-Komplexes mit einer hohen *Coverage* (Σ) gemessen worden (PRMT5 (42,7 Σ); WD45 (36,84 Σ); RIOK1 (34,51 Σ)). Diese Komplexmitglieder können ebenfalls nach einer CD95L-Stimulation an Caspase-8-Co-IP detektiert werden, wobei ihre *Coverage* fast unverändert bleibt (siehe Abbildung 12A). Neben PRMT5 kann ebenfalls PRMT1 an Caspase-8-Co-IP in beiden Proben detektiert werden, welches ebenfalls Mitglied der PRMT-Familie ist. Die Analyse durch MS zeigt, dass der PRMT5-Komplex mit den Mitgliedern PRMT5, WD45 und RIOK1 möglicherweise mit Caspase-8 interagieren kann. Dies konnte sowohl nach einer CD95L-Stimulation als auch unstimuliert festgestellt werden (siehe Abbildung 12A). Andere Komponenten des PRMT5-Komplexes, beispielsweise das Protein pICln, können nicht detektiert werden. Dieser beschriebene Versuch wurde von Dr. rer. nat. Sabine Pietkiewicz (Translationale Entzündungsforschung, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg) durchgeführt und von Prof. Dr. Thilo Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Magdeburg, Massenspektrometrie) analysiert. Ähnliche Effekte können nach einer CD95-Co-IP beobachtet werden (siehe Abbildung 12B). Dabei können sowohl vor als auch nach einer

CD95L-Stimulation die mutmaßlichen Signale von Komponenten des PRMT5-Komplexes detektiert werden.

Um die vorherige massenspektrometrische Untersuchung zu validieren, werden zusätzliche Analysen mit Hilfe des Western Blot Verfahrens mit verschiedenen Co-IP (siehe Kapitel 2.2.5.4) und IP (siehe Kapitel 2.2.5.1) durchgeführt. In den Versuchen der massenspektrometrischen Analysen der Caspase-8-Co-IP und CD95 Co-IP werden jeweils die gleichen Lysate verwendet: eine unstimulierte Probe sowie eine Probe mit 15 Minuten 166 ng/ml CD95L-Stimulation. Die verwendeten Lysate werden als Kontrolle gewertet (siehe Abbildung 12C, Input). Innerhalb des Lysats ist zu erkennen, dass die potenziellen Signale von PRMT5, RIOK1, WD45 und FADD über die Zeit der Stimulation leicht abnehmen. Gleiches gilt für Procaspase-8a/b, dessen typisches Doppelsignal zur Stimulation leicht abnimmt. Dieser Effekt kann durch die Formierung des DISC und einer einhergehenden Spaltung erklärt werden, selbst wenn keine Caspase-8 Spaltprodukte detektiert werden. Innerhalb der Caspase-8-Co-IP können FADD Signale erfasst werden. Diese Signale können auf die Formierung des DISC hindeuten, zusätzlich aber auch auf andere Komplexe wie Komplex II. Die unstimulierte Probe innerhalb der Caspase-8-Co-IP weist ein schwaches FADD-Signal auf, jedoch ist eine Zunahme des Signals nach 30 Minuten der Stimulation sowie ein weiterer, verstärkter Anstieg nach 60 Minuten möglich. Potenzielle Signale der Mitglieder des PRMT5-Komplexes (PRMT5, WD45 und RIOK1) werden ebenfalls mit den stärksten Signalen nach 60 Minuten Stimulation detektiert. In unstimulierten Proben sind dagegen schwächere Signale sichtbar. Insgesamt ist der Anstieg aller Signale ebenfalls an Procaspase-8 zu sehen. Dieser Anstieg nimmt über die Zeit zu. Dies ist durch unterschiedliche Mengen des gebundenen Antikörpers an die Beads möglich. Mögliche Signale einer Mono-Methylierung von Caspase-8 sind nicht detektierbar. Die vorhandenen Signale des Mono-Methylierungs Antikörpers werden in allen Proben detektiert, teilweise innerhalb der Bead-Kontrolle (siehe Abbildung. 12C). Für eine Untersuchung der etwaigen Interaktionen werden PRMT5-Co-IP durchgeführt (siehe Abbildung 12D) (siehe Kapitel 2.2.5.4). Es konnten innerhalb der PRMT5-Co-IP potenzielle Signale von WD45 detektiert werden. Des Weiteren konnten wahrscheinliche Procaspase-8-Signale erfasst werden, diese nehmen mit der CD95-Stimulation ab. Somit konnten Hinweise auf eine etwaige Interaktion zwischen Caspase-8 und Mitgliedern des PRMT5-Komplexes erfasst werden. Nachdem erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem PRMT5-Komplex und Caspase-8 beobachtet werden konnten, soll als nächstes überprüft werden, ob potenzielle Caspase-8 Signale innerhalb einer IP mit spezifischem Mono-Methylierungsantikörper detektierbar sind (siehe Kapitel 2.2.5.1). Die Methyltransferase PRMT5 führt zu Mono- und Di-Methylierungen (siehe Kapitel 1.3.2). Daher soll als erstes die mögliche Mono-Methylierung von Caspase-8 untersucht werden. Die Überprüfung der Monomethylierung erfolgt mit Hilfe einer IP mit einem anti-Mono-Methyl-Arginin-Antikörper (MMA-IP) (siehe Abbildung 12E). Signale der Mitglieder des PRMT5-Komplexes konnten an der IP detektiert werden. Jedoch können keine potenziellen Signale von Caspase-8, FADD oder Caspase-10 erfasst werden. Auch spezifische Methylierungssignale können nicht in der Caspase-8-Co-IP detektiert werden (siehe Abbildung 12C). Somit sind diese Proteine wahrscheinlich nicht mono-methyliert bzw. es konnte keine Mono-Methylierung der DISC-Proteine detektiert werden.

Insgesamt können innerhalb dieser Versuche erste Hinweise auf eine potenzielle Interaktion zwischen Mitgliedern des PRMT5-Komplexes und Caspase-8 erfasst werden. Eine mögliche Abhängigkeit spezifisch zu einer CD95L-Stimulation ist nicht messbar gewesen. Zusätzlich ist die mutmaßliche Interaktion zwischen beiden Komponenten schwächer als die bereits erfasste

und etablierte FADD-Caspase-8 Interaktion, die mit der Formierung des DISC oder von Komplex II einhergeht. Eine etwaige Mono-Methylierung von Caspase-8 kann ebenfalls nicht erfasst werden.

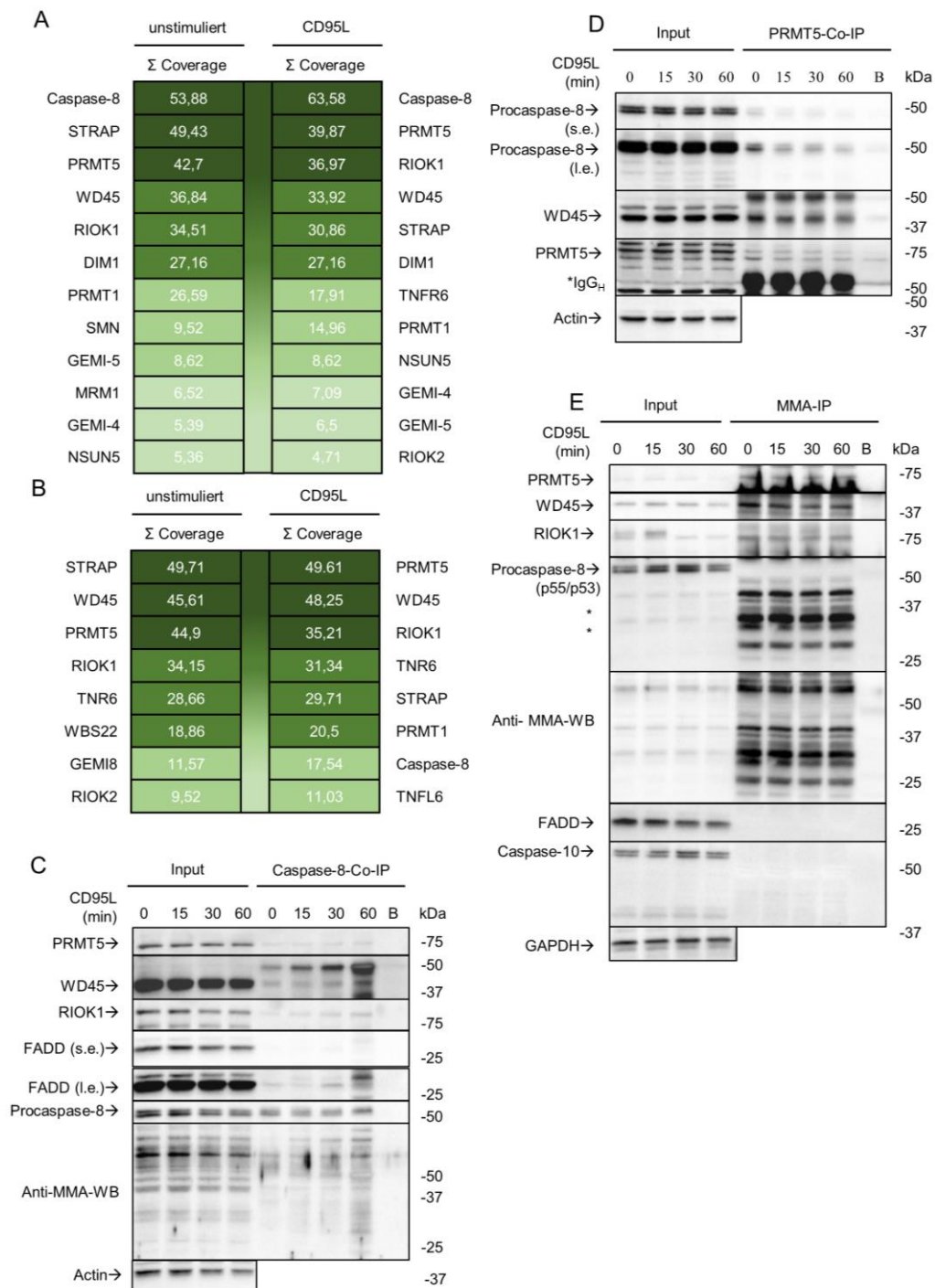


Abbildung 12 Interaktion zwischen Procaspase-8 und dem PRMT5-Komplex: SKW 6.4 Zellen werden mit 166 ng/ml CD95L für 15 Minuten (A), (B) oder die angegebene Zeit (C-E) stimuliert. Die angegebene Zeit (min) entspricht Minuten. Das Zelllysate (Input) wird einer Co-IP mit anti-Caspase-8-Antikörper (A), (C); anti-CD95-Antikörper (B); PRMT5-Antikörper (D) oder einfacher IP mit MMA-Antikörper (E) unterzogen. Sowohl Lysat als auch Co-IP werden dargestellt. Die Bead-Kontrolle wird durch „B“ markiert. Für Procaspase-8 werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ short exposure) als auch längere Belichtungen (l.e./ long exposure) gezeigt. Analyse der Caspase-8-Co-IP und der CD95-IP mit Hilfe der massenspektrometrischen Methode. Durchgeführt von Dr. rer. nat. Sabine Pitkiewicz (Translationale Entzündungsforschung) und Prof. Dr. Thilo Kühne (Institut für Experimentelle Innere Medizin, Magdeburg, Massenspektrometrie) (A) (B). Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs von drei unabhängigen Untersuchungen (A-E). Die verschiedenen IP und Co-IP erfolgen anhand nachfolgender Protokolle: A-D: Co-IP nach Protokoll 4, siehe Kapitel 2.2.7.4; E: IP nach Protokoll 1, siehe Kapitel 2.2.7.1. (D) Die Heavy-Chain des Antikörpers wird mit Ig_H markiert. Abkürzung: IP: Immunpräzipitation; Co-IP: Co-Immunpräzipitation; MMA: Mono-Methyl-Arginin; s.e.: short exposure; l.e.: long exposure. Unspezifische Signale werden mit „*“ markiert.

3.1.2 Potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8

Nachdem Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen PRMT5 und Caspase-8 detektiert werden konnten, wird anschließend der Methylierungs-Status überprüft. Eine etwaige Mono-Methylierung konnte durch fehlende Signale innerhalb einer MMA-IP nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 12E). Aus diesem Grund wird der potenzielle symmetrische Di-Methylierungs-Status überprüft, da PRMT5 ebenfalls diese Methylierung ermöglicht, nicht jedoch eine asymmetrische Di-Methylierung (siehe Kapitel 1.3.2).

Unstimulierte Proben und Proben, die eine Stunde mit 250 ng/ml CD95L stimuliert werden, werden für IP verwendet, bei denen ein spezifischer Antikörper für symmetrische Di-Methylierungen verwendet wird (engl. *anti-dimethyl-arginine Antibody, symmetric* (nachfolgend SYM-10 genannt)) (siehe Kapitel 2.2.5.2) (siehe Abbildung 13). Dabei können keine etwaigen Caspase-8 Signale in der unstimulierten Probe detektiert werden. Jedoch werden potenzielle Caspase-8 Spaltprodukte p43 und p41 sowie p18 nach einer CD95L-Stimulation in der SYM-10-IP detektiert (siehe Abbildung 13A, zweite Spalte). Zusätzlich können auch potenzielle Signale von Procaspase-8 an der SYM-10-IP erfasst werden (siehe Abbildung 13). Allerdings werden nur mutmaßliche Caspase-8 (p43/ p41 und p18) –Signale innerhalb der SYM-10-IP beobachtet.

Anhand des Inputs kann die Spezifität der detektierten Signale innerhalb der IP überprüft werden (siehe Abbildung 13B). Procaspase-8a/b kann als Doppelbande innerhalb des Inputs detektiert werden. Nach der CD95L-Stimulation kommt es zur Spaltung von Procaspase-8a/b in seine Spaltprodukte p43/ p41, sowie p18 (siehe Abbildung 13B). Die erfassten Banden stimmen dabei mit den Bereichen innerhalb der IP überein.

Für die Überprüfung der eventuellen Caspase-8-Aktivität an der SYM-10 IP wird ein Aktivitäts-Assay mit Beads der SYM-10 IP durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.5.2). Dabei kann beobachtet werden, dass die gemessene Aktivität von Caspase-8 nach einer CD95L-Stimulation an der SYM-10 IP steigt (siehe Abbildung 13C). Das Aktivitäts-Assay verdeutlicht daher, dass die Caspase-8 Spaltprodukte an der SYM-10 IP zusätzlich katalytisch aktiv sein könnten.

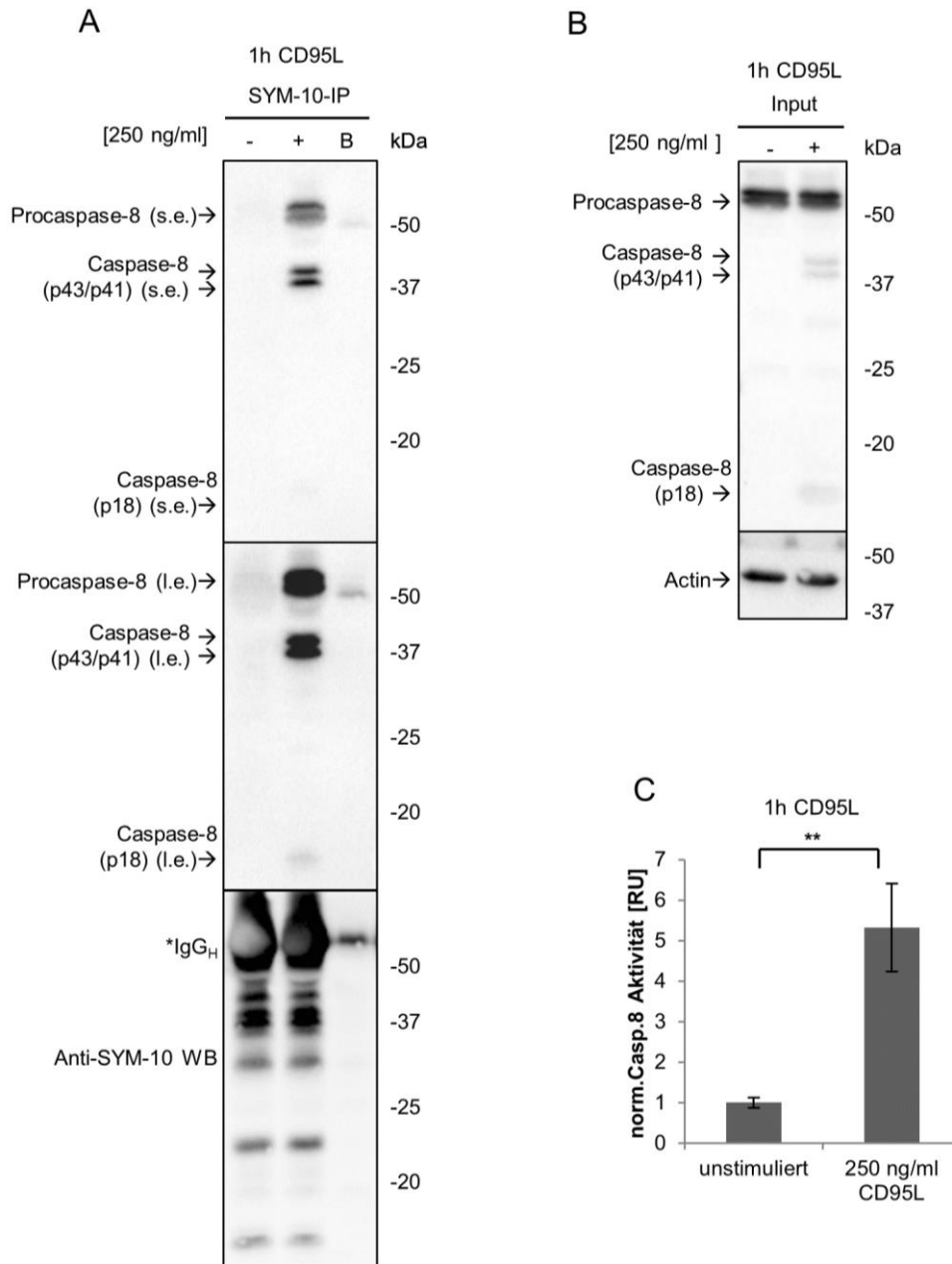


Abbildung 13 Caspase-8 ist potenziell symmetrisch di-methyliert: SKW 6.4 Zellen wurden mit 250 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert. Das Zelllysat (Input) wird einer IP mit SYM-10-Antikörper (A) unterzogen. Sowohl Lysat (B) als auch SYM-10-IP werden dargestellt. Die Bead-Kontrolle wird durch „B“ markiert. Für Procaspase-8 werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ short exposure) als auch längere Belichtungen (l.e./ long exposure) gezeigt. Die dargestellten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen (A, B). SKW 6.4 Zellen werden mit 250 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert (C). Anschließend erfolgt die Durchführung einer SYM-10-IP nach Protokoll 2 (siehe Kapitel 2.2.5.2). Die Caspase-8-Aktivität wurde mittels Caspase-8-Assays bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.2). Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des unpaired Student t-Tests. Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. (A) Die IP erfolgen durch folgendes Protokoll: IP nach Protokoll 2 (siehe Kapitel 2.2.7.2). Die Heavy-Chain des Antikörpers wird mit Ig_H markiert. Abkürzung: IP: Immunpräzipitation; s.e.: short exposure; l.e.: long exposure; RU: relative unit.

Für eine Überprüfung der etwaigen Caspase-8 Bindung an den SYM-10 Antikörpern wird anschließend eine Denaturierungs-IP mit einem anti-Caspase-8-Antikörper durchgeführt (Den.-Casp.-8-IP). Mit Hilfe der so genannten ‚Denaturierung‘ vor der IP und der zusätzlichen Behandlung mit 10 % SDS können Protein-Protein-Interaktionen getrennt werden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit schwächere Signale von beispielsweise PTM zu detektieren, da diese weiterhin kovalent an Caspase-8 verknüpft sein können. Durch die Den.-IP werden somit nur Caspase-8 und die daran haftenden PTM aus dem Lysat gebunden. Für die Überprüfung der

potenziellen symmetrischen Di-Methylierung werden die Zellen unstimuliert bzw. mit CD95L stimuliert lysiert und für die Den.-Casp.8-IP verwendet (siehe Abbildung 14). Sowohl in den stimulierten Proben, als auch in der unstimulierten Probe sind starke Signale der IgG_H des Antikörpers zu sehen. Potenzielle Signale der Spaltprodukte von Procaspase-8a/b können in der unstimulierten Probe nicht detektiert werden. Erst durch die Stimulation werden mutmaßliche Caspase-8 Spaltprodukte (p43/ p41 und p18) mit dem SYM-10 Antikörper detektiert. Die erfassten Signale weisen die gleichen Bereiche auf wie die Caspase-8-Spaltprodukte, die durch den anschließenden anti-Caspase-8 Antikörper detektiert werden können (siehe Abbildung 14A).

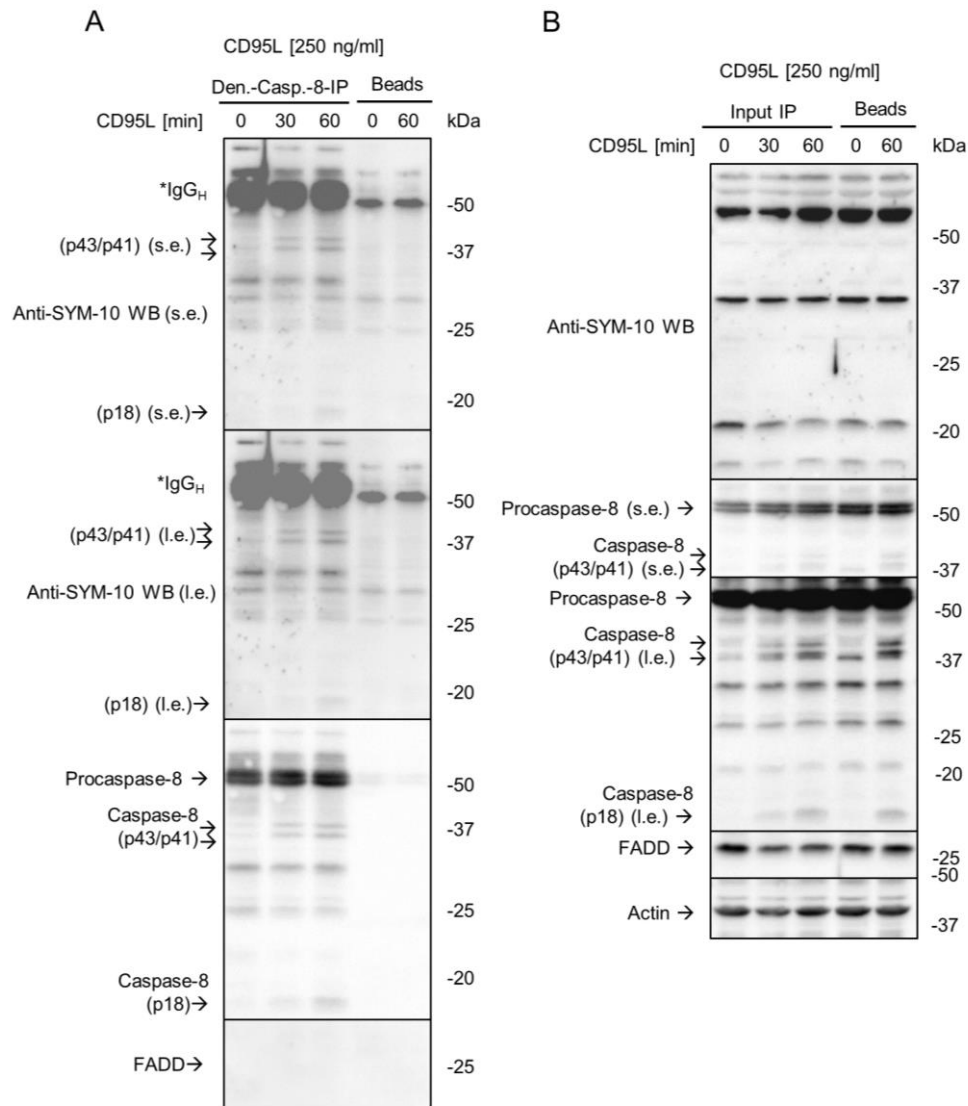


Abbildung 14 Caspase-8 ist potenziell symmetrisch di-methyliert: SKW 6.4 Zellen werden mit 250 ng/ml CD95L für 30 Minuten oder eine Stunde stimuliert. Das Zelllysat (Input) wird denaturiert (den.) und anschließend einer IP mit anti-Caspase-8 Antikörper (**A**) unterzogen. Sowohl Lysat (**B**), als auch Den.-Caspase-8 IP (Den.-Casp.-8-IP) werden dargestellt. Die Bead-Kontrolle wird durch „Beads“ markiert. Für Anti-Sym-10 und Procaspase-8 werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) als auch längere Belichtungen (l.e./ *long exposure*) gezeigt. Die dargestellten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. (**A**) Die Den.-IP erfolgen durch folgendes Protokoll: Den.-IP nach Protokoll 5 (siehe Kapitel 2.2.7.5). Die *Heavy-Chain* des Antikörpers wird mit IgG_H markiert. Abkürzungen: Den.-Casp.8-IP: Denaturierungs-Caspase-8-Immunopräzipitation; s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*.

Innerhalb des Lysats können keine spezifischen Banden in der Region von p43 und p41 mit Hilfe des SYM-10 Antikörpers erfasst werden (siehe Abbildung 14B). Jedoch zeigt die anti-Caspase-8 Western Blot Analyse, dass die spezifischen Signale innerhalb der IP den gleichen Bereich wie im Lysat besitzen (siehe Abbildung 14B). Mit Hilfe der Den.-Casp.8-IP konnten die zuvor erfassten, potenziellen symmetrischen Di-Methylierungen von Caspase-8 unabhängig von der SYM-10-IP gezeigt werden. Die Ergebnisse geben daher weitere Hinweise auf eine mögliche symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8.

3.1.3 Hemmung der Caspase-8-Aktivität als Resultat der PRMT5 Inhibierung

EPZ (EPZ015666 (GSK3235025)) ist ein spezifischer Inhibitor für die Aktivität von PRMT5, welcher somit die Methylierung seiner Zielproteine verhindern kann. Da Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem PRMT5-Komplex und Caspase-8 erfasst werden konnten und Caspase-8 potenziell symmetrisch di-methyliert wird, soll der Effekt einer pharmakologischen Inhibition von PRMT5 auf die Caspase-8-Aktivierung untersucht werden. Dazu wird die Spaltung von Procaspase-8a/b sowie von Procaspase-3 mit Hilfe einer CD95L-Stimulation unter Einfluss von EPZ untersucht (siehe Abbildung 15).

Eine Einzelstimulation mit 200 ng/ml CD95L von SKW 6.4 Zellen führt nach 60 Minuten und 120 Minuten zu einer Spaltung von Procaspase-8 (siehe Abbildung 15A). Mit Zunahme der Stimulationszeit kommt es zu einer Zunahme der Procaspase-8-Spaltung. Der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD (zVAD-fmk) verhindert diese Spaltung fast vollständig. Auch die Prä-Stimulation mit EPZ führt zu einer Reduzierung der Procaspase-8 Spaltung. Allerdings ist das inhibitorische Niveau von EPZ im Vergleich zu der zVAD-Stimulation niedriger (siehe Abbildung 15A). Bei beiden Inhibitoren werden sowohl die Spaltprodukte Caspase-8 p43/ p41 als auch p18 reduziert und somit reduziert sich die gesamte Spaltung (siehe Abbildung 15A). Die Effektor-Caspase-3, welche durch Caspase-8 aktiviert wird, wird durch die CD95L-Stimulation in die Untereinheiten p19 und p17 gespalten (siehe Abbildung 15B). Wie bei Caspase-8 führt eine Prä-Stimulation mit zVAD zu einer fast vollständigen Reduzierung der Procaspase-3 Spaltung. Als Pan-Caspase-Inhibitor wird die Caspase-Kaskade blockiert und dadurch ebenfalls die Spaltung und Aktivierung von Procaspase-3. Zudem kann eine Reduzierung der Spaltprodukte durch die Co-Stimulation mit EPZ hervorgerufen werden (siehe Abbildung 15B). Bei der Überprüfung der Caspase-8 Spaltung und Aktivierung wird die Caspase-3 Spaltung gleichfalls nicht vollständig reduziert (siehe Abbildung 15B). Bei allen durchgeführten Experimenten konnte keine Spaltung der Procaspasen durch eine Einzelstimulation mit EPZ detektiert werden, die über das Niveau der unstimulierten Probe hinausgeht (siehe Abbildung 15). Diese inhibitorischen Effekte verdeutlichen, dass die Inhibierung von PRMT5 auch einen Einfluss auf die Spaltung der Caspasen und ihre Aktivität besitzt.

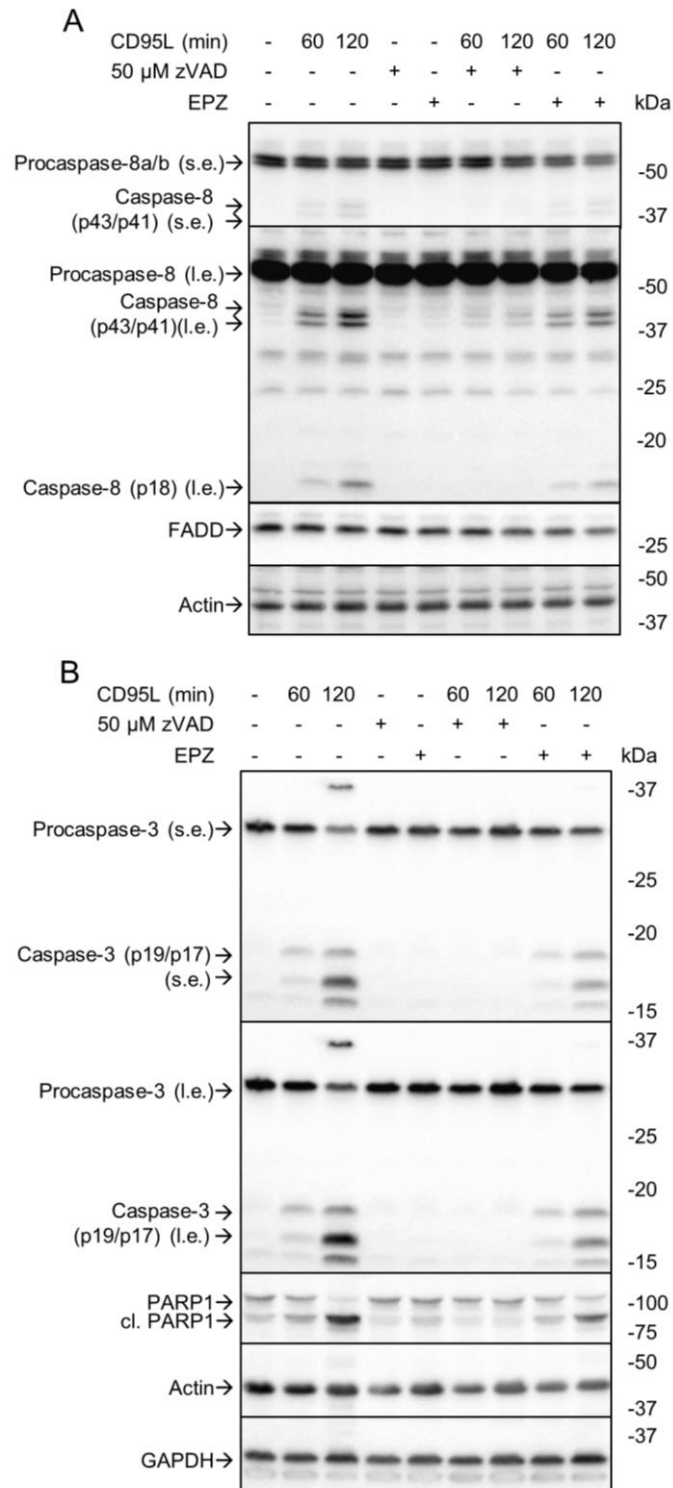


Abbildung 15 EPZ reduziert die CD95L induzierte Caspase-Spaltung: SKW 6.4 Zellen wurden mit 200 ng/ml CD95L für die angegebene Zeit stimuliert (**A, B**). Die angegebene Zeit (min) entspricht Minuten. Zwei Stunden vor der CD95L Stimulation werden die Zellen mit 5 μ M EPZ stimuliert oder eine Stunde mit zVAD vorbehandelt. Für Procaspase-8, Caspase-8 (p43/ p41), Procaspase-3 und Caspase-3 (p19/ 17) werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) als auch längere Belichtungen (l.e./ *long exposure*) gezeigt. Die dargestellten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: min: Minuten; s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*; cl: engl. *cleaved* / dt. *gespalten*.]

In SKW 6.4 Zellen konnten Hinweise auf eine potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8 (p43/ p41) nach einer CD95L-Stimulation detektiert werden. Anschließend werden Hinweise auf eine potenzielle Di-Methylierung von Caspase-8 in HeLa-CD95 Zellen untersucht. Dazu wird ein Untersuchungssystem mit HeLa-CD95-C8-KO Zellen verwendet, die

mit unterschiedlichen Vektoren transfiziert werden können. Dafür wird als erstes die mögliche Bindung des Caspase-8a WT (Wildtyp) an der SYM-10-IP untersucht. Der WT wird in Kontrast zu Negativ-Kontrollen gestellt (HeLa-CD95-C8-KO Zellen oder HeLa-CD95-Vektor Zellen), um die Spezifität der potenziellen Caspase-8-Signale zu testen (siehe Abbildung 16). Nach einer CD95L-Stimulation sind diverse und mögliche Caspase-8-Signale an der SYM-10-IP zu detektieren (siehe Abbildung 16A). Dabei sind die Banden in den Bereichen der Pro-Form (p55) als auch der Spaltprodukte p43 und p18 von Caspase-8a zu sehen. Nach einer Co-Stimulation aus CD95L und EPZ können ebenfalls Banden von möglicher Procaspase-8a sowie Caspase-8 (p43) detektiert werden. P18 Banden sind nicht zu erkennen. Außerdem bewegen sich die anderen Proteinsignale verglichen mit einer Einzelstimulation auf einem schwächeren Level.

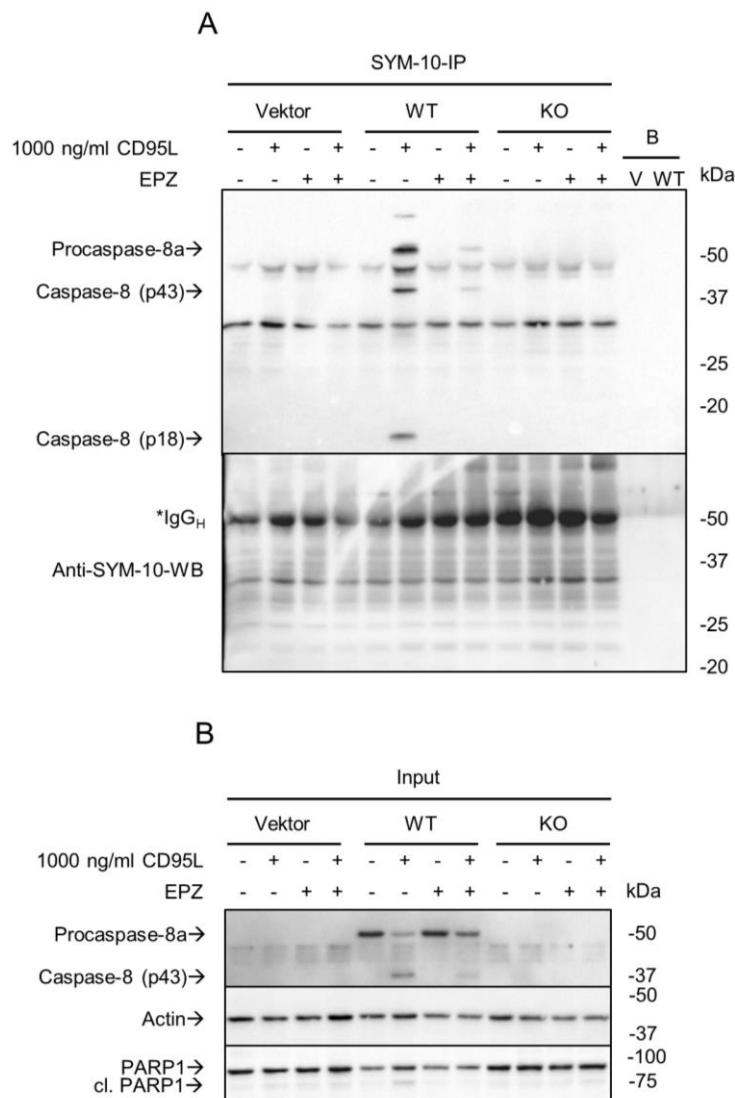


Abbildung 16 PRMT5-Inhibierung reduziert die potenzielle Methylierung von Caspase-8a-WT: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach der Transfektion mit 1000 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert. Zwei Stunden vor dieser Stimulation werden die Zellen mit 5 µM EPZ stimuliert. Das Zelllysate (Input) wird einer IP mit SYM-10-Antikörpern (A) unterzogen. Sowohl Lysat (B) als auch SYM-10-IP werden dargestellt. Die Bead-Kontrolle wird durch „B“ markiert. V (HeLa-CD95-Vektor) und WT (HeLa-CD95-C8-WT) sind Zelllysate der dazugehörigen Zelllinie, die für die Bead-Kontrolle dienen. Die dargestellten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Die IP erfolgten durch folgendes Protokoll: IP nach Protokoll 2 (siehe Kapitel 2.2.7.2). Die *Heavy-Chain* des Antikörpers wird mit IgG_H markiert. Abkürzung: IP: Immunpräzipitation; cl: engl. *cleaved* / dt gespalten; V: HeLa-CD95-Vektor Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; KO: HeLa-CD95-C8-KO Zellen.

Gleichzeitig soll überprüft werden, ob der PRMT5-Inhibitor EPZ einen Einfluss auf die potenziellen Caspase-8-Signale in der SYM-10-IP besitzt. Signale von Procaspase-8a können innerhalb der spezifischen Transfektion im Zelllysat nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16B). Auch das Spaltprodukt Caspase-8 (p43) kann nach einer CD95L-Stimulation detektiert werden. Jedoch besitzt EPZ die bereits erfassten inhibitorischen Effekte auch auf HeLa-CD95-C8-WT Zellen, indem Procaspase-8a weniger gespalten wird (siehe Abbildung 16B). Zusätzlich findet die Spaltung von PARP1 verglichen mit einer CD95L-Einzelstimulation auf einem niedrigeren Niveau statt. Die Negativ-Kontrollen der HeLa-CD95-Vektor und HeLa-CD95-C8-KO Zellen besitzen keine Caspase-8-Signale, weshalb die Caspase-8-Signale der WT-Transfektion spezifisch sind.

Dieser Versuch verdeutlicht, dass Caspase-8a-WT auch nach einer Transfektion möglicherweise symmetrisch di-methyliert werden kann und das EPZ ebenfalls einen hemmenden Einfluss besitzt.

3.1.4 Reduktion der Caspase-8-Kaskade durch Mutationen an möglichen Methylierungsstellen

Innerhalb der Aminosäuresequenz von Procaspase-8a gibt es zwei potenzielle RG-Motive für Arginin-Methylierungen: R233 und R435. Beide Arginine sind ebenfalls häufige Bestandteile von Punktmutationen in Krebserkrankungen sowie in ALPS-Erkrankungen (siehe Tabellen 1 und 2). Arginin-Methylierungen kommen nur als Mono- bzw. Di-Methylierungen vor [199]. An Caspase-8 konnten keine Hinweise auf Mono-Methylierungen festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.1), jedoch gibt es Hinweise auf potenzielle symmetrische Di-Methylierungen an Caspase-8. Aus diesem Grund wird in den folgenden Versuchen die Rolle der potenziellen Methylierungsstellen untersucht.

Zur Überprüfung, werden HeLa-CD95-C8-KO Zellen wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben transfiziert. Die Mutationen wurden spezifisch jeweils zu Procaspase-8a R233 und Procaspase-8a R435 durch Dr. rer. nat. Nikita Ivanisenko (Translationale Entzündungsforschung, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg) *in silico* konzipiert und durch die Firma Genscript generiert (siehe Kapitel 2.2.8).

Die transiente Transfektion erfolgt dabei parallel und die verwendeten Zellen werden aus dem gleichen Zellstock generiert, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit untereinander zu erzeugen. Mit Hilfe der Vektoren werden daher unterschiedliche HeLa-CD95-C8 Zellen mit spezifischen Veränderungen, dem pcDNA3-Vektor oder dem C8-WT erzeugt (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21 Namen der verwendeten transient-transfizierten Zellen

Name der transfizierten Vektoren	vollständiger Name der Zellen
pcDNA3-Vektor	HeLa-CD95-Vektor
C8-R233H	HeLa-CD95-C8-R233H
C8-R435Q	HeLa-CD95-C8-R435Q
C8-WT	HeLa-CD95-C8-WT
C8-KO	HeLa-CD95-C8-KO

Für die funktionelle Überprüfung der Mutationen werden die Zellen nach der Transfektion auf ihre Procaspase-8-Expression untersucht (siehe Abbildung 17). Dabei wird deutlich, dass die Proteinlevel von Procaspase-8a nach der Transfektion im Vergleich zwischen den einzelnen Experimenten unterschiedlich sind. Das Proteinlevel von Procaspase-8a variiert dabei leicht zwischen den verschiedenen transfizierten Zellen (siehe Abbildung 17A). Als Negativ-Kontrolle dienen HeLa-CD95-Vektor Zellen, die kein Procaspase-8a generieren sowie HeLa-CD95-C8-KO Zellen, die nicht transfiziert werden. In beiden Zelltypen können keine Procaspase-8a-Proteinsignale detektiert werden (siehe Abbildung 17A).

Nach einer einstündigen Stimulation mit CD95L kann nur in HeLa-CD95-C8-WT Zellen eine Spaltung von Procaspase-8a nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17A). Sowohl in den HeLa-CD95-C8-R233H Zellen und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen als auch in HeLa-CD95-C8-WT Zellen nimmt die Menge von Procaspase-8 nach einer CD95L-Stimulation ab. Jedoch ist das Proteinlevel in allen Proben auf einem fast gleichen Niveau (siehe Actin).

Die Abnahme von Procaspase-8a ist daher nicht durch eine Reduzierung der Proteinkonzentration zu erklären. Allerdings sind keine Spaltprodukte in HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen erfasst worden. Dies deutet daraufhin, dass es zu einer reduzierten Spaltung von Procaspase-8a durch die CD95L-Stimulation kommt bzw. dass die Menge des exprimierten Proteins niedriger ist. Diese Resultate zeigen die ersten Hinweise für eine mögliche Beeinflussung der Caspase-8-Prozessierung durch die Mutationen R233H und R435Q.

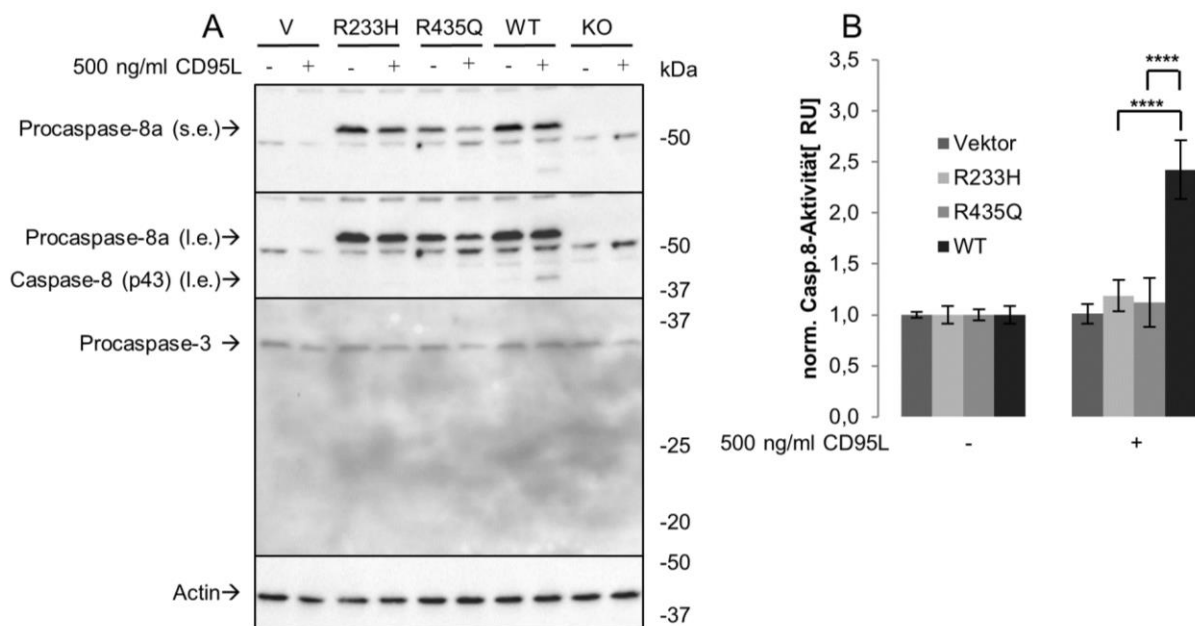


Abbildung 17 Caspase-8 Mutation an potenziellen Methylierungsstellen reduziert Caspase-8-Aktivität: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach der spezifischen Transfektion mit 500 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert (A). Die gezeigten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Für Procaspase-8 werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) als auch längere Belichtungen (l.e./ *long exposure*) gezeigt. HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden mit 500 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert (B). Die Caspase-8-Aktivität wird mittels Caspase-8-Assays bestimmt. Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzungen: V: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; KO: HeLa-CD95-C8-KO Zellen; s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*; RU: *relative unit*. (B) Die Transfektionskontrollen werden in Anhang 1 gezeigt.

In der Folge soll der Einfluss der Aminosäureveränderungen auf die Aktivität von Caspase-8 überprüft werden. Dazu wird die Caspase-8-Aktivität mit Hilfe eines Caspase-8-Aktivitäts-

Assays überprüft (siehe Abbildung 17B). Die Zellen werden mit 500 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert. Die Aktivität von Caspase-8 in HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen kann kaum durch die CD95L-Stimulation gesteigert werden. Dagegen steigt die Aktivität nach der CD95L-Stimulation in HeLa-CD95-C8-WT Zellen verglichen mit HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen auf mehr als das Doppelte an (siehe Abbildung 17B). Somit wird nicht nur die Spaltung von Procaspase-8a durch die Mutationen bei Procaspase-8a-R233H und -R435Q beeinträchtigt, sondern auch die Aktivität gehemmt.

Nach der Überprüfung der Caspase-8-Aktivität erfolgt die Untersuchung der Initiierung der Caspase-Kaskade. Die Initiierung der Caspase-Kaskade wird anhand der Spaltung von Procaspase-3 und der Aktivitätsbestimmung mit Hilfe eines Caspase-3/7-Aktivitäts-Assays durchgeführt (siehe Abbildung 18). Dazu werden die Zellen mit 500 ng/ml CD95L für zwei oder drei Stunden stimuliert (siehe Abbildung 18A, B). Während die Caspase-3/7-Aktivität in HeLa-CD95-C8-WT Zellen nach zwei Stunden Stimulation bereits auf etwa das Doppelte ansteigt, verbleibt die Aktivität in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen auf niedrigem Niveau (siehe Abbildung 18A). Nach drei Stunden Stimulation nimmt die Aktivität in HeLa-CD95-C8-WT Zellen weiter zu (siehe Abbildung 18B). Zwar erhöhen sich auch die Caspase-3/7-Aktivitäten in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen, allerdings nimmt die Caspase-3/7-Aktivität in HeLa-CD95-C8-WT Zellen noch stärker zu. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Spaltung von Procaspase-3 innerhalb von HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen niedriger ist als in HeLa-CD95-C8-WT Zellen (siehe Anhang 3). Sowohl die reduzierte Spaltung von Procaspase-3 als auch die reduzierte Caspase-3/7-Aktivität verdeutlichen, dass die CD95L-induzierte Caspase-Kaskade in HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen in einem geringeren Maße erfolgt. Die bereits erfasste Reduzierung der CD95L-induzierte Caspase-8-Aktivität durch Procaspase-8-R233H und Procaspase-8-R435Q führen somit auch zu einer Reduzierung der Caspase-3/7-Aktivität.

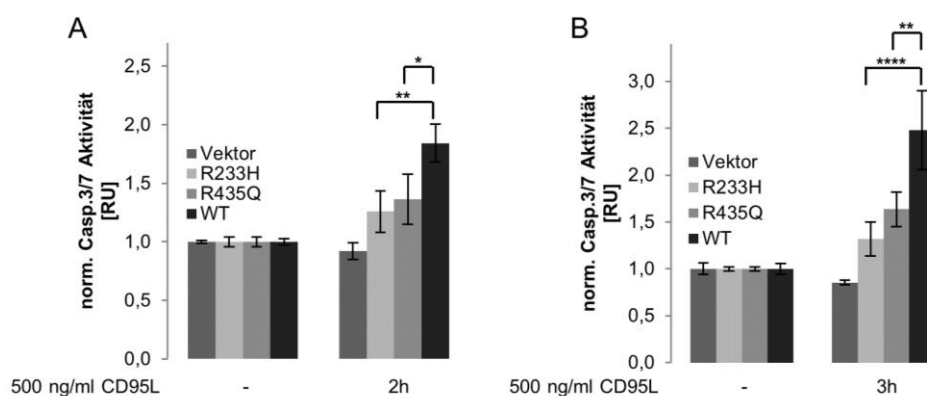


Abbildung 18 Mutation an potenzielle Methylierungsstellen reduziert CD95L-induzierte Caspase-3/7-Aktivität: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach der Transfektion mit Procaspase-8-R233H, R435Q oder WT mit 500 ng/ml CD95L für zwei Stunden (A) oder drei Stunden (B) stimuliert. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde durch Caspase-3/7-Assays bestimmt. Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzungen: Vektor: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; RU: *relative unit*. Die Transfektionskontrollen werden in Anhang 2 gezeigt.

Nachdem der Einfluss der Caspase-8-Mutationen auf die Caspase-Kaskade festgestellt werden konnte, wird darauffolgend der Einfluss der beiden Caspase-8-Mutationen auf die Zellviabilität und den Zelltod analysiert (siehe Abbildungen 19 und 20). Die Zellviabilität wird anhand des ATP-Gehalts oder einer Messung der Aktivität des Zellmetabolismus erfasst (siehe

Abbildung 19). Bereits nach sechs Stunden CD95L-Stimulation kann eine Reduzierung des ATP-Gehalts um etwa ein Drittel in HeLa-CD95-C8-WT Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 19A). Der ATP-Gehalt der Zellen ist bei dieser Messung konträr mit der Zellviabilität, mehr ATP-Gehalt bedeutet daher eine höhere Zellviabilität. Die Reduzierung der Zellviabilität erfolgt dabei konzentrationsabhängig. Eine 1000 ng/ml CD95L-Stimulation reduziert die Zellviabilität stärker als die 500 ng/ml CD95L Stimulation. Innerhalb von HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen führt die CD95L-Stimulation zu keiner bzw. kaum einer Reduzierung der Zellviabilität nach sechs Stunden (siehe Abbildung 19A). Auch bei einer längeren CD95L-Stimulation kann kaum eine Reduzierung der Zellviabilität bei HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 19B). Wie bei der kürzeren Stimulation kann auch nach 24 Stunden in HeLa-CD95-C8-WT Zellen die Reduzierung der Zellviabilität durch eine CD95L-Stimulation festgestellt werden (siehe Abbildung 19B). Dabei sinkt der ATP Gehalt durch die 1000 ng/ml CD95 Stimulation um zwei Fünftel der normalisierten Zellviabilität (siehe Abbildung 19A, B). Eine ähnliche Tendenz kann bei der Messung der Aktivität des Zellmetabolismus in HeLa-CD95-C8-WT Zellen erfasst werden. Sowohl nach sechs Stunden als auch nach 24 Stunden CD95L Stimulation erfolgt eine Reduzierung der Aktivität des Metabolismus (siehe Abbildung 19 C, D). Nach sechs Stunden Stimulation mit 500 ng/ml CD95L wird die Zellviabilität um ein Fünftel reduziert. Nach 24 Stunden Stimulation hat sich die Reduktion bei gleicher Konzentration etwa verdoppelt. Ein gleichwertiger Zellviabilitätsverlust findet in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q-Zellen nicht statt (siehe Abbildungen 19C, D). Auch in HeLa-CD95-C8-KO Zellen sowie in HeLa-CD95-Vektor Zellen kann keine Reduzierung der metabolischen Aktivität nach einer CD95L-Stimulation gemessen werden (siehe Abbildung 19C, D).

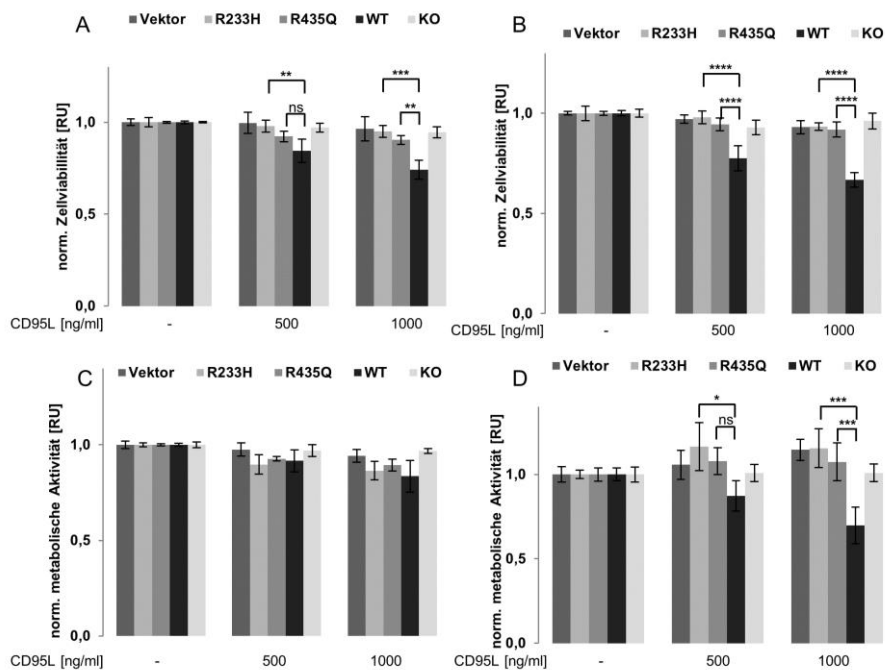


Abbildung 19 Caspase-8 Mutationen verhindern die Reduzierung der Zellviabilität durch CD95L-Stimulation: Durchführung der Zellviabilitätsassays durch die Messung von ATP (A, B) und der metabolischen Aktivität (C, D). HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach der Transfektion mit Procaspase-8-R233H, R435Q oder WT mit 500 ng/ml oder 1000 ng/ml CD95L für sechs Stunden (A) oder 24 Stunden (B) stimuliert. C, D sind die entnommenen und normierten Daten eines Experiments und entsprechen sechs Stunden (C) und 24 Stunden (D) des Assays. Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzungen: Vektor: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; KO: HeLa-CD95-C8-KO Zellen; RU: *relative unit*. Die Transfektionskontrollen werden in Anhang 4 gezeigt.

Somit besitzen Procaspase-8a-R233H und Procaspase-8a-R435Q einen hemmenden Effekt auf die CD95L-induzierte Zellviabilitätsreduzierung. Auch ist Procaspase-8a-WT nötig, um die metabolische Zellaktivität zu diesem Zeitpunkt zu reduzieren.

Aufgrund dieser Effekte wird anschließend der Einfluss von Procaspase-8a-R233H und Procaspase-8a-R435Q auf den Zelltod untersucht. Für die Messung des Zelltodes werden die Zellen nach der CD95L-Stimulation mit den Zell-Farbstoffen Annexin V FITC und PI gefärbt (siehe Abbildung 20). Anschließend erfolgt die Messung der Fluoreszenz-Signale mit Hilfe eines bildgebenden Durchflusszytometers (siehe Abbildung 20C). Neben den Fluoreszenz-Signalen können zeitgleich Hellfeldaufnahmen der Zellen erstellt werden, wodurch die Zellmorphologie beispielhaft gezeigt werden kann. Der Farbstoff Annexin V FITC kann an das Protein Phosphatidylserin binden, jedoch nicht in die Zelle selbstständig eindringen. Phosphatidylserin befindet sich an der Innenseite der Membran. Durch die Apoptose-Induktion wird das Protein an der äußeren Membran freigelegt, da die zelluläre Normalverteilung gestört ist. Dadurch können Hinweise auf eine Zelltodinduktion mit Hilfe des Farbstoffes Annexin V FITC gemessen werden. Der Farbstoff PI kann direkt an der DNA binden. Jedoch ist eine Membranschädigung nötig, damit PI in die Zelle gelangen kann. Während die Anlagerung von Phosphatidylserin an der Außenseite der Membran kein Merkmal für eine Membranschädigung ist, sind diese Schäden für eine Anlagerung von PI an der DNA notwendig. Diese Schädigungen erfolgen vorallem in späten apoptotischen oder nekrotischen Ereignissen [27]. Viable Zellen, in denen keine Zelltodsignale erfolgen, besitzen keine Fluoreszenz-Signale (siehe Abbildung 20C).

Die Zellen werden mit 1000 ng/ml oder 2000 ng/ml CD95L für sechs Stunden stimuliert und anschließend mit PI und Annexin V FITC eingefärbt. Nach CD95L-Stimulationen werden vor allem in HeLa-CD95-C8-KO Zellen, HeLa-CD95-Vektor Zellen sowie in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen besonders große negative Zellpopulationen gemessen. Die Anzahl der negativen Zellen nimmt trotz der Stimulation nicht ab (siehe Abbildung 20A). Auch der Anteil an Annexin-positiver oder doppel-positiver Zellen nach einer Stimulation nimmt nicht zu (siehe Abbildung 20B). Im Gegensatz dazu sinkt die Anzahl einzelner negativer HeLa-CD95-C8-WT Zellen nach einer CD95L-Stimulation (siehe Abbildung 20A). Durch die Stimulation mit 1000 ng/ml CD95L nimmt der Anteil einzelner negativer Zellen um etwa ein Viertel ab. Eine höhere Konzentration von 2000 ng/ml reduziert den Anteil einzelner negativer Zellen sogar um etwa ein Drittel (siehe Abbildung 20A).

Auch die Effekte auf den Anteil von einzelnen Annexin-positiver oder doppel-positiver Zellen verhalten sich ähnlich. Die CD95L-Stimulation erhöht den Anteil doppel-positiver Zellen konzentrationsabhängig um etwa zwei Drittel (siehe Abbildung 20B). Eine CD95L-Stimulation führt somit im Beisein der Procaspase-8a-WT zu mehr doppel-positiven Zellen und damit auch zu einer Erhöhung des Zelltodes. Procaspase-8a-R233H und Procaspase-8a-R435Q hingegen verhindern Zelltod, da die einzelnen doppel-positiven Zellen nach einer CD95L-Stimulation nicht zunehmen. Zusätzlich kann gezeigt werden, dass die Zellen nach einer 2000 ng/ml CD95-Stimulation in HeLa-CD95-C8-WT Zellen in einzelne doppel-positiv und annexin-positiv unterschieden werden können (siehe Abbildung 20B). Nicht alle einzelnen positiven Zellen sind doppel-positiv, dies kann darauf hinweisen, dass etwa ein Achtel der Zellen früh-apoptotisch ist und somit gerade im Begriff ist zu sterben.

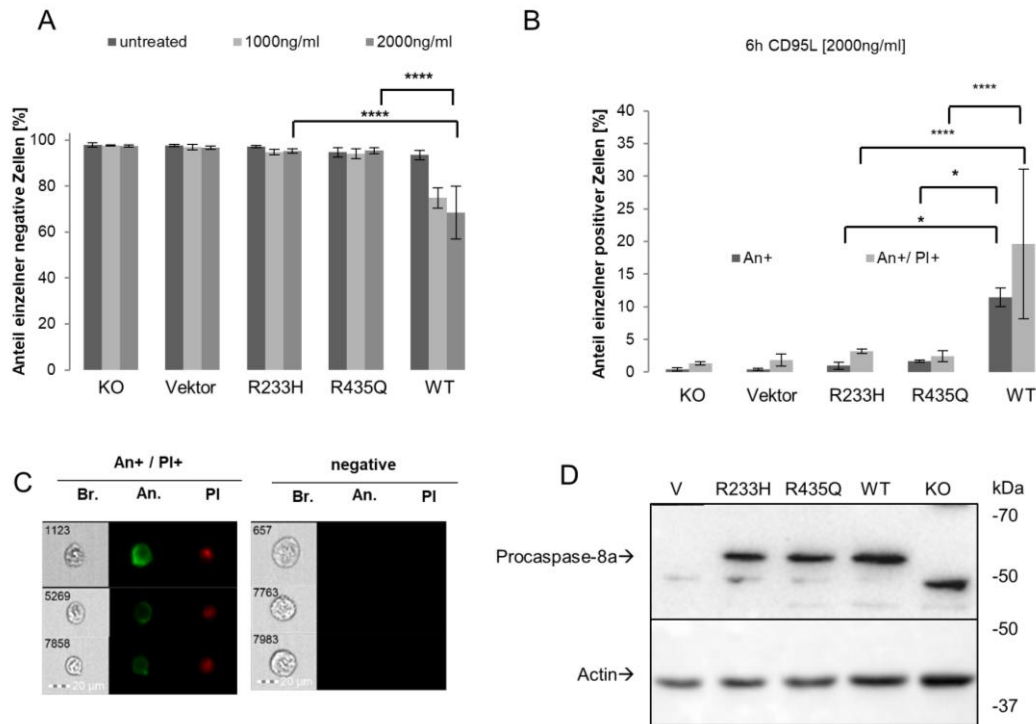


Abbildung 20 Caspase-8-R233H und R435Q verhindern den CD95L induzierten Zelltod: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach Transfektion mit Procaspase-8-R233H, R435Q oder WT mit 1000 ng/ml oder 2000 ng/ml CD95L für sechs Stunden stimuliert. Anschließend werden die Zellen mit PI und Annexin V FITC gelabelt und die Fluoreszenz mit einem bildgebenden Durchflusszytometer gemessen. Gezeigt werden die Mittelwerte der einzelnen negativen Zellen (A), die kein Fluoreszenz-Signal aufweisen sowie die einzelnen positiven Zellen (B). Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Fluoreszenzsignale der Propidium Iodid (PI)- und Annexin V FITC (An)-Färbungen (C). Western Blot Analysen der Transfektionskontrolle der verwendeten Versuche (D). Gezeigt wird einer von drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzungen: Vektor: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; KO: HeLa-CD95-C8-KO Zellen; An+ = Annexin V FITC positive Zellen; PI+ = PI positive Zellen; Br.=engl. *bright field* / Hellfeld.

3.1.5 Lokalisierung der Procaspasen-8a-R233H, -R435Q und -WT

Caspase-8 kommt sowohl innerhalb des Zytoplasmas als auch im Nucleus vor [133] [289] [290]. Um die Lokalisierung der mutierten Procaspasen-8a-R233H und -R435Q zu analysieren, werden die spezifischen Zellen ohne Stimulation in Nucleus- und Zytoplasma-Fractionen separiert (siehe Abbildung 21). Die Qualität der Fraktionierung kann anhand spezifischer Proteine qualifiziert werden. Beispielsweise, ist das Nucleus-Protein PARP1 ausschließlich in der Nucleus-Fraktion konstatiert (siehe Abbildung 21). Somit zeigt die Fraktionierung der Zelllysate, dass das Gesamtzelllysat in Zytoplasma- und Nucleus-Fractionen getrennt wird.

Für die Lokalisierung der verschiedenen Procaspase-8a Proteine werden unstimulierte Proben untersucht. Procaspase-8a-Signale von HeLa-CD95-C8-R233H, HeLa-CD95-C8-R435Q und HeLa-CD95-C8-WT Zellen werden innerhalb der Zytoplasma-Fraktion detektiert. Dabei ist das Proteinlevel in HeLa-CD95-C8-WT Zellen am schwächsten. Dieses Niveau geht mit der Menge an detektiertem FADD einher und könnte somit auf eine geringere Proteinkonzentration dieser Probe zurückzuführen sein (siehe Abbildung 21). In der Nucleus-Fraktion sind keine Procaspase-8a-Signale erfasst worden. Weder in HeLa-CD95-C8-WT Zellen noch in HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen können Signale des Proteins detektiert werden. Auch Caspase-8-Spaltprodukte sind weder in der Zytoplasma-Fraktion noch in der Nucleus-Fraktion nachgewiesen worden. Es erfolgt daher keine ungerichtete Spaltung des Proteins (siehe Abbildung 21). Die Procaspase-8a-R233H und -R435Q sind somit genau wie Procaspase-8a-WT im Zytoplasma lokalisiert.

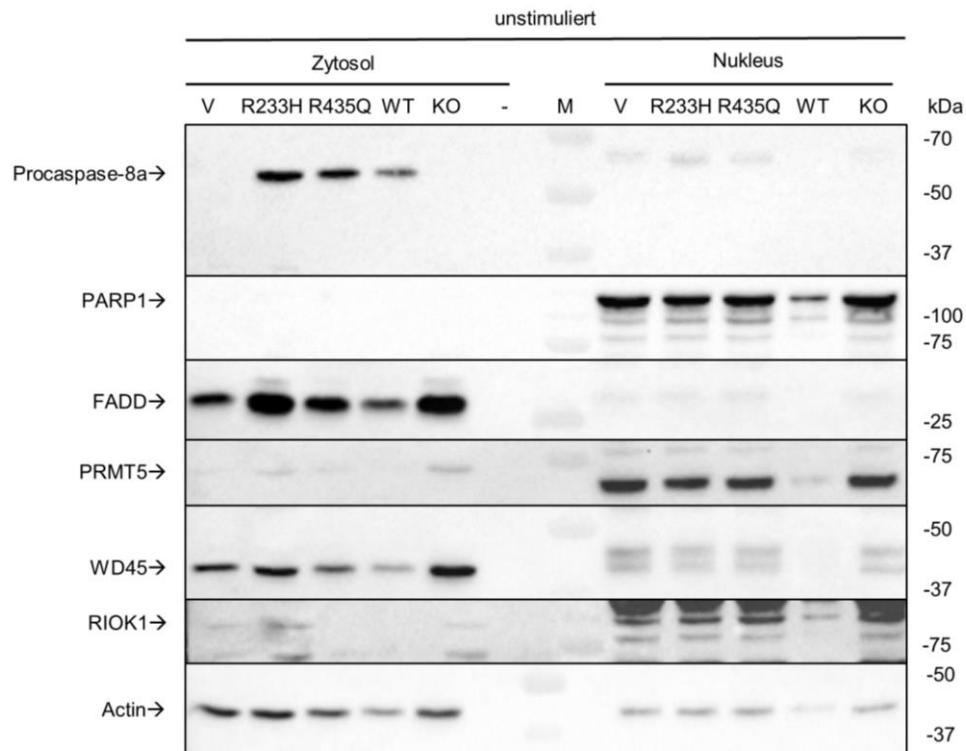


Abbildung 21 Procaspase-8-R233H, R435Q und WT sind im Zytosol lokalisiert: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach Transfektion mit Procaspase-8-R233H, R435Q oder WT in Nukleus und Zytosol fraktioniert. Dargestellt werden die unstimulierten Proben. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: Vektor: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; KO: HeLa-CD95-C8-KO Zellen.

3.1.6 Mutiertes Procaspase-8 kann nicht an SYM-10-IP erfasst werden

Procaspase-8a-R233H und Procaspase-8a-R435Q verhindern die Initiierung der Caspase-Kaskade und reduzieren dadurch den CD95L-induzierten Zelltod (siehe Kapitel 3.1.4). Sowohl R233 als auch R435 sind potenzielle Arginin-Methylierungsstellen und häufige Punktmutationen von Procaspase-8 (siehe Kapitel 1.2.2.5). Nachdem der Einfluss der Punktmutation auf den Zelltod analysiert wurde, soll anschließend überprüft werden, ob etwaige Signale von Procaspase-8a-R233H und -R435Q innerhalb von SYM-10-IP erfasst werden können. Ein potenzieller Effekt durch die Inhibierung der möglichen Caspase-8-PRMT5 Interaktion konnte bereits mit Hilfe von EPZ gezeigt werden (siehe Kapitel 3.1.3). Da die Aminosäuren R233 und R435 gleichzeitig mögliche Methylierungsstellen sind, könnte das Fehlen einer Methylierung zu einer Reduzierung mit dem anti-SYM Antikörper führen.

Für die Überprüfung möglicher Caspase-8 symmetrischer Di-Methylierungen wird eine IP mit Hilfe des argininspezifischen Di-Methylierungs-Antikörpers SYM-10 durchgeführt (siehe Abbildung 22A). Die IP wird sowohl mit unstimuliertem Lysat als auch mit Zelllysate einer einstündigen Stimulation mit 1000 ng/ml CD95L durchgeführt (siehe Abbildung 22). Das Zelllysate stammt von HeLa-CD95-C8-KO, HeLa-CD95-Vektor, HeLa-CD95-C8-R233H, HeLa-CD95-C8-R435Q und HeLa-CD95-C8-WT Zellen. Potenzielle Procaspase-8a-Signale können innerhalb der Lysate in HeLa-CD95-C8-R233H, HeLa-CD95-C8-R435Q und HeLa-CD95-C8-WT Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 22B). Das Niveau von diesen Signalen ist dabei fast identisch. Nur nach einer CD95L-Stimulation nimmt die Intensität des Procaspase-8a-Signals in HeLa-CD95-C8-WT Zellen ab (siehe Abbildung 22B). Die HeLa-CD95-C8-KO und

HeLa-CD95-C8-Vektor Zellen besitzen keine spezifischen Procaspase-8a-Signale (siehe Abbildung 22B). Zudem können nur innerhalb der HeLa-CD95-C8-WT Zellen und nach einer CD95L-Stimulation die Spaltprodukte von Procaspase-8a (p43 und p18) detektiert werden. Dies reproduziert die vorangegangenen Ergebnisse, nach denen das Niveau der Procaspase-8a-Spaltung in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen niedriger als in HeLa-CD95-C8-WT Zellen ist (siehe Kapitel 3.1.4). Auch die PARP1-Spaltung in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen kann nach der CD95L-Stimulation detektiert werden. Die Spaltung von PARP1 erfolgt in HeLa-CD95-C8-WT Zellen nach einer CD95L-Stimulation wesentlich stärker als in HeLa-CD95-C8-R233H oder HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen (siehe Abbildung 22B). Diese Unterschiede konnten zuvor auch in der Reduzierung der Zellviabilität und der Induzierung des Zelltodes erfasst werden, da die Spaltung von PARP1 auf Zelltod hindeutet (siehe Kapitel 3.1.4).

Nachdem die reduzierenden Effekte von Procaspase-8a-R233H und -R435Q auf eine CD95L-Stimulation erfasst wurden, wird abschließend die Fähigkeit für eine mögliche Caspase-8-Methylierung untersucht. Potenzielle Caspase-8-Signale können innerhalb der IP mit SYM-10 Antikörpern nicht in unstimulierten Proben detektiert werden (siehe Abbildung 22A). Davon betroffen sind die als Negativ-Kontrollen verwendeten Zellen HeLa-CD95-C8-KO, HeLa-CD95-Vektor sowie mit punktmutierter Procaspase-8 HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen (siehe Abbildung 22A, B). Nach einer einstündigen CD95L-Stimulation können in den HeLa-CD95-C8-WT Zellen mögliche Signale von Procaspase-8a, Caspase-8 (p43) und Caspase-8 (p18) an der SYM-10-IP erfasst werden. Diese Signale können nur nach einer CD95L-Stimulation gemessen werden. Dabei können sowohl potenzielle Signale von Procaspase-8 detektiert werden als auch mögliche Signale von Caspase-8 (p43, p18). Da etwaige Signale von Caspase-8 innerhalb der IP gemessen werden können, ist dies ein weiterer Hinweis auf eine potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8 (siehe Abbildung 22A). Die beschriebenen Caspase-8-Signale können jedoch nur in HeLa-CD95-C8-WT Zellen an der SYM-10-IP erfasst werden.

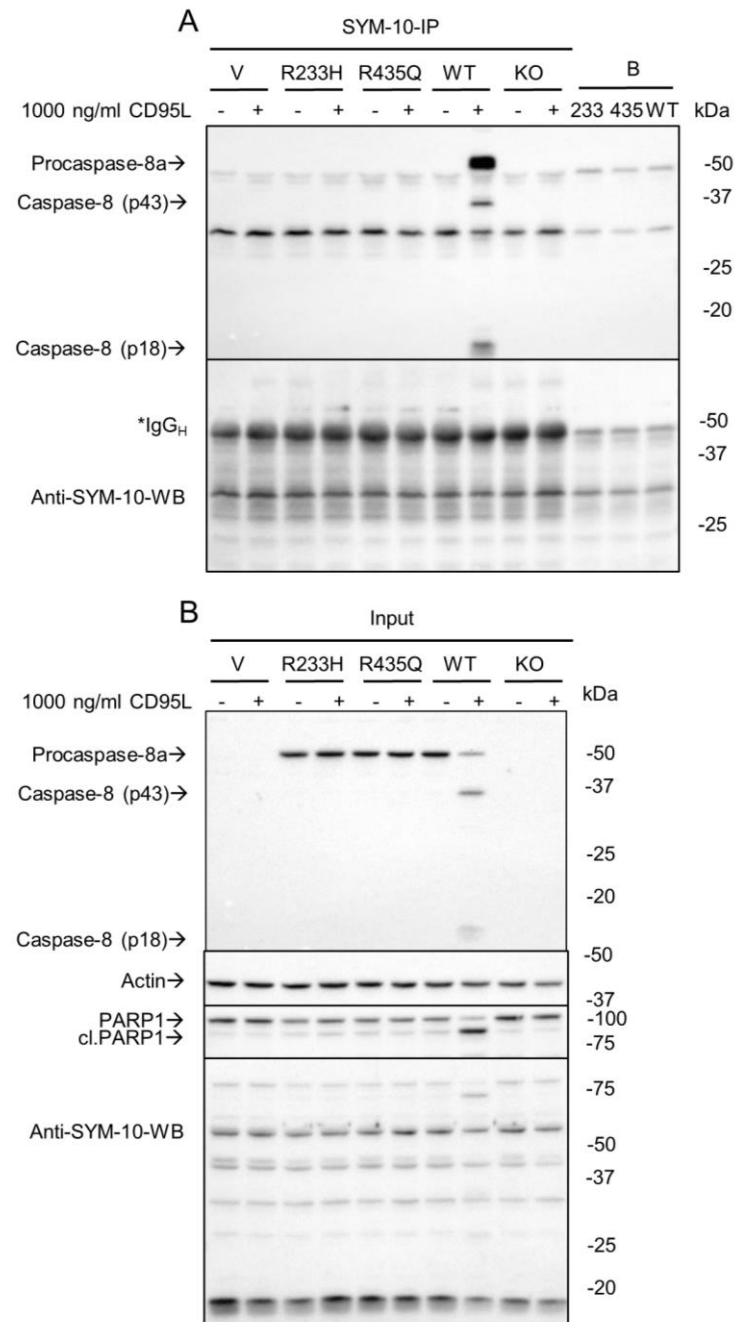


Abbildung 22 Mögliche Signale der Caspase-8-Mutationen werden innerhalb der Methylierungs-IP detektiert: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach der Transfektion mit 1000 ng/ml CD95L für eine Stunde stimuliert. Das Zelllysate (Input) wurde einer IP mit SYM-10-Antikörper (A) unterzogen. Sowohl Lysat (B) als auch SYM-10-IP werden dargestellt. Die Bead-Kontrolle wird durch „B“ markiert. Die dargestellten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Die *Heavy-Chain* des Antikörpers wird mit IgG_H markiert. Die IP erfolgten durch folgendes Protokoll: IP nach Protokoll 2 (siehe Kapitel 2.2.7.2). Abkürzungen: Vektor: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; KO: HeLa-CD95-C8-KO Zellen.

3.2 Dekodierung des RL2-Mechanismus in Mammakarzinomzellen

Brustkrebs gehört noch immer zu den häufigsten Karzinomarten innerhalb von Deutschland. Für eine sanftere Therapie werden neue Therapieformen auf Basis von natürlich vorkommenden Proteinen und Peptiden untersucht. Eines dieser Peptide ist RL2, bei dem der Zelltod-Mechanismus innerhalb von Mammakarzinomzellen bisher unbekannt war. Hauptziel ist dabei die Entschlüsselung des RL2-induzierten Zelltodes und potenziellen Signalweges. Darüber hinaus soll das Zusammenspiel zwischen RL2 und weiteren Signalwegen, wie beispielsweise dem extrinsischen Apoptose-Signalweg untersucht werden. Dieses Zusammenspiel und der Hauptmechanismus sollen im Folgenden entschlüsselt werden.

3.2.1 RL2-Translokation an die Mitochondrien

Ein wesentlicher Ansatz für die Dekodierung des RL2-Mechanismus ist die Lokalisierung des Peptids innerhalb von Zellen. Für eine genaue Lokalisierung wird eine Fraktionierung der Zellen vorgenommen. Dazu werden MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen für eine Stunde oder drei Stunden mit 300 µg/ml RL2 stimuliert, die Proben in Zytosol-, Nukleus- und Mitochondrien-Fractionen getrennt und mit den unstimulierten Proben verglichen (siehe Abbildung 23A). Die Qualität der Fraktionierung wird anhand spezifischer Marker-Proteine überprüft. SOD2 (Superoxid Dismutase 2) ist ein Enzym, das innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, genau wie AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) oder das bereits benannte Protein TOM70 (siehe Kapitel 1.4.2). Als Nukleus-Marker-Protein dient PARP1, das nur innerhalb des Nukleus vorkommt (siehe Kapitel 1.2). Für die Zytosol-Fraktion wird Actin als Marker verwendet. Dieses Protein ist Teil des Zytoskeletts und kommt verstärkt innerhalb des Zytosols vor. Actin kann allerdings auch zusätzlich innerhalb des Nukleus geortet werden. Unter allen Versuchsbedingungen ist die Einteilung und Detektion der Mitochondrienproteine gleich. SOD2 und AIF-Signale sind jeweils in den Mitochondrien-Fractionen am stärksten. Gleiches gilt für die Nukleus-Fractionen, bei denen PARP1 ausschließlich in dieser Fraktion detektiert werden kann. Actin-Signale können sowohl bei unstimulierten Proben als auch bei den stimulierten Proben innerhalb der Nukleus-Fraktion, aber noch stärker in der Zytosol-Fraktion detektiert werden. Nur nach drei Stunden RL2-Stimulation ist das Actin-Signal in der Nukleus-Fraktion stärker als in der Zytosol-Fraktion. So kann nachgewiesen werden, dass in jeder Fraktion die spezifischen Proteine vorhanden sind und somit die Fraktionierung erfolgreich war (siehe Abbildung 23A). Innerhalb der Zell-Fraktionierung werden die stärksten RL2-Monomer-Signale jeweils in den Mitochondrien-Fractionen detektiert. Zusätzlich sind RL2-Signale in der Nukleus-Fraktion vorhanden. In der Zytosol-Fraktion dagegen sind keine RL2-Signale vorhanden. Zusätzlich konnten neben Monomer-Signalen auch Dimer-Signale innerhalb der Mitochondrien-Fraktion detektiert werden. Sowohl die starken Monomer- als auch die Dimer-Signale verdeutlichen, dass RL2 an den Mitochondrien lokalisiert werden kann (siehe Abbildung 23A). Mit Hilfe des Versuches kann gezeigt werden, dass RL2 in die Zellen transloziert und an den Mitochondrien lokalisiert ist.

Nachdem RL2 an den Mitochondrien lokalisiert wurde, wird anschließend der RL2-Einfluss auf die OCR (engl. *Oxygen Consumption Rate*/ dt. Sauerstoffverbrauchsrate) überprüft, da die Mitochondrien als Hauptkraftwerk der Zellen dienen. Die Messung des OCR erfolgt dazu nach acht Stunden RL2-Stimulation durch Dr. rer. nat. Lado Otrin (Max-Planck-Institut für dynamische Komplexe in technischen Systemen). Nach der Stimulation werden die

unstimulierten Proben mit den RL2-stimulierten Proben und der Messung der OCR verglichen. Beide Versuchsbedingungen weisen eine fast identische OCR auf (siehe Abbildung 23B). Somit wird die OCR durch eine achtstündige RL2-Stimulation nicht verändert.

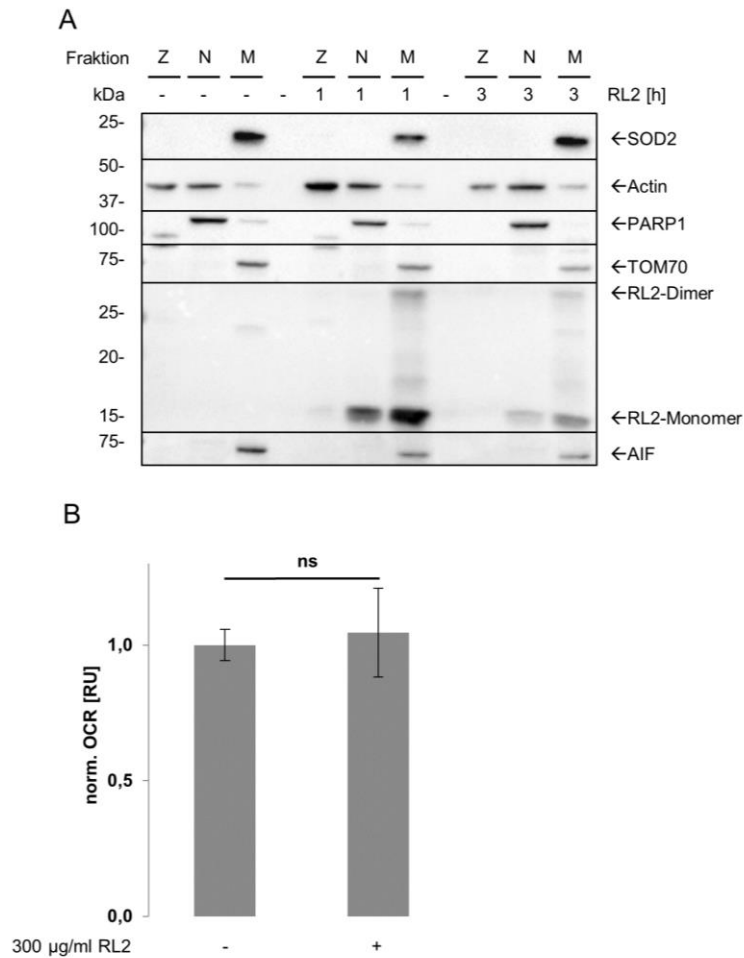


Abbildung 23 RL2 transloziert nach der Stimulation an die Mitochondrien: MDA-MB-231 werden mit 300 µg/ml RL2 für die angegebene Zeit stimuliert und anschließend fraktioniert in Z (Zytosol), N (Nukleus) und M (Mitochondrien) Fraktionen (A). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment für drei unabhängige Versuche. Messung der OCR (engl. *Oxygen Consumption Rate*) nach einer achtstündigen Stimulation mit 300 µg/ml RL2 (B). Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests. Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzungen: Z: Zytosol; N: Nukleus; M: Mitochondrien; OCR: *Oxygen Consumption Rate*; RU: *relative unit*. Abbildung A: modifiziert nach [291]; Abbildung B: modifiziert nach [292].

Im Zuge einer Veröffentlichung, wurden MS und Western Blot Analysen für die Untersuchung mit Hilfe eines RL2-Pull-downs angefertigt (*Pull-down* nach Protokoll 3, Kapitel 2.2.7.3). Dabei konnte das Protein TOM70 als Hauptinteraktionspartner erfasst werden (Daten nicht gezeigt) [291]. Neben TOM70 können weitere Proteine an dem RL2-Pull-down detektiert werden. Zudem können weitere Proteine des TIM-Komplexes (*Translocase of the Inner Membrane*) (TIM8A; TIM8B) detektiert werden. Dieser Komplex ist konträr zum TOM-Komplex und dient ebenfalls dem Import von Proteinen in die Mitochondrien. Der TOM-Komplex befindet sich dabei an der äußeren Membran, der TIM-Komplex an der inneren Membran. Um die Interaktion voneinander unabhängig zu validieren wurde eine IP mit einem anti-TOM70-Antikörper durchgeführt. Dabei konnten spezifische Banden von RL2 innerhalb der stimulierten Probe erfasst werden (Daten nicht gezeigt) [291]. Die Detektionen von TOM70 als potenziellem Hauptinteraktionspartner und die Konnektivität zu Proteinen des TIM-Komplex verdeutlicht die RL2-Lokalisierung an Mitochondrien.

3.2.2 Induzierung von Mitophagie in MDA-MB-231 Zellen durch RL2

Eine Unterart der Autophagie, die speziell bei Mitochondrien auftritt, ist die Mitophagie (siehe Kapitel 1.4.2). Innerhalb der Mitophagie kann der TOM-Komplex eine wichtige Rolle spielen. Er dient dazu, Proteine in das Innere der Mitochondrien zu leiten, sodass diese verdaut werden können. Eine Beeinträchtigung des TOM-Komplex kann daher zu einer Induzierung der Mitophagie beitragen und diese auslösen (siehe Kapitel 1.4.2).

Aufgrund der Lokalisierung von RL2 und der Interaktion zwischen RL2 und TOM70 an Mitochondrien, wird die Wirkung von RL2 auf spezifische mitochondriale Zelltod-Proteine und Mitophagie überprüft (siehe Abbildung 24). Die Induzierung von Mitophagie und Autophagie kann anhand der Zunahme von LC3-II detektiert werden (siehe Kapitel 1.4.1). Tatsächlich führt die 300 µg/ml RL2-Stimulation bereits nach zwei Stunden zu einer Steigerung des LC3-II Levels bei gleichzeitiger Abnahme von LC3-I. Auch nach vier Stunden 300 µg/ml RL2-Stimulation ist das LC3-II-Level über der unstimulierten Probe und zeigt, dass es sich um keinen zufälligen Effekt handelt (siehe Abbildung 24A). Diese Konvertierung von LC3 gibt einen Hinweis auf die RL2-induzierte Autophagie oder Mitophagie. Gleichzeitig wird der Einfluss von RL2 auf die Level von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Protein-Familie untersucht (siehe Abbildung 24A). Wichtige pro-apoptotische Proteine sind Bax sowie Bid, die ebenfalls Hauptbestandteile der intrinsischen Apoptose sind (siehe Kapitel 1.2). Nach vier Stunden 300 µg/ml RL2-Stimulation kommt es zu einer Reduzierung dieser Proteine (siehe Abbildung 24A). Dagegen steigt das Level des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 durch die RL2-Stimulation an. Somit besitzt RL2 einen eher anti-apoptotischen Effekt auf die Bcl-2-Protein-Familie. Darüber hinaus werden Effekte auf die Caspase-8-Kaskade untersucht. Allerdings führt RL2 weder zu einer Spaltung von Procaspase-8 noch von Procaspase-3 (siehe Abbildung 24A).

RL2 ist an den Mitochondrien lokalisiert, zusätzlich kann der TOM-Komplex und vor allem TOM70 bei der Induzierung von Mitophagie beitragen. Deshalb wird überprüft, ob RL2 Mitophagie induzieren kann (siehe Abbildung 24B, C). Die Stimulation mit 300 µg/ml RL2 erhöht das jeweilige Niveau von PINK1 und LC3-II bereits nach zwei Stunden Stimulation (siehe Abbildung 24B). Auch bei einer niedrigeren Konzentration von 200 µg/ml führt RL2 zu einem Anstieg von LC3-II und PINK1. Dabei werden ebenfalls die Protein-Level der Mitophagie-Marker BNIP3 und NIX erhöht (siehe Abbildung 24C). Die verschiedenen Anstiege der Mitophagie-Marker-Proteine zeigen deutlich, dass RL2 Mitophagie induziert. Gemeinsam mit der Lokalisierung und dem Einfluss auf das mitochondriale Potenzial (Daten nicht gezeigt) zeigt dies, dass Mitophagie ein wesentlicher Mechanismus von RL2 innerhalb der Zellen sein kann. Neben der Entschlüsselung des RL2-Mechanismus in dieser Dissertation, soll das Zusammenspiel zwischen RL2 und weiteren Zelltod-Induktoren untersucht werden. Für diesen Zweck wird der extrinsische Apoptose-Induktor TRAIL verwendet. Als erstes wird überprüft, ob TRAIL einen Einfluss auf die RL2-induzierte Mitophagie besitzt. Dazu werden MDA-MB-231 Zellen nach TRAIL-Einzelstimulationen und RL2-TRAIL-Doppelstimulationen analysiert (siehe Abbildung 24B, C). Durch die TRAIL-Stimulation kommt es zu keiner bzw. kaum einer Erhöhung der Proteinlevels von LC3-II, PINK1, BNIP3 und NIX (siehe Abbildung 24B, C). Darüber hinaus können jedoch Effekte der TRAIL-induzierten Apoptose auf die RL2-Mitophagie beobachtet werden. So senkt die TRAIL-Behandlung innerhalb der Co-Stimulation mit RL2 den Anstieg von LC3-II und PINK1 (siehe Abbildung 24B). Auch bei einer niedrigeren Konzentration beider Stimulanzen sind die Level der Mitophagie-Marker-Proteine LC3-II und PINK1 niedriger als bei einer reinen RL2-Stimulation (siehe Abbildung 24C). Außerdem werden die Niveaus der übrigen Marker-Proteine BNIP3 und NIX auf einem niedrigeren Level

detektiert. Somit reduziert die TRAIL-induzierte Apoptose die durch RL2 hervorgerufene Mitophagie (siehe Abbildung 24B, C).

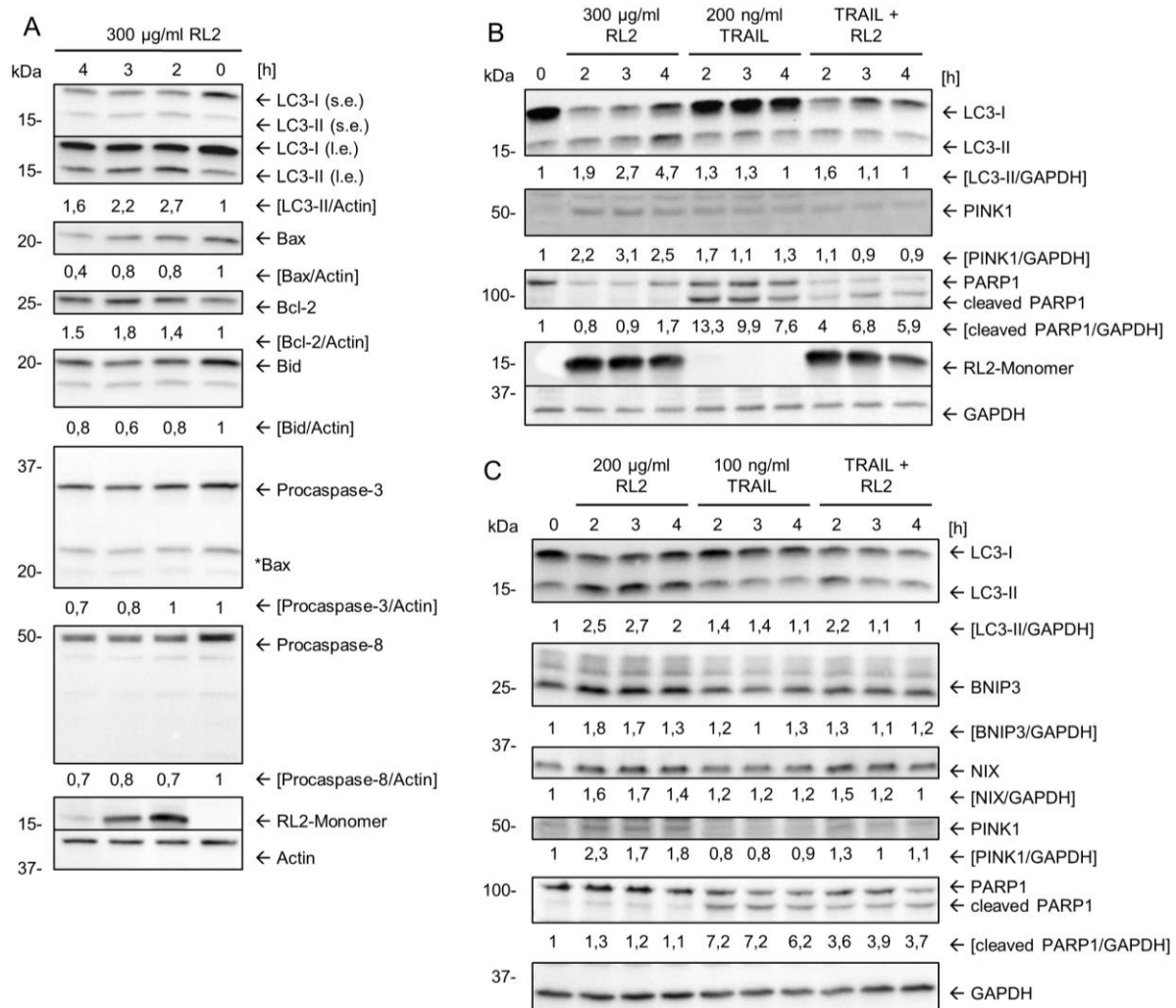


Abbildung 24 RL2 induziert Mitophagie: MDA-MB-231 Zellen werden mit RL2 (**A**) und TRAIL (**B, C**) in den angegebenen Konzentrationen und Zeitdauern stimuliert. Zwischen den einzelnen detektierten Antikörpern stehen die Werte der jeweiligen Quantifizierung. Dargestellt wird jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Für LC3-I und LC3-II werden jeweils sowohl kurze Belichtungen (s.e./ short exposure) als auch längere Belichtungen (l.e./ long exposure) gezeigt (**A**). Abkürzungen: Abbildung: s.e.: short exposure; l.e.: long exposure. modifiziert nach [292].

Jedoch kommt es auch zu umgekehrten hemmenden Effekten. Die TRAIL-induzierte Apoptose führt zu einer Spaltung des Enzyms PARP1. Die Zunahme des Spaltproduktes nimmt bereits nach zwei Stunden Stimulation stark zu und ist ein Hinweis auf die Induzierung von Zelltod (siehe Abbildung 24B, C). Eine RL2-Behandlung der MDA-MB-231 Zellen führt zu einer geringeren Spaltung von PARP1. Innerhalb der Co-Stimulation aus RL2 und TRAIL ist das Level der PARP1-Spaltung niedriger als nach einer TRAIL-Behandlung (siehe Abbildung 24B, C). Zusätzlich verbleibt das Niveau der PARP1-Spaltung auf einem Level innerhalb der vier Stunden Co-Stimulation. Für diese Zeitpunkte ist es daher keine kurzfristige Hemmung, die zu einer verzögerten Spaltung führt, sondern eine langfristige Hemmung (siehe Abbildung 24B, C). Somit könnten hemmende Effekte in der TRAIL hervorgerufenen Apoptose durch die RL2-induzierten Mitophagie auftreten.

3.2.3 Wechselhaftes Zusammenspiel von TRAIL und RL2 Co-Stimulationen

In ersten Versuchen konnte RL2 innerhalb der Zelle lokalisiert werden (siehe Abbildung 23). Zudem wurde TOM70 als Interaktionspartner an den Mitochondrien identifiziert und Mitophagie konnte als wichtigstes Resultat einer RL2-Stimulation dekodiert werden (siehe Abbildung 23) [291] [292]. Es zeigt sich auch, dass die durch TRAIL verursachte Apoptose hemmende Effekte auf die Zunahme der Mitophagie-Marker Proteine hat. Zusätzlich kommt es jedoch auch zu konträren und inhibitorischen Effekten der Mitophagie auf die TRAIL-induzierte Apoptose, indem die Spaltung des Enzyms PARP1 reduziert wird (siehe Abbildung 24).

Im Folgenden werden die Effekte der Co-Stimulation auf die Zellviabilität und den Zelltod untersucht. Es soll überprüft werden, ob die detektierten Effekte einen größeren Einfluss auf die Zellen ausüben. Dazu wird die Zellviabilität anhand eines metabolischen Assays untersucht (siehe Abbildung 25). Eine RL2-Stimulation führt nach sechs Stunden zu einer Reduzierung der metabolischen Aktivität um etwa die Hälfte. Nach Stimulationen von mehr als 24 Stunden sogar auf etwa ein Drittel (siehe Abbildung 25). Diese Daten decken sich mit den bereits etablierten Ergebnissen und verdeutlichen, dass RL2-Behandlungen zu einer Reduzierung der Zellviabilität führen (siehe Kapitel 1.5, Abbildung 25). Eine stärkere Reduzierung der Zellviabilität wird durch die Einzelstimulation mit TRAIL hervorgerufen. Bereits nach sechs Stunden Stimulation reduziert TRAIL die Zellviabilität auf etwa ein Sechstel der Zellviabilität und besitzt stärkere Effekte als RL2. Nach 24 Stunden wird die Zellviabilität weiter reduziert, was zeigt, dass die Effekte zeitabhängig sind. Nach einer sechsstündigen Co-Stimulation aus simultaner Behandlung mit RL2 und TRAIL sinkt die Viabilität der Zellen nicht auf das gleiche Level wie bei einer reinen TRAIL-Stimulation zum gleichen Zeitpunkt (siehe Abbildung 25). Die zuvor detektierten und hemmenden Effekte auf die Spaltung von PARP1 können daher auf die frühen Zeitpunkte einer Co-Stimulation übertragen werden (siehe Abbildung 24, 25). Über die Zeit wechseln die Effekte der Co-Stimulation, denn nach 24 Stunden Co-Stimulation ist die Reduzierung der Zellviabilität auf einem gleichen Level wie nach einer TRAIL-Einzelstimulation. Zudem sinkt das Niveau der Zellviabilität für längere Zeitpunkte noch weiter ab und ist nach 30 Stunden Co-Stimulation niedriger als bei einer TRAIL-Einzelstimulation (siehe Abbildung 25). Die hemmenden Effekte einer frühen Co-Stimulation werden zu sensitiven, langfristigen Effekten umgewandelt. Sie ermöglichen so eine stärkere Reduzierung der Zellviabilität durch die Co-Stimulation, verglichen mit den jeweiligen TRAIL- oder RL2-Einzelstimulationen.

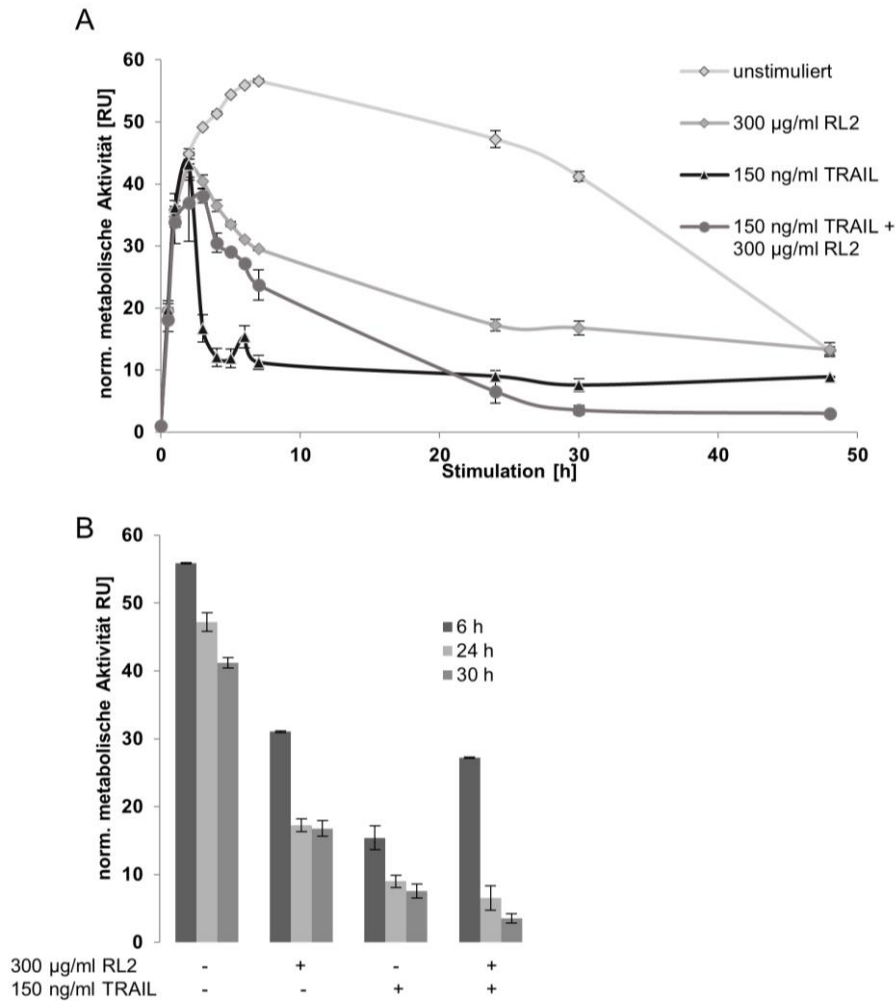


Abbildung 25 RL2 inhibiert die TRAIL-induzierte Reduzierung der Zellviabilität in den ersten Stunden, sensitiviert die Zellen jedoch bei längerer Stimulationsdauer: MDA-MB-231 werden mit 300 µg/ml RL2, 150 ng/ml TRAIL oder gemeinsam stimuliert (A, B). Die metabolische Aktivität wird mit Hilfe eines metabolischen Assays erfasst. (B) entspricht den Zeitpunkten aus (A). In (B) erfolgt eine Normalisierung entsprechend der unstimulierten Proben zu den jeweiligen Zeitpunkten. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: RU: *relativ unit*; h: Stunden. Abbildung: modifiziert nach [292].

Nachdem die wechselhaften Effekte der Co-Stimulation entdeckt wurden, soll als nächstes überprüft werden, ob diese Effekte auf die Induzierung des Zelltodes übertragen werden können (siehe Abbildung 26). Es werden MDA-MB-231 Zellen mit TRAIL oder der Co-Stimulation aus RL2 und TRAIL für sechs Stunden und 48 Stunden stimuliert (siehe Abbildung 26). Der Zelltod wird mit Hilfe des bildgebenden Durchflusszytometers und PI bzw. Annexin V FITC-Färbung detektiert (siehe Abbildung 26C, siehe Kapitel 2.2.9). In früheren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass RL2 Zelltod induziert (siehe Kapitel 1.5). Eine TRAIL-Einzelstimulation steigert die Anzahl der doppel-positiven Zellen um das Dreifache, verglichen mit der unstimulierten Probe. Hingegen führt eine Co-Stimulation nur zu einer halb so großen Steigerung. Somit können auch für den Zelltod hemmende Effekte durch die Co-Stimulation detektiert werden (siehe Abbildung 26A). Nach 48 Stunden Stimulation steigert die Co-Stimulation die Anzahl der erfassten doppel-positiven Zellen stark an, verglichen mit der unstimulierten Probe. Im Gegensatz dazu nimmt die Zahl der doppel-positiven Zellen durch die TRAIL-Einzelstimulation nur um etwa das Sechsfache zu (siehe Abbildung 26B). Die bereits erfassten sensitiven Effekte der Co-Stimulation lassen sich daher auch auf die Induzierung des Zelltodes übertragen, da verglichen mit einer reinen TRAIL-Stimulation mehr doppel-positive Zellen vorhanden sind (siehe Abbildung 26B).

Sowohl innerhalb der Reduzierung der Zellviabilität als auch in der Induzierung des Zelltodes können gegensätzlichen Effekte durch die Co-Stimulation aus RL2 und TRAIL beobachtet werden. Diese Effekte unterliegen einem zeitlichen Einfluss. Dabei kommt es in den ersten Stunden der Stimulation zu hemmenden Effekten auf die Signalwege. Durch eine längere Stimulation können hingegen fördernde Effekte auf den Zelltod beobachtet werden.

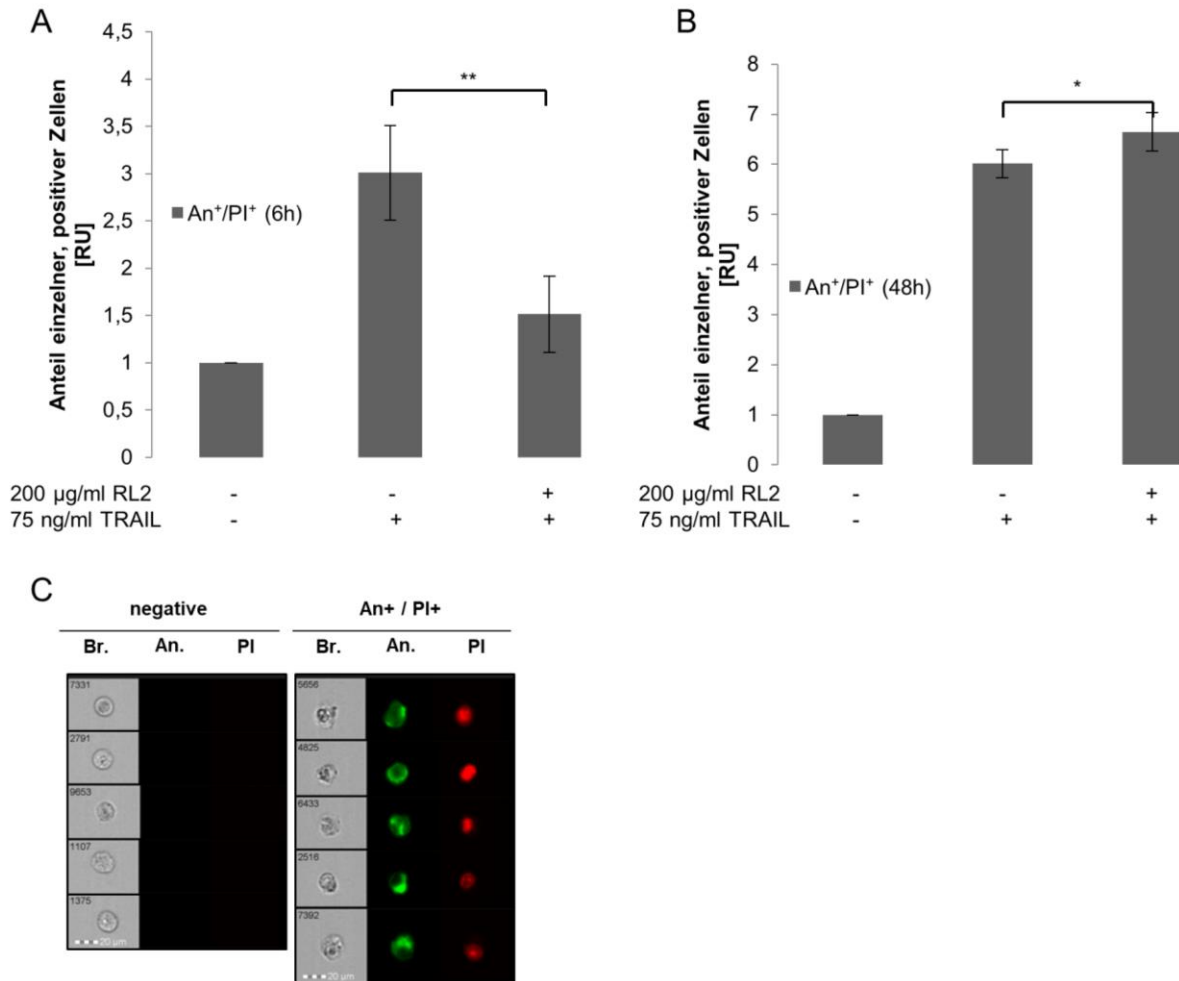


Abbildung 26 RL2 inhibiert TRAIL induzierten Zelltod, verstärkt ihn jedoch über längere Zeit: MDA-MB-231 Zellen werden mit 75ng/ml TRAIL stimuliert oder mit 200µg/ml RL2 und TRAIL co-stimuliert. Die Stimulationen erfolgen für sechs Stunden (A) oder 48 Stunden (B). Anschließend werden die Zellen mit PI und Annexin V FITC gelabelt und die Fluoreszenz mit einem bildgebenden Durchflusszytometer gemessen. Gezeigt werden die normierten Mittelwerte der erfassten einzelnen positiven Zellen (A, B). Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Fluoreszenzsignale der Propidium Iodid (PI)- und Annexin V FITC (An)-Färbungen (C). Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe unpaired Student t-Tests. Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzungen: An+ = Annexin V FITC positive Zellen; PI+ = PI positive Zellen; Br.=engl. *bright field*/ dt.Hellfeld; RU: *relative unit*. Abbildung: modifiziert nach [292].

3.2.4 Inhibierung der TRAIL-induzierten Caspase-8-Kaskade durch RL2

Nachdem die unterschiedlichen Effekte der Doppelstimulation mit TRAIL erfasst werden konnten, erfolgt die Untersuchung der hemmenden und inhibitorischen Effekte. Für die Überprüfung der DISC-Formierung werden IP mit Hilfe des anti-His-Tag-Antikörpers durchgeführt. Das verwendete TRAIL besitzt an einem Epitop ein His-Tag. Über die Bindung des Liganden an den Antikörper können anschließend der Rezeptor und darauf aufbauend die weiteren Komponenten des DISC immunpräzipitiert werden. Innerhalb der unstimulierten Probe können keine spezifischen DISC-Mitglieder detektiert werden. Es fehlt der Ligand, der DR4 aktiviert und somit erfolgt keine DISC-Formierung und Detektion. Gleiches gilt für eine reine RL2-Stimulation (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation der MDA-MB-231 Zellen mit TRAIL führt zu einer DISC-Formierung (siehe Abbildung 27A). Nach der TRAIL-Stimulation kommt es zu einer Bindung der DISC-Mitglieder Caspase-8, FADD und DR4. Dabei können auch die beiden aktiven Caspase-8-Spaltprodukte p43 und p41 erfasst werden, die durch die DISC-Formierung generiert werden (siehe Abbildung 27A). Nach einer Co-Stimulation aus RL2 und TRAIL können Mitglieder des DISC detektiert werden. Jedoch sind die Signale von FADD, Procaspase-8, Caspase-8 (p43, p41) und DR4 deutlich schwächer als die spezifischen Signale nach einer TRAIL-Stimulation. Da das Level der verwendeten Antikörper identisch ist, zeigt sich der inhibitorische Effekt von RL2 auf die DISC-Formierung bei einer Co-Stimulation (siehe Abbildung 27A). Bei der Untersuchung des Lysats fällt auf, dass die Spaltprodukte von Caspase-8 nach einer Co-Stimulation auf einem niedrigeren Protein-Niveau sind als bei einer TRAIL-Einzelstimulation. Gleiches gilt auch für FADD sowie Procaspase-8. Beide Proteine sind durch die Co-Stimulation innerhalb des Lysats auf einem niedrigeren Level, verglichen mit der TRAIL-Einzelstimulation (siehe Abbildung 27B). Somit hemmt RL2 nicht nur direkt die Formierung des DISC, sondern reduziert ebenfalls die Level der DISC-Proteine.

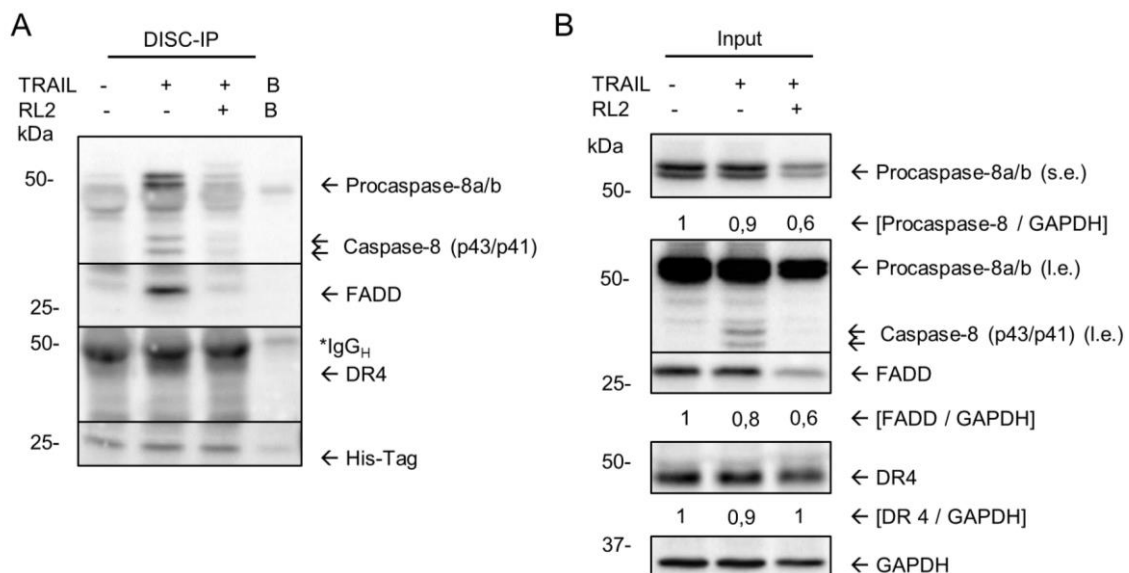


Abbildung 27 RL2 inhibiert die TRAIL-induzierte DISC-Formierung: MDA-MB-231 Zellen werden mit 100 ng/ml TRAIL und 200 µg/ml RL2 für eine Stunde stimuliert. Das Zelllysate (Input) wurde einer IP mit His-Tag-Antikörpern (DISC-IP) (A) unterzogen. Sowohl Lysat (B) als auch DISC-IP werden dargestellt. Die Bead-Kontrolle wird durch „B“ markiert. Für Procaspase-8 werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) als auch längere Belichtungen (l.e./ *long exposure*) gezeigt. Die dargestellten Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Die Heavy-Chain des Antikörpers wird mit IgG_H markiert. Die IP erfolgten durch folgendes Protokoll: IP nach Protokoll 1 (siehe Kapitel 2.2.7.1). Abkürzung: IP: Immunpräzipitation; DISC: engl. *death-inducing signalling complex*; DR4: engl. *death receptor 4*/ dt. Todesrezeptor 4. s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*; B: Bead-Kontrolle. Abbildung: modifiziert nach [292].

Nach der Feststellung der DISC-Reduzierung durch RL2 soll überprüft werden, ob die niedrige Menge des DISC ausreichend ist, um die Caspase-Kaskade zu induzieren. Dafür wird die Spaltung von Caspase-8 und dessen Aktivität analysiert (siehe Abbildung 28). Eine RL2-Stimulation reduziert das Level an Procaspase-8 leicht, gleiches ist nach einer TRAIL-Behandlung zu sehen. Jedoch wird durch die TRAIL-Stimulation Procaspase-8a/b gespalten, sodass ebenfalls die Spaltprodukte p43/ p41, p30 und p18 zu detektieren sind. Diese Spaltprodukte sind nicht innerhalb der RL2-Stimulationen zu sehen. RL2 reduziert daher das Procaspase-8a/b-Level, ohne dass es zu stabilen Spaltprodukten kommt. Innerhalb der Co-Stimulation können ebenfalls die genannten Spaltprodukte detektiert werden. Allerdings sind die Level dieser Proteine innerhalb der Co-Stimulation auf einem niedrigeren Level, verglichen mit der reinen TRAIL-Stimulation (siehe Abbildung 28A).

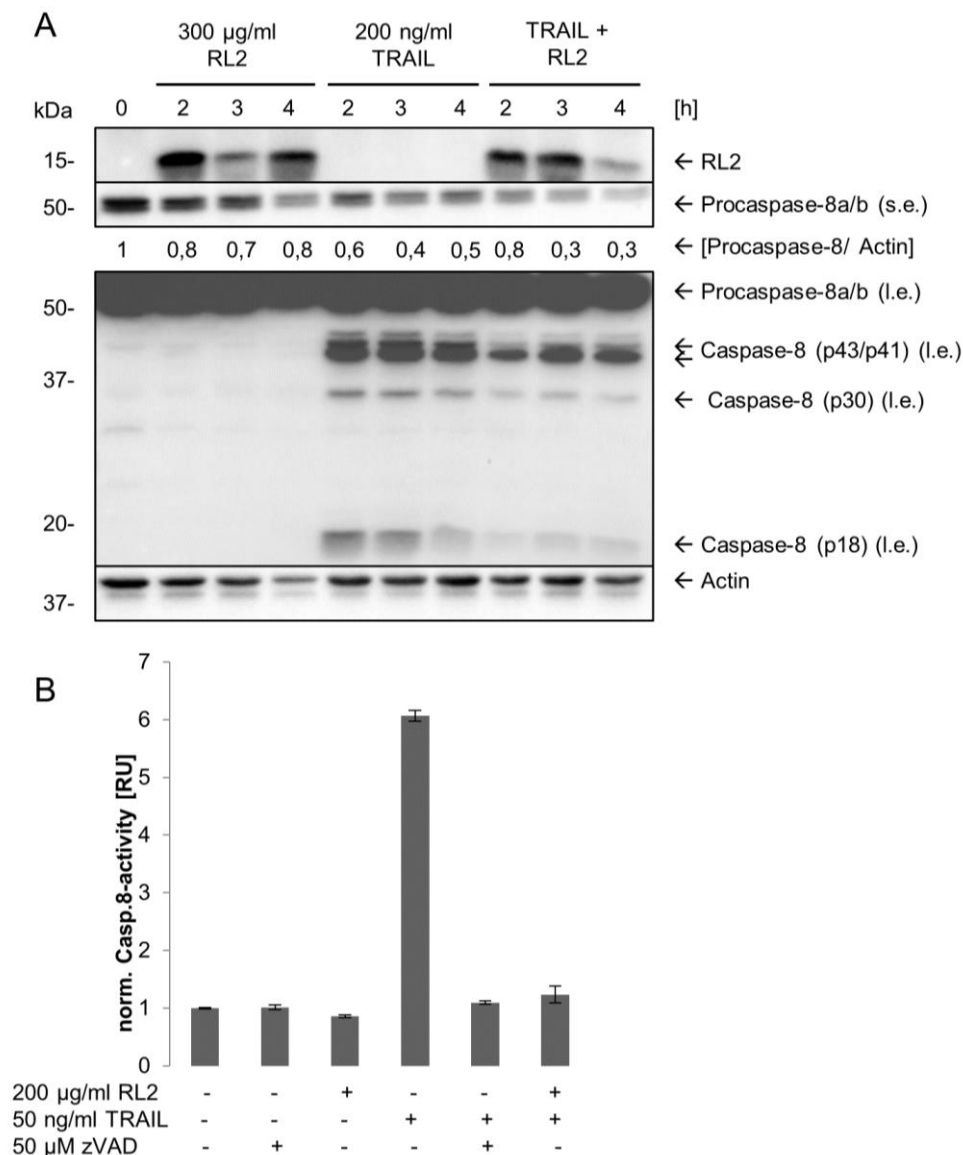


Abbildung 28 RL2 reduziert die TRAIL-induzierte Caspase-8 Spaltung und Aktivierung: MDA-MB-231 Zellen werden für die angegebene Zeit mit den angegebenen Konzentrationen von RL2, TRAIL und zVAD stimuliert. Die Western Blot Analyse zeigt sowohl die quantifizierten Werte der Signale (zwischen den Zeilen) als auch kurze Belichtung (s.e./ *short exposure*) und längere Belichtung (l.e./ *long exposure*) von Procaspase-8a/b und Caspase-8 (A). Dargestellt wird ein Experiment, repräsentativ für drei weitere Versuche. Die Caspase-8-Aktivität wurde mittels Caspase-8-Assays bestimmt (B). Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*; RU: *relative unit*. Abbildung: modifiziert nach [292].

Neben der Spaltung von Procaspase-8 wird die Aktivität des Proteins mit Hilfe eines Assays überprüft. Die TRAIL-Stimulation führt zu einem starken Anstieg der Caspase-8-Aktivität, eine Steigerung der Aktivität kann durch RL2 nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 28B). Gleiche Effekte werden bei einer zVAD-Stimulation beobachtet, welche als Pan-Caspase-Inhibitor als Negativ-Kontrolle dient. Die Co-Stimulation aus TRAIL und zVAD resultiert in einem starken inhibitorischen Effekt, bei der die Caspase-8-Aktivität auf das Niveau der unstimulierten Probe gesenkt wird. Auch die bereits detektierten inhibitorischen Effekte von RL2 innerhalb der Co-Stimulation können bei einer Überprüfung der Caspase-8-Aktivität beobachtet werden. Die Caspase-8-Aktivität erreicht nach der gemeinsamen Stimulation lediglich ein leicht erhöhtes Niveau (siehe Abbildung 28B). RL2 führt somit zu einer Reduzierung der Aktivität und Caspase-8-Spaltung.

Darüber hinaus konnten weitere hemmende Effekte von RL2 auf die TRAIL-induzierte DISC-Formierung detektiert werden. Nun soll untersucht werden, ob die reduzierte Caspase-8-Aktivität ausreichend ist, um die Effektor-Caspase-3 zu spalten und zu aktivieren. Dazu werden Aktivitäts-Assays und die Spaltung des Proteins betrachtet (siehe Abbildung 29). Die TRAIL-Behandlung führt zu einer deutlichen Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität um etwa das Fünffache (siehe Abbildung 29A). Auch eine RL2-Behandlung ermöglicht einen leichten Anstieg der Aktivität. Dieser beträgt jedoch nur das Doppelte, verglichen mit der unstimulierten Probe und liegt daher deutlich unter der Caspase-Aktivierung durch TRAIL. Die Aktivität von Caspase-3/7 ist nach einer RL2+TRAIL-Co-Stimulation größer angestiegen als nach einer reinen RL2-Stimulation, zugleich aber auch niedriger als nach einer einzelnen TRAIL-Stimulation (siehe Abbildung 29A). Die Überprüfung der Spaltprodukte mit Hilfe der Western Blot Analyse bestätigt die zuvor erfassten inhibitorischen Effekte von RL2 auf TRAIL (siehe Abbildung 29B).

Da es sich bei der Stimulation um eine simultane Behandlung handelt, wird ebenfalls die Prä-Stimulation überprüft (siehe Abbildung 29A). Eine Einzelstimulation mit TRAIL führt konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität auf das Zehnfache. Im Gegensatz dazu steigt die Aktivität durch RL2 kaum an. Die simultanen Stimulationen zeigen die gleichen inhibitorischen Effekte wie zuvor. Die Aktivität steigt zwar an, liegt aber unter der reinen TRAIL-Stimulation. Fast die gleichen Effekte werden nach einer RL2-Prä-Stimulation detektiert. Somit führt auch eine Prä-Stimulation mit RL2 zu inhibitorischen Effekten mit fast identischen Effekten wie eine simultane Co-Stimulation (siehe Abbildung 29A).

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine RL2-Behandlung zu einer Spaltung und Aktivierung von Procaspase-3 führt (siehe Kapitel 1.5) [278] [279]. Diese Daten können mit den Mammakarzinomzellen reproduziert werden (siehe Abbildung 29). Dabei führt eine RL2-Stimulation zu einer leichten Spaltung von Procaspase-3 (siehe Abbildung 29B). Die Behandlung mit TRAIL führt zu einer stärkeren Spaltung von Procaspase-3 und damit zu einem Anstieg der Proteinlevel von Caspase-3 (p19/ p17). Eine Co-Stimulation aus TRAIL und RL2 resultiert ebenfalls in einer Spaltung von Procaspase-3. Das Niveau der Spaltprodukte liegt dabei höher als bei einer reinen RL2-Behandlung, ist jedoch niedriger als bei einer reinen TRAIL-Stimulation (siehe Abbildung 29B).

Dieser Versuch verdeutlicht daher, dass auch die TRAIL-induzierte Spaltung von Procaspase-3 durch RL2 gehemmt werden kann.

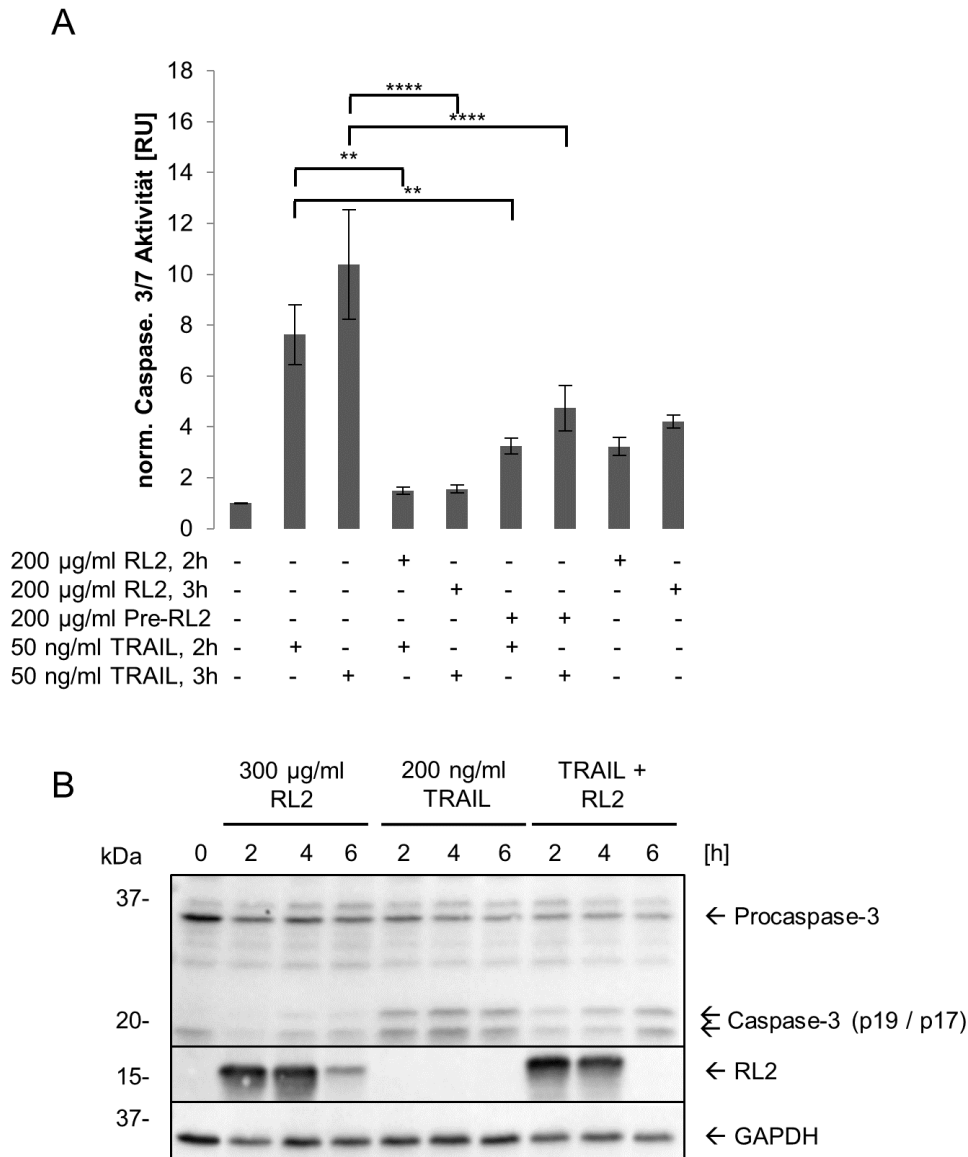


Abbildung 29 RL2 inhibiert die TRAIL-induzierte Caspase-3-Aktivität: MDA-MB-231 Zellen werden für die angegebene Zeit mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 und TRAIL stimuliert. Die Caspase-3/7-Aktivität wird mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt (A). Die Co-Stimulation erfolgt simultan oder in der gezeigten Vorstimulation (pre-RL2/ eine Stunde vor TRAIL-Stimulation). Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Die Western Blot Analyse zeigt die Spaltung von Procaspase-3 nach TRAIL und RL2 sowie Co-Stimulation (B). Abkürzungen: RU: *relativ unit*. Abbildung: Modifiziert nach [292].

3.2.5 Gegenseitige Behinderung von RL2 und TRAIL

Die Caspase-Kaskade ist einer der wichtigsten DR-Signalwege, der unter anderem durch TRAIL aktiviert werden kann. Innerhalb der intrinsischen Apoptose spielt die Bcl-2-Protein-Familie eine besonders wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.2). Daher wird im Folgenden überprüft, welchen Einfluss eine Co-Stimulation aus RL2 und TRAIL auf die Bcl-2-Protein-Familie haben kann. Es werden das pro-apoptotische Protein Bax sowie die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 nach Einzel- und Co-Stimulation überprüft (siehe Abbildungen 24A, 30A). Die reine RL2-Behandlung der Mammakarzinomzellen führt zu einem leichten Anstieg der Level der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-2. Die gleichen Effekte werden in der Co-Stimulation mit TRAIL beobachtet. Eine reine TRAIL-Stimulation führt hingegen nicht zu einem Anstieg dieser Proteine. Demzufolge erfolgen der Proteinanstieg und damit ebenfalls die

einhergehenden hemmenden Effekte auf die Apoptose in Folge der RL2-Stimulation. Dagegen führen eine RL2-Stimulation oder die Doppelbehandlung zu einer Reduzierung der Bax-Signale. Eine TRAIL-Stimulation resultiert in einem etwas niedrigeren bzw. fast gleichbleibenden Signal des pro-apoptotischen Proteins Bax. Dies verdeutlicht ebenfalls die inhibitorischen Effekte von RL2 auf die Apoptose-Signale durch TRAIL (siehe Abbildung 30A).

Neben den synergetischen und gegenseitigen Effekten auf die Signalwege von TRAIL und RL2, spielt der Wirkort ebenfalls eine wichtige Rolle. Dabei konnte gezeigt werden, dass RL2 nicht die Menge des DR4 reduziert (siehe Abbildung 27B). Daher kann TRAIL an den Rezeptor binden, ohne dass es durch RL2 inhibiert wird. Jedoch wird das Niveau des Adapterproteins FADD durch RL2 reduziert, genau wie die Menge von Caspase-8. Dies führt zu einer Senkung der DISC-Formierung und so zu indirekten inhibitorischen Effekten auf den Wirkort von TRAIL (siehe Abbildung 27B).

Darauffolgend soll der Effekt von TRAIL auf die Lokalisierung von RL2 überprüft werden (siehe Abbildung 30B). Dazu werden Fraktionen spezifisch für das Zytosol, den Nukleus und die Mitochondrien durchgeführt. Die Reinheit der Fraktionen wird anhand der Marker-Proteine Actin (Zytosol), SOD2 (Mitochondrien) und EndoG (Nukleus) überprüft. Die stärksten EndoG-Signale können innerhalb der Nukleus-Fraktionen detektiert werden. SOD2-Signale werden innerhalb der Mitochondrien-Fraktion gemessen. Beide Signale entsprechen ihrer Spezifität. Actin-Signale können in allen Fraktionen detektiert werden, wobei die stärksten Signale innerhalb der Zytosol-Fraktion gemessen werden. Insgesamt zeigen die Marker-Proteine, dass die Fraktionierung erfolgreich ist (siehe Abbildung 30B).

Die Zellen werden vor der Fraktionierung mit RL2, TRAIL oder der Co-Stimulation aus beiden Zelltodinduktoren behandelt. Verglichen mit der entsprechenden Fraktion nach einer TRAIL-Stimulation kann dabei eine niedrigere PARP1-Spaltung innerhalb der Nukleus-Fraktion der Co-Stimulation beobachtet werden. Dies reproduziert die bereits beobachteten inhibitorischen Effekte von RL2 auf die TRAIL-induzierte Apoptose innerhalb einer Zellfraktionierung.

Durch die Zellfraktionierung soll überprüft werden, ob RL2 trotz TRAIL-Co-Stimulation weiterhin innerhalb der Mitochondrien-Fraktion lokalisiert ist. Dabei können RL2-Monomer- und RL2-Dimer-Signale innerhalb der Mitochondrien-Fraktion erfasst werden. Die Signale sind sowohl nach RL2-Einzelstimulationen sichtbar als auch nach RL2-Co-Stimulation (siehe Abbildung 30B). Jedoch liegt die Protein-Signalstärke von RL2-Monomeren in der Co-Stimulation unter der Signalstärke in der reinen RL2-stimulierten Probe (siehe Abbildung 30B). Dennoch kommt es auch nach einer TRAIL-Co-Stimulation weiterhin zu einer Lokalisierung von RL2 an den Mitochondrien.

Das Ergebnis zeigt, dass RL2 und TRAIL gegenseitige hemmende Effekte auf die jeweils andere Signalkaskade haben. Die Wirkorte werden dabei nicht beeinflusst, die jeweiligen Signalkaskaden weisen allerdings hemmende Effekte auf.

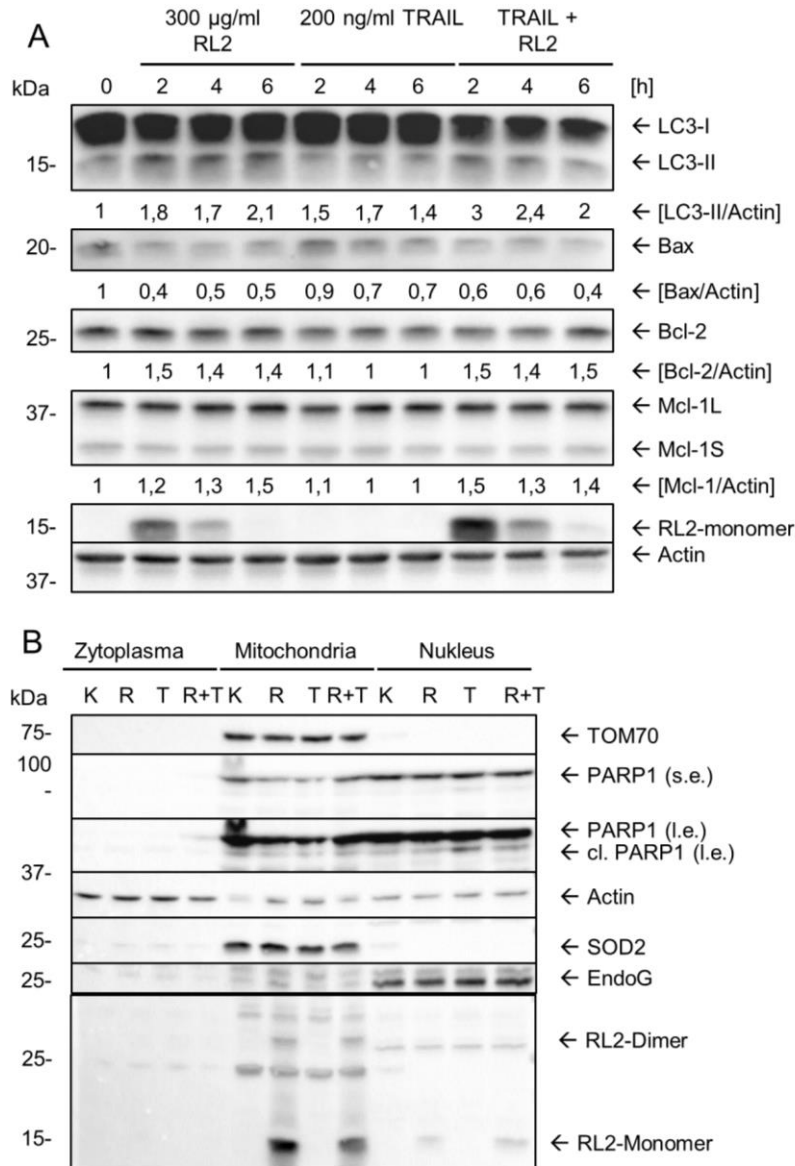


Abbildung 30 RL2 und TRAIL hindern sich gegenseitig in ihren zellulären Prozessen: MDA-MB-231 Zellen werden mit RL2, TRAIL oder einer Kombination aus RL2 und TRAIL in den angegebenen Konzentrationen und Zeitdauern stimuliert (A). Zwischen den einzelnen detektierten Antikörpern stehen die Werte der jeweiligen Quantifizierung. Gezeigt wird die Fraktionierung in Zytoplasma, Mitochondrien und Nukleus Fraktionen nach RL2 (R), TRAIL (T) und RL2+TRAIL (R+T) sowie die unstimulierte Zellprobe (B). Die Zellen werden mit 100 ng/ml TRAIL und 200 µg/ml RL2 für eine Stunde stimuliert. Für PARP1 werden jeweils die kurzen (s.e./ *short exposure*.) und langen (l.e./ *long exposure*) Belichtungen gezeigt. Dargestellt wird jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: K: Kontrolle/ unstimuliert; R= 200 µg/ml RL2 Stimulation; T= 100 ng/ml TRAIL Stimulation; R+T= 200 µg/ml RL2 Stimulation mit simultaner 100 ng/ml TRAIL Stimulation; Mcl-1L: Mcl-1 *long*; Mcl-1S: Mcl-1 *short*. cl. PARP1 = *cleaved* PARP1; s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*. Abbildung: Modifiziert nach [292].

3.2.6 Einfluss von RL2 auf unterschiedliche Mammakarzinomzelllinien

In den bisherigen Versuchen sind vor allem MDA-MB-231 Zellen (siehe Kapitel 3.2.1 bis 3.2.5; Daten nicht gezeigt) mit RL2 stimuliert worden (siehe Kapitel 3.2.1 bis 3.2.5). Um die Effekte von RL2 auf weitere Mammakarzinomzellen zu untersuchen, werden BT549, SKBR3 und T47D Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von RL2 behandelt (siehe Abbildung 31). Dabei zeigt sich, dass die Zellviabilität von BT549 und T47D Zellen konzentrations- und zeitabhängig durch die RL2-Stimulation reduziert wird (siehe Abbildung 31A, C). Durch eine Stimulation mit 300 µg/ml RL2 wird die Zellviabilität beider Zelllinien nach sechs Stunden um

etwa ein Drittel abgesenkt. Bei einer höheren Stimulation von 500 $\mu\text{g/ml}$ RL2 nimmt die Reduzierung der Zellviabilität weiter zu. Hingegen kann in SKBR3 Zellen keine Reduzierung der Zellviabilität erfasst werden (siehe Abbildung 31B).

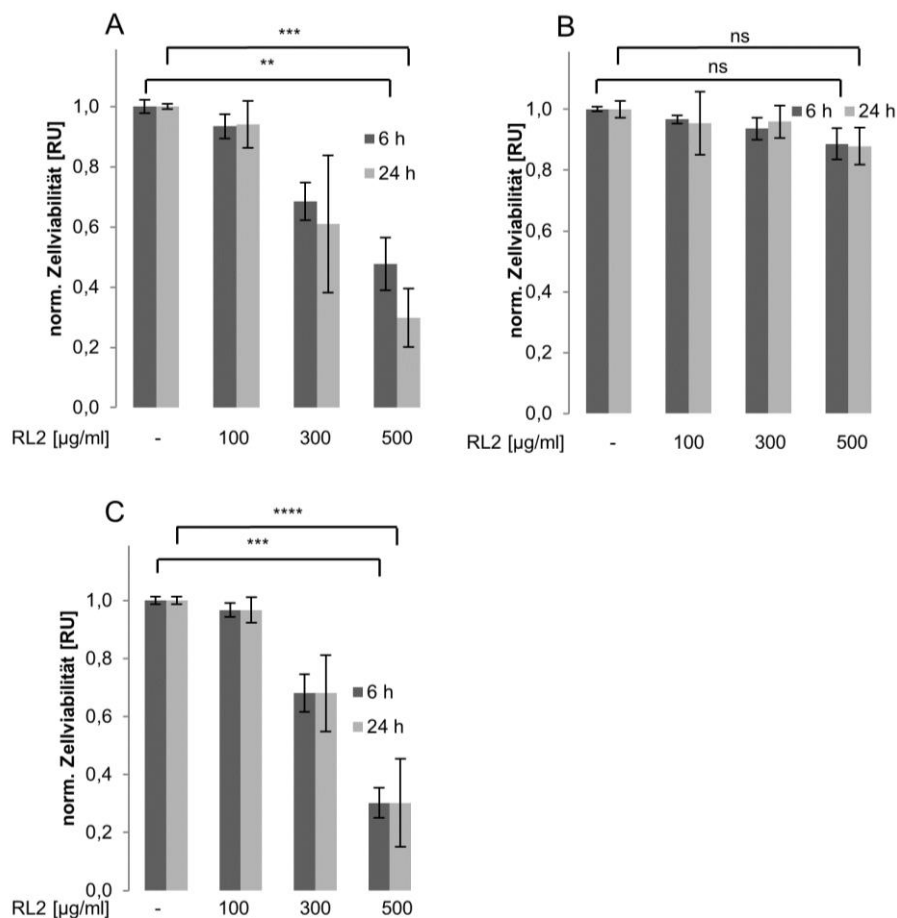


Abbildung 31 RL2 reduziert die Zellviabilität in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien: BT549 (A), SKBR3 (B) und T47D (C) Zellen werden für die angegebene Zeit mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 stimuliert. Die Zellviabilität wird mittels ATP-Gehalt bestimmt. Die gemessene Zellviabilität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzung: RU: *relativ unit*. Modifiziert nach [293].

Neben der Überprüfung der Zellviabilität anhand des ATP-Gehalts wird die Viabilität zusätzlich durch die metabolische Aktivität nach einer RL2-Stimulation überprüft (siehe Abbildung 32). Innerhalb von BT549 und T47D Zellen kann dabei jeweils nach sechs Stunden RL2 Stimulation eine Reduzierung der metabolischen Aktivität beobachtet werden (siehe Abbildung 32A, C). Dagegen verhalten sich die Werte in allen Proben von SKBR3 Zellen fast identisch. Die Messwerte der stimulierten Proben liegen kaum unter den Werten der unstimulierten Probe und verdeutlichen damit, dass RL2 nicht die Aktivität des Zellmetabolismus in SKBR3 Zellen reduzieren kann. Insgesamt zeigen die Versuche, dass BT549 und T47D Zellen sensitiv auf eine RL2 Stimulation reagieren, SKBR3 Zellen hingegen resistent gegen die RL2-Stimulation sind (siehe Abbildung 32B).

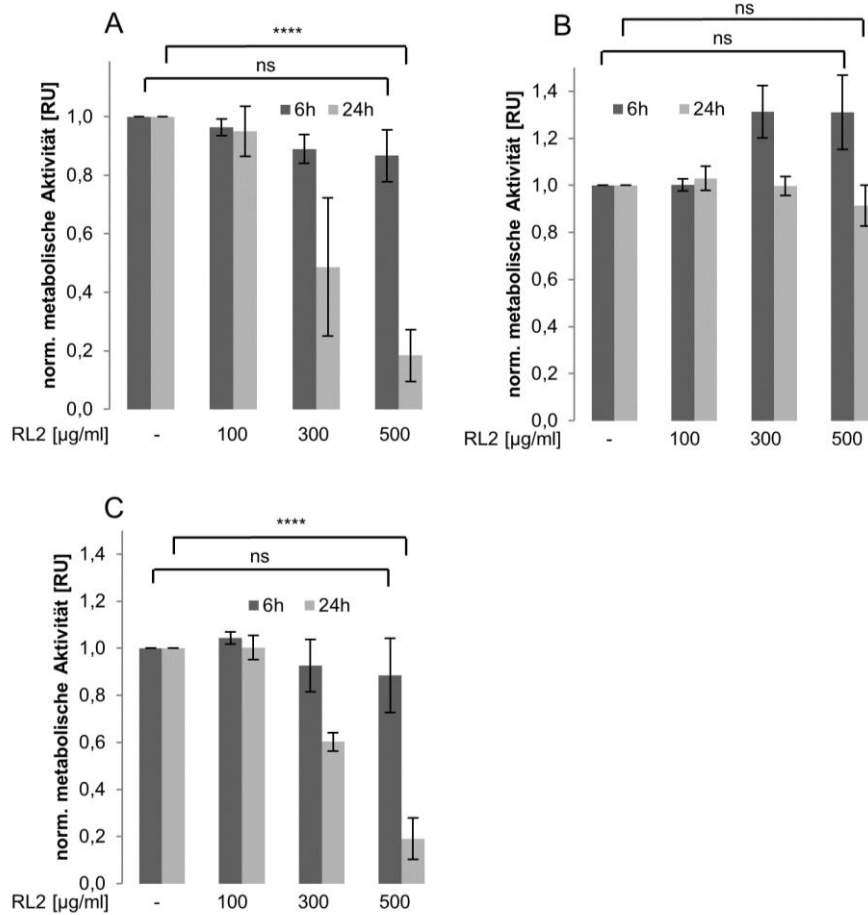


Abbildung 32 RL2 reduziert die metabolische Aktivität in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien: BT549 (A), SKBR3 (B) und T47D (C) Zellen werden für die angegebene Zeit mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 stimuliert. Die metabolische Aktivität wird mit Hilfe eines metabolischen Assays bestimmt. Die gemessene Zellviabilität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzung: RU: *relativ unit*. Modifiziert nach [293].

Neben der Zellviabilität wird die Induzierung der Mitophagie durch RL2 überprüft. Dazu werden die Zellen bis zu sechs Stunden stimuliert und anschließend wird das Niveau der Mitophagie-Markerproteine LC3 II, BNIP3 und NIX analysiert. Vor allem in BT549 Zellen nimmt die Menge an LC3 II, NIX und BNIP3 nach einer RL2-Behandlung zu. Auf einem niedrigeren Niveau finden diese Zunahmen auch in SKBR3 und T47D Zellen statt (siehe Abbildung 33A). Die gezeigten Steigerungen werden durch die Quantifizierungen der Proteinsignale bestätigt (siehe Abbildung 33B, C). Insgesamt kann vor allem in den sensitiven Zelllinien eine Zunahme der Mitophagie-Markerproteine erfasst werden, wobei das Niveau dieser Proteine dort bereits in den unstimulierten Proben erhöht ist. Daher ist die Induzierung der Mitophagie durch eine RL2-Stimulation in BT549 Zellen besonders sichtbar.

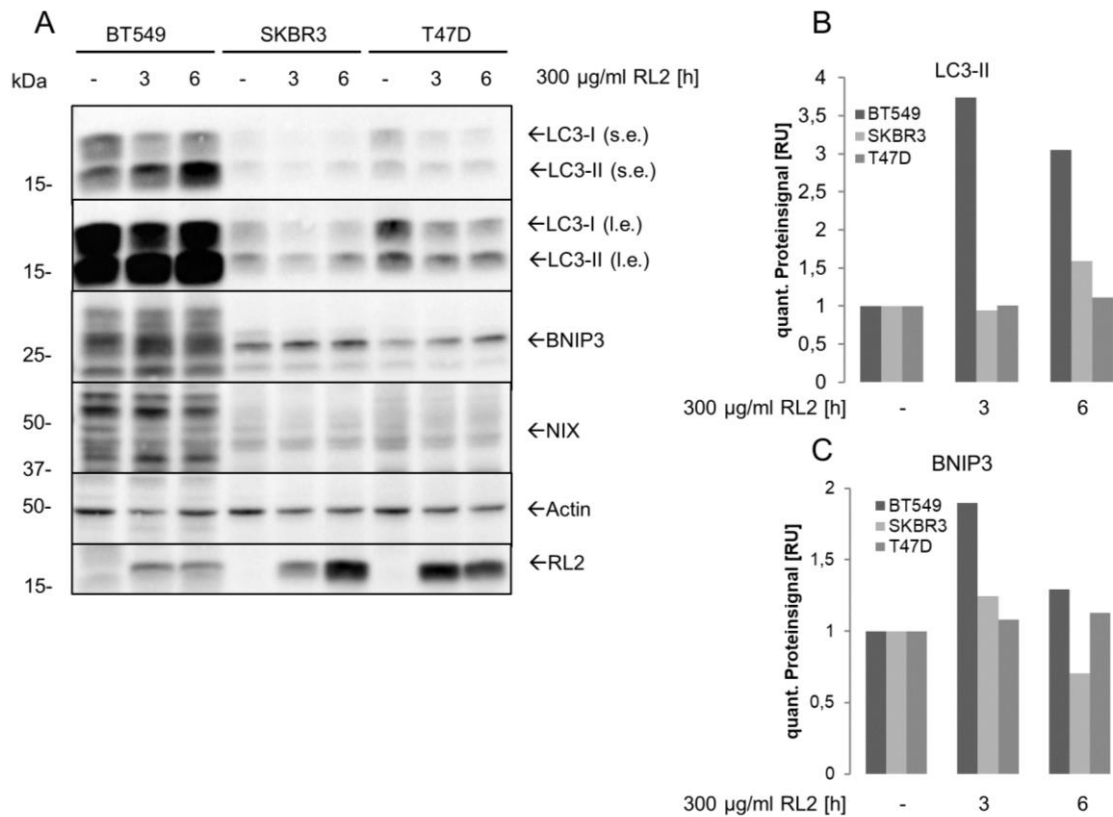


Abbildung 33 Induzierung von Mitophagie in verschiedenen Zellen: BT549, SKBR3 und T47D Zellen werden für die angegebene Zeit mit der angegebenen Konzentration von RL2 stimuliert (A). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment, stellvertretend für drei weitere unabhängige Versuche. Für die Signale von LC3-I und LC3-II werden kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) und lange Belichtungen (l.e./ *long exposure*) dargestellt. Die Quantifizierungen der Proteinsignale LC3-II (B) und BNIP3 (C) werden für diesen Versuch dargestellt. Abkürzungen: s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*; RU: *relative unit*. Modifiziert nach [293].

3.2.7 DXR Co-Stimulation mit RL2 führt zu einem erhöhten Effekt in BT549 Zellen

RL2 zeigte in früheren Versuchen sensitivierende Effekte auf Co-Stimulationen im Hinblick auf eine erhöhte Reduzierung der Zellviabilität bei längeren Stimulationszeiten (siehe Kapitel 3.2.3). Deshalb soll nachfolgend untersucht werden, ob diese steigernden Co-Effekte mit weiteren Stimulanzen erzielt werden können. Eine potenzielle Co-Stimulation mit RL2 ist das etablierte und bereits in der Karzinom-Therapie verwendete DXR (Doxorubicin). DXR ist ein Interkalant, welches auf die DNA und RNA wirkt, wodurch die DNA-Synthese gestört wird und es zu einer Radikalbildung kommt [294]. Zwar wird DXR bereits seit den 1960er Jahren verwendet, jedoch besitzt es weitreichende Nebenwirkungen für den Patienten [294]. Die gegenseitigen Effekte von RL2 und DXR werden anhand der Zellviabilität überprüft. Dazu wird als erstes der additive Effekt der Co-Stimulation in RL2-sensitiven Zellen erfasst. Die Zellviabilität von BT549 Zellen wird durch 10 µM DXR-Behandlung um etwa ein Drittel nach 24 h reduziert. Die RL2-Behandlung führt zu einer Reduzierung der Zellviabilität um etwa das gleiche Niveau. Innerhalb der Co-Stimulation wird die Zellviabilität stärker als die Einzelstimulationen reduziert, was dadurch die additiven Effekte zeigt (siehe Abbildung 34A). DXR wirkt in SKBR3 Zellen hingegen weitaus potenter (siehe Abbildung 34B). Die Zellen sind weiterhin nicht sensitiv bezüglich einer RL2-Behandlung. Jedoch liegt die Reduzierung der Viabilität durch die Co-Stimulation auf dem gleichen Niveau wie eine reine DXR-Behandlung.

Somit kommt es weder zu additiven noch hemmenden Effekten von RL2 auf DXR in SKBR3 Zellen (siehe Abbildung 34B). Aufgrund der starken Viabilitäts-Reduzierung werden darauffolgend die Effekte durch niedrigere DXR-Konzentrationen analysiert (siehe Abbildung 34C, D). Auch bei einer niedrigen Konzentration von 1,5 μM DXR können innerhalb der Co-Stimulation mit RL2 in BT549 Zellen nur additive Effekte gemessen werden (siehe Abbildung 34C). Innerhalb von SKBR3 Zellen können weder sensitivierende noch hemmende Effekte durch RL2 auf die Co-Stimulation mit DXR beobachtet werden. Somit kann gezeigt werden, dass RL2 keinen Einfluss auf die Reduzierung der Zellviabilität von SKBR3 Zellen durch DXR besitzt.

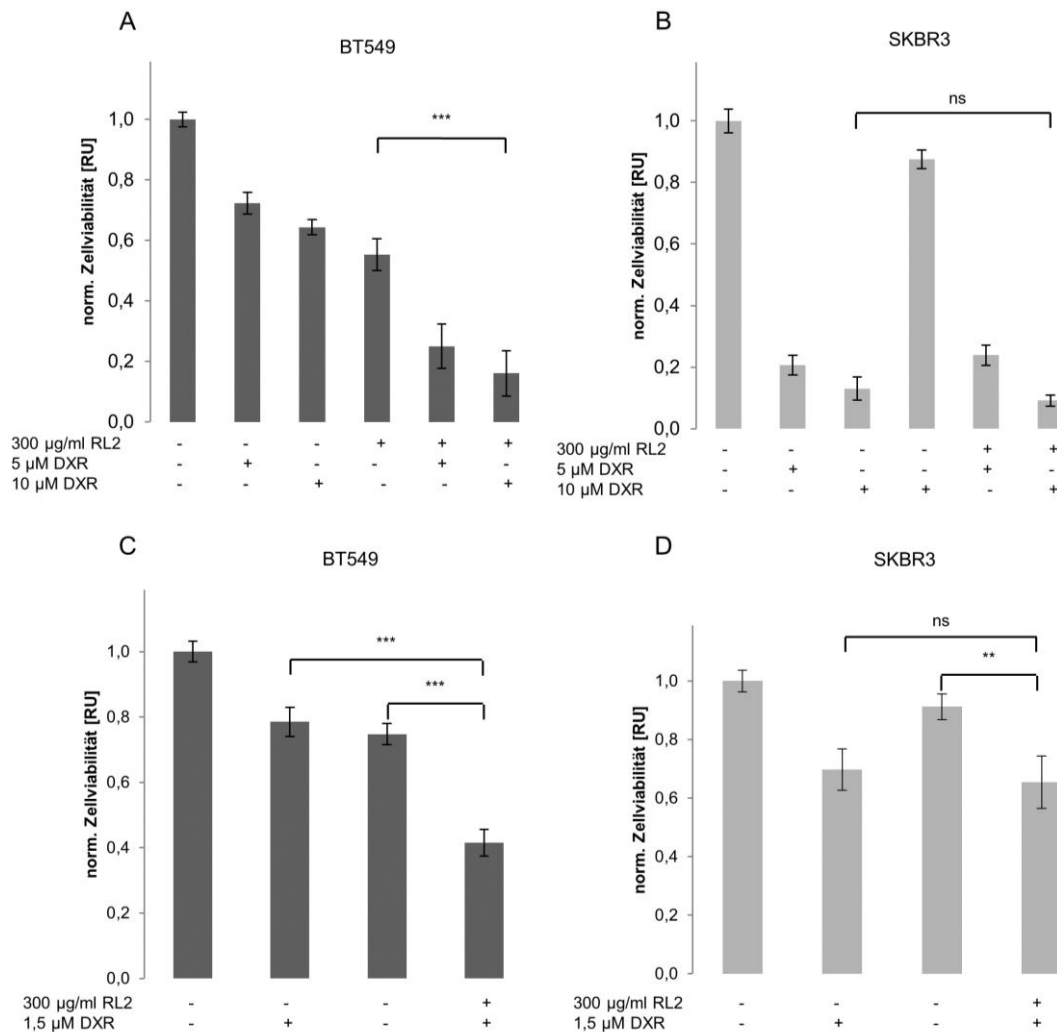


Abbildung 34 DXR Co-Stimulation sensitiviert SKBR3 Mammakarzinomzellen nicht für eine RL2-Behandlung: BT549 (A, C) und SKBR3 (B, D) Zellen werden für die angegebene Zeit mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 stimuliert. Die Zellviabilität wird mittels ATP-Gehalt bestimmt. Die gemessene Zellviabilität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests (Linie) und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzung: RU: *relative unit*. Modifiziert nach [293].

In früheren Versuchen konnten inhibitorische Effekte von RL2 auf die Caspase-Kaskade nach einer TRAIL-Stimulation beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.4). Diese Effekte können nicht in Co-Stimulationen von RL2 und DXR beobachtet werden. In BT549 Zellen steigt das Niveau der Caspase-3/7-Aktivität durch die DXR-Stimulation stark an. Auch nach einer RL2-Behandlung nimmt die Aktivität leicht zu. Durch die Co-Stimulation steigt die Aktivität weiter an, verglichen mit den Einzelstimulationen. Somit sind auch bei der Caspase-3/7-Aktivität

additive Effekte zu sehen (siehe Abbildung 35). Innerhalb von SKBR3 Zellen steigt das Level der Caspase-3/7-Aktivität durch eine RL2-Stimulation leicht an. Demgegenüber steigt die Aktivität durch eine DXR-Behandlung stärker an und erhöht sich innerhalb der Co-Stimulation weiter. Es können daher leicht sensitivierende Effekte durch RL2 auf die DXR-induzierte Caspase-3/7-Aktivität in SKBR3 Zellen gemessen werden (siehe Abbildung 35). Jedoch ist insgesamt das Niveau der Caspase-3/7-Aktivität in SKBR3 Zellen niedriger, verglichen mit BT549 Zellen.

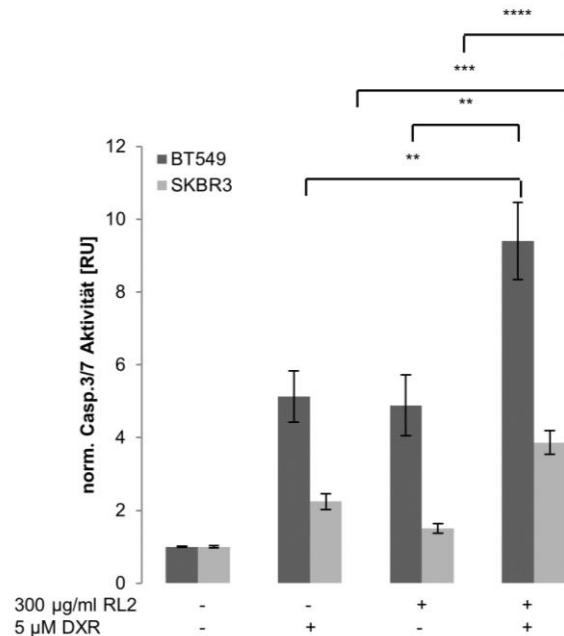


Abbildung 35 RL2 verstärkt teilweise die DXR-induzierte Caspase-Kaskade: BT549 und SKBR3 Zellen werden für sechs Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 und DXR stimuliert. Die Caspase-3/7-Aktivität wird mittels Caspase-3/7-Assay bestimmt. Die gemessene Aktivität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzung: RU: *relative unit*. Modifiziert nach [293].

Die Caspase-3/7-Aktivität konnte mit Hilfe von Assays bestimmt werden. Zusätzlich soll die Spaltung der Procaspasen-3 und -8 überprüft werden (siehe Abbildung 36). BT549 und SKBR3 Zellen werden wie zuvor mit RL2, DXR oder der Co-Stimulation für 24 Stunden behandelt und durch das Western Blot Verfahren analysiert. Dabei kann in BT549 Zellen gezeigt werden, dass sowohl DXR als auch RL2 zu einer Spaltung von Procaspase-3 führen, wobei RL2 eine schwächere Spaltung induziert. Wie zuvor innerhalb der Aktivitäts-Assays, kann die Co-Stimulation zu einer verstärkten Spaltung und mehr Spaltprodukten von Procaspase-3 führen (siehe Abbildung 36). Procaspase-8 wird ebenfalls durch DXR in BT549 Zellen gespalten, die Zunahme der Spaltprodukte ist jedoch geringer. Innerhalb von SKBR3 Zellen kommt es zu einer geringeren Procaspase-3-Spaltung nach DXR Behandlung und keiner Spaltung durch RL2. Jedoch nehmen die Spaltprodukte ebenfalls durch die Co-Stimulation zu. Verglichen mit BT549 Zellen besitzen SKBR3 Zellen ein höheres Proteinniveau an Procaspase-8. Wie zuvor bei Procaspase-3, wird Procaspase-8 nur durch DXR gespalten, allerdings nehmen die Spaltprodukte auch in der Co-Stimulation zu. Gleiche Tendenzen können bei der Spaltung von PARP1 detektiert werden (siehe Abbildung 36). Insgesamt verdeutlichen diese Versuche, dass es in BT549 zu additiven Effekten zwischen RL2 und DXR auf die Caspase-Kaskade kommt. In SKBR3 Zellen führt eine Co-Stimulation von DXR und RL2 hingegen lediglich zu einem leichten Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität.

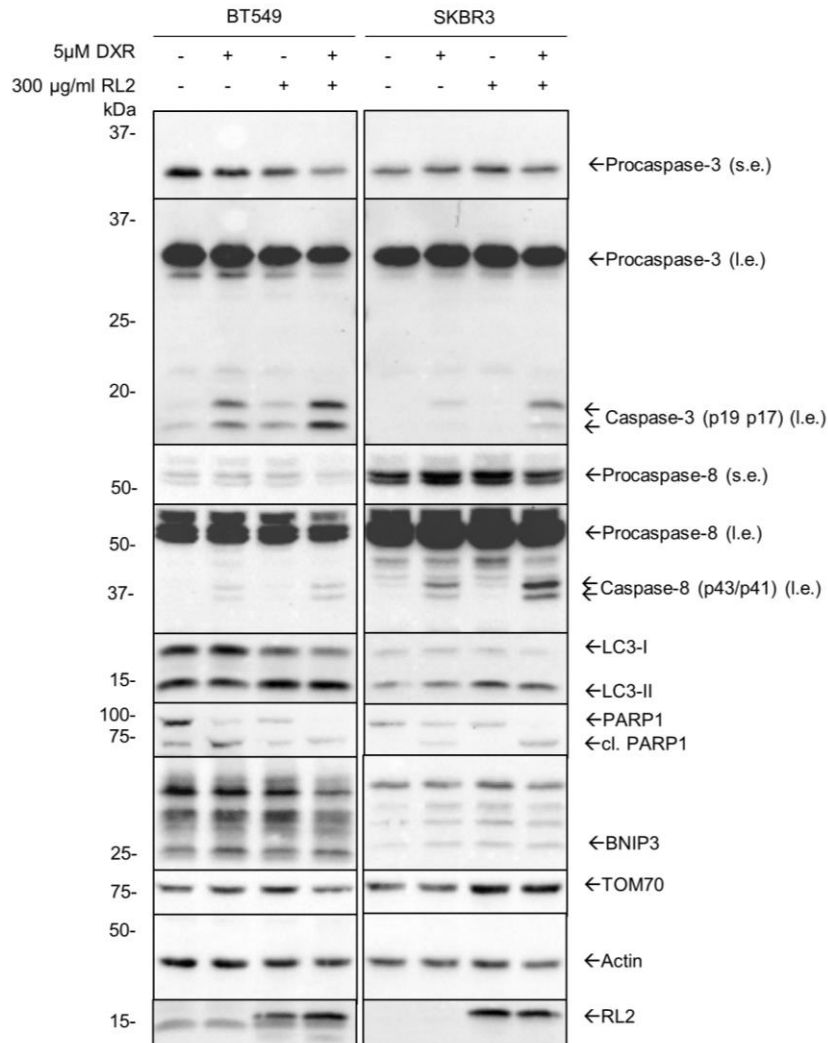


Abbildung 36 Induzierung der Caspase-Kaskade in BT549 und SKBR3 Zellen: BT549 und SKBR3 Zellen werden für die angegebene Zeit mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 und DXR für 24 Stunden stimuliert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment, stellvertretend für drei weitere unabhängige Versuche. Für die Signale von Caspase-3 und Caspase-8 werden jeweils kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) und lange Belichtungen (l.e./ *long exposure*) gezeigt. Abkürzungen: s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*. Modifiziert nach [293].

3.2.8 RL2- und DXR-Co-Stimulationen erhöhen die LDH-Ausschüttung in BT549 Zellen

Nach einer Überprüfung der Effekte von RL2 und DXR Co-Stimulationen in BT549 und SKBR3 Zellen auf die Zellviabilität und die Induzierung der Caspase-3-Aktivität, soll anschließend erfasst werden, ob die Co-Stimulation additive Effekte auf die Zytotoxizität besitzt (siehe Kapitel 2.2.5). Dazu wird die LDH (*engl. lactate dehydrogenase*) -Freisetzung nach 24-stündiger Stimulation von RL2, DXR oder der Co-Stimulation bestimmt (siehe Abbildung 37). Innerhalb von BT549 Zellen führen RL2- und DXR-Einzelstimulationen zu einer Verdoppelung der LDH-Freisetzung, verglichen mit der unstimulierten Probe. Eine fünffache Freisetzung von LDH kann nach der Co-Stimulation aus RL2 und DXR gemessen werden (siehe Abbildung 37A). Somit kommt es im Vergleich zu den Einzelstimulationen zu einer noch stärkeren LDH-Freisetzung durch die Co-Stimulation. Dadurch kann gezeigt werden, dass die Co-Stimulation zu einer Erhöhung der Zytotoxizität führt (siehe Abbildung 37A). In SKBR3 Zellen kann ebenfalls eine Verdoppelung der LDH-Freisetzung durch DXR beobachtet werden. Jedoch wird

kein zusätzliches LDH mit Hilfe von RL2 ausgeschüttet (siehe Abbildung 37B). Auch die in BT549 Zellen gemessene Steigerung der Zytotoxizität durch die Co-Stimulation kann nicht in SKBR3 Zellen detektiert werden. Insgesamt ist das normierte Niveau der LDH-Freisetzung in SKBR3 Zellen niedriger als in BT549 Zellen (siehe Abbildung 37). Obwohl die Co-Stimulation aus DXR und RL2 die Caspase-3/7-Aktivität in SKBR3 Zellen erhöht, kann kein Einfluss auf die Zellviabilität oder die Zytotoxizität gemessen werden. Insgesamt konnte daher nur in BT549 Zellen eine Steigerung der Zytotoxizität durch die Co-Stimulation mit RL2 und DXR erfasst werden, nicht jedoch bei den Einzelstimulationen.

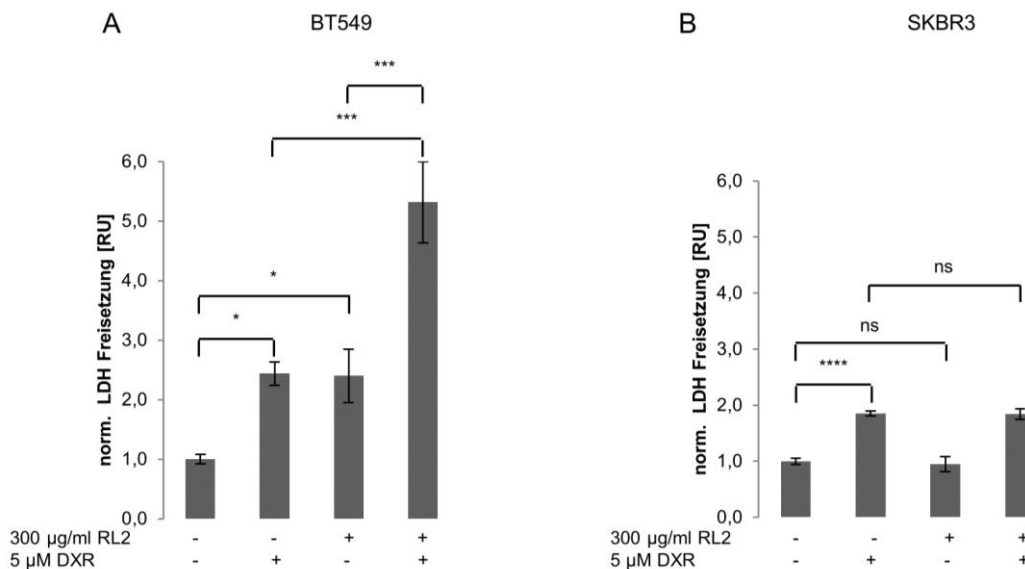


Abbildung 37 RL2 und DXR führen zu einer Erhöhung des Zelltodes in BT549 Zellen: BT549 (A) und SKBR3 (B) Zellen werden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von RL2 und DXR stimuliert. Die Erhöhung der Zytotoxizität wird mit Hilfe der Ausschüttung von LDH innerhalb eines LDH-Assays (LDH-Glo® Cytotoxicity Assay) bestimmt. Die gemessene Freisetzung wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplicaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Abkürzung: LDH = engl. *lactate dehydrogenase*; RU: *relative unit*. Modifiziert nach [293].

3.2.9 RL2- und DXR-Co-Stimulationen führen zu synergetischen Effekten

Nachdem festgestellt wurde, dass RL2 und DXR Co-Stimulationen zu einer stärkeren Erhöhung der Zytotoxizität führen und die Zellviabilität vermehrt reduzieren können, soll untersucht werden, ob die Effekte synergetisch, additiv oder antagonistisch sind. Dazu wird mit Hilfe des IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) -Wertes der CI (engl. *combinatorial index*) nach Loewe berechnet (siehe Kapitel 2.2.12). Die Berechnung der jeweiligen IC_{50} -Werte von RL2 und DXR erfolgen mit Hilfe der Messung der Zellviabilität durch den ATP-Gehalt (siehe Abbildung 38A, B). Dabei konnte bestimmt werden, dass der IC_{50} -Wert von RL2 bei etwa 366 µg/ml liegt, während DXR eine mittlere inhibitorische Konzentration von etwa 6,5 µM in BT549 Zellen aufweist. In früheren Studien konnte ein IC_{50} -Wert von etwa 300 µg/ml RL2 in MDA-MB-231 Zellen erfasst werden [295]. Somit ist eine höhere Konzentration von RL2 nötig, um den mittleren inhibitorischen Effekt in BT549 Zellen zu erreichen. Nach der Berechnung der IC_{50} -Werte werden die zuvor verwendeten Konzentrationen auf synergetische Effekte überprüft (siehe Kapitel 2.2.12 und Abbildung 38C). Dabei zeigen die verwendeten Konzentrationen (300 µg/ml RL2; 1,5 µM DXR; 5 µM DXR und 10 µM DXR) keine

synergetischen Tendenzen (siehe Abbildung 38D, E). Nur die Kombination aus 300 µg/ml RL2 und 1,5 µM DXR weist additive Tendenzen auf (siehe Abbildung 38D, E). Um zu überprüfen, in welchen Konzentrationen von RL2 und DXR synergetische Effekte möglich sind, werden potenzielle Konzentrationen verwendet, um den CI zu bestimmen (siehe Abbildung 38E). Dabei zeigt sich, dass niedrige Konzentrationen beider Stimulanzien zusammen eher zu synergetischen Effekten neigen könnten, als höhere (siehe Abbildung 38F). Daher werden in nachfolgenden Versuchen niedrigere Konzentrationen in Co-Stimulationen verwendet (siehe Abbildung 39).

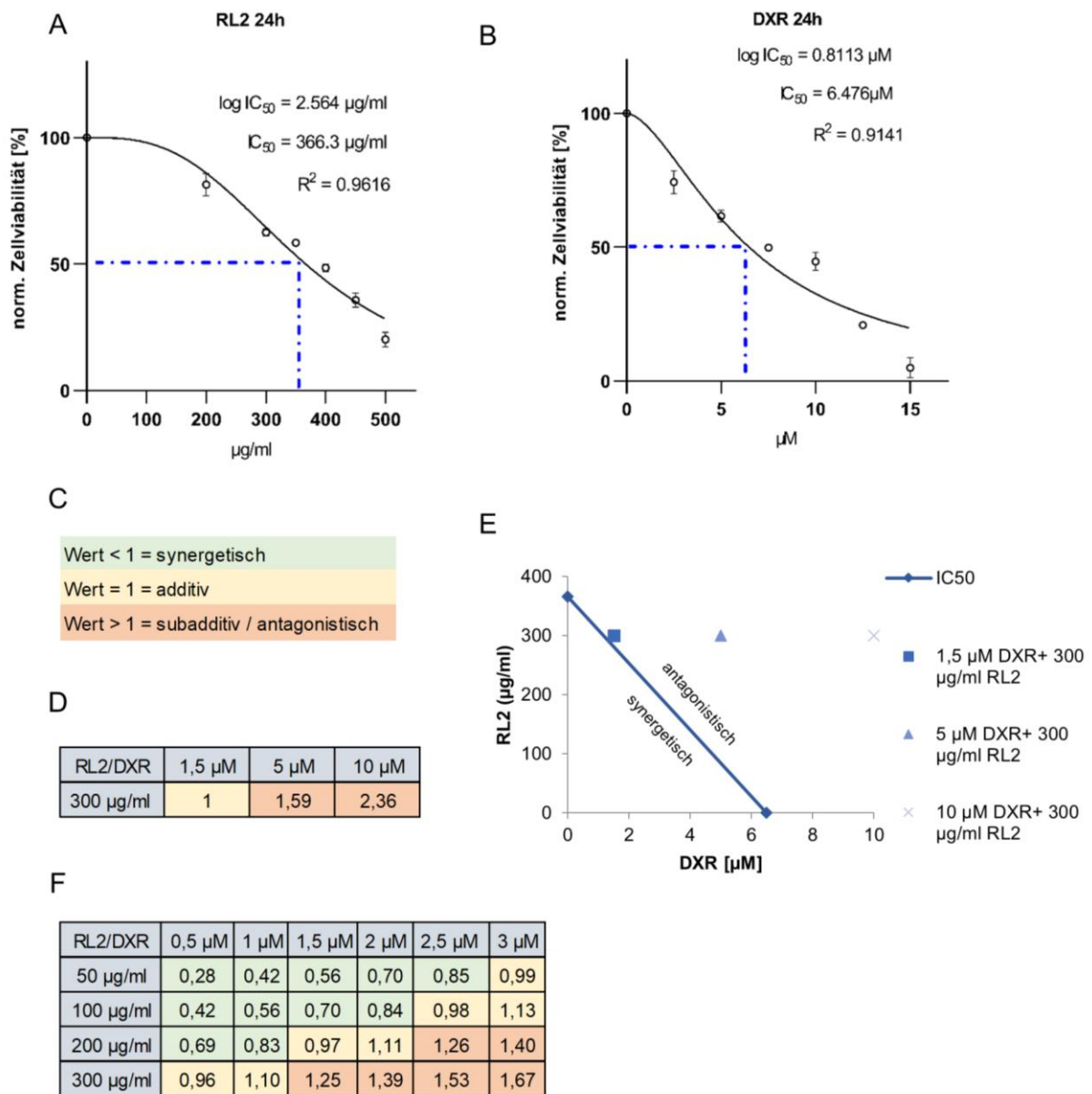


Abbildung 38 Berechnung des IC₅₀-Wertes und Überprüfung der Effekte innerhalb von Co-Stimulationen: BT549 Zellen werden mit RL2 (A) oder DXR (B) für 24 Stunden stimuliert. Die Zellviabilität wird mittels ATP-Gehalt bestimmt. Die gemessene Zellviabilität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Berechnung des IC₅₀-Wertes erfolgt mit Hilfe des Programms Prism (siehe Kapitel 2.2.12). (C) Beurteilung des CI (engl. *combinatorial index*): Grüne Färbung bedeutet synergetische Effekte, gelbe Färbung bedeutet additive Effekte und rote Färbung bedeutet antagonistische Effekte. (D) Berechnung und Klassifizierung des CI aus zuvor verwendeten Co-Stimulationskonzentrationen von RL2 und DXR in BT549 Zellen. (E) Isobologram des synergetischen und antagonistischen Bereiches der verwendeten Konzentrationen aus (D). (F) Berechnung der potenziellen CI von unterschiedlichen RL2 und DXR Konzentrationen, sowie mögliche Klassifizierungen. Abkürzung: CI: *combinatorial index*. Modifiziert nach [293].

Einzelstimulationen von 50 µg/ml RL2, 100 µg/ml RL2 oder 0,5 µM DXR führen zu keiner signifikanten Reduzierung der Zellviabilität in BT549 Zellen (siehe Abbildung 39A). Eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität ist erst durch 200 µg/ml RL2, bzw. 1 µM DXR möglich. Dabei wird die Viabilität durch 200 µg/ml RL2 um etwa ein Fünftel reduziert, ähnlich sind die Effekte durch die 1 µM DXR Stimulation. Allerdings führt die Co-Stimulation mit den niedrigsten Konzentrationen von RL2 (50 µg/ml) und DXR (0,5 µM) zu einer signifikanten Senkung der Zellviabilität um etwa ein Viertel (siehe Abbildung 39A). Obwohl die Einzelstimulationen nicht ausreichen, um die Viabilität der BT549 Zellen zu reduzieren, führt die RL2-DXR-Co-Stimulation zu einer messbaren Senkung der Viabilität. Zusätzlich senkt die Co-Stimulation (50 µg/ml RL2 + 0,5 µM DXR) die Zellviabilität auf ein ähnliches Level ab wie die höchste verwendete Einzel-DXR-Stimulation (2,5 µM).

Es kann beobachtet werden, dass die RL2-Co-Stimulationen mit 0,5 µM DXR-Konzentrationen die gleichen Effekte aufweisen, wie niedrigere RL2-Co-Stimulation mit 2,5 µM DXR. Beispielsweise senkt die Co-Stimulation aus 100 µg/ml RL2 und 2,5 µM DXR die Zellviabilität auf das gleiche Niveau wie die simultane Co-Stimulation aus 200 µg/ml RL2 mit 0,5 µM DXR. Beide Co-Stimulationen senken die Viabilität um etwa 3/5 der unstimulierten Probe ab (siehe Abbildung 39A). Somit führt eine Erhöhung von RL2 zu einer Reduzierung der nötigen DXR Konzentration auf ein Fünftel, damit etwa gleiche Viabilitäts-Effekte eintreten können.

Darüber hinaus wurde in diesem Versuch der CI_{ra} (engl. *combinatorial index* anhand der engl. *response additivity*) für die verwendeten Konzentrationen überprüft (siehe Kapitel 2.2.12; siehe Abbildung 39B). Dabei wird sichtbar, dass alle verwendeten Kombinationen von RL2 und DXR einen Effekt besitzen. Die Co-Stimulationen führen jeweils zu stärkeren Effekten, verglichen mit den zu erwarteten Effekten. Die zuvor berechneten antagonistischen Effekte (Kombinationen aus Konzentrationen mit mehr als 200 µg/ml RL2 und 2,5 µM DXR) können nicht eindeutig gezeigt werden, da der CI_{ra} auch bei diesen Konzentrationen eine positive Tendenz von unter Eins aufweist. Jedoch kann für die hohen Konzentrations-Kombinationen ein stagnierender Effekt detektiert werden. Trotz Erhöhung der Stimulationskonzentrationen wird die Zellviabilität nur in einem niedrigeren Maß gesenkt, verglichen mit den Kombinationen aus niedrigeren Konzentrationen.

Insgesamt konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass RL2 und DXR vor allem in niedrigen Konzentrationen synergetische Effekte von Co-Stimulationen besitzen können.

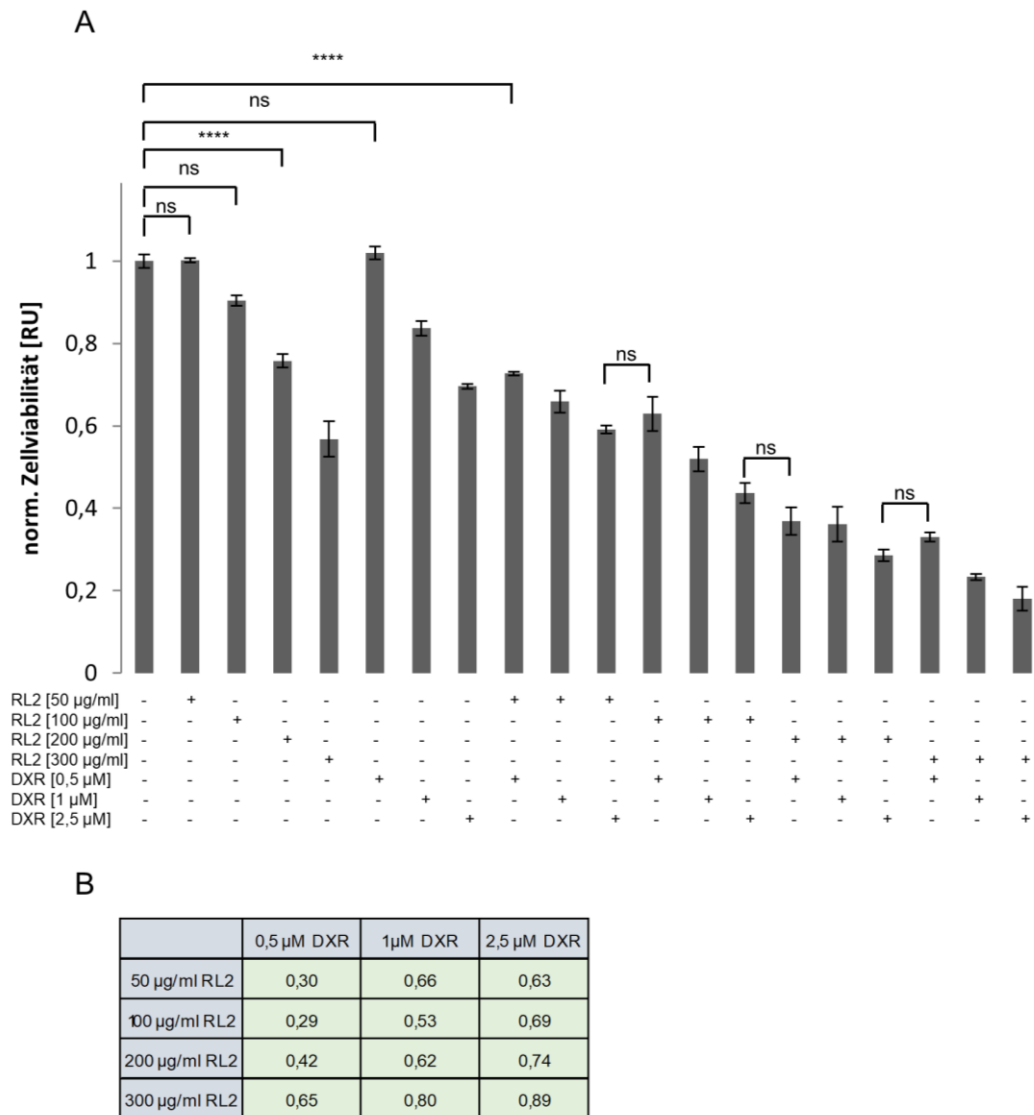


Abbildung 39 RL2- und DXR-Co-Stimulation führt zu synergetischen Effekten: BT549 Zellen werden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von RL2, DXR oder simultan stimuliert (A). Die Zellviabilität wird mittels ATP-Gehalt bestimmt. Die gemessene Zellviabilität wird gegen die jeweilige unstimulierte Probe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von unabhängigen, normierten Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ordinary one-way ANOVA-Tests (Linie) und des Tukey-Tests (Umklammerung). Beurteilung des Tests siehe Kapitel 2.2.11. Berechnung und Klassifizierung der CI_{ra} (engl. *combinatorial index*) anhand der ra (engl. *response additivity*) (B). Berechnung und Klassifizierung anhand von Kapitel 2.2.12: grüne Färbung der Werte bedeuten synergetische, bzw. positive Effekte. Abkürzungen: CI: *combinatorial index*; ra: *response additivity*; RU: *relative unit*. Modifiziert nach [293].

4 Diskussion

Der programmierte Zelltod ist ein essentieller Bestandteil der Homöostase innerhalb multizellulärer Organismen (zusammengefasst in [3]). Eine Dysregulation dieses Prozesses und seiner Signalwege können zu erheblichen Erkrankungen führen (zusammengefasst in [3]). Die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit den Prozessen ist für zukünftige Therapien sehr wichtig. Innerhalb des programmierten Zelltodes nimmt die Apoptose eine Sonderrolle ein, da sie einen zielgerichteten Zelltod bedeutet, an dessen Ende die zurückgebliebenen Kompartimente von umliegenden Zellen abgebaut werden können. Ein vielseitiges Protein der Signalkaskade ist Caspase-8 [112]. Durch dessen Aktivierung kann das zuvor induzierte Todessignal weitergeleitet werden. Allerdings bietet dieses Protein auch eine potenzielle Störstelle der Signalwege, was zu einer Verhinderung des Signals führen kann wie beispielsweise durch PTM [126].

Aufgrund einer Anzahl an Mutationen, die im Verdacht stehen, an Erkrankungen beteiligt zu sein, ist Caspase-8 eine mögliche Variable für die Dekodierung des Zelltodes und Ausgangspunkt für potenzielle Therapeutika (siehe Kapitel 1.2.2.5).

Die Untersuchung neuer potenzieller Therapeutika ist ebenfalls ein essentieller Bestandteil der Grundlagenforschung. So gibt es neben den aktuellen Formen auch die Bestrebungen, natürlich vorkommende Proteine, Peptide und Antikörper einzusetzen. Eines dieser Peptide ist RL2 (siehe Kapitel 1.5). In ersten Versuchen zeigt RL2 ein vielversprechendes Potenzial, um den Zelltod innerhalb von Mammakarzinomzellen zu induzieren. Jedoch ist bis dato der RL2-induzierte Mechanismus unbekannt. Ohne Dekodierung des Mechanismus ist die weitere Verwendung nicht möglich, sodass die Erforschung dieses Mechanismus als Voraussetzung für weitere Schritte erforderlich ist. Auch die Interaktion mit bereits etablierten Stimulanzen muss weiterhin untersucht werden, um gegenseitige Effekte zu erfassen.

4.1 Die Bedeutung einer möglichen Methylierung für Procaspase-8

An Procaspase-8 konnten bereits unterschiedliche PTM detektiert werden (siehe Kapitel 1.3.1). Bis zu dieser Dissertation konnten keine Hinweise auf Modifikationen durch Methylierungen an Procaspase-8 erfasst werden. Eines der Hauptthemen dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung von Caspase-8 auf eine potenzielle Methylierung.

4.1.1 Interaktion von Procaspase-8 mit dem PRMT5-Komplex

PRMT5 und die dazugehörigen Komplexe besitzen eine große Bandbreite an Interaktionsmöglichkeiten. In früheren Studien konnten Interaktionen innerhalb des Nukleus, aber auch innerhalb des Zytosols beobachtet werden (siehe Kapitel 1.3.2). Mit Hilfe verschiedener IP konnte in dieser Dissertation gezeigt werden, dass es diverse Hinweise auf eine Interaktion zwischen Procaspase-8 und dem PRMT5-Komplex gibt (siehe Kapitel 3.1.1). Sowohl mit Hilfe der MS-Analyse als auch durch Western Blot Analysen konnten potenzielle Signale von PRMT5 innerhalb von Procaspase-8-Co-IP erfasst werden. Auch mit Hilfe einer

PRMT5-Co-IP konnten etwaige, schwache Procaspase-8-Signale gezeigt werden (siehe Abbildung 12C). Andere IP mit anti-RIOK1- oder anti-WD45-Antikörpern konnten weder mutmaßliche Signale von Procaspase-8 noch dessen Untereinheiten erfassen (Daten nicht gezeigt).

Während Procaspase-8 vor allem innerhalb des Zytosols lokalisiert ist, ist die Lokalisierung des PRMT5-Komplexes von der Zusammenstellung abhängig. Falls RIOK1 innerhalb des PRMT5-Komplexes vorhanden ist, ist der Komplex vermehrt innerhalb des Zytosols lokalisiert [213]. Potenzielle Signale von RIOK1 konnten ebenfalls innerhalb von Caspase-8-Co-IP erfasst werden. Diese Signale deuten auf eine mögliche Interaktion des Komplexes aus PRMT5, WD45 und RIOK1 mit Procaspase-8 innerhalb des Zytosols hin. Verstärkend kommt hinzu, dass potenzielle Signale von Procaspase-8, RIOK1, PRMT5 und WD45 mit Hilfe einer MS-Analyse von CD95L-IP gemessen wurden. Zusätzlich wurden mögliche Procaspase-8, PRMT5 und RIOK1 Banden in einer DISC-IP erfasst (siehe Anhang 5). Mögliche Signale der weiteren Komplexe mit den Mitgliedern pICln oder COPR5 konnten nicht durch MS-Analysen erfasst werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt die Vermutung zu, dass die mögliche Komplex-Interaktion innerhalb des Zytosols im Beisein von RIOK1 stattfinden kann bzw. teilweise dort stattfindet [213]. Zusätzlich scheint es sich um eine transiente Interaktion zu handeln. Die Signale der PRMT5-Komplex-Mitglieder sind in DISC und Procaspase-8-IP schwächer im Vergleich zu bereits erfassten Procaspase-8 Interaktionen wie z.B. mit FADD. Umgekehrt sind die potenziellen Procaspase-8-Signale in PRMT5-IP auf einem niedrigeren Niveau, verglichen mit RIOK1 und WD45. Dies verdeutlicht, dass es sich nicht nur um eine transiente Interaktion zu handeln scheint, sondern die möglichen Interaktionen zwischen dem PRMT5-Komplex und Procaspase-8 in einem schwächeren Maße erfolgen.

Mit Hilfe der CD95L-Stimulation werden die DISC-Formierung sowie die Aktivierung von Caspase-8 induziert. Jedoch werden potenzielle Signale des PRMT5-Komplexes, sowohl vor der Stimulation als auch danach, durch die Caspase-8-IP erfasst. Dabei erfolgt kaum eine Zu- oder Abnahme der detektierten Signale. Die potenzielle Interaktion könnte somit regelmäßig stattfinden, ohne dass zwischen einer dauerhaften oder kurzzeitigen und transienten Interaktion unterschieden werden kann. Insgesamt konnten die ersten Hinweise erfasst werden, dass Caspase-8 wahrscheinlich mit dem PRMT5-Komplex interagieren kann (siehe Abbildung 40). Allerdings ist es möglich, dass weitere Mitglieder des DISC an der potenziellen Interaktion mit dem PRMT5-Komplex beteiligt sind. Diese Untersuchungen müssen in zukünftigen Studien durchgeführt werden.

Hauptaktivität von PRMT5 ist die Mono- oder symmetrische Di-Methylierung des Arginins eines Proteins. Dabei kann die Interaktion kurzzeitig bzw. indirekt erfolgen. Grundlage dafür ist die Aktivierung von PRMT5 durch Komplexbildung, bei dem die Komplexmitglieder als Rekrutierungsplattform dienen. Potenzielle Signale von RIOK1 und WD45 wurden neben Signalen von PRMT5 in Caspase-8-IP detektiert und ermöglichen eine PRMT5-Komplexbildung.

Dies lässt die Vermutung zu, dass Caspase-8 und PRMT5 innerhalb eines Komplexes vorkommen können. Potenzielle Mono-Methylierungen konnten an Caspase-8 nicht festgestellt werden. Auch Hinweise auf asymmetrische Di-Methylierung konnten nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig gibt es verschiedene Hinweise auf eine symmetrische Di-Methylierung. Dies kann zusätzlich darauf hindeuten, dass Caspase-8 möglicherweise mit dem PRMT5-Komplex interagieren kann, da aktives PRMT5 zu diesen Methylierungen führen kann.

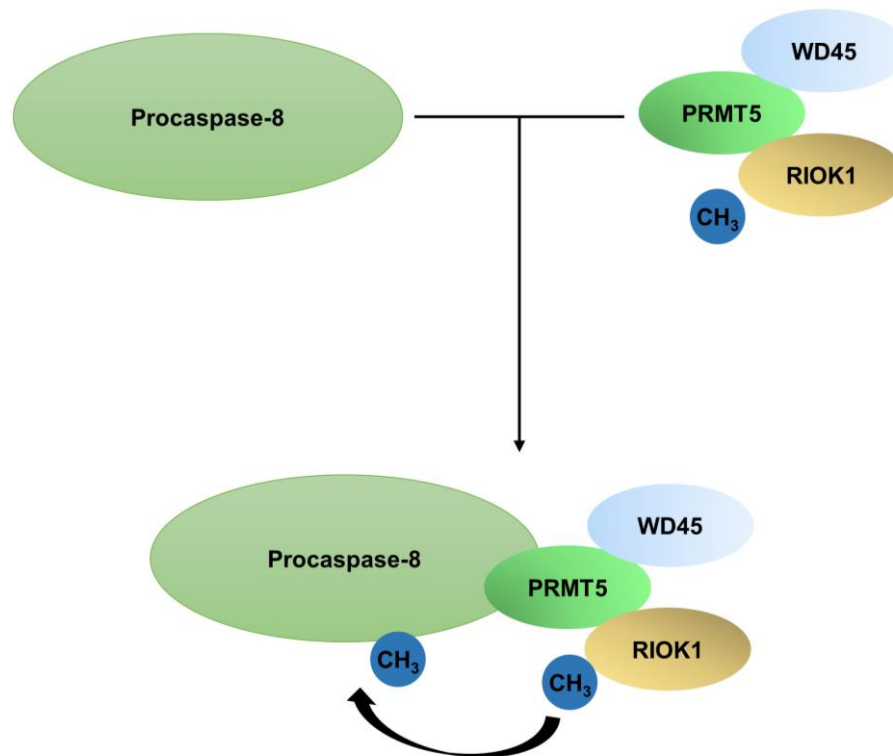


Abbildung 40 Mögliche Interaktion zwischen Procaspase-8 und dem PRMT5-Komplex: Procaspase-8 kann mit dem PRMT5-Komplex interagieren. Dabei kann die Methylierung von Procaspase-8 erfolgen.

Durch die Versuche konnten Hinweise auf zwei unterschiedliche Effekte beobachtet werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass Procaspase-8 mit dem PRMT5-Komplex, bestehend aus RIOK1, WD45 und PRMT5, interagieren kann, ohne dass eine Stimulation nötig ist (siehe Kapitel 3.1.1.). Andererseits sind die Hinweise auf eine symmetrische Di-Methylierung nur in Proben nach einer CD95L-Stimulation zu beobachten. Es ist daher möglich, dass Procaspase-8 transient mit dem PRMT5-Komplex ohne Stimulation interagieren kann. Die potenzielle symmetrische Di-Methylierung erfolgt hingegen erst durch die Stimulation mit CD95L. Es gibt Hinweise, dass auch die Spaltprodukte symmetrisch di-methyliert werden können (siehe Kapitel 3.1.2). Im Zuge der CD95L-induzierten Formierung des DISC kommt es zu einer Konformationsänderung von Caspase-8. Durch diese Änderung ist es möglich, dass potenzielle Methylierungsstellen von Caspase-8 zugänglicher sind und somit etwaige Methylierungen vereinfachen. Zusätzlich könnte die symmetrische Di-Methylierung zu stabilisierenden Effekten der p18 und p10 Untereinheiten von Caspase-8 führen. In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Procaspase-8 durch unterschiedliche PTM stabilisiert werden kann [187]. Zusätzlich wird in einer älteren Studie verdeutlicht, dass die Methylierung durch PRMT5 zu einer Stabilisierung des Zielproteins führen kann [196].

4.1.2 Reduktion der Caspase-8-Aktivität durch Inhibierung von PRMT5

In ersten Versuchen konnten Hinweise auf eine potenzielle Caspase-8 Interaktion mit dem PRMT5-Komplex erfasst werden und, dass Caspase-8 von diesem potenziell symmetrisch dimethyliert wird (siehe Kapitel 4.1.1). Um den Einfluss der PRMT5-Aktivität auf die Spaltung und Aktivität von Caspase-8 zu überprüfen, wurde der PRMT5-spezifische Inhibitor EPZ ausgewählt. Dabei führt EPZ zu einer Reduzierung der Caspase-8-Spaltprodukte (siehe Kapitel 3.1.3). Zusätzlich wird die Spaltung der Initiator-Caspase-3 reduziert. Daher ist es möglich, dass die Reduzierung der PRMT5-Aktivität die CD95L-induzierte Caspase-Kaskade beeinflusst. Dies wird auch deutlich an der Spaltung von PARP1, welches ein Ziel-Substrat der Caspase-Kaskade ist (siehe Kapitel 3.1.3). Somit wird erkennbar, dass die Aktivität von PRMT5 einen Einfluss auf die Aktivität von Caspase-8 bzw. auf die Caspase-Kaskade besitzt (siehe Abbildung 41). Dies deutet darauf hin, dass die Konformationsänderung von Caspase-8 am DISC mit Hilfe von Methylierungen beeinflusst werden kann. Allerdings ist es auch möglich, dass die Stabilität der Caspase-8-Untereinheiten durch die Reduzierung der PRMT5-Aktivität gesenkt werden kann.

Der Einfluss von PTM auf die Stabilität bei Caspase-8 konnte bereits in früheren Studien untersucht werden [187]. Durch die Hemmung von PRMT5 kommt es zu einer Reduzierung der potenziellen Caspase-8-Methylierung, welche durch die reduzierenden Effekte innerhalb von SYM-10-IP deutlich wird (siehe Kapitel 3.1.3). Die mögliche symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8 scheint somit von EPZ über PRMT5 gehemmt zu werden (siehe Abbildung 41). Neben EPZ wurde der Einfluss eines weiteren PRMT-Inhibitors in Versuchen überprüft (Daten nicht gezeigt). Dieser Inhibitor, AMI-5, ist ein PRMT-Proteinfamilien-spezifischer Inhibitor, jedoch reduziert er die Aktivität mehrerer Mitglieder. Dabei zeigen sich ähnliche Tendenzen wie bei EPZ (Daten nicht gezeigt).

In einigen Versuchen wurde der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD verwendet. Dabei wurde deutlich, dass der spezifischere Caspase-Inhibitor zu einer stärkeren Hemmung der Caspase-8-Spaltung führt (siehe Kapitel 3.1.3). Die Hemmung der Caspase-8-Aktivität mit Hilfe von EPZ ist hingegen eine indirekte Inhibition über die PRMT5-Aktivität. Die Methylierung von Caspase-8 fördert wahrscheinlich die katalytische Aktivität, indem die Stabilität der Konformation erhöht wird. Dabei ist die Methylierung jedoch nicht zwingend notwendig, sondern verlängert möglicherweise die Halbwertszeit der Heterotetramere.

Eine vollständige und langfristige Inhibierung der PRMT5-Aktivität durch EPZ ist nicht durchführbar, die Rolle von PRMT5 ist zu vielseitig [296]. Eine komplette Inhibierung würde den zellulären Prozess in einem Umfang stören, dass nicht unterschieden werden kann, ob die resultierenden Effekte durch die EPZ-Stimulation oder aufgrund der Inaktivierung von PRMT5 erfolgen. Es käme zu einer zu starken Hemmung der unterschiedlichen Methylierungen, an denen PRMT5 beteiligt ist, wodurch zu große Nebeneffekte auftreten würden [201]. Auch eine längere Vor-Stimulation für eine vermehrte Inaktivierung ist aufgrund der Beteiligung von PRMT5 an DNA-Reparatur- und Proliferations-Mechanismen schwierig umzusetzen [210] [211]. Die Inhibierung der Aktivität unterliegt daher einem Abwägen und Abschätzen der inhibierenden Effekte auf die potenzielle Methylierung von Caspase-8 gegenüber den Nebeneffekten auf die gesamte Zelle. Die Hemmung der Caspase-8-Aktivität und die damit einhergehende Inhibierung der Caspase-8-Spaltung liefert jedoch einen weiteren Hinweis bezüglich der potenziellen Caspase-8-Methylierung.

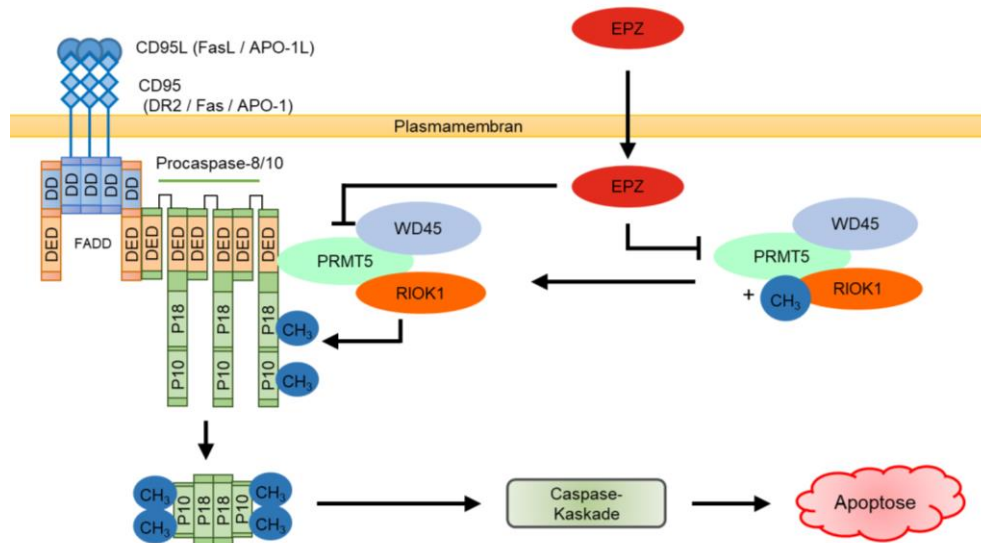


Abbildung 41 PRMT5-Inhibierung reduziert die Caspase-8-Aktivität: Gezeigt wird die potenzielle Interaktion zwischen Procaspase-8 und PRMT5 nach CD95L-Stimulation. Der PRMT5-Komplex könnte dabei mit Procaspase-8 interagieren und die Spaltprodukte können anschließend stabilisiert werden. Dies unterstützt die Induzierung der Caspase-Kaskade und schließlich die Apoptose. Simultane EPZ-Stimulation reduziert die PRMT5-Aktivität und könnte dadurch die potenzielle Methylierung von Caspase-8 hemmen. Modifiziert nach [62].

4.1.3 Potenzielle Methylierungsstellen bei Procaspase-8 und Auswirkungen auf die Spaltung und Aktivität von Caspase-8

Die potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8 kann anhand von spezifischen Methylierungsstellen erfolgen [297]. Diese bestehen aus Arginin, sowie ein oder zwei Glycin AS [207] [208] [209] [297]. Diese Aminosäuresequenz befindet sich innerhalb von Procaspase-8 an zwei Stellen. Die erste Sequenz ist an AS R233, die zweite Sequenz an AS R435 (siehe Abbildung 42). Beide Motive befinden sich nicht innerhalb der DEDs, sondern innerhalb der p18-umfassenden Domäne (R233) oder in der p10-umfassenden Aminosäure-Region (R435) (siehe Abbildungen 42 und 43). Daher ist es möglich, dass die potenziellen Caspase-8-Methylierungen an allen Untereinheiten bzw. in Procaspase-8 vorkommen können. Punktmutationen dieser beiden Methylierungsstellen kommen sowohl in ALPS als auch in Karzinom-Erkrankungen vor (siehe Kapitel 1.2.2.5) [157] [158] [159] [164] [165] [162] [163]. Die Rolle, welche Punktmutationen innerhalb der Erkrankungen besitzen, ist nicht entschlüsselt.

Es konnte beobachtet werden, dass durch die Einführung der Mutationen R233H und R435Q in Procaspase-8, die Caspase-8-Aktivität reduziert wird (siehe Kapitel 3.1.5). Auch der CD95L-induzierte Zelltod sowie die Reduzierung der Zellviabilität werden in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen inhibiert. Jedoch kommt es nach dreistündiger CD95L-Stimulation auch in diesen Zellen zu einer Spaltung von Procaspase-8a sowie Procaspase-3. Eine Veränderung der Lokalisierung innerhalb des Zytosols von Procaspase-8a-R233H und –R435Q konnte nicht beobachtet werden (siehe Kapitel 3.1.6). Zusätzlich konnten weder potenzielle Signale von Procaspase-8a-R233H noch von Procaspase-8-R435Q innerhalb von Co-IP detektiert werden. Im Gegensatz zu HeLa-CD95-C8-WT Zellen konnten in HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen keine möglichen Caspase-8 Signale in der IP erfasst werden. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die beiden Arginine

R233 und R435 notwendig sind, um Caspase-8 möglicherweise symmetrisch zu di-methylieren (siehe Kapitel 3.1.7).

10	20	30	40	50	60
MDFSRNLYDI	GEQLDSEDLA	SLKFLSLDYI	PQRKQPEIKD	ALMLFQRLQE	KRMLEESNLS
70	80	90	100	110	120
FLKELLFRIN	RLDLLITYLN	TRKEEMEREL	QTPGRAQISA	YRVMLYQISE	EVSRSSELSRF
130	140	150	160	170	180
KFLLQEEISK	CKLDDDMNLL	DIFIEMEKRV	ILGEGKLDIL	KRVCAQINKS	LLKIINDYEE
190	200	210	220	230	240
FSKERSSSLE	GSPDEFSNGE	ELCGVMTISD	SPREQDSESQ	TLDKVYQMKMS	KPRGYCLIIN
250	260	270	280	290	300
NHNFAKAREK	VPKLHSIRDR	NGTHLDAGAL	TTTFEELHFE	IKPHDDCTVE	QIYEILKIYQ
310	320	330	340	350	360
LMDHSNMDCF	ICCILSHGDK	GIIYGTDGQE	APIYELTSQF	TGLKCPSLAG	KPKVFFIQAC
370	380	390	400	410	420
QGDNYQKQIP	VETDSEEQPY	LEMDLSSPQT	RYIPDEADFL	LGMATVNNCV	SYRNPAEGTW
430	440	450	460	470	480
YIQSLCQSLR	ERCPRGDDIL	TILTEVNYEV	SNKDDKKNMG	KQMPQPTFTL	RKKLVFPSD

Abbildung 42 Mögliche Methylierungsstellen an Procaspase-8: Gezeigt wird die Aminosäuresequenz von Procaspase-8 sowie dessen potenziellen Methylierungsstellen für eine symmetrische Di-Methylierung (Rot umkreist). Zusätzlich werden potenzielle Punktmutationen dargestellt, die unter Verdacht stehen, an Erkrankungen beteiligt zu sein (rote Buchstaben). Außerdem werden die DED-Bereiche (gelb hinterlegt), p18-Region (grün hinterlegt) und p10-Region (rostbraun hinterlegt) gezeigt.

Die symmetrische Di-Methylierung ist eine dauerhafte Modifikation, die meistens erst durch eine Demethylase aufgehoben wird (zusammengefasst in [298]). Allerdings konnten bis dato keine Arginin-spezifischen Demethylasen identifiziert werden, zudem wird ihre Existenz zum Teil kontrovers diskutiert (zusammengefasst in [299] [300] [301]). Eine Untersuchung nach potenziellen Demethylasen an Caspase-8 könnte die genaue Rolle der Methylierungen weiter definieren. In diesen zukünftigen Studien sollte zusätzlich der Einfluss der Methylierungen auf die Stabilität von Caspase-8 untersucht werden, um bessere Einblicke in die Apoptose-Regulation zu ermöglichen. Aufgrund des Einflusses des PRMT5-Inhibitors auf die Spaltung von Caspase-8, dem Einfluss der Arginin-AS R233 und R435 auf die Caspase-8-Spaltung und -Aktivität sowie die Reduzierung der potenziellen Caspase-8-Methylierungs-Signale scheint die symmetrische Di-Methylierung einen Einfluss auf die Caspase-8-Aktivität zu haben.

Die potenzielle symmetrische Di-Methylierung der Caspase-8 Domänen scheint vor der Spaltung von Procaspase-8 zu erfolgen (siehe Kapitel 3.1.1). Erst durch die CD95L-Stimulation kann Caspase-8 potenziell an R233 und R435 symmetrisch di-methyliert werden (siehe Kapitel 3.1.2, 3.1.4 und 3.1.7). Darauf deuten die möglichen Caspase-8-Signale in den beschriebenen IP hin. Dies legt nahe, dass auch Procaspase-8 an diesen Argininen modifiziert werden kann (siehe Abbildungen 42 und 43). Weshalb die potenzielle Caspase-8-Methylierung erst nach der CD95L-Stimulation erfolgen kann, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die potenzielle symmetrische Di-Methylierung kann als möglicher stabilisierender Faktor dienen, jedoch wird auch bei Procaspase-8-R233H oder -R435Q die Caspase-Kaskade initiiert. Dies geschieht allerdings in einem schwächeren Maße als bei Procaspase-8-WT (siehe Kapitel 3.1.5). Dabei könnte das entsprechend, andere Arginin möglicherweise symmetrisch di-methyliert werden und dadurch teilweise die fehlende Methylierung kompensieren. Die Mutationen können zusätzlich einen destabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur besitzen. Um dies zu verhindern, wurden Strukturanalysen durchgeführt und die Mutationen so ausgewählt, dass sie eine minimale Störung der Struktur aufweisen.

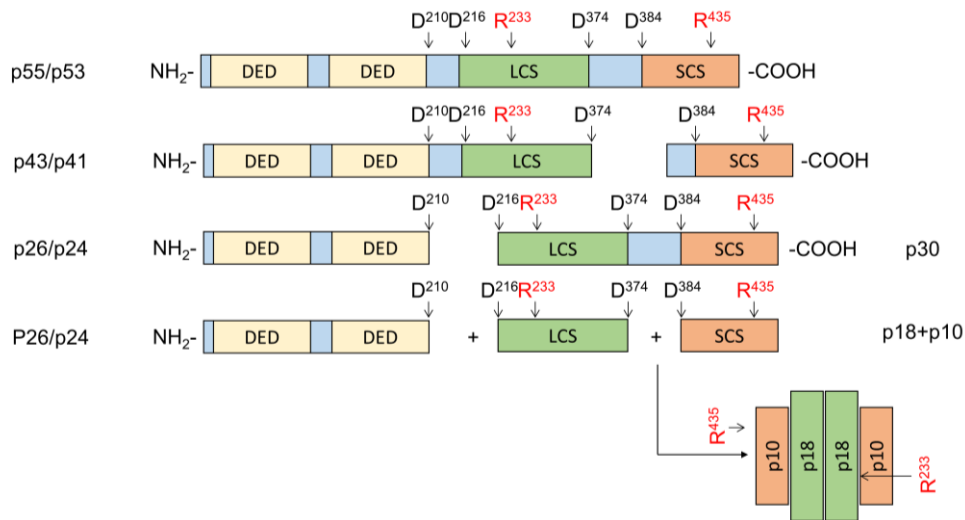


Abbildung 43 Potenzielle Methylierungsstellen an Caspase-8: Gezeigt werden die Domänen und Untereinheiten von Procaspase-8 und Caspase-8 sowie der Ort der potentiellen Stelle für eine mögliche symmetrische Di-Methylierung (rote Buchstaben). Bearbeitet nach [87].

Neben der Bedeutung als Apoptose-Initiator-Caspase ist Caspase-8 an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt (siehe Kapitel 1.2.2.4). Einige dieser Prozesse finden innerhalb des Nukleus statt. Die Rolle der potentiellen Caspase-8-Methylierung auf diese Prozesse muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Procaspase-8-WT wird sowohl wie Procaspase-8-R233H und -R435Q innerhalb des Zytosols erfasst. Eine Beeinträchtigung innerhalb von HeLa-CD95-C8-R233H und HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Dies muss ebenfalls in zukünftigen Studien erforscht werden.

4.1.4 Die potenzielle Rolle der Caspase-8-Methylierung bei Zelltod und Krankheiten

Durch Versuche konnten Hinweise auf eine potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8 erfasst werden. Die Veränderung der wahrscheinlichen Methylierungsstellen von Caspase-8 resultieren in einer negativen Beeinträchtigung der Caspase-Kaskade.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass auch weitere DISC-Proteine mit dem PRMT5-Komplex interagieren können und von diesem beeinflusst werden [302]. Dabei wird c-FLIP_L durch PRMT5 inhibiert, wodurch eine vermehrte Caspase-8-Aktivität erzeugt werden kann. Jedoch ist die enzymatische Aktivität von PRMT5 für eine c-FLIP_L Beeinflussung nicht wichtig. Jedoch führt die c-FLIP-PRMT5 Interaktion zu einer weiteren Interaktion mit der E3-Ligase ITCH. Dies ermöglicht die c-FLIP-Degradierung mit Hilfe des Proteosoms [302]. Einen gegensätzlichen Effekt sieht man durch die potenzielle symmetrische Di-Methylierung von Caspase-8, die als möglicher Stabilisierungsfaktor der Untereinheiten dienen kann. Damit könnte der PRMT5-Komplex eine doppelte Bedeutung besitzen: zum einen durch einen stärkenden Effekt auf die Spaltung und Aktivität von Caspase-8, zum anderen wird dessen Inhibitor c-FLIP_L gehemmt (siehe Abbildung 44). Diese gegensätzlichen Effekte von PRMT5 auf c-FLIP und Caspase-8 sind nicht eindeutig entschlüsselt. Analysen für die doppelte Rolle von PRMT5 müssen daher in zukünftigen Studien untersucht werden. Dem gegenüber steht die direkte Beeinflussung von Caspase-8

durch die die Mutationen R233 und R435. Die Aktivierung von Procaspase-8 kann dadurch direkt beeinflusst werden und nicht indirekt durch PRMT5 und c-FLIP.

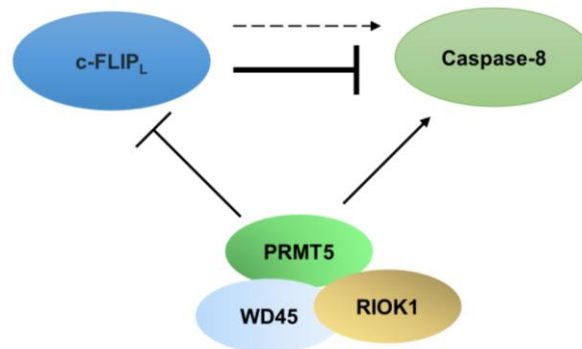


Abbildung 44 Potenzielle Auswirkungen von PRMT5 und c-FLIP auf Caspase-8: Gezeigt wird das Zusammenspiel und die gegenseitigen Effekte von c-FLIP_L und PRMT5. Innerhalb einer natürlich vorkommenden Zellpopulation wird Caspase-8 durch c-FLIP_L inhibiert, gleichzeitig durch einen Stimulus und dem Einfluss von PRMT5 in seiner Spaltung und Aktivität unterstützt. PRMT5 inhibiert wiederum c-FLIP_L, sodass ein Gleichgewicht vorhanden ist. Innerhalb von Zellen mit niedrigerer c-FLIP_L Expression kann das Protein zelltofördernde Effekte aufweisen (gestrichelter Pfeil).

Ein weiteres Protein, welches an Zelltod-Signalwegen beteiligt ist und mit PRMT5 interagiert, ist RIPK1. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte nachgewiesen werden, dass PRMT5 an Komponenten des Ripoptosoms binden kann. Allerdings findet die detektierte Interaktion nur zwischen RIPK1 und PRMT5 statt, nicht jedoch mit RIPK3. Es findet nur eine Methylierung von RIPK3 statt, wodurch eine rückwärtsgewandte Kontrolle der RIPK1-Aktivität ermöglicht wird. Dieses Zusammenspiel mit weiteren Zelltod-Proteinen verdeutlicht, dass Methylierungen und der PRMT5-Komplex an vielseitigen Signalwegen beteiligt sind [303].

Die Punktmutationen von Caspase-8 an R233 und R435 können in verschiedenen Karzinom- und ALPS-Erkrankungen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.2.2.5). Welchen Einfluss beide Mutationen innerhalb der Erkrankungen haben, ist allerdings noch nicht untersucht worden. Spekulativ gesehen könnten Procaspase-8-R233 und Procaspase-8-R435 zu einer Reduzierung der Caspase-8-Aktivität führen, wodurch der Zelltod beeinflusst werden könnte. Innerhalb von den hier durchgeführten *in vitro*-Analysen konnten Hinweise auf eine solche Beeinflussung des Zelltodes erfasst werden. Die Homöostase könnte daher in Patienten mit mindestens einer von beiden Mutationen gestört sein. Um den genauen Einfluss der Punktmutationen *in vivo* zu entschlüsseln, müssen zukünftige Studien mit Hilfe von *ex vivo* Proben der Patienten durchgeführt und analysiert werden.

Die Verwendung der Punktmutationen als Angriffspunkt innerhalb von Karzinomkrankungen ist schwierig. In ersten Studien konnte nachgewiesen werden, dass DNA-Methyltransferasen in Lungenkarzinomen eingesetzt werden können [304]. Jedoch zeigten andere Studien, dass vor allem die Inhibierung von PRMT5 zu einer erfolgreichen Behandlung bei Tumoren führen kann [305] [306]. Daher ist es naheliegender, die Zelltod-Induktion in R233- und R435-mutierten Zellen mit Hilfe von nicht Caspase-8-abhängigen Zelltodarten zu behandeln. Dies würde Nebeneffekte einer PRMT5-Beeinträchtigung auf andere zelluläre Bereiche minimieren, da es zu keinen zusätzlichen Methylierungen weiterer Prozesse käme. Ob die veränderten Procaspase-8 Proteine trotz der Beeinträchtigung in einem ausreichenden Maße aktiviert und genutzt werden können, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.2 Dekodierung des RL2-Signalweges und sein Einfluss auf die extrinsische Apoptose

Neben der Dekodierung von Todesrezeptorsignalwegen, Mutationen und PTM spielen auch natürlich vorkommende Proteine und Peptide eine bedeutende Rolle für potenzielle Karzinom-Therapeutika. Eines dieser Peptide ist RL2, welches innerhalb von verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien Zelltod induziert. Dabei waren bislang der RL2-induzierte Signalweg sowie dessen Effekte auf die extrinsische Apoptose unbekannt.

4.2.1 Translokation von RL2 zu den Mitochondrien

RL2 besitzt eine molekulare Masse von etwa 13 kDa [276] [277]. Darüber hinaus weist RL2 einen pI-Wert (Isoelektrischer Punkt) von 9,85 sowie eine Hydrophobizität von -0,9 auf [307] [308]. Diese Werte deuten darauf hin, dass RL2 durch die Membran in das Zellinnere gelangen kann. Unterstützt wird diese These dadurch, dass RL2 ausschließlich innerhalb der Zellen detektiert wurde (Daten nicht gezeigt) [291]. Zusätzlich sind keine Membran-Oberflächen-Proteine oder -Rezeptoren innerhalb der MS-Analyse erfasst worden (siehe Kapitel 3.2.1) [291]. Auch die starke Translokation von RL2 an die Mitochondrien in monomerer und dimerer Form deutet auf die dortige Hauptinteraktion hin (siehe Abbildung 23). Dabei neigt RL2 aufgrund seiner Struktur zu einer Aggregatformation [307].

An den Mitochondrien interagiert RL2 mit TOM70, welches ein Protein des TOM-Komplexes ist (siehe Kapitel 3.2.1). Die RL2-Interaktion führt zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und einer daraus resultierenden Reduzierung des ATP-Gehalts (siehe Abbildung 45) [291]. Dies ist einer der ersten Hinweise auf einen mitochondrialen Zelltod wie der Mitophagie.

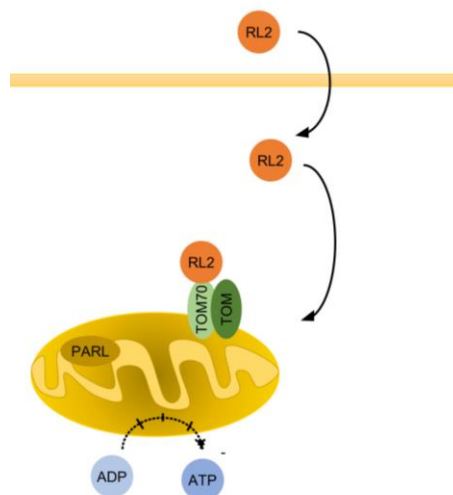


Abbildung 45 RL2 transloziert innerhalb der Zelle an das Mitochondrium: RL2 gelangt durch die Zellmembran in das Innere der Zelle. Dort transloziert das Peptid zum Mitochondrium und interagiert mit TOM70 an dem TOM-Komplex.

Die Interaktion von RL2 mit TOM70 kann sowohl über einen *RL2-Pulldown*, mit Hilfe von massenspektrometrischer Analyse und Western Blot Analyse sowie TOM70-IP nachgewiesen werden. Die Daten verdeutlichen, dass die Mitochondrien der Hauptinteraktionsort sind und TOM70 der wichtigste Interakteur ist (siehe Kapitel 3.2.1) [291]. Dies wird durch den inhibitorischen Effekt eines TOM70-KD auf die RL2-induzierte Reduzierung des ATP-Gehalts

verdeutlicht [291]. RL2 besitzt jedoch keinen Einfluss auf die OCR (siehe Kapitel 3.2.1). Innerhalb der Zellen ist es möglich, dass es noch immer genug intakte Mitochondrien gibt oder die beeinflussten Mitochondrien zwar weniger ATP erzeugen können, die Zellatmung allerdings trotzdem normal stattfindet. Die RL2-Lokalisierung an den Mitochondrien ist ein weiterer Hinweis auf den RL2-induzierten Zelltod (siehe Abbildung 45). Es verdeutlicht zusätzlich, dass Mitophagie als mitochondrien-spezifische Autophagie eine entscheidende Rolle innerhalb des RL2-induzierten Signalweges spielen kann.

4.2.2 Induzierung von Mitophagie in Mammakarzinomzelllinien durch RL2

RL2 ist innerhalb von Mammakarzinomzellen an den Mitochondrien lokalisiert und interagiert mit TOM70 an dem mitochondrialen Import-Komplex TOM und dort mit TOM70 (siehe Kapitel 3.2.1). In zeitgleichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine RL2-Stimulation zu einer Beeinflussung von autophagischen Faktoren führen kann [309]. Die Inhibition der Autophagie mit Hilfe eines Inhibitors führte jedoch nicht zu einer kompletten Hemmung. Stattdessen führte die Inhibierung zu einer leichten Sensibilisierung der Zellen und erfolgte nur in einem Maße, welches nicht ausreichend ist, um den RL2-induzierten Zelltod zu erklären. Neben der leichten Aktivierung von Autophagie führt eine RL2-Stimulation zu einem Anstieg von ROS innerhalb der Zellen [309]. Auch dieser Anstieg ist nicht ausreichend, um den RL2-induzierten Zelltod vollständig zu dekodieren. Stattdessen kann der ROS-Anstieg durch eine Beeinträchtigung der Mitochondrien durch RL2 verursacht werden. Insgesamt konnte die Studie aus dem Jahr 2019 keine eindeutigen Erklärungen für den RL2-induzierten Zelltod liefern. Jedoch enthält sie Hinweise, dass autophagische Prozesse an den zellulären Beeinträchtigungen durch RL2 beteiligt sein können [309]. Darunter fällt der Anstieg von LC3-II, welcher auch in mitophagischen Zellen beobachtet wird und Autophagie mit Mitophagie verknüpft [256] [257] [309]. Die RL2-Lokalisation, der Einfluss von TOM70 auf Mitophagie und die Hinweise auf Autophagie führten zu einer Überprüfung mitophagischer Proteinmarker (siehe Kapitel 3.2.2). Diese Proteine zeigen durch ihre Zunahme, dass RL2 Mitophagie innerhalb der Zellen auslöst (siehe Abbildung 46). Die These wird zum einen durch den Anstieg der Mitophagie-Proteine unterstützt, zum anderen durch die Interaktion zwischen RL2 und TOM70 (siehe Kapitel 3.2.1). Eine Beeinträchtigung von TOM70 führt zu einer Import-Reduzierung von PINK1 [260] [261]. In gesunden bzw. normalen Mitochondrien wird PINK1 in das Innere der Mitochondrien importiert und dort von PARL degradiert. Dieser Import erfolgt mit Hilfe des TOM-Komplexes, wobei TOM70 als Rezeptor für die Erkennung dient (siehe Abbildung 46) [261]. Die Bindung von RL2 an TOM70 kann daher den Import von PINK1 unterbinden, wodurch Parkin rekrutiert und ubiquityniert werden kann. Dies ermöglicht anschließend die weitere mitophagische Signalweiterleitung. Dadurch kann RL2 zu einem Anstieg der Rezeptoren BNIP3 und NIX an den Mitochondrien führen, die für die Weiterleitung eines Parkin-unabhängigen Signalweges verantwortlich sind [250] [251] [252]. Dieser Signalweg ist zusätzlich TOM-unabhängig und erfolgt durch den Anstieg hypoxischer Bedingungen oder eine Art Hungern der Zellen [253] [254]. Da die OCR nicht durch RL2 beeinträchtigt wird, handelt es sich wahrscheinlich nicht um Hypoxie als Auslöser des BNIP3- und NIX-Anstiegs. Stattdessen kann RL2 zu einer Reduzierung des ATPs führen und dadurch dessen Mangel ermöglichen. Dieses zelluläre Aushungern kann in einem Anstieg von BNIP3 und NIX resultieren und damit zu einer Verstärkung der Mitophagie führen.

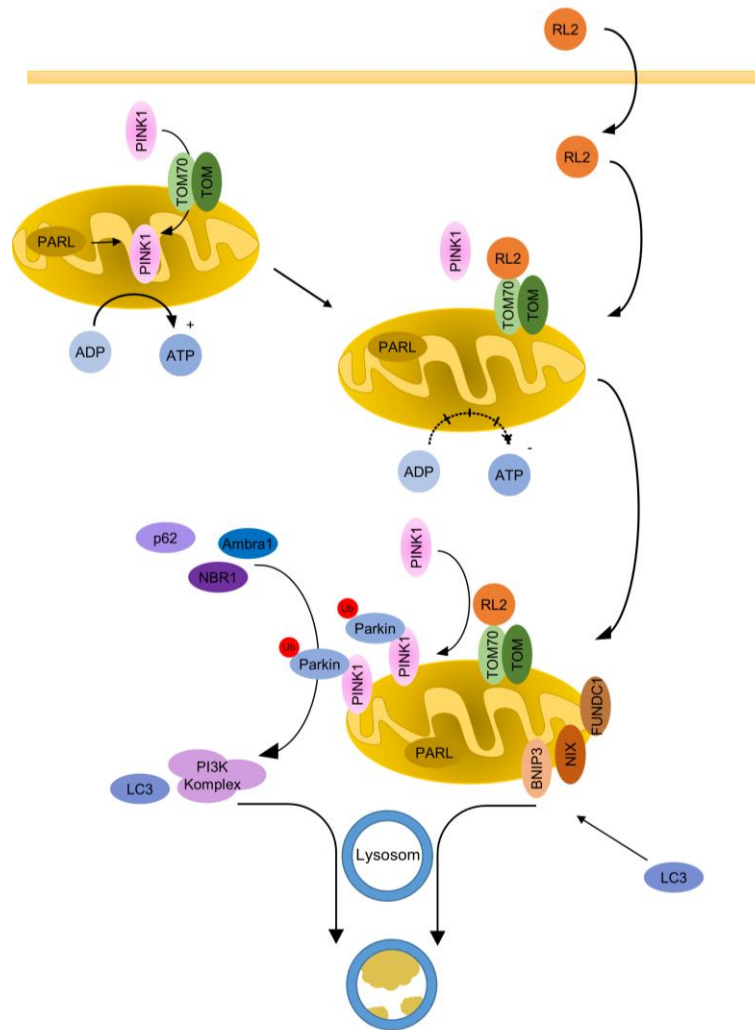


Abbildung 46 RL2 kann durch die mögliche TOM70-Interaktion Mitophagie innerhalb der Zelle induzieren: RL2 gelangt durch die Zellmembran in das Innere der Zelle. Dort transloziert das Peptid zum Mitochondrium und interagiert mit TOM70 an dem TOM-Komplex. Dies verhindert den regulativen PINK1-Import und Abbau in den Mitochondrien. Dadurch können vermehrt PINK1-Proteine an der mitochondrialen Membran binden und Parkin rekrutieren. Dadurch kann der PI3K-Komplex gebildet werden. Gleichzeitig nimmt die Menge von BNIP3 und NIX an den Mitochondrien zu. Mit Hilfe von LC3 werden die Mitochondrien in das Autophagosom rekrutiert und abgebaut.

Darüber hinaus muss untersucht werden, welcher Bereich von RL2 mit TOM70 interagieren kann. RL2 ist 111 AS lang und damit länger als Lactaptin (77 AS) oder RL1 (68 AS), aber kürzer als K-Casein (182 AS) (Abbildung 11). RL2 kann am effektivsten Zelltod induzieren, verglichen mit RL1, Lactaptin oder K-Casein [277]. Ob die anderen Proteine und Peptide mit TOM70 interagieren können, ist nicht bekannt. Aufgrund ihrer geringeren Zelltodinduzierung ist es möglich, dass ihnen (RL1, Lactaptin) eine Aminosäure-Sequenz fehlt, die für die potenzielle Interaktion mit TOM70 notwendig ist. Diese Aminosäure-Sequenz müsste in den ersten 24 AS von RL2 vorhanden sein, da es Überschneidungen mit den restlichen Peptiden gibt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich die Interaktions-Sequenz von RL2 an einer exponierten Stelle befindet und dadurch die Bindung an TOM70 ermöglicht. Dafür spricht, dass K-Casein alle AS von RL2 besitzt, jedoch nicht die gleiche Sensitivität. Aufgrund der Größe von K-Casein ist es möglich, dass es nicht im selben Umfang in die Zelle transloziert wird und dadurch weniger effektiv ist. Für eine genaue Untersuchung der potenziellen RL2-TOM70-Interaktion muss in zukünftigen Versuchen das Bindemotiv beider Partner entschlüsselt werden. Dies ermöglicht die Modifikation von RL2, wodurch die Bindung und Interaktion mit TOM70 verbessert wird und ein stärkerer Zelltod induziert werden kann.

4.2.3 Inhibierung des TRAIL-induzierten Zelltodes durch RL2

Die Behandlung von Mammakarzinomzelllinien mit RL2 führt zu einer potenziellen Induzierung von Mitophagie und Zelltod. Allerdings erfolgt die Zelltod-Induktion durch RL2 auf einem niedrigeren Level als bei bereits etablierten Apoptose-Induktoren wie z.B. CD95L oder TRAIL. Sollen die Effektivität von RL2 verbessert und die Nebeneffekte der etablierten Induktoren durch Minimierung der Konzentrationen gesenkt werden, können kombinatorische Behandlungen genutzt werden. Zusätzlich soll entschlüsselt werden, welche Effekte der RL2-induzierte Zelltod auf die extrinsische Apoptose besitzt. Es werden gegensätzliche Effekte in zeitlicher Abhängigkeit erfasst (siehe Kapitel 3.2.3). Während es zu einer Sensitivierung der Mammakarzinomzellen in Richtung Zelltod nach 24 Stunden Co-Stimulation kommt, werden in den Messpunkten zuvor hemmende Effekte detektiert (siehe Abbildungen 25 und 26) (siehe Kapitel 3.2.3). Die sensitivierenden Effekte zeigen, dass niedrigere Konzentrationen für gleichbleibende Effekte verwendet werden können. Dies bietet das Potenzial für Patienten, schwächeren Nebenwirkungen ausgesetzt zu sein.

In den ersten Stunden der Co-Stimulation konnten inhibitorische Effekte beobachtet werden. Diese sind durch die Inhibierung des TRAIL-induzierten DISC sowie der daraus resultierenden Caspase-Kaskade zu erklären (siehe Abbildung 47) (siehe Kapitel 3.2.4). Zwar hemmt RL2 nicht die gesamte DISC-Formierung, allerdings ist das Level der DISC-Bildung nicht ausreichend, um die gleiche Caspase-8-Spaltung und -Aktivität wie nach einer TRAIL-Stimulation zu induzieren. Dies führt dazu, dass die Aktivität von Caspase-3/7 reduziert sowie die Spaltung des Enzyms PARP1 hervorgerufen wird. Dabei werden sowohl die Pro-Formen der Caspasen als auch deren Spaltprodukte reduziert. Auch das Level von pro-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie wird gesenkt, obwohl das Proteinniveau von anti-apoptischen Proteinen nach einer RL2-Stimulation gesteigert wird (siehe Kapitel 3.2.5). Somit kommt es zu einer kurzzeitigen Hemmung der pro-apoptischen Signalwege von TRAIL durch RL2 (siehe Abbildung 47). Auch die TRAIL-Stimulation besitzt hemmende Effekte auf die RL2-Signalwege. Innerhalb der Co-Stimulation liegt die Steigerung des Proteinniveaus von Mitophagie-Markerproteinen unter der Zunahme einer reinen RL2-Behandlung (siehe Kapitel 3.2.2).

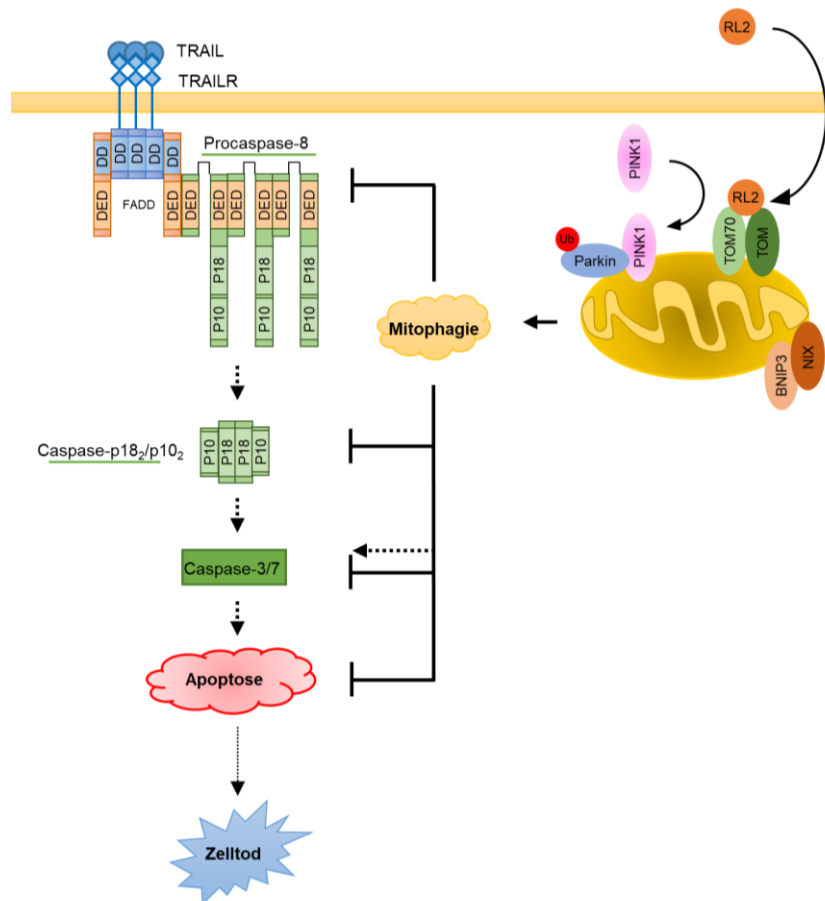


Abbildung 47 Inhibition des Zelltodes innerhalb einer RL2-TRAIL-Co-Stimulation: TRAIL-Stimulation führt zu Bildung des DISC und Induzierung der Caspase-Kaskade. Dies führt zu Apoptose und Zelltod. Bei simultaner RL2-Stimulation bindet das Peptid an den Mitochondrien und induziert Mitophagie. In den ersten Stunden nach der Stimulation führt dies zur Inhibition des DISC, der Caspase-Kaskade und der Apoptose (linke Seite). Modifiziert nach [62].

Somit gibt es eine potenzielle gegenseitige Hemmung der Signalwege. Die induzierte Mitophagie unterbindet die Apoptose-Signalkaskade. Gleichzeitig kommt es bei längeren Stimulationsdauern zu einer Sensitivierung in Richtung Zelltod. Zellen, die durch die TRAIL-Stimulation nicht in den Zelltod geführt werden konnten, werden durch die zusätzliche RL2-induzierte Mitophagie sensitiviert und sterben ebenfalls. Dies ist durch die einsetzende potenzielle Mitophagie möglich, die für die Zellen ein zusätzlicher Störfaktor ist (siehe Abbildung 48). Die RL2-induzierte Mitophagie erfolgt vor allem dauerhaft und über einen längeren Zeitpunkt. Dieses Zusammenspiel und die Sensitivierung von RL2 und TRAIL ermöglichen die Reduzierung der Stimulations-Konzentrationen sowie der Nebenwirkungen bei Einsatz als potenzielles Therapeutikum.

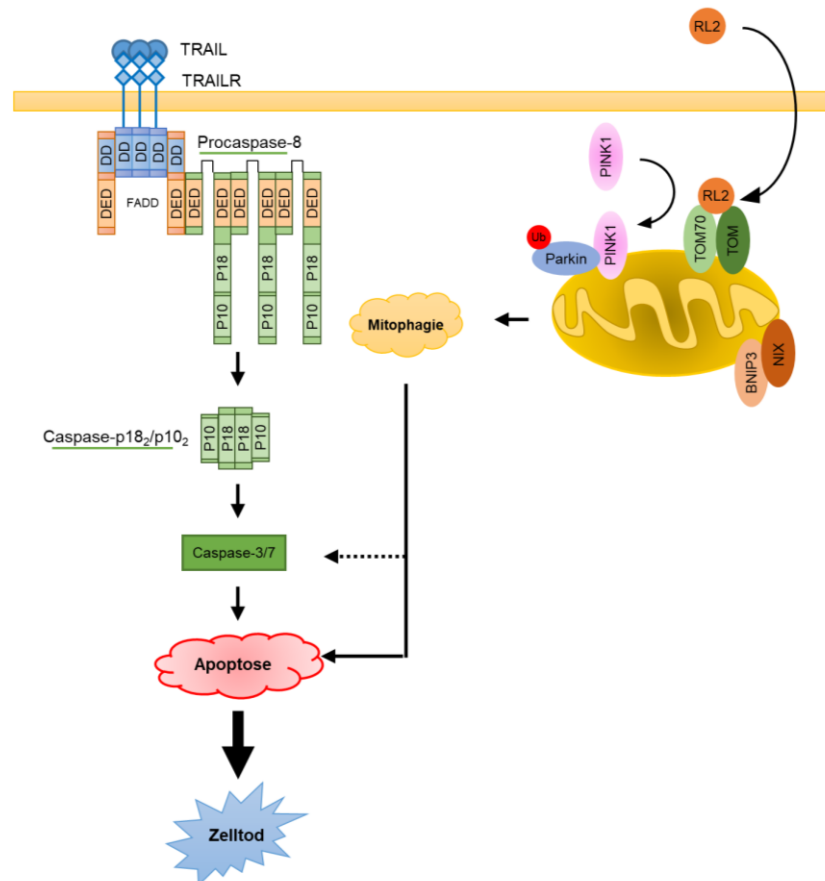


Abbildung 48 Sensitivierung des Zelltodes innerhalb einer RL2-TRAIL-Co-Stimulation: TRAIL-Stimulation führt zu Bildung des DISC und Induzierung der Caspase-Kaskade. Dies führt zu Apoptose und Zelltod. Bei simultaner RL2-Stimulation bindet das Peptid an den Mitochondrien und induziert Mitophagie. Durch längere Stimulationsdauern entfallen die hemmenden Effekte der Mitophagie auf die Apoptose und es kann vermehrt Zelltod induziert werden. Modifiziert nach [62].

4.2.4 RL2 als potenzielles Therapeutikum

Eine Behandlung mit RL2 führt zu Zelltod innerhalb von Mammakarzinomzelllinien und sensitiviert Zellen innerhalb einer apoptose-spezifischen Co-Stimulation. Gleichzeitig wird in anderen Zellarten kein Zelltod induziert [277]. RL2 besitzt daher wichtige Eigenschaften eines potenziellen Therapeutikums. Es konnte gezeigt werden, dass RL2 auch in weiteren Zelllinien die Zellviabilität reduziert (siehe Kapitel 3.2.6). BT549 und T47D sind beides Mammakarzinomzelllinien und reagieren sensitiv auf eine RL2-Stimulation, wobei BT549 dreifach negativ und T47D $\text{E}\alpha$ positive Zellen sind. Die zuvor getesteten Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 entsprechen den gleichen Arten (MDA-MB-231= dreifach negativ; MCF-7= $\text{E}\alpha$) (MCF-7-Daten nicht gezeigt). Die Zellviabilität der HER2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2) -positiven Zelllinie SKBR3 konnte nicht durch eine RL2-Behandlung reduziert werden (siehe Kapitel 3.2.6). Gleichzeitig kann keine Steigerung der Zytotoxizität anhand der LDH-Freisetzung gemessen werden. Dies kann an der Überexpression von Zellproliferations-Faktoren liegen, die einhergehen mit der Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors [310] [311].

Ein weiterer Faktor ist die Untersuchung der Effekte der RL2-induzierten Mitophagie auf weitere Signalwege beispielsweise den intrinsischen Signalweg ausgelöst durch DXR (siehe 3.2.6). Es konnte gezeigt werden, dass RL2 und DXR keine hemmenden Effekte innerhalb der

ersten Stimulationsstunden in Co-Stimulation besitzen, jedoch additive Effekte über längere Stimulationsdauern aufweisen (siehe Abbildung 49) (siehe Kapitel 3.2.7). Die Wirkzeit von DXR spielt dabei eine entscheidende Rolle, da die Reduzierung der Zellviabilität erst nach 24 Stunden erfolgt. Dies entspricht in etwa der stärksten Zellviabilitäts-Reduzierung durch eine RL2-Behandlung. Die Co-Stimulation verdeutlicht zusätzlich, dass es additive Effekte bei der Reduzierung der Zellviabilität durch die RL2-DXR-Co-Stimulation geben kann. Auch die DXR-induzierte Caspase-Kaskade kann durch eine RL2-Stimulation verstärkt werden. Selbst in RL2-resistenten SKBR3 Zellen sind verstärkende Effekte von RL2 auf die DXR-induzierte Caspase-Kaskade detektiert worden.

Für die Überprüfung der synergetischen Effekte wurden die IC_{50} -Werte von DXR und RL2 bestimmt (siehe Kapitel 3.2.9). Dabei konnte beobachtet werden, dass RL2 in BT549 Zellen einen höheren IC_{50} -Wert besitzt als in MDA-MB-231 Zellen [295]. Für weitere Zelllinien muss der IC_{50} -Wert in zukünftigen Studien berechnet werden. Mit Hilfe der IC_{50} -Werte konnten die synergetischen, additiven und antagonistischen Bereiche nach Loewe erfasst werden (siehe Kapitel 3.2.9). Die zuvor verwendeten Konzentrationen von RL2 und DXR liegen in den durchgeführten Versuchen innerhalb von antagonistischen bzw. additiven Bereichen. Diese gezeigten Konzentrationen wurden in den bisherigen Studien verwendet, weshalb sie in dieser Arbeit ebenfalls genutzt wurden. Anschließend erfolgte die Überprüfung der potenziellen synergetischen Konzentrationen anhand eines Zellviabilitäts-Assays. Dabei konnte gemessen werden, dass RL2 und DXR in Co-Stimulationen zu einer Reduzierung der Zellviabilität führen können, obwohl die Einzel-Stimulationen keine signifikanten Reduzierungen aufweisen. Somit zeigen sich für niedrige RL2- (50 $\mu\text{g/ml}$) und DXR- (0,5 μM) Konzentrationen synergetische Effekte. Zusätzlich konnte ein potenzieller Reduktionseffekt von RL2 auf die DXR-Konzentration erfasst werden. Durch die Erhöhung der RL2-Konzentration kann die Konzentration von DXR um etwa das Fünffache gesenkt werden. Die resultierenden Effekte bleiben dabei jedoch gleich. Zwischen diesen Proben konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dies ist besonders für zukünftige Anwendungen interessant, da bisher keine starken Nebeneffekte von RL2 erfasst werden konnten. DXR hingegen neigt zu weitreichenden Nebeneffekten [294]. Eine Reduzierung von DXR mit Hilfe von RL2 könnte somit Patienten deutlich von Nebenwirkungen entlasten. Es verdeutlicht außerdem, dass RL2 als potenzielle Co-Stimulanz eingesetzt werden könnte

Neben den additiven Effekten von RL2 auf DXR-Behandlungen konnte mit Hilfe von SKBR3-Zellen eine erste Mammakarzinomzelllinie identifiziert werden, bei der kein Zelltod durch RL2 induziert werden kann. Bei SKBR3 Zellen handelt es sich um eine HER2 überexprimierende Zelllinie, sodass Wachstumsfaktoren in einem höheren Maße exprimiert werden. Dies könnte die Erklärung für die detektierte RL2-Resistenz darstellen. Zwar kann eine potenzielle Induzierung der Mitophagie erfasst werden, jedoch können die Wachstumsfaktoren die weitere Zelltodinduktion unterbinden. Dies könnte auch der Grund sein, weshalb es zu einer reduzierten Zytotoxizität und Senkung der Zellviabilität in SKBR3 Zellen kommt. Der Umfang an Mitophagie und aktiver Caspase-3 ist nicht ausreichend, um die Zellen in den Zelltod zu überführen. Ein weiterer Grund für die Inhibierung ist, dass das Proteinlevel der Mitophagy-Marker-Protein niedriger ist als in sensitiven Zelllinien (siehe Kapitel 3.2.6). Um den Einfluss der Überexpression von HER2 zu untersuchen, müssen neben SKBR3 Zellen weitere Zelllinien untersucht werden.

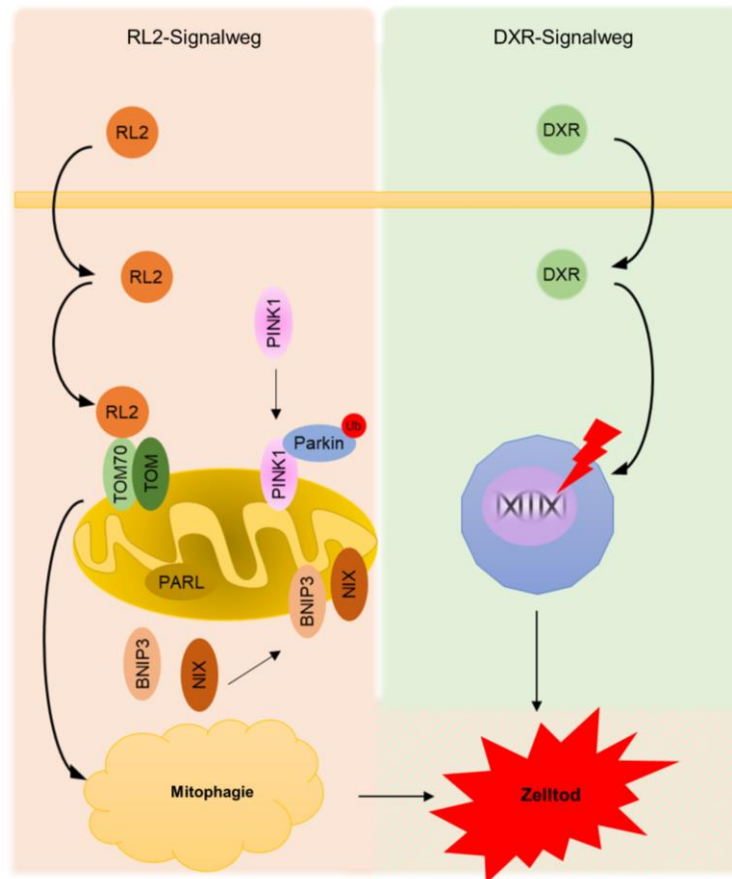


Abbildung 49 Separate Signalwege der DXR- und RL2-induzierten Zellteilung: DXR agiert besonders stark als Interkalant und kann darüber den Zelltod induzieren. RL2 ist an den Mitochondrien lokalisiert und induziert nach einer TOM70-Interaktion Mitophagie. Dies führt ebenfalls zum Zelltod. Abkürzung: Ub.= Ubiquitinierung. Modifiziert nach [293].

In zukünftigen Studien müssen weitere Zelltod-Induktoren in Co-Stimulation mit RL2 untersucht werden, um die Wechselwirkungen zu dekodieren. Dies ist notwendig, um RL2 als potenzielles Therapeutikum zu etablieren, hemmende Effekte auf etablierte Zytostatika zu entschlüsseln und den genauen Mechanismus des RL2-induzierten Zelltodes zu dekodieren. Durch den induzierten Zelltod und die sensitivierende Wirkung in Co-Stimulationen bietet RL2 das Potenzial als mögliches Mammakarzinom-Therapeutikum verwendet zu werden.

5 Ausblick

5.1 Bedeutung der potenziellen Methylierung von Caspase-8

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Caspase-8 möglicherweise symmetrisch dimethyliert werden kann und dass eine Beeinträchtigung von Caspase-8 zu einer Reduzierung der Caspase-Kaskade und des Zelltodes führen kann (siehe 4.1). Bisher konnte in keiner veröffentlichten Studie ein Zusammenhang zwischen Caspase-8 und der Methylierung an zwei spezifischen Argininen nachgewiesen werden. Dies wurde vor allem anhand von biochemischen Assays analysiert. In zukünftigen Studien müssen diese Daten mit Hilfe von MS-Analysen validiert werden, um die genauen Effekte beispielsweise auf die Stabilität der Caspase-8 Heterotetramere die Methylierungen zu definieren.

Während dieser nachfolgenden Analysen muss zusätzlich das Zusammenspiel zwischen der symmetrischen Di-Methylierung und weiteren PTM an Caspase-8 untersucht werden. An Caspase-8 konnten bereits zahlreiche PTM erfasst werden (siehe Kapitel 1.3.1). Welchen Einfluss eine potenzielle Methylierung auf die weiteren PTM besitzt, könnte zu der Entschlüsselung der Bedeutung von Methylierung für Caspase-8 und den Zelltod beitragen. In diesem Zusammenhang können auch zukünftige Studien durchgeführt werden, die die Rolle der möglichen Methylierung von Caspase-8 auf nicht apoptotische-Signalwege untersuchen.

Dies umfasst die genaue Lokalisierung von Caspase-8 nach einer Methylierung. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass die potenzielle Interaktion zwischen dem PRMT5-Komplex mit Caspase-8 innerhalb des Zytosols stattfindet, jedoch konnte Caspase-8 in anderen Studien auch innerhalb des Nukleus nachgewiesen werden. Eine mögliche Methylierung von Caspase-8 inmitten des Nukleus ist daher möglich und sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Die potenzielle Methylierung von Caspase-8 steht in einem Zusammenhang mit den AS R233 und R435, welche mögliche Methylierungsstellen sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Mutation an diesen Stellen zu einer Reduzierung des Zelltodes führen kann. In verschiedenen Karzinom-Erkrankungen, aber auch in ALPS-Erkrankungen, konnten Punktmutationen an den potenziellen Methylierungsstellen beobachtet werden.

In künftigen Untersuchungen sollte daher analysiert werden, ob es Zusammenhänge zwischen den Punktmutationen und den genannten Erkrankungen gibt. Diese Analysen könnten *ex vivo* mit Hilfe von Patientenproben erfolgen und als Grundlage für weitere Studien dienen.

5.2 Dekodierung des RL2-Mechanismus und dessen Potenzial für Karzinom-Therapien

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass RL2 in Mammakarzinomzellen den Zelltod auslöst. Jedoch war bis zu dieser Arbeit nicht bekannt, welcher Mechanismus für den RL2-induzierten Zelltod verantwortlich ist. Die Forschungsergebnisse im Rahmen dieser Dissertation dekodieren den wichtigsten molekularen Hauptmechanismus des RL2-induzierten Zelltodes. Diese Arbeit stellt damit die Grundlage für zukünftige Forschungen an der Mitophagie, ausgelöst durch RL2, dar. Ein wesentliches Analysefeld sind die Wechselwirkungen mit weiteren Zellprozessen, die nicht in direkter Verbindung mit der Mitophagie stehen. Zusätzlich muss die Region der Interaktion zwischen RL2 und TOM70 untersucht werden. In zukünftigen Studien könnte diese Gruppierung für eine Modifikation von RL2 dienen, um die Langlebigkeit, Interaktionsstärke und Spezifität zu erhöhen. Eine solche Modifikation würde die Konzentration reduzieren und die einhergehenden, potenziellen Nebeneffekte senken. Des Weiteren wären zusätzliche Anwendungen möglich. Etwa als Verabreichung mit Hilfe der mRNA-Technik, wodurch die Effektivität des potenziellen Therapeutikums erhöht wird, da RL2 in der betroffenen Region direkt erzeugt wird.

Die RL2-abhängige Induktion der Mitophagie kann ebenfalls in weiteren Mammakarzinomzelllinien beobachtet werden, jedoch nicht innerhalb einer HER2-positiven Zelllinie (siehe Kapitel 3.2.7). Aus diesem Grund müssen das Zusammenspiel der RL2-induzierten Mitophagie mit den Auswirkungen der Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren und, ob weitere HER2-positive Zelllinien gegen eine RL2 Behandlung resistent sind, in zukünftigen Studien untersucht werden. Dies ermöglicht eine spezifischere Anwendung von RL2 als potenzielles Therapeutikum. Eine genaue Wechselwirkung zwischen RL2-induzierter Mitophagie und Wachstumsfaktoren konnte nicht nachgewiesen werden. Potenzielle Interaktionen und Wechselwirkungen bieten einen weiteren Angriffspunkt für zukünftige Therapeutika, können aber ebenfalls auch bei der Dekodierung des restlichen RL2-Signalweges behilflich sein. Dazu gehört auch die Untersuchung von RL2 mit dem bereits etablierten Therapeutikum Trastuzumab. Besonders die Wechselwirkungen beider Stimulanzen in nicht sensitiven SKBR3 Zellen bieten ein vielfältiges Erforschungsgebiet und die Möglichkeit, resistente Mammakarzinomzellen zu behandeln [312].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die RL2-induzierte Mitophagie sensitive Langzeiteffekte auf die von TRAIL ausgelöste, extrinsische Apoptose besitzt (siehe Kapitel 3.2.3). Darüber hinaus konnten additive Effekte auf den intrinsischen Zelltod mit Hilfe einer DXR-Behandlung beobachtet werden. Beide Effekte zeigen, dass eine RL2-Co-Stimulation mit weiteren Stimulanzen zu verstärkenden Effekten führt. Daher ist es ratsam, in zukünftigen Studien weitere Zelltod-Induktoren mit kombinierten RL2-Behandlungen zu erforschen, um die Auswirkungen solcher Co-Stimulationen zu erfassen und spezifischere Therapien zu ermöglichen.

Neben sensitivierenden Effekten konnten zusätzlich kurzzeitige, hemmende Auswirkungen innerhalb der RL2-TRAIL-Co-Stimulation beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.3 bis 3.2.5). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass unterschiedliche Zelltodsignalwege miteinander agieren. Die Untersuchung weiterer Zelltodsignalwege in Kombination mit RL2-induzierter Mitophagie ermöglicht neue Erkenntnisse über die Bedeutung der Mitochondrien an zellulären

Prozessen. Zusätzlich können potenzielle Nebeneffekte innerhalb kombinierter Therapien, an denen Mitochondrien oder eine RL2-Stimulation beteiligt sind, erfasst werden. Die Untersuchung des RL2-induzierten Zelltodes bietet ein vielfältiges Spektrum an potenziellen Versuchen, Modifikationen für Spezifikationen und kombinierten Stimulationen, um RL2 als potenzielles Therapeutikum zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

- [1] F. Erdmann, C. Spix, A. Katalinic, M. Christ, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Krnzhöfer, K. Kunz, K. Manegold, A. Penzkofer, K. Tremel, G. Vollmer, S. Weg-Remers, B. Barnes, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, J. Fiebig, M. Franke, I. Gurung-Schönfeld, J. Haberland, M. Imhoff, K. Kraywinkel, A. Starker, P. von Berenberg-Gossler, A. Wienecke und A. Kötschau, „Krebs in Deutschland für 2017/2018,“ Nr. 13, pp. 1-171, 2021.
- [2] K. Seyrek, N. V. Ivanisenko, F. Wohlfromm, J. Espe und I. N. Lavrik, „Impact of human CD95 mutations on cell death and autoimmunity: a model,“ *Trends in Immunology*, Bd. 43, Nr. 1, pp. 22-40, Januar 2022.
- [3] P. H. Krammer, R. Arnold und I. N. Lavrik, „Life and Death in peripheral T cells,“ *Nature reviews Immunology*, Bd. 7, Nr. 7, pp. 532-42, 7 Juli 2007.
- [4] S. Sperandio, I. de Belle und D. E. Bredesen, „An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death,“ *Cell Biology*, Bd. 97, Nr. 26, pp. 14376-14381, 19 Dezember 2000.
- [5] J. Debnath, E. H. Baehrecke und G. Kroemer, „Does Autophagy contribute to cell death,“ *Autophagy*, Bd. 1, Nr. 2, pp. 66-74, Juli 2005.
- [6] T. P. Ashford und K. R. Porter, „CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES,“ *Journal of Cell Biology*, Bd. 12, Nr. 1, pp. 198-202, 1 Januar 1962.
- [7] S. M. Laster, J. Wood und L. R. Gooding, „Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis,“ *Journal of Immunology*, Bd. 141, Nr. 8, pp. 2629-2634, 15 Oktober 1988.
- [8] K. Seyrek, F. Wohlfromm, J. Espe und I. N. Lavrik, „The cross-talk of autophagy and apoptosis in breast carcinoma: implications for novel therapies?,“ *The Biochemical Journal*, Bd. 479, Nr. 14, pp. 1581-1608, 29 Juli 2022.
- [9] S. M. Frisch und H. Francis, „Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis,“ *The Journal of Cell Biology*, Bd. 124, Nr. 4, pp. 619-626, Februar 1994
- [10] R. C. Scott, G. Juhasz und T. P. Neufeld, „Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death,“ *Current Biology*, Bd. 17, Nr. 1, pp. 1-11, 9 Januar 2007.
- [11] B. K. Kennedy, N. R. Austriaco, J. Zhang und L. Guarente, „Mutation in the silencing gene S/R4 can delay aging in *S.cerevisiae*,“ *cell*, Bd. 80, Nr. 3, pp. 485-496, 10 Februar 1995.

- [12] A. Degtarev, Z. Huang, M. Boyce, Y. Li, J. Prakash, N. Mizushima, G. D. Duny, T. J. Mitchison, M. A. Moskowitz und J. Yuan, „Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury,“ *nature* , 1 Juli 2005.
- [13] C. A. Ray und D. J. Pickup, „The Mode of Death of Pig Kidney Cells Infected with Cowpox Virus Is Governed by the Expression of the crmA Gene,“ *Virology*, Bd. 217, Nr. 1, pp. 384-391, 1 März 1996.
- [14] N. Holler, R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J.-L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed und J. Tschopp, „Fas triggers an alternative, caspase-8–independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule,“ *nature immunology*, Bd. 1, pp. 489-495, Dezember 2000.
- [15] T. Vanden Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak und P. Vandenabeele, „Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways,“ *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, Bd. 15, Nr. 2, pp. 135-147, Februar 2014.
- [16] R. Weinlich, A. Oberst, H. M. Beere und D. R. Green, „Necroptosis in development, inflammation and disease,“ *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, Bd. 18, pp. 127-136, 21 Dezember 2017.
- [17] S. Dixon, K. M. Lemberg, M. R. Lamprecht, R. Skouta, E. M. Zaitsev, C. E. Gleason, D. N. Patel, A. J. Bauer, A. M. Cantley, W. S. Yang, B. Morrison und B. R. Stockwell, „Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death,“ *Cell*, Bd. 149, Nr. 5, pp. 1060-1072, 25 Mai 2012.
- [18] B. Hassannia, P. Vandenabeele und T. Vanden Berghe, „Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer,“ *Cancer Cell*, Bd. 35, Nr. 6, pp. 830-849, 10 Juni 2019.
- [19] N. S. Wilson, V. Dixit und A. Ashkenazi, „Death receptor signal transducers nodes of coordination in immune signaling networks,“ *nature immunology* , Bd. 10, Nr. 4, pp. 348-355, 19 März 2009
- [20] S. Elmore, „Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,“ *Toxicologic Pathology*, Bd. 35, Nr. 4, pp. 495-516, 2007.
- [21] R. C. Taylor, S. P. Cullen und S. J. Martin, „Apoptosis: controlled demolition at the cellular level,“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Bd. 9, Nr. 3, pp. 231-241, März 2008.
- [22] L. Ginaldi , M. De Martinis, A. D`Ostilio, L. Marini, M. F. Loreto, M. P. Corsi und D. Quaglino, „Cell proliferation and apoptosis in the immune system in the elderly,“ *Immunologic Research*, Bd. 21, Nr. 1, pp. 31-38, Februar 2000.
- [23] F. H. Igney und P. H. Krammer, „Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis,“ *Nature reviews Cancer*, Bd. 2, Nr. 4, pp. 277-288, 01 April 2002.

- [24] J. Kerr, A. Wyllie und A. Currie, „Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics,“ *British Journal of Cancer*, Bd. 26, pp. 239-257, 1 August 1972.
- [25] J. Kerr, „Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death,“ *The Journal of Pathology*, Bd. 105, Nr. 1, pp. 13-20, September 1971.
- [26] J. Kerr und J. Searle, „A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures,“ *The Journal of Pathology*, Bd. 107, Nr. 1, pp. 41-44, Mai 1972.
- [27] S. Pietkiewicz, J. H. Schmidt und I. N. Lavrik, „quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V /propidium iodide staining,“ *Journal of immunological methods*, Bd. 423, pp. 99-103, 16 Mai 2015.
- [28] Y. A. Lazebnik, S. Cole, C. A. Cooke, W. G. Nelson und W. C. Earnshaw, „Nuclear Events of Apoptosis In Vitro in Cell-free mitotic Extracts: A Model System for Analysis of the Active Phase of Apoptosis,“ *Journal of Cell Biology*, Bd. 123, Nr. 1, pp. 7-22, 1993.
- [29] E. Solary, R. Bertrand, K. W. Kohn und Y. Pommier, „Differential Induction of Apoptosis in Undifferentiated and Differentiated HL-60 Cells by DNA Topoisomerase I and II Inhibitors,“ *blood*, Bd. 81, Nr. 5, pp. 1359-1368, 1 März 1993.
- [30] G. Kroemer, L. Galuzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. Alnemro, E. Baehrecke, M. Blagosklonny, W. El-Deiry, P. Golstein, D. Green, M. Hengartner, R. Knight, S. Lipton, W. Malorni, M. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky und G. Melino, „Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009,“ *cell death and differentiation*, Bd. 16, pp. 3-11, 10 oktober 2008.
- [31] A. Masud, A. Mohapatra, S. A. Lakhani, A. Ferrandino, R. Hakem und R. A. Flavell, „Endoplasmic Reticulum Stress-induced Death of Mouse Embryonic Fibroblasts Requires the Intrinsic Pathway of Apoptosis,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 282, Nr. 19, pp. 14132-14139, 11 Mai 2007.
- [32] E. H.-Y. Cheng, M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten und S. j. Korsmeyer, „BCL-2, CBCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAL- Mediated Mitochondrial Apoptosis,“ *Molecular Cell*, Bd. 8, Nr. 3, pp. 705-711, September 2001.
- [33] L. Y. Li, X. Luo und X. Wang, „Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria,“ *nature*, Bd. 412, pp. 95-99, 05 Juli 2001.
- [34] Y. Suzuki, Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio und R. Takahashi, „A Serine Protease, HtrA2, I Released from Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death,“ *Molecular Cell*, Bd. 8, Nr. 3, pp. 613-621, September 2001.

- [35] C. Cande, I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami und G. Kroemer, „Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria,“ *Biochimie*, Bd. 84, Nr. 2-3, pp. 215-222, März 2002.
- [36] S. W. Muchmore, M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettersheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S.-L. Wong, S.-C. Ng und S. W. Fesik, „X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death,“ *nature*, Bd. 381, Nr. 6580, pp. 335-341, 23 Mai 1996.
- [37] M. Sattler, H. Liang, D. Nettesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson und S. W. Fesik, „Structure of Bcl-XL-Bak peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis,“ *Science*, Bd. 275, Nr. 5302, pp. 983-986, 14 Februar 1997.
- [38] M. Suzuki, R. J. Youle und N. Tjandra, „Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization,“ *Cell*, Bd. 103, Nr. 4, pp. 645-654, 10 November 2000.
- [39] A. Kelekar und C. B. Thompson, „Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis,“ *Trends in Cell Biology*, Bd. 8, Nr. 8, pp. 324-330, 1 August 1998.
- [40] P. Zhou, L. Qian, K. M. Kozopas und R. W. Craig, „Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions,“ *Blood*, Bd. 89, Nr. 2, pp. 630-643, 15 Januar 1997.
- [41] D. Hockenberry, G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber und S. J. Korsmeyer, „Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death,“ *nature*, Bd. 348, pp. 334-336, 22 November 1990.
- [42] L. Gibson, S. P. Holmgren, D. C. Huang, O. Bernard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. R. Sutherland, E. Baker, J. M. Adams und S. Cory, „bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival,“ *Oncogene*, Bd. 13, Nr. 4, pp. 665-675, 1996.
- [43] L. H. Boise, M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez und C. B. Thompson, „bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death,“ *Cell*, Bd. 74, Nr. 4, pp. 597-608, 27 August 1993.
- [44] R. Eskes, S. Desagher, B. Antonsson und J.-C. Martinou, „Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into Outer Mitochondrial Membrane,“ *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 20, Nr. 3, pp. 929-935, 1 Februar 2000.
- [45] M. C. Wei, T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson und S. J. Korsmeyer, „tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerize BAK to release cytochrome c,“ *Genes & Development*, Bd. 14, Nr. 16, pp. 2060-2071, 15 August 2000.

- [46] Y. Subburaj, K. Cosentino, M. Axmann, E. Pedrueza-Villalmanzo, E. Hermann, S. Bleicken, J. Spatz und A. J. Garcia-Saez, „Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species,“ *nature communications*, Bd. 6, Nr. 8042, 14 August 2015.
- [47] K. Cosentino und A. J. Garcia-Saez, „Bax and Bak Pores: Are we Closing the Circle?,“ *Trends in cell biology*, Bd. 27, Nr. 4, pp. 266-275, April 2017.
- [48] M. Marani, T. Tenev, D. Hancock, J. Downward und N. R. Lemoine, „Identification of Novel Isoforms of the BH3 Domain Protein Bim Which Directly Activate Bax To Trigger Apoptosis,“ *Molecular and cellular Biology*, Bd. 22, Nr. 11, pp. 3577-3589, 1 Juni 2002.
- [49] K. Wang, X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman und S. J. Korsmeyer, „BID: a novel BH3 domain-only death agonist,“ *Genes & Development*, Bd. 10, Nr. 22, pp. 2859-2869, 15 November 1996.
- [50] D. C. Huang, J. M. Adams und S. Cory, „The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-3 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4,“ *the EMBO journal*, Bd. 17, Nr. 4, pp. 1029-1039, 16 Februar 1998.
- [51] K. Nakano und K. H. Vousden, „PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53,“ *Molecular Cell*, Bd. 7, Nr. 3, pp. 683-694, 1 März 2001.
- [52] E. Oda, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi und N. Tanaka, „Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis,“ *Science*, Bd. 288, Nr. 5468, pp. 1053-1058, 12 Mai 2000.
- [53] J. Zha, H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman und S. J. Korsmeyer, „BH3 Domain of BAD Is Required for heterodimerization with Bcl-XL and Pro-Apoptotic Activity,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 272, Nr. 39, pp. 24101-24104, 26 September 1997.
- [54] L. O`Connor, A. Strasser, L. A. O`Reilly, G. Hausmann, M. Adams Jerry , S. Cory und D. C. Huang, „Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis,“ *The EMBO Journal*, Bd. 17, Nr. 2, pp. 384-395, 15 Januar 1998.
- [55] E. Gavathiotis, D. E. Reyna, M. L. Davis, G. Bird und L. D. Walensky, „BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX,“ *Molecular Cell*, Bd. 40, Nr. 3, pp. 481-492, 2010.
- [56] J. F. Lovell, L. P. Billen, S. Nindnder, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber und D. Andrews, „Membrane Binding by tBid Initiates an Ordered Series of Events Culminating in Membrane Permeabilization by Bax,“ *Cell*, Bd. 135, Nr. 6, pp. 1074-1084, 12 Dezember 2008.
- [57] D. Westphal, G. Dewson, M. Menard, P. Frederick, S. Iyer, R. Bartolo, L. Gibson, P. E. Czabotar, B. J. Smith, J. M. Adams und R. M. Kluck, „Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial

- outer membrane," *Proceedings of the national academy of sciences*, Bd. 111, Nr. 39, pp. E4076-85, 30 September 2014.
- [58] Z. Zhang, S. Subramaniam, J. Kale, C. liao, B. Huang, H. Brahmlatt, S. G. Gondon, S. M. Lapolla, F. A. Hays, J. Ding, F. He, X. C. Zhang, J. Li, A. Senes, D. W. Andrews und J. Lin, „BH3-in groove dimerization initiates and helix9 dimerization expands Bax pore assembly in membranes," *The EMBO journal*, Bd. 35, pp. 208-236, 23 Dezember 2015.
- [59] H. Zou, Y. Li, X. Liu und X. Wang, „An APAF-1 Cytochrome c Miltimeric Complex is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9," *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 274, Nr. 17, pp. 11549-11556, April 1999.
- [60] P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri und X. Wang, „Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade," *Cell*, Bd. 91, Nr. 4, pp. 479-489, 14 November 1997.
- [61] c. Du, M. Fang, Y. Li und X. Wang, „Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochromoe c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition," *Cell*, Bd. 102, Nr. 1, pp. 33-42, 2000.
- [62] I. N. Lavrik, A. Golks und P. H. Krammer, „Death receptor signaling," *Journal of Cell Science*, Bd. 118, Nr. 2, pp. 265-267, Januar 2005.
- [63] B. C. Trauth, C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Möller, W. Falk, K.-M. Debatin und H. K. Peter, „Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression by Induction of Apoptosis," *Science*, Bd. 245, Nr. 4915, pp. 301-305, 21 Juli 1989.
- [64] S. Yonehara, A. Ishii und M. Yonehara, „A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.," *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 169, Nr. 5, pp. 1747-1756, 01 Mai 1989.
- [65] L. E. French und J. Tschopp, „Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors," Bd. 10, Nr. 1, pp. 117-123, Januar 2003.
- [66] H. Wajant, „Death receptors," *Essays in Biochemistry*, Bd. 39, pp. 53-71, 01 Oktober 2003.
- [67] L. Clancy, K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M. J. Lenardo und F. K.-M. Chan, „Preiligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis," *Proceedings of the national academy of sciences*, Bd. 102, Nr. 50, pp. 18099-18104, 13 Dezember 2005.
- [68] M. Kriegler, C. Perez, K. DeFay, I. Albert und S. Lu, „A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF," *Cell*, Bd. 53, Nr. 1, pp. 45-53, 8 April 1988.

- [69] S. Neumann, T. Bidon, M. Branschädel, A. Krippner-Heidenreich, P. Scheurich und M. Doszczak, „The Transmembrane Domains of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptors 1 and 2 Co-Regulate Apoptotic Signaling Capacity,“ *PLOS One*, Bd. 7, Nr. 8, p. e42526, 3 August 2012.
- [70] S. Nagata, „Apoptosis by Death Factor,“ *Cell*, Bd. 88, Nr. 3, pp. 355-365, 07 Februar 1997.
- [71] A. Ashkenazi und V. M. Dixit, „Death Receptors: Signaling and Modulation,“ *Science*, Bd. 281, Nr. 5481, pp. 1305-1308, 28 August 1998.
- [72] H. H. Park, Y.-C. Lo, S.-C. Lin, L. Wang, J. K. Yang und H. Wu, „The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation,“ *Annual Review of Immunology*, Bd. 25, pp. 561-586, 15 Juli 2010.
- [73] A. Kohl und M. G. Grütter, „Fire and death: the pyrin domain joins the death-domain superfamily,“ *Comptes rendus biologiques*, Bd. 327, Nr. 12, pp. 1077-1086, Dezember 2004.
- [74] B. Huang, M. Eberstadt, E. .. Olejniczak, R. P. Meadows und S. W. Fesik, „NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain,“ *Nature*, Bd. 384, Nr. 6610, pp. 638-641, 26 Dezember 1996.
- [75] M. Eberstadt, B. Huang, Z. Chen, R. P. Meadows, S.-C. NG, L. Zheng, M. J. Lenardo und S. W. Fesik, „NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain,“ *Nature*, Bd. 392, Nr. 6679, pp. 941-945, 30 April 1998.
- [76] J. J. Chou, H. Matsuo, H. Duan und G. Wagner, „Solution Structure of the RAIDD CARD and Model for CARD/CARD Interaction in Caspase-2 and Caspase-9 Recruitment,“ *Cell*, Bd. 94, Nr. 2, pp. 171-180, 24 Juli 1998.
- [77] S. Hiller, A. Kohl, F. Firitto, T. Herrmann, G. Wider, G. G. rkus und K. Wüthrich, „NMR Structure pf the Apoptosis- and Inflammation-Related NALP1 Pyrin Domain,“ *Structure*, Bd. 11, Nr. 10, pp. 1199-1205, Oktober 2003.
- [78] A. Chinnaiyan , K. O`Rourke, M. Tewari und V. M. Dixit, „FADD, novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis,“ *Cell*, Bd. 81, Nr. 4, pp. 505-512, 19 Mai 1995.
- [79] C. H. Weber und C. Vincenz, „The death domain superfamily: a tale of two interfaces,“ *Trends in Biochemical Sciences*, Bd. 26, Nr. 8, pp. 475-481, 1 August 2001.
- [80] C.-Y. F. Huang, Y.-M. Wu, C.-Y. Hsu, W.-S. Lee, M.-D. Lai, T.-J. Lu, C.-L. Huang, T.-H. Leu, H.-M. Shih, H.-I. Fang, D. R. Robinson, H.-J. kung und C.-J. Yuan, „Caspase Activation of Mammalian Sterile 20-like Kinase 3(Mst3): NUCLEAR TRANSLOCATION AND INDUCTION OF APOPTOSIS,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 277, Nr. 37, pp. 34367-34374, 13 September 2002.

- [81] L. R. Thomas, A. Henson, J. C. Reed, F. R. Salsbury und A. Thorburn, „Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 279, Nr. 31, pp. 32780-32785, 01 Juni 2004.
- [82] J.-L. Bodmer, N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneide, P. Juo, J. Blenis und J. Tschopp, „TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8,“ *Nature Cell Biology*, Bd. 2, pp. 241-243, 13 März 2000.
- [83] J. R. Muppidi, A. Lobito, M. Ramaswamy, J. Yang, L. Wang, H. Wu und R. Siegel, „Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis,“ *Cell Death and Differentiation*, Bd. 13, Nr. 10, pp. 1641-1650, 20 Januar 2006.
- [84] F. L. Scott, B. Stec, C. Pop, M. K. Dobraczewska, J. E. J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G. S. Salvesen, R. Schwarzenbacher und S. J. Riedl, „The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering,“ *Nature*, Bd. 457, Nr. 7232, pp. 1019-1022, 19 Februar 2009.
- [85] F. C. Kischkel, D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim und A. Ashkenazi, „Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5,“ *Immunity*, Bd. 12, Nr. 6, pp. 611-620, 1 Juni 2000.
- [86] M. E. Peter, R. C. Budd, J. Desbarats, S. M. Hedrick, A.-O. Hueber, M. K. Newell, L. B. Owen, R. M. Pope, J. Tschopp, H. Wajant, D. Wallach, R. H. Wiltrout, M. Zörnig und D. H. Lynch, „The CD95 receptor: Apoptosis Revisited,“ *Cell*, Bd. 129, Nr. 4, pp. 447-450, 2007.
- [87] K. Schleich, U. Warnken, N. Fricker, S. Öztürk, P. Richter, K. Kammerer, M. Schnölzer, P. H. Krammer und I. N. Lavrik, „Stoichiometry of the CD95 Death-Inducing Signaling Complex: Experimental and Modeling Evidence for a Death Effector Domain Chain Model,“ *Molecular Cell*, Bd. 47, Nr. 2, pp. 306-319, 27 Juli 2012.
- [88] L. S. Dickens, R. S. Boyd, R. Jukes-Jones, M. A. Hughes, G. L. Robinson, L. Fairall, J. W. Schwabe, K. Cain und M. MacFarlane, „A Death effector Domain Chain DISC Model reveals a Crucial Role for caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death,“ *Molecular Cell*, Bd. 47, Nr. 2, pp. 291-305, 27 Juli 2012.
- [89] M. A. Hughes, I. R. Powley, R. Jukes-Jones, S. Horn, M. Feokistova, L. Fairall, J. W. Schwabe, M. Leverkus, K. Cain und M. MacFarlane, „Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate,“ *Molecular Cell*, Bd. 61, Nr. 6, pp. 834-849, 17 März 2016.
- [90] A. Strasser, L. O'Connor und V. M. Dixit, „Apoptosis Signaling,“ *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 69, pp. 217-245, Juli 2000.

- [91] T. W. Day, S. Huang und A. R. Safa, „c-FLIP knockdown induces ligand-independent DR5-, FADD-, caspase-8, and caspase-9- dependent apoptosis in breast cancer cells,“ *Biochemical Pharmacology*, Bd. 76, Nr. 12, pp. 1694-1704, 2008.
- [92] C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, L.-M. Debatin, P. H. Krammer und M. E. Peter, „Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways,“ *The EMBO Journal*, Bd. 17, pp. 1675-1687, 16 März 1998.
- [93] A. Strasser, P. Jost und S. Nagata, „The many roles of FAS receptor signaling in the immune system,“ Bd. 30, Nr. 2, pp. 180-192, 20 Februar Immunity.
- [94] B. B. Aldridge, S. Gaudet, D. A. Lauffenburger und P. K. Sorger, „Lyapunov exponents and phase diagrams reveal multi-factorial control over TRAIL-induced apoptosis,“ *Molecular systems biology*, Bd. 7, p. 553, 22 November 2011.
- [95] I. S. Goping, A. Gross, J. N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S. J. Korsmeyer und G. C. Shore, „Regulated Targeting of BAX to Mitochondria,“ *Journal of Cell Biology*, Bd. 143, Nr. 1, pp. 207-215, 05 Oktober 1998.
- [96] A. Gross, J. Jockel, M. C. Wei und S. J. Korsmeyer, „Enforced dimerization of BA results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis,“ *The EMBO Journal*, Bd. 17, Nr. 14, pp. 3878-3885, 15 Juli 1998.
- [97] I. N. Lavrik, A. Golks und P. H. Krammer, „Caspases: pharmalogical manipulation of cell death,“ *The Journal of clinical Investigation*, Bd. 115, Nr. 10, pp. 2665-2672, Oktober 2005.
- [98] N. A. Thornberry und Y. Lazebnik, „Caspases: Enemies Within,“ *Science*, Bd. 281, Nr. 5381, pp. 1312-1316, 28 August 1998.
- [99] N. Walker, R. Talanian, K. Brady, L. Dang, N. Bump, C. Ferenza, S. Franklin, T. Ghayur, M. Hackett, L. Hammill, L. Herzog, M. Hugunin, W. Houy, J. Mankovich, L. McGuinness, E. Orlewicz, M. Paskind, C. Pratt, P. Reis, A. Summani, M. Terranova, J. Welch, L. Xiong, A. Möller, D. Tracey, R. Kamen und W. Wong, „Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1beta-converting enzyme: A (p20/p10)₂ homodimer,“ *Cell*, Bd. 78, Nr. 2, pp. 343-352, 29 Juli 1994.
- [100] I. Lavrik, I. Krueger, I. Schmitz, S. Baumann, H. Weyd, P. Krammer und S. Kirchhoff, „The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC,“ *Cell Death and Differentiation*, Bd. 10, pp. 144-145, 25 März 2003.
- [101] J. Shi, Y. Zhao, K. Wang, X. Shi, Y. Wang, H. huang, Y. Zuhang, T. Cai, F. Wang und F. Shao, „Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death,“ *Nature*, Bd. 526, Nr. 7575, pp. 660-665, 29 Oktober 2015.
- [102] F. Martinon, K. Burns und J. Tschopp, „The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspase and Processing of ProIL-beta,“ *Molecular Cell*, Bd. 10, Nr. 2, pp. 417-426, August 2002.

- [103] F. Martinon, K. Hofmann und J. Tschopp, „The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation,“ *Current Biology*, Bd. 11, Nr. 4, pp. 118-120, 20 Februar 2001.
- [104] K. M. Boatright, M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J.-E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green und G. S. Salvesen, „A unified Model for Apical Caspase Activation,“ *Molecular Cell*, Bd. 11, Nr. 2, pp. 529-541, Februar 2003.
- [105] J. Chai, Q. Wu, E. Shiozaki, S. M. Srinivasa, E. S. Alnemri und Y. Shi, „Crystal Structure of a Procaspase-7 Zymogen: Mechanisms of Activation and Substrate Binding,“ *Cell*, Bd. 107, Nr. 3, pp. 299-407, 2 November 2001.
- [106] S. J. Riedl, P. Fuentes-Prior, M. Renatus, N. Kairies, S. Krapp, R. Huber, G. S. Salvesen und W. Bode, „Structural basis for the activation of human procaspase-7,“ *Biochemistry*, Bd. 98, Nr. 26, pp. 14790-14795, 18 Dezember 2001.
- [107] A. Tinel und J. Tschopp, „The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress,“ *Science*, Bd. 304, Nr. 5672, pp. 843-846, 7 Mai 2004.
- [108] G. Yin, S. M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri und E. S. Alnemri, „Caspase-2 Induces Apoptosis by Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 277, Nr. 16, pp. 13430-13437, 19 April 2002.
- [109] H. Hirata, A. Takahashi, S. Kobayashi, S. Yonehara, H. Sawai, T. Okazaki, K. Yamamoto und M. Sasada, „Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced Apoptosis,“ *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 187, Nr. 4, pp. 587-600, 16 Februar 1998.
- [110] S. Ruchaud, N. Korfali, P. Villa, T. J. Kottke, C. Dingwall, S. H. Kaufmann und W. C. Earnshaw, „Caspase-6 gene disruption reveals a requirement of lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation,“ *The EMBO Journal*, Bd. 21, pp. 1967-1977, 15 April 2002.
- [111] H.-H. Lin, H.-L. Hsu und N.-H. Yeh, „Apoptotic cleavage of NuMa at the C-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification,“ *Journal of biomedical science*, Bd. 14, Nr. 5, pp. 681-694, September 2007.
- [112] C. Scaffidi, J. P. Medema, P. H. Kramer und M. E. Peter, „FLICE Is a Predominantly Expressed as Two Functionally Active Isoforms, Caspase-8/a and Caspase-8/b,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 272, Nr. 24, pp. 26953-26958, 24 Oktober 1997.
- [113] J. Grenet, T. Teitz, T. Wei, V. Valentine und V. J. Kidd, „Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene,“ *Gene*, Bd. 226, Nr. 2, pp. 225-232, 21 Januar 1999.

- [114] M. P. Boldin, T. M. Goncharov, Y. V. Goltseve und D. Wallach, „Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death,“ *Cell*, Bd. 85, Nr. 6, pp. 803-815, 14 Juni 1996.
- [115] T. Fernandez-Alnemri, R. Armstrong, J. Krebs, S. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L. Fritz, J. Trapani, K. Tomaselli, G. Litwack und E. Alnemri, „In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 93, Nr. 15, pp. 7464-7469, 23 Juli 1996.
- [116] D. G. Breckenridge, M. Nguyen, S. Kuppig, M. Reth und G. C. Shore, „The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the AP31 complex at the endoplasmic reticulum,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 99, Nr. 7, pp. 4331-4336, 2 April 2002.
- [117] M. Musio, A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, F. C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter und V. M. Dixit, „FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) Death-Inducing Signaling Complex,“ *Cell*, Bd. 85, Nr. 6, pp. 817-827, 14 Juni 1996.
- [118] C. Scaffidi, J. P. Medema, P. H. Krammer und M. E. Peter, „FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, Caspase-8/a and Caspase-8/b,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 272, Nr. 43, pp. 26953-26958, 1997.
- [119] J. C. Hoffmann, A. Pappa, P. H. Krammer und I. N. Lavrik, „A New C-Terminal Cleavage Product of Procaspase-8, p30 Defines an Alternative Pathway of Procaspase-8 Activation,“ *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 29, Nr. 16, pp. 4431-4440, August 2009.
- [120] T.-M. Fu, Y. Li, A. Lu, Z. Li, P. R. Vajjhala, A. C. Cruz, D. B. Srivastava, F. DiMaio, P. A. Penczek, R. M. Siegel, K. J. Stacey, E. H. Egelmann und H. Wu, „Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex,“ *Molecular Cell*, Bd. 64, Nr. 2, pp. 236-250, 20 Oktober 2016.
- [121] M. A. Hughes, N. Harper, M. Butterworth, K. Cain, G. M. Cohen und M. MacFarlane, „Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival,“ *Molecular Cell*, Bd. 35, Nr. 3, pp. 265-279, 14 August 2009.
- [122] J. W. Yu, P. D. Jeffrey und Y. Shi, „Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL,“ *Biochemistry*, Bd. 106, Nr. 20, pp. 8169-8174, 19 Mai 2009.
- [123] J. P. Medema, C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer und M. E. Peter, „FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC),“ *The EMBO Journal*, Bd. 16, pp. 2794-2804, 1997.

- [124] M. R. Sprick, E. Rieser, h. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand und H. Walczak, „Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8 in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8“, *The EMBO Journal*, Bd. 21, Nr. 17, pp. 4520-4530, 02 September 2002.
- [125] M. Kaufmann, D. Bozic, C. Briand, J.-L. Bodmer, O. Zerbe, A. Kohl, J. Tschopp und M. G. Grütter, „Identification of basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling“, *FEBS letters*, Bd. 527, Nr. 1, pp. 250-254, 28 August 2002.
- [126] L. K. Hillert, N. V. Ivanisenko, J. Espe, C. König, V. A. Ivanisenko, T. Kähne und I. N. Lavrik, „Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly“, *Oncogene*, Bd. 39, Nr. 8, pp. 1756-1772, 18 November 2019.
- [127] J. L. Fox, M. A. Hughes, X. Meng, M. A. Sarnowska, I. R. Powley, R. Jukes-Jones, D. Dinsdale, T. J. Ragan, L. Fairall, J. W. Schwabe, N. Morone, K. Cain und M. MacFarlane, „Cryo-EM structural analysis of FADD:Caspase-8 complexes defines the catalytic dimer architecture for co-ordinated control of cell fate“, *nature communications*, Bd. 12, Nr. 1, 05 Februar 2021.
- [128] S. Öztürk, K. Schleich und I. N. Lavrik, „Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions“, *Experimental cell research*, Bd. 318, Nr. 11, pp. 1324-1331, 1 Juli 2012.
- [129] K. Schleich, J. Buchbinder, S. Pietkiewicz, T. Kähne, U. Warnken, S. Öztürk, M. Schnölzer, M. Naumann, P. Krammer und I. Lavrik, „Molecular architecture of the DED chains at the DISC: Regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 domain“, *Cell death and Differentiation*, Bd. 23, Nr. 4, April 2016.
- [130] J. L. Fox, M. A. Hughes, X. Meng, N. A. Sarnowska, I. R. Powley, R. Jukes-Jones, D. Dinsdale, T. J. Ragan, L. Fairall, J. W. R. Schwabe, N. Morone, K. Cain und M. MacFarlane, „Cryo-EM structural analysis of FADD:Caspase-8 complexes defines the catalytic dimer architecture for co-ordinated control of cell fate“, *Nature Communications*, Bd. 12, Nr. 819, 05 Februar 2021.
- [131] D. W. Chang, Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimnich, B. C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M. E. Peter und X. Yang, „c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis“, *The EMBO Journal*, Bd. 21, pp. 3704-3714, 15 Juli 2002.
- [132] N. Fricker, J. Beaudouin, P. Richter, R. Eils, P. H. Krammer und I. N. Lavrik, „Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL“, *Journal of Cell Biology*, Bd. 190, Nr. 3, pp. 377-389, 09 August 2010.
- [133] I. Müller, E. Strozyk, S. Schindler, S. Beisert, H. Z. Oo, T. Sauter, P. Lucarelli, S. Raeth, A. Hausser, N. Al Nakouzi, L. Fazli, M. E. Gleave, H. Liu, H.-U. Simon, H.

- Walczak, D. R. Green, J. Bartek, M. Daugaard und D. Kulms, „Cancer Cells Employ Nuclear Caspase-8 to Overcome the p52-Dependent G2/M Checkpoint through Cleavage of USP28,“ *Molecular Cell*, Bd. 77, Nr. 5, pp. 970-984, 5 März 2020.
- [134] R. Mandal, M. Raab, F. Rödel, A. Krämer, I. Kostova, S. Pena-Llopis, G. Medici, B. Häupl, T. Oellerich, K. Gasimli, M. Sanhaji, S. Becker und K. Strebhardt, „The non-apoptotic function of caspase-8 in negatively regulating the CDK9-mediated Ser2 phosphorylation of RNA polymerase II in cervical cancer,“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, Bd. 79, Nr. 597, 18 November 2022.
- [135] L. Besnault-mascard, C. Leprince, M. T. Auffredou, B. Meunier, M. F. Bourgeade, J. Camonis, H. K. Lorenzo und A. Vazquez, „Caspase-8 sumoylation is associated with nuclear localization,“ *Oncogene*, Bd. 24, p. 3268, 14 März 2005.
- [136] C. M. Henry und S. J. Martin, „Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory "FADDosome" Complex upon TRAIL Stimulation,“ *Molecular Cell*, Bd. 65, Nr. 4, pp. 715-729.e5, 16 Februar 2017.
- [137] D.-W. Zhang, J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B.-J. Lu, S.-C. Lin, M.-Q. Dong und J. Han, „RIP3, an Energy Metabolism Regulator Tat Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis,“ *Science*, Bd. 325, Nr. 5938, pp. 332-336, 4 Juni 2009.
- [138] S. He, L. Wang, L. Miao, t. Wang, F. Du, L. Zhao und X. Wang, „Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF-alpha,“ *Cell*, Bd. 137, Nr. 6, pp. 1100-1111, 12 Juni 2009.
- [139] Y. Dondelinger, W. Declerq, S. Montessuit, R. Roelandt, A. Goncalves, I. Bruggeman, P. Hulpiau, K. Weber, C. A. Sehon, R. W. Marquis, J. Bertin, P. J. Gough, S. Savvides, J.-C. Martinou, M. J. Bertrand und P. Vandenabeele, „MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates,“ *Cell Reports*, Bd. 7, Nr. 4, pp. 971-981, 22 Mai 2014.
- [140] B. Xia, S. Fang, X. Chen, H. Hu, P. Chen, H. Wang und Z. Gao, „MLKL forms cation channels,“ *Cell Research*, Bd. 26, Nr. 5, pp. 517-528, Mai 2016..
- [141] A. Oberst, C. P. Dillon, R. Weinlich, L. L. McCormick, P. Fitzgerald, C. pop, R. Hakem, G. S. Salvesen und D. R. Green, „Catalytic activity of the caspase-8-FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis,“ *nature*, Bd. 471, Nr. 7338, pp. 363-367, 02 März 2011.
- [142] W. J. Kaiser, J. W. Upton, A. B. Long, D. Livngston-Rosanoff, L. P. Daley-Bauer, R. Hakem, T. Caspary und E. S. Mocarski, „RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice,“ *nature*, pp. 368-372, 04 November 2010.
- [143] D. Hersh, D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow und A. Zychlinsky, „The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1,“ *Biological Sciences*, Bd. 96, Nr. 5, pp. 2396-2401, 02 März 1999.

- [144] D. M. Monack, D. Hersh, N. Ghori, D. Bouley, A. Zychlinsky und S. Falkow, „Salmonella Exploits Caspase-1 to Colonize Peyer`s Patches in a Murine Typhoid Model,“ *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 192, Nr. 2, pp. 249-258, 17 Juli 2000.
- [145] M. Lamkanfi, T.-D. Kanneganti, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, I. Vanoverberghe, J. Vandekerckhove, P. Vandenabeele, K. Gevaert und G. Nunez, „Targeted Peptidecentric Proteomics Reveals Caspase-7 as a Substrate of the Caspase-1 Inflammasomes,“ *Molecular and cellular Proteomics*, Bd. 7, Nr. 12, pp. 2350-2363, Dezember 2008.
- [146] J. Shi, Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu und F. Shao, „Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS,“ *nature*, Bd. 514, Nr. 7521, pp. 187-192, 06 August 2014
- [147] X. Liu, Z. Zhang, J. Ruan, Y. Pan, V. G. Magupalli, H. Wu und J. Liebermann, „Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores,“ *nature*, Bd. 535, pp. 153-158, 2016.
- [148] J. Ding, K. Wang, W. Liu, Y. She, Q. Sun, J. Shi, H. Sun, D.-C. Wang und F. Shao, „Pore-forming activity and structural autoinhibition of gasdemin family,“ *nature*, Bd. 535, Nr. 7610, pp. 153-158, 07 Juli 2016.
- [149] P. Orning, D. Weng, K. Starheim, D. Ratner, Z. Best, B. Lee, A. Brooks, S. Xia, H. Wu, M. Kelliher, S. B. Berger, P. J. Gough, M. M. Proulx, N. Kayagaki, K. A. Fitzgerald und E. Lien, „Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death,“ *Science*, Bd. 362, Nr. 6418, pp. 1064-1069, 25 Oktober 2018.
- [150] J. Sarhan, B. C. Liu, H. I. Muendlein, P. Li, R. Nilson, A. Y. Tang, A. Rongvaux, S. C. Bunnell, F. Shao, D. R. Green und A. Poltorak, „Caspase-8 induces cleavage of gasdemin D to elicit pyroptosis during Yersinia infection,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 115, Nr. 115, pp. E10888-E10897, 13 November 2018.
- [151] R. Schwarzer, L. Laurien und M. Pasparakis, „New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8,“ *Current opinion in cell biology*, Bd. 63, pp. 186-193, 2020.
- [152] M. Fritsch, S. D. Günther, R. Schwarzer, M.-C. Albert, F. Schorn, J. P. Werthenbach, L. M. Schiffmann, N. Stair, H. Aktien, J. M. Seeger, M. Lamkanfi, M. Krönke, M. Pasparakis und H. Kashkar, „Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis,“ *Nature*, Bd. 575, Nr. 7784, pp. 683-687, November 2019.
- [153] D. Tomar, P. Prajapati, L. Sripada, K. Singh, R. Singh, A. K. Singh und R. Singh, „TRIM13 regulates caspase-8 ubiquitination, translocation to autophagosomes and activation during ER stress induced cell death,“ *biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, Bd. 1833, Nr. 12, pp. 3134-3144, Dezember 2013.

- [154] A. D. Gitlin, K. Heger, A. F. Schubert, R. Reja, D. Yan, V. C. Pham, E. Suto, J. Zhang, Y. C. Kwon, E. C. Freund, J. Kang, A. Pham, R. Caothien, N. Bacarro, T. Hinkle, M. Xu, b. S. McKenzie, B. Haley, W. P. Lee, J. R. Lill, M. Roose-Girma, M. Dohse, J. D. Webster, K. Newton und V. M. Dixit, „Integration of innate immune signalling by caspase-8 cleavage N4BP1,“ *nature*, Bd. 587, Nr. 7833, pp. 275-280, November 2020.
- [155] R. Allam, K. E. Lawlor, E. Chi-Wang, A. L. Mildenhall, D. M. Moujalled, R. S. Lewis, F. Ke, K. D. Mason, M. J. White, K. J. Stacey, A. Strasser, L. A. O'Reilly, W. Alexander, B. T. Kile, D. L. Vaux und J. E. Vince, „Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming,“ *EMBO Reports*, Bd. 15, pp. 982-990, 2 Juli 2014.
- [156] A. Halle, V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore und D. T. Golenbock, „The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta,“ *Nature Immunology*, Bd. 9, Nr. 8, pp. 857-865, 11 Juli 2008.
- [157] H. J. Chun, L. Zheng, M. Ahmad, J. Wang, C. K. Speirs, R. M. Siegel, J. K. Dale, J. Puck, J. Davis, C. G. Hall, S. Skoda-Smith, T. P. Atkinson, S. E. Straus und M. J. Lenardo, „Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency,“ *nature*, Bd. 419, pp. 395-399, 26 September 2002.
- [158] J. K. Niemela, S. ye, C. Kelly, M. Zhang, J. Davies, J. Melendez, J. Dreiling, D. Kleiner, K. Calvo, J. B. Oliveira und S. D. Rosenzweig, „Caspase-8 Deficiency Presenting as Late-Onset Multi-Organ Lymphocytiv Infiltration with Granulomas,“ *Journal of Clinical Immunology*, Bd. 35, Nr. 4, pp. 348-355, Mai 2015.
- [159] V. Kanderova, H. Grombirikova, I. Zentsova, K. Reblova, A. Klocperk, M. Fejtкова, M. Bloomfield, B. Ravcukova, T. Kalina, T. Freiberger und A. Sediva, „Lymphoproliferation, immunodeficiency and early-onset inflammatory bowel disease associated with a novel mutation in Caspase-8,“ *haematologica*, Bd. 104, Nr. 1, pp. e32-e34, 2019.
- [160] N. Stransky, A. M. Egloff, A. D. Tward, A. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G. Kryukov, M. S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A. H. Ramos, P. Stojanov, S. L. Carter, D. Voet, M. L. Cortes, D. Auclair, M. F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R. C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J. L. Weissfeld, R. R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareno, J. C. Fernandes-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, M. Matthew, E. S. Lander, G. Getz, T. R. Golub, L. A. Garraway und J. R. Grandis, „The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous,“ *Science*, Bd. 333, Nr. 6046, pp. 1157-1169, 28 Juli 2011.
- [161] Z. Cui, H. Dabas, b. C. Leonard, J. V. Shiah, J. R. Grandis und F. E. Johnson, „Caspase-8 mutations associated with head and neck cancer differentially retain functional properties related to TRAIL-induced apoptosis and cytokine induction,“ *Cell death and Disease*, Bd. 12, Nr. 8, p. 775, 06 August 2012..

- [162] A. Zehir, R. Benyard, R. H. Shah, A. Syed, S. Middha, J. Kim, P. Srinivasan, J. Gao, D. Chakravarty, S. M. Devlin, M. D. Hellman, D. A. Barron, A. M. Schram, M. Hameed, S. Dogan, D. S. Ross, J. F. Hechtman, D. F. DeLair, J. Yao, D. L. Mandelker, D. T. Cheng, R. Chandramohan, A. S. Mohanty, A. N. Ptashkin, G. Jayakumar, M. Prasad, M. H. Syed, A. B. Rema, Z. Y. Liu, K. Nafa, L. Borsu, J. Sadowska, J. Casanova, R. Bacares, I. J. Kiecka, A. Razumova, J. B. Son, L. Stewart, T. Baldi, K. A. Mullaney, H. Al-Ahmadie, E. Vakiani, A. A. Abeshouse, A. V. Penson, P. Jonsson, N. Camacho, M. T. Chang, S. Philips, H. Zhang, J. Wang, A. Ochoa, J. Wills, M. Eubank, S. B. Thomas, S. M. Gardos, D. N. Reales, J. Galle, R. Duran, R. Cambria, W. Anida, A. Cercek, D. R. Feldmann, M. M. Gounder, A. Hakimi, J. J. Harding, G. Iyer, Y. Y. Jangjigian, E. J. Jordan, C. M. Kelly, M. A. Lowery, L. G. Morris, A. M. Omuro, N. Raj, P. Razavi, A. N. Shoushtari, N. Shukla, T. E. Soumerai, A. M. Varghese, R. Yaeger, J. Coleman, B. Bochner, G. J. Riely, L. B. Saltz, H. I. Scher, P. J. Sabbatini, M. E. Robson, D. S. Limstra, B. S. Taylor, J. Baselga, N. Schultz, D. M. Hyman, M. E. Arcila, D. B. Solit, M. Ladanyi und M. F. Berger, „Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients,“ *Nature medicine*, Bd. 23, Nr. 6, pp. 703-713, Juni 2017.
- [163] S. Perdomo, D. Ananthrama, M. Foll, B. Abedi-Ardekani, G. Durand, L. A. Reis Rosa, R. Holmila, F. le Calcvez-Kelm, E. H. Tajara, V. Wünsch-Filho, J. E. Levi, M. Vilensk, J. Polesel, L. Holcatova, C. Canova, P. Lagiou, J. D. McKay und P. Brennan, „Genomic analysis of head and neck cancer cases from two high incidence regions,“ *PLOS ONE*, Bd. 13, Nr. 1, p. e0191701., 29 Januar 2018.
- [164] National Institutes of Health, „uniprot.org,“ National Institutes of Health, Switzerland, 14 Oktober 2022. [Online]. Available: https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q14790/entry#disease_variants. [Zugriff am 15 Januar 2024].
- [165] Sanger Institut, „Cosmic,“ Sanger Institut, [Online]. Available: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=CASP8#references>. [Zugriff am 15 Januar 2024].
- [166] M. Shitashige, M. Toi, T. Yano, M. Shibata, Y. Matsuo und F. Shibasaki, „Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax Heterodimer Triggered by Phosphorylation of Serine 70 of Bcl-2,“ *The Journal of Biochemistry*, Bd. 130, Nr. 6, pp. 741-748, Dezember 2001.
- [167] J. Seo, E.-W. Lee, J. Shin, D. Seong, Y. W. Nam, M. Jeong, S.-H. Lee, C. Lee und J. Song, „K6 linked polyubiquitynilation of FADD by CHIP prevents death inducing signaling complex formation suppressing cell death,“ *Oncogene*, Bd. 37, Nr. 36, pp. 4994-5006, 23 Mai 2018.
- [168] G. Han, M. Ye, H. Liu, C. Song, D. Sun, Y. Wu, X. Jiang, R. Chen, C. Wang, L. Wang und H. Zou, „Phosphoproteome analysis of human liver tissue by long-gradient nanoflow LC coupled with multiple stage MS analysis,“ *Electrophoresis*, Bd. 31, Nr. 6, pp. 1080-1089, März 2010.

- [169] J. Marin-Rubio, E. Perez-Gomez, Fernandez-Piqueras und M. Villa-Morales, „S194-P-FADD as a marker of aggressiveness and poor prognosis in human T-cell lymphoblastic lymphoma,“ *Carcinogenesis*, Bd. 40, Nr. 10, pp. 1260-1268, Oktober 2019.
- [170] V. Vilmont, O. Filhol, A.-M. Hesser, Y. Coute, C. Hue, L. Remy-Tourneur, S. Mistou, C. Cochet und G. Chiocchia, „Modulatory role of the anti-apoptotic kinase CD2 in sub-cellular localization of Fas associated death domain protein (FADD),“ *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research*, Bd. 1853, Nr. 11, pp. 2885-2896, November 2015.
- [171] M.-S. Jang, S.-J. Lee, N. S. Kang und E. Kim, „Cooperative Phosphorylation of FADD by Aur-a and Plk1 in Response to taxol Triggers Both Apoptotic and Necrotic Cell Death,“ *Therapeutics, Targets and Chemical Biology*, Bd. 71, Nr. 23, pp. 7207-7215, 1 Dezember 2011.
- [172] E. C. Alappat, C. Feig, b. Boyerinas, J. Volkland, M. Samuels, A. E. Murmann, A. Thorburn, V. J. Kidd, C. A. Slaughter, S. L. Osborn, A. Winoto, W.-J. Tang und M. E. Peter, „Phosphorylation of FADD at Serine 194 by CK1 α regulates Its Nonapoptotic Activities,“ *Molecular Cell*, Bd. 19, Nr. 3, pp. 321-332, 5 August 2005.
- [173] S.-G. Choi, H. Kim, E. I. Jeong, H.-J. Lee, S. Park, S.-Y. Lee, H.-J. Lee, S. W. Lee, C. H. Chung und Y.-K. Jung, „SUMO-Modified FADD Recruits Cytosolic Drp1 and Caspase-10 to Mitochondria for Regulated Necrosis,“ *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 37, Nr. 2, 4 Januar 2017.
- [174] A. Kaunisto, V. Kochin, T. Asaoka, A. Mikhailov, M. Poukkula, A. Meinander und J. E. Eriksson, „PKC-mediated phosphorylation regulates c-FLIP ubiquitinylation and stability,“ *Cell Death and Differentiation*, Bd. 16, Nr. 9, pp. 1215-1226, 03 April 2009.
- [175] M. Poukkula, A. Kaunisto, V. Hietakangas, K. Denessiouk, T. Katajamäki, M. S. Johnson, L. Sistonen und J. E. Eriksson, „Rapid Turnover of c-FLIPshort Is Determined by Its Unique C-terminal Tail,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 280, Nr. 29, pp. 27345-27355, Juli 2005.
- [176] K. Seyrek, N. W. Iwanisenko, M. Richter, L. K. Hillert, C. König und I. N. Lavrik, „Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins,“ *Trends in Cell Biology*, Bd. 30, Nr. 5, pp. 354-369, 01 Mai 2020.
- [177] Y. Matthes, M. Raab, M. Sanhaji, I. N. Lavrik und K. Strebhardt, „Cdk1/Cyclin B1 Controls Fas-Mediated Apoptosis by Regulating Caspase-8 Activity,“ *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 30, Nr. 5, pp. 354-369, 01 Mai 2020.
- [178] L. A. Allan und P. R. Clarke, „Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis,“ *Molecular Cell*, Bd. 26, Nr. 2, pp. 301-310, 27 April 2007.

- [179] L. K. Nutt, S. S. Margolis, M. Jensen, C. E. Herman, W. G. Dunphy, J. C. Rathmell und S. Kornbluth, „Metabolic Regulation of Oocyte Cell Death through the CaMKII-Mediated Phosphorylation of Caspase-2,“ *Cell*, Bd. 123, Nr. 1, pp. 89-103, 07 Oktober 2005.
- [180] I. Powley, M. Hughes, K. Cain und M. MacFarlane, „Caspase-8 tyrosine-380 phosphorylation inhibits CD95 DISC function by preventing procaspase-8 maturation and cycling within the complex,“ *Oncogene*, Bd. 35, pp. 5629-5640, 2016.
- [181] S. Barbero, D. Barila, A. Mielgo, V. Stagni, C. Kiran und D. Stupack, „Identification of a Critical Tyrosine Residue in Caspase-8 That Promotes Cell Migration,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 283, Nr. 19, pp. 13031-13034, 9 Mai 2008.
- [182] J. Senft, B. Helfer und S. M. Frisch, „Caspase-8 Interacts with the p85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase to Regulate Cell Adhesion and Motility,“ *Cancer Research*, Bd. 67, Nr. 24, pp. 11505-11509, 15 Dezember 2007.
- [183] S. Cursi, A. Rufini, V. Stagni, I. Condo, V. Matafora, A. Bachi, A. P. Bonifazi, L. Coppola, G. Superti-Furga, R. Testi und D. Barila, „Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression,“ *The EMBO Journal*, Bd. 25, Nr. 9, pp. 1895-1905, 20 April 2006.
- [184] S. H. Jia, J. Parodo, A. Kapus, O. D. Rotstein und J. C. Marshall, „Dynamic Regulation of Neutrophil Survival through Tyrosine Phosphorylation or Dephosphorylation of Caspase-8,“ *Mechanisms of Signal Transduction*, Bd. 283, Nr. 9, pp. 5402-5413, Februar 2008.
- [185] M. Alvarado-Kristensson, F. Melander, K. Leandersson, L. Rönstrand, C. Wernstedt und T. Andersson, „p38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils,“ *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 199, Nr. 4, pp. 449-458, 17 Februar 2004.
- [186] C. Peng, Y.-Y. Cho, F. Zhu, J. Zhang, W. Wen, X. Yanming, K. Yao, W.-Y. Ma, A. M. Bode und Z. Dong, „Phosphorylation of Caspase-8(Thr-263) by Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) mediates Caspase-8 Ubiquitination and Stability,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 286, Nr. 9, p. 6946, 4 März 2011.
- [187] Z. Jin, Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V. C. Pham, J. R. Lill und A. Ashkenazi, „Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling,“ *Cell*, Bd. 137, Nr. 4, pp. 721-735, 15 Mai 2009.
- [188] Y. Li, Y. Kong, H. Chen, Z. Wang, Y.-C. Hsieh, D. Zhao, X. Zhi, J. Huang, J. Zhang, H. Li und C. Chen, „The HECTD3 E3 ubiquitin ligase facilitates cancer cell survival by promoting K63-linked polyubiquitination of caspase-8,“ *Cell Death and Disease*, Bd. 4, Nr. 11, p. e935, 28 November 2013
- [189] Y.-M. Kim, T.-H. Kim, H.-T. Chung, R. V. Talanian, X.-M. Yin und T. R. Billiar, „Nitric oxide prevents tumor necrosis factor α -induced rat hepatocyte apoptosis by the

- interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8," *Hepatology*, Bd. 32, Nr. 4, pp. 770-778, 30 Dezember 2003.
- [190] H. Li, C.-j. Xu und J. Yuan, „Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis," *Cell*, Bd. 94, Nr. 4, pp. P491-501, 21 August 1998.
- [191] K. Newton, K. E. Wickliffe, D. L. Dugger, A. Maltzmann, M. Roose-Girma, M. Dohse, L. Komuves, J. D. Webster und V. M. Dixit, „Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis," *Nature*, Bd. 574, Nr. 7778, pp. 428-431, 11 September 2019
- [192] A. Benchoua, C. Couriaud, C. Guegan, L. Tartier, P. Couvert, G. Friocourt, J. Chelly, J. Menissier-de Murcia und B. Onteniente, „Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivated poly(ADP-ribose) polymerase-2," *The Journal of biological chemistry*, Bd. 277, Nr. 37, pp. 34217-34222, 13 September 2002.
- [193] U. K. Soni, S. B. Chadchan, A. Joshi, V. Kumar, V. K. Maurya, R. K. Verma und R. K. Jha, „Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is essential for endometrial receptivity and blastocyst implantation, and regulated by caspase-8," *Molecular and cellular endocrinology*, Bd. 518, 01 Dezember 2020.
- [194] W. K. Paik und S. Kim, „Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 29, Nr. 11, pp. 14-20, 11 Oktober 1967.
- [195] J. Najbauer, B. A. Johnson, A. Young und D. Asward, „Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins," *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 268, Nr. 14, pp. 10501-10509, 15 Mai 1993.
- [196] A. Favia, L. Salvatori, S. Nanni, L. K. Iwamoto-Stohl, S. Valente, A. Mai, F. Scagnoli, R. A. Fontanella, P. Totta, S. Nasi und B. Illi, „The Protein Arginine Methyltransferases 1 and 5 affect Myc properties in glioblastoma stem cells," *scientific reports*, Bd. 9, Nr. 1, p. 15925, 04 November 2019.
- [197] J.-P. Bryant, J. Heiss und Y. K. Banasavadi-Siddegowda, „Arginine Methylation in Brain Tumors: Tumor Biology and Therapeutic Strategies," *cells*, Bd. 10, Nr. 1, p. 124, 11 Januar 2021.
- [198] J. Xu und S. Richard, „Cellular pathways influenced by protein arginine methylation: Implications for cancer," *Molecular Cell*, Bd. 81, Nr. 21, pp. 4357-4368, 4 November 2021.
- [199] M. T. Bedford und S. Richard, „Arginine Methylation: An Emerging Regulator of Protein Function," *Molecular Cell*, Bd. 18, Nr. 11, pp. 263-272, 29 April 2005.

- [200] A. E. Raposo und S. C. Piller, „Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle,“ *Cell Division*, Bd. 13, Nr. 3, 20 März 2018.
- [201] T. L. Branscombe, A. Frankel, J.-H. Lee, J. R. Cook, Z.-h. Yang, S. Pestka und S. Clarke, „PRMT5 (Janus Kinase-binding Protein 1) Catalyzes the Formation of Symmetric Dimethylarginine Residues in Proteins,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 276, Nr. 35, pp. 32971-32976, 31 August 2001.
- [202] T. Branscombe Miranda, M. Miranda, A. Frankel und S. Clarke, „PRMT7 Is a Member of the Protein Arginine Methyltransferase Family with a Distinct Substrate Specificity,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 279, Nr. 22, pp. 22902-22907, Mai 2004.
- [203] J. R. Cook, J.-H. Lee, Z.-H. Yang, C. D. Krause, N. Herth, R. Hoffmann und S. Pestka, „FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues,“ *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Bd. 342, Nr. 2, pp. 472-481, 7 April 2006.
- [204] S. Antonysamy, Z. Bonday, R. M. Campbell, B. Doyle, Z. Druzina, T. Gheyi, B. Han, L. N. Jungheim, Y. Qian, C. Rauch, M. Russel, J. M. Sauder, S. R. Wassermann, K. Weichert, F. S. Willard, A. Zhang und S. Emtage, „Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex,“ *Biochemistry*, Bd. 109, Nr. 44, pp. 17960-17965, 15 Oktober 2012.
- [205] W. J. Friesen, S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G. S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann und G. Dreyfuss, „The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins,“ *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 21, Nr. 24, pp. 8289-8300, 24 Juli 2001.
- [206] G. Krapivinsky, W. Pu, K. Wickman, L. Krapivinsky und D. E. Clapham, „pICln Binds to a Mammalian Homolog of a Yeast Protein Involved in Regulation of Cell Morphology,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 273, Nr. 18, pp. 10811-10814, 1 Mai 1998.
- [207] G. Meister, C. Eggert, D. Bühler, H. Brahms, C. Kambach und U. Fischer, „Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor PICln,“ *Current Biology*, Bd. 11, Nr. 24, pp. 1990-1994, 11 Dezember 2001.
- [208] H. Brahms, L. Meheus, V. De Brabandere, U. Fischer und R. Lührmann, „Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein,“ *RNA*, Bd. 7, Nr. 11, pp. 1531-1542, 11 Januar 2002.
- [209] K. Dittmar, F. Lotti, K. Dittmar, I. Younis, L. Wan, M. Kasim und G. Dreyfuss, „SMN Deficiency Causes Tissue-Specific Perturbations in the Repertoire of snRNAs and Widespread Defects in Splicing,“ *Cell*, Bd. 133, Nr. 4, pp. 585-600, 16 Mai 2008.
- [210] M. Jansson, S. T. Durant, E.-C. Cho, S. Sheahan, M. Edelmann, B. Kessler und N. B. La Thangue, „Arginine methylation regulates the p53 response,“ *nature cell biology*, Bd. 10, pp. 1431-1439, 16 November 2008.

- [211] A. Scoumanne, J. Zhang und X. Chen, „PRMT5 is required for cell-cycle progression and p53 tumor suppressor function,“ *Nucleic Acids Research*, Bd. 37, Nr. 15, pp. 4965-4976, 15 Juni 2009.
- [212] J.-M. Hsu, C.-T. Chen, C.-K. Chou, H.-P. Kuo, L.-Y. Li, C.-Y. Lin, H.-J. Lee, Y.-N. Wang, M. Liu, H.-W. Liao, B. Shi, C.-C. Lai, M. T. Bedford, C.-H. Tsai und M.-C. Hung, „Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation“.
- [213] G. Guderian, C. Peter, J. Wiesner, A. Sickmann, K. Schulze-Osthoff, U. Fischer und M. Grimmler, „RioK1, a New Interactor of Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5), Competes with pICln for binding and Modulates PRMT5 Complex Composition and Substrate Specificity,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 286, Nr. 3, pp. 1976-1986, 21 Januar 2011.
- [214] B. Widmann, F. Wandrey, L. Badertscher, E. Wyler, J. Pfannstiel, I. Zemp und U. Kutay, „The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits,“ *Molecular biology of the cell*, Bd. 23, Nr. 1, pp. 22-35, Januar 2012.
- [215] A. Krzyzanowski, R. Gasper, H. Adihou, P. 't Hart und H. Waldmann, „Biochemical Investigation of the Interaction of pICln, RioK1 and COPR5 with the PRMT5-MEP50 Complex,“ *ChemBiochem*, Bd. 22, Nr. 11, pp. 1908-1914, 2 Juni 2021.
- [216] M. Lacroix , S. El Messaoudi, G. Rodier, A. Le Cam, C. Sardet und E. Fabrizio, „The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5,“ *EMBO Reports*, Bd. 9, pp. 452-458, 11 April 2008.
- [217] K. A. Gelato und W. Fischle, „Role of histone modifications in defining chromatin structure and function,“ *Biological Chemistry*, Bd. 389, Nr. 4, pp. 353-363, April 2008
- [218] C. Teyssier, D. Chen und M. R. Stallcup, „Requirement for Multiple Domains of the Protein Arginine Methyltransferase CARM1 in Its Transcriptional Coactivator Function,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 277, Nr. 48, pp. 46066-46072, 29 November 2002.
- [219] S. Rea, F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z.-W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, D. C. Allis und T. Jenuwein, „Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases,“ *Nature* Bd. 406, Nr. 6796, pp. 593-599, 10 August 2000.
- [220] B. Yang, J.-Q. Wang, Y. Tan, R. Yuan, Z.-S. Vhen und C. Zou, „RNA methylation and cancer treatment,“ *Pharmacological research*, Bd. 174, Dezember 2021.
- [221] L. Yu, F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E. H. Baehrecke und M. Lenardo, „Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation,“ *Biological Sciences*, Bd. 103, Nr. 13, pp. 4952-4957, 17 März 2006.

- [222] Z. Hruban, B. Spargo, R. Swift und R. Kleinfeld, „Focal Cytoplasmic Degradation,“ *The American Journal of Pathology*, Bd. 42, Nr. 6, pp. 657-683, Juni 1963.
- [223] I. Tanida, T. Nishitani, T. Nemoto, T. Ueno und E. Kominami, „Mammalian Apg12p, but not the Apg12 - Apg5p conjugate, facilitates LC3 processing.,“ *Biochemical and Biophysical Research*, Bd. 296, Nr. 5, pp. 1164-1170, 6 September 2002.
- [224] L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, B. Levine, D. R. Green und G. Kroemer, „Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles,“ *Nature Reviews drug Discovery*, Bd. 16, Nr. 7, pp. 487-511, 19 Mai 2017.
- [225] S. Alers, A. S. Löffler, S. Wesselborg und B. Stork, „Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, short cuts and feedbacks,“ *Molecular Cell Biology*, Bd. 32, Nr. 1, pp. 2-11, Januar 2012.
- [226] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet und K.-L. Guan, „AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation,“ *nature cell biology*, Bd. 13, Nr. 2, pp. 132-141, 23 Januar 2011.
- [227] P.-M. Wong, C. Puente, I. G. Ganley und X. Jiang, „The ULK1 complex,“ *Autophagy*, Bd. 9, Nr. 2, pp. 124-137, 1 Februar 2013.
- [228] E. Itakura, C. Kishi, K. Inoue und N. Mizushima, „Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian atg14 and UVRAG,“ *molecular biology of the cell*, Bd. 19, Nr. 12, pp. 5031-5603, 08 Oktober 2008.
- [229] C. Liang, P. Feng, B. Ku, I. Dotan, D. Canaani, B.-H. Oh und J. U. Jung, „Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG,“ *nature cell biology*, Bd. 8, Nr. 7, pp. 688-698, Juli 2006.
- [230] G. M. Fimia, A. Stoykova, A. Romagnoli, L. Giunta, S. Di Bartolomeo, R. Nardacci, M. Corazzari, C. Fuoco, A. Ucar, P. Schwartz, P. Gruss, M. Piacentini, K. Chowdhury und F. Cecconi, „Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system,“ *nature*, Bd. 447, Nr. 7148, pp. 1121-1125, 28 Juni 2007.
- [231] S. Adi-Harel, S. erlich, E. Schmukler, S. Cohen-Kedar, O. Segev, L. Mizrachy, J. A. Hirsch und R. Pinkas-Kramarski, „Beclin 1 self-association is independent of autophagy induction by amino acid deprivation and rapamycin treatment,“ *journal of Cellular Biochemistry*, Bd. 110, Nr. 5, pp. 1262-1271, 14 Juli 2010.
- [232] C. Otomo, Z. Metlagel, G. Takaesu und T. Otomo, „Structure of the human ATG12-ATG5 conjugate required for LC2 lipidation in autophagy,“ *nature structural and molecular biology*, Bd. 20, Nr. 1, pp. 59-66, Januar 2013.
- [233] J. Kim, V. M. Dalton, K. Eggerton, S. Scott und D. J. Klionsky, „Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways,“ *molecular biolog of the cell*, Bd. 10, Nr. 05, 13 Oktober 2017.

- [234] K. Sato, K. Tsuchihara, S. Fuji, M. Sugiyama, T. Goya, Y. Atomi, T. Ueno, A. Ochiai und H. Esumi, „Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation,“ *Cancer research*, Bd. 67, Nr. 20, pp. 9677-9684, 2007.
- [235] S. Pankiv, T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.-A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy und T. Johansen, „p62/SQSTM1 binds directly to ATG8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy,“ *Journal of biological chemistry*, Bd. 282, Nr. 33, pp. 24131-24145, 2007.
- [236] H. Nakatogawa, Y. Ichimura und Y. Ohsumi, „Atg8, a Ubiquitin-like Protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion,“ *Cell*, Bd. 130, Nr. 1, pp. 165-178, 13 Juli 2007.
- [237] N. Mizushima, Y. Ohsumi und T. Yoshimori, „Autophagosome formation in mammalian cells,“ *Cell structure and functions*, Bd. 27, Nr. 6, pp. 421-429, Dezember 2002.
- [238] T. Yoshimori, F. Yamagata, A. Yamamoto, N. Mizushima, Y. Kabeya, A. Nara, I. Miwako, M. Ohashi, M. Ohsumi und Y. Ohsumi, „The Mouse SKD1, a Homologue of Yeast Vps2p, Is Required for Normal Endosomal Trafficking and Morphology in mammalian Cells,“ *Molecular Biology of the Cell*, Bd. 11, Nr. 2, pp. 747-763, 01 Februar 2000.
- [239] N. Bishop und P. Woodman, „ATPase-defective Mammalian VPS4 Localizes to Aberrant Endosomes and Impairs Cholesterol Trafficking,“ *Molecular Biology of the Cell*, Bd. 11, Nr. 1, pp. 227-239, 01 januar 2000.
- [240] L. Jahreiss, F. M. Menzies und D. C. Rubinsztein, „The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kss-and-Rund Fusion with Lysosomes,“ *Traffic*, Bd. 9, Nr. 4, pp. 574-587, 2008.
- [241] P. Roberts, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Kvam, E. O`Toole, m. Winey und D. S. Goldfarb, „Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*,“ *Molecular Biology of the Cell*, Bd. 14, pp. 129-141, 18 November 2002.
- [242] H. A. Franch, S. Sooparb, J. Du, L. L. Shen und N. S. Brown, „A Mechanism Regulationg Proteolysis i Specific Proteins during Renal Tubular Cell Grwoth,“ *Jornal of Biological Chemistry*, Bd. 276, Nr. 22, pp. 19126-19131, Juni 2001.
- [243] A. M. Cuervo, E. Knecht, S. R. Terlecky und J. F. Dice, „Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation,“ *American Jorunal of Physiology*, Bd. 269, Nr. 5, pp. 1200-1208, 1 November 1995..
- [244] U. Bandyopadhyay, S. Kaushik, L. Varticovski und A. M. Cuervo, „The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamuc Protein Complexes at the Lysosomal Membrane,“ *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 28, Nr. 18, pp. 5747-5763, 15 September 2008.

- [245] C. de Duve und R. Wattiaux, „Functions of Lysosomes,“ *Annual review of physiology*, Bd. 28, pp. 435-492, 1966.
- [246] S. Rodriguez-Enriquez, I. Kim, R. T. Currin und J. J. Lemasters, „Tracker dyes to probe mitochondriaö autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes,“ *Autophagy*, Bd. 2, Nr. 1, pp. 39-46, 10 Januar 2006.
- [247] S. V. Scott und D. J. Klionsky, „delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm,“ *Current Opinion in Cell Biology*, Bd. 10, Nr. 4, pp. 523-529, 1998.
- [248] S. Pickles, P. Vigie und R. J. Youle, „Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance,“ *Current*, Bd. 28, Nr. 4, pp. R170-R185, 19 Februar 2018.
- [249] I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez und J. J. Lemasters, „Selective degradaton of mitochondria by mitophagy,“ *Archves of biochemistry and biophysics*, Bd. 462, Nr. 2, p. 245, 15 Juni 2007.
- [250] S. Ghavami, M. Eshragi, S. Ande, W. Chazin, T. Klonisch, A. Halayko, K. D. Mcneill, M. Hashemi, C. Kerkhoff und M. Los, „S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3,“ *Cell Research*, Bd. 20, Nr. 3, pp. 314-331, 24 November 2009..
- [251] T. Imazu, S. Sgimizu, S. Tagami, M. Matsushima, Y. Nakamura, T. Miki, A. Okuyama und Y. Tsujimoto, „Bcl2/E1B 19kDa-interactiing protein 3-like protein (Bnip3L) inteacts with Bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability,“ *Oncogene*, Bd. 18, Nr. 32, pp. 4523-4529, 18 August 1999.
- [252] Y. Nakamura, N. Kitamura, D. Shinogi, M. Yoshida, O. Goda, R. Murai, H. Kamino und H. Arakawa, „BNIP3 and NIX Mediate Mieap-Induced Accumulation of Lysosomal Proteins within Mitochondria,“ *PLOS ONE*, Bd. 7, Nr. 1, p. e30767, 26 Januar 2012.
- [253] R. K. Bruick, „Expression of the gene encoding the proapoptotic NIP3 protein induced by hypoxia,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 97, Nr. 16, pp. 9082-9087, 1 August 2000.
- [254] H. Zhang, M. Bosch-Marce, L. A. Shimoda, Y. S. Tan, J. H. Baek, J. B. Wesley, F. J. Gonzalez und G. L. Semenza, „Mitochondrial Autophagy Is an HIF-9-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 283, Nr. 16, pp. 10892-10903, April 2008.
- [255] C. Mammucari, G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A. L. Goldberg, S. Schiaffino und M. Sandri, „FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle in Vivo,“ *Cell Metabolism*, Bd. 6, Nr. 3, pp. 458-471, 5 Dezember 2007.
- [256] I. Novak, V. Kirkin, D. G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F. Löhr, D. Popovic, A. Occhipinti, A. S. Reichert, J. Terzic, V. Dötsch, P. A. Ney und I. Dikic,

- „Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance,“ *EMBO Reports*, Bd. 11, Nr. 1, pp. 45-51, Januar 2010.
- [257] L. Liu, D. Feng, G. Chen, M. Chen, Q. Zheng, P. Song, Q. Ma, C. Zhu, R. Wang, W. Qi, L. Huang, P. Xie, B. Li, X. Wang, H. Jin, J. Wang, F. Yang, P. Liu, Y. Zhu, S. Sui und Q. Chen, „Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells,“ *nature cell biology*, Bd. 14, Nr. 2, pp. 177-185, 22 Januar 2012.
- [258] W.-X. Ding und X.-M. Yin, „Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles and analysis,“ *biological Chemistry*, Bd. 393, Nr. 7, pp. 547-564, 19 April 2013.
- [259] D. Narendra, A. Tanaka, D.-F. Suen und R. J. Youle, „Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy,“ *Journal of Cell Biology*, Bd. 183, Nr. 5, pp. 795-803, 24 November 2008.
- [260] S. M. Jin, M. Lazarou, C. Wang, L. A. Kane, D. P. Narendra und R. J. Youle, „Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL,“ *Journal of Cell Biology*, Bd. 191, Nr. 5, pp. 933-942, 29 November 2010.
- [261] H. kato, Q. Lu, D. Reapaport und V. Kozjak-Pavlovic, „Tom70 Is Essential for PINKK1 import into Mitochondria,“ *PLOS ONE*, Bd. 8, Nr. 3, pp. 1-6, 5 März 2013.
- [262] C. Zhou, Y. Huang, Y. Shao, J. May, D. Prou, C. Perier, W. Dauer, E. A. Schon und S. Przedborski, „The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 105, Nr. 33, pp. 12022-12027, 19 August 2008.
- [263] M. Lazarou, S. M. Jin, L. A. Kane und R. J. Youle, „Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin,“ *Developmental cell*, Bd. 22, Nr. 2, pp. 320-333, 14 Februar 2012.
- [264] Y. Kim, J. Oark, S. Kim, S. Song, S.-K. Kwon, S.-H. Lee, T. Kitada, J.-M. Kim und J. Chung, „PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin Through direct phosphorylation,“ *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Bd. 377, Nr. 3, pp. 975-980, 19 Dezember 2008.
- [265] A. Tanaka, M. M. Cleland, S. Xu, D. P. Narendra, D.-F. Suen, M. Karbowski und R. J. Youle, „Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin,“ *Journal of Cell Biology*, Bd. 191, Nr. 7, p. 1367.1380, 20 Dezember 2010.
- [266] S. R. Yoshii, C. Kishi, N. Ishihara und N. Mizushima, „Parkin Mediates Proteasome-dependent Protein Degradation and Rupture of the Outer Mitochondrial Membrane,“ *Protein Synthesis and Degradation*, Bd. 286, Nr. 22, pp. 19630-19640, Juni 2011.

- [267] W.-X. Ding, H.-M. Ni, M. Li, Y. Liao, X. Chen, D. B. Stolz, G. W. Dorn und X.-M. Yin, „Nix is Critical to Two Distinct Phases of Mitophagy, Reactive Oxygen Species-mediated Autophagy Induction and Parkin-Ubiquitin-p62-mediated Mitochondrial Priming,“ *Cell Biology*, Bd. 285, Nr. 36, pp. 27879-27890, September 2010.
- [268] C. Van Humbeeck, T. Cornelissen, H. Hofkens, W. Mandemakers, K. Gevaert, B. De Strooper und W. Vandenberghe, „Parkin Interacts with Ambra1 to Induce Mitophagy,“ *Neurobiology of Disease*, Bd. 31, Nr. 28, pp. 10249-20161, 13 Juli 2011.
- [269] M. Lazarou, D. A. Sliter, L. A. Kane, S. A. Sarraf, C. Wang, J. L. Burman, D. Sideris, A. I. Fogel und R. J. Youle, „The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy,“ *Nature*, Bd. 524, Nr. 7565, pp. 309-314, 20 August 2015.
- [270] H. Kato und K. Mihara, „Identification of Tom5 and Tom6 in the preprotein translocase complex of human mitochondrial outer membrane,“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 369, Nr. 3, pp. 958-963, 9 Mai 2008.
- [271] J. C. Young, N. J. Hoogenraad und F. U. Hartl, „Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70,“ *Cell*, Bd. 112, Nr. 1, pp. 41-50, 10 Januar 2003.
- [272] P. J. Dekker, M. T. Ryan, J. Brix, H. Müller, A. Hönliger und N. Pfanner, „Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane: Molecular Dissection and Assembly of the General Import Pore Complex,“ *Molecular and cellular Biology*, Bd. 18, Nr. 11, pp. 6515-6524, November 1998.
- [273] T. Söllner, G. Griffiths, R. Pfaller, N. Pfanner und W. Neupert, „MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins,“ *Cell*, Bd. 59, Nr. 6, pp. 1061-1070, 22 Dezember 1989.
- [274] J. Brix, K. Dietmeiers und N. Pfanner, „Differential Recognition of Preproteins by Purified Cytosolic Domains of the Mitochondrial Import Receptors Tom20, Tom22 and Tom70,“ *Protein Chemistry and Structure*, Bd. 272, Nr. 33, pp. 20730-20735, August 1997.
- [275] T. L. Dawson, G. J. Gores, A.-L. Nieminen, B. Herman und J. J. Lemasters, „Mitochondria as a source of reactive oxygen species during stress in rat hepatocytes,“ *Cell Physiology*, pp. 961-967, 01 April 1993.
- [276] V. Nekipelaya, D. Semenov, M. Potapenko, E. Kuligina, Y. Y. Kit, I. V. Romanova und V. A. Richter, „Lactaptin Is a Human Milk Protein Inducing Apoptosis of MCF-7 Adenocarcinoma Cells,“ *Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology*, Bd. 419, Nr. 2, pp. 268-271, 20 Juli 2007.
- [277] D. V. Semenov, A. S. Fomin, E. V. Kuligina, O. A. Koval, V. A. Matveeva, I. N. Babkina, N. V. Tikunova und V. A. Richter, „Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaptin, and their effect on cultured human cells,“ *the protein Journal*, Bd. 29, Nr. 3, pp. 174-180, April 2010.

- [278] O. A. Koval, A. S. Fomin, V. I. Kaledin, D. V. Semenov, M. O. Potapenko, E. V. Kuligina, V. P. Nikolin, E. V. Nikitenko und V. A. Richter, „A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models,“ *Biochimie*, Bd. 94, Nr. 12, pp. 2467-2474, Dezember 2012.
- [279] O. A. Koval, A. V. Tkachenko, A. S. Fomin, D. V. Semenov, A. A. Nushtaeva, E. V. Kuligina, E. L. Zavjalov und V. A. Richter, „Lactaptin Induces p53-Independent Cell Death Associated with Features of Apoptosis and Autophagy and Delays Growth of Breast Cancer Cells in Mouse Xenografts,“ *PLOS ONE*, Bd. 9, Nr. 4, 07 April 2014.
- [280] L. Neumann, C. Pforr, J. Beaudouin, A. Pappa, N. Dricker, P. H. Krammer, I. N. Lavrik und R. Eils, „Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide live and death of cells,“ *molecular systems biology*, Bd. 6, p. 352, 9 März 2010.
- [281] R. M. Neve, K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.-P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W.-L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar und J. W. Gray, „A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes,“ *Cancer Cell*, Bd. 10, Nr. 6, pp. 515-527, Dezember 2006.
- [282] R. Cailleau, R. Young, M. Olive und W. Reeves, „Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions,“ *Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 53, Nr. 3, pp. 661-674, September 1974.
- [283] K. Satya-Prakash, S. Pathak, T. Hsu, M. Olive und R. Cailleau, „Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes,“ *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Bd. 3, Nr. 1, pp. 61-73, Januar 1981.
- [284] B. P. Brinkley B.R., L. Wible, M. Mace, D. Turner und R. Cailleau, „Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro,“ *Cancer research*, Bd. 40, Nr. 9, pp. 3118-3129, September 1980.
- [285] H. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan, „A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma,“ *Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 51, Nr. 5, pp. 1409-1416, November 1973.
- [286] M. Lippman, G. Bolan und K. Huff, „The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture,“ *Cancer research*, Bd. 36, Nr. 12, pp. 4596-4601, Dezember 1976.
- [287] W. F. Scherer, J. T. Syverton und G. O. Gey, „Studies on the propagation in vitro of polyomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix,“ *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 97, Nr. 5, pp. 695-710, 01 Mai 1953.

- [288] D. Duarte und N. Vale, „Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology,“ *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, Bd. 3, p. 100110, 12 Mai 2022.
- [289] R. Koschny, S. Brost, U. Hinz, J. Sykora, E. M. Batke, S. Singer, K. Breuhahn, W. Stremmel, H. Walczak, P. Schemmer, P. Schirmacher und T. M. Ganten, „Cytosolic and nuclear caspase-8 have opposite impact on survival after liver resection for hepatocellular carcinoma,“ *BMC Cancer*, Bd. 13, Nr. 532, 09 November 2013.
- [290] D. Kulms, B. Pöppelmann, D. Yarosh, T. A. Luger, J. Krutmann und T. Schwarz, „Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 96, Nr. 14, pp. 7974-7979, 06 Juli 1999.
- [291] M. Richter, F. Wohlfromm, T. Kähne, H. Bongartz, H. Seyrek, Y. Kit, O. Chinak, V. A. Richter, O. A. Koval und I. N. Lavrik, „The Recombinant Fragment of Human K-Casein Induces cell Death by Targeting the Proteins of the Mitochondrial Import in Breast Cancer Cells,“ *Cancers*, Bd. 12, Nr. 6, 31 Mai 2020.
- [292] F. Wohlfromm, M. Richter, L. Otrin, K. Seyrek, T. Vidakovic-Koch, E. Kuligina, V. Richter, O. Koval und I. N. Lavrik, „Interplay Between Mitophagy and Apoptosis Defines a Cell Fate Upon Co-treatment of Breast Cancer Cells With a Recombinant Fragment of Human κ -Casein and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand,“ *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Bd. 8, Nr. 1, p. 617762., 18 Januar 2021.
- [293] F. Wohlfromm, K. Seyrek, N. Ivanisenko, O. Troitskaya, D. Kulms, V. Richter, O. Koval und I. N. Lavrik, „RL2 Enhances the Elimination of Breast Cancer Cells by Doxorubicin,“ *Cells*, Bd. 12, Nr. 24, 06 Dezember 2023.
- [294] S. Ayla, I. Seckin, G. Tanriverdi, M. Cengiz, M. Eser, B. Soner und G. Oktem, „Doxorubicin Induced Nephrotoxicity: Protective Effect of Nicotinamide,“ *International Journal of Cell Biology*, 16 Juni 2011.
- [295] O. Troitskaya, M. Varlamov, A. Nushtaeva, V. Richter und O. Koval, „Recombinant Lactapin Induces Immunogenic Cell Death and Creates an Antitumor Vaccination Effect in Vivo with Enhancement by an IDO Inhibitor,“ *Molecules*, Bd. 25, Nr. 12, 17 Juni 2020.
- [296] J. Rho, S. Choi, Y. R. Seong, W.-K. Cho, S. H. Kim und D.-S. Im, „PRMT5, Which Forms Distinct-oligomers, Is a Member of the Protein-arginine Methyltransferase Family,“ *Journal of biological Chemistry*, Bd. 276, Nr. 12, pp. 11393-11401, 06 April 2001.
- [297] L. Boffa, J. Karn, G. Vidali und V. Allfrey, „Distribution of NG,NG-dimethylarginine in nuclear protein fraction,“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 74, Nr. 3, pp. 969-976, Februar 1977.

- [298] R. Blanc und S. Richard, „Arginine Methylation: The Coming of Age,“ *Molecular Cell*, Bd. 65, Nr. 1, pp. 8-24, 5 Januar 2017.
- [299] Y. Yang und M. T. Bedford, „Protein arginine methyltransferases and cancer,“ *nature reviews cancer*, Bd. 13, Nr. 1, pp. 37-50, Januar 2013.
- [300] B. Chang, Y. Chen, Y. Zhao und R. Bruick, „JMJD6 is a histone arginine demethylase,“ *Science*, Bd. 318, Nr. 5849, pp. 444-447, 19 Oktober 2007.
- [301] C. J. Webby, A. Wolf, N. Gromak, M. Dreger, H. Kramer, B. Kessler, M. L. Nielsen, C. Schmitz, D. S. Butler, J. R. Yates, C. M. Delahunty, P. Hahn, A. Lengeling, M. Mann, N. Proudfoot, C. Schofield und A. Böttger, „Jmjd6 catalyses Lysyl-Hydroxylation of U2AF65, a Protein Associated with RNA Splicing,“ *Science*, Bd. 325, Nr. 5936, pp. 90-93, 03 Juli 2009.
- [302] M. Li, W. An, L. Xu, Y. Lin, L. Su und X. Liu, „The arginine methyltransferase PRMT5 and PRMT1 distinctly regulate the degradation of anti-apoptotic protein CFLARL in human lung cancer cells,“ *Journal of Experimental and clinical cancer research*, Bd. 38, Nr. 1, p. 64, 8 Februar 2019..
- [303] C. Chauhan, A. Martinez-Val, R. Niedenthal, J. Velgaard Olsen, A. Kotlyarov, S. Bekker-Jensen, M. Gaestel und M. B. Menon, „PRMT5-mediated regulatory arginine methylation of RIPK3,“ *Cell Death discovery*, Bd. 9, Nr. 14, 19 Januar 2023.
- [304] M. A. Pereira, L. Tao, Y. Liu, V. E. Steele und R. A. Lubet, „Modulation by budesonide of DNA-methylation and mRNA expression in mouse lung tumors,“ *International Journal of Cancer*, Bd. 120, Nr. 5, pp. 1150-1153, 19 Januar 2007.
- [305] L. Siu, D. Rasco, S. P. Vinay, P. Romano, J. Menis, F. Opdam, K. Heinhuis, J. Egger, S. Gorman, R. Parasrampur, K. Wang, B. Bremer und M. Gounder, „4380-METEOR-1: A phase I study of GSK3326595, a first in-class protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitor, in advanced solid tumours,“ *Annals of Oncology*, Bd. 30, Nr. 5, p. v159, Oktober 2019.
- [306] A. Fedoriw, S. R. Rajapurkar, S. O'Brien, S. V. Gerhart, L. H. Mitchell, n. D. Adams, N. Rioux, T. Lingaraj, S. A. Ribich, M. B. Pappalardi, N. Shah, J. Laraio, Y. Liu, M. Butticello, C. L. Carpenter, C. Creasy, S. Kenchuk, M. T. McCabe, C. F. McHugh, R. Nagarajan, C. Wagner, F. Zappacosta, R. Annan, N. O. Concha, R. A. Thomas, T. K. Hart, J. J. Smith, R. A. Copeland, M. P. Moyer, J. Campbell, K. Stickland, J. Mills, S. Jaques-O'Hagan, C. Allain, D. Johnston, A. Raimondi, M. Porter Scott, N. Waters, K. Swinger, A. Boriack-Sjodin, T. Riera, G. Shapiro, R. Chesworth, R. K. Prinjha, R. G. Kruger, O. Barbash und H. P. Mohammad, „Anti-tumor Activity of the Type I PRMT-Inhibitor, GSK3368715, Synergizes with PRMT5 Inhibition through MTAP Loss,“ *Cancer Cell*, Bd. 36, Nr. 1, pp. 100-114, 8 Juli 2019.
- [307] O. A. Chinak, A. V. Shernyukov, S. S. Ovcherenko, E. A. Sviridow, V. M. Golyshhev, A. S. Fomin, I. A. Pyshnaya, E. V. Kuligina, V. A. Richter und E. G. Bagryanskaya,

- „Structural and Aggregation Features of a Human K-Casein Fragment with Antitumor and Cell-Penetrating Properties,“ *Molecules*, Bd. 24, Nr. 16, p. 2919, 12 August 2019.
- [308] O. Chinak, E. Golubitskaya, I. Pyshnaya, G. Stepanov, E. Zhuravlev, V. Richter und O. Koval, „Nucleic Acids Delivery Into the Cells Using Pro-Apoptotic Protein Lactaptin,“ *Frontiers in Pharmacology*, Bd. 10, 18 September 2019.
- [309] A. V. Bagamanshina, O. S. Troitskaya, A. A. Nushtaeva, A. Y. Yunusova, M. O. Starykovich, E. V. Kuligina, Y. Y. Kit, M. Richter, F. Wohlfromm, T. Kähne, I. N. Lavrik, V. A. Richter und O. A. Koval, „Cytotoxic and Antitumor Activity of Lactaptin in Combination with Autophagy Inducers and Inhibitors,“ *BioMed Research International*, Bd. 2019, p. 4087160, 17 Juni 2019..
- [310] V. G. Keshamouni, R. R. Mattingly und K. B. Reddy, „Mechanism of -17-beta-Estradiol-induced Erk1/2 Activation in Breast Cancer Cells: A Role for HER2 and PKC-Gamma,“ *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 277, Nr. 25, pp. 22558-22565, 21 Juni 2002.
- [311] V. Roy und E. A. Perez, „Beyond Trastuzumab: Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors in HER-2-Positive Breast Cancer Cells,“ *The Oncologist*, Bd. 14, Nr. 11, pp. 1061-1069, November 2009.
- [312] P.-H. Tseng, Y.-C. Wang, S.-C. Weng, J.-R. Weng, C.-S. Chen, R. W. Brueggemeier, C. L. Shapiro, C.-Y. Chen, S. E. Dunn, M. Pollak und C.-S. Chen, „Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor,“ *Molecular pharmacology*, Bd. 70, Nr. 5, pp. 1534-1541, November 2006.
- [313] S. M. Frisch, „Reversal of malignancy by the adenovirus Ela gene,“ *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Bd. 350, pp. 261-266, 3 June 1995.
- [314] T. Suda, T. Takahashi, P. Golstein und S. Nagata, „Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel of thr tumor necrosis factor family,“ *Cell*, Bd. 75, Nr. 6, p. 1169, 17 Dezember 1993.
- [315] K. Hoffmann, „The modular nature of apoptotic signaling proteins,“ *Cellular and Molecular Life Sciences*, Bd. 55, Nr. 8-9, pp. 1113-1128, Juli 1999.
- [316] M. O. Hengartner und R. H. Hirvitz, „C.elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2,“ *Cell*, Bd. 76, Nr. 4, pp. 665-676, 25 Februar 1994.
- [317] J. Han, P. Sabbatini, D. Perez, L. Rao, D. Modha und E. White, „The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein,“ *Genes and Development*, Bd. 10, Nr. 4, pp. 461-477, 15 Februar 1996.

- [318] S. Henderson, D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson und A. Rickinson, „Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 90, Nr. 18, pp. 8479-8483, 1993.
- [319] J. D. Gary und S. Clarke, „RNA and Protein Interactions Modulated by Protein Arginine Methylation,“ *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Bd. 61, pp. 65-131, 1998.
- [320] L. Gros, C. Delaporte, S. Frey, J. Decesse, B. R. de Saint-Vincent, L. Cavarec, A. Dubart, A. V. Gudkov und A. Jacquemin-Sablon, „Identification of New Drug Sensitivity Genes Using Genetic Suppressor Elements,“ *Cancer Research*, Bd. 63, Nr. 1, pp. 164-171, 1 Januar 2003.
- [321] E. Guccione und S. Richard, „The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation,“ *nature reviews molecular cell biology*, Bd. 20, pp. 642-657, 26 Juli 2019.
- [322] A. Butera, M. Roy, C. Zampieri, E. Mammarella, E. Panatta, G. Melino, A. D'Allesandro und I. Amelio, „p53-driven lipidome influence non-cell-autonomous lysophospholipids in pancreatic cancer,“ *Biology Direct*, Bd. 17, Nr. 1, p. 6, 8 März 2022.
- [323] T. L. Garvey, J. Bertin, R. M. Siegel, G.-h. Wang, M. J. Lenardo und J. I. Cohen, „Binding of FADD and Caspase-8 to Molluscum Contagiosum Virus MC159 v-FLIP Is Not Sufficient for Its Antiapoptotic Function,“ *Journal of Virology*, Bd. 76, Nr. 2, pp. 697-706, 15 Januar 2002.
- [324] F. Gonzalez, D. Lawrence, B. Yang, S. Yee, R. Pitti, S. Marsters, V. C. Pham, J.-P. Stephan, J. Lill und A. Ashkenazi, „TRAF2 Sets a Threshold for extrinsic Apoptosis by tagging Caspase-8 with a Ubiquitin Shutoff Timer,“ *Molecular Cell*, Bd. 48, Nr. 6, pp. 888-899, 28 Dezember 2012.
- [325] L. Wang, F. Du und X. Wang, „TNF-alpha Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways,“ *Cell*, Bd. 133, Nr. 4, pp. 693-703, 16 Mai 2008.
- [326] O. Micheau und J. Tschopp, „Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes,“ *Cell*, Bd. 114, Nr. 2, p. 181.190, 25 Juli 2003.
- [327] R. S. Malireddi, P. Gurung, S. Kesavardhana, P. Samir, A. Burton, H. Mummareddy, P. Vogel, S. Pelletier, S. Burgula und T.-D. Kanneganti, „Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity- independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease,“ *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 217, Nr. 3, 23 Dezember 2019.
- [328] W. Dai, J. Zhang, S. Li, F. He, Q. Liu, J. Gong, Z. Yang, Y. Gong, F. Tang, Z. Wang und C. Xie, „Protein Arginine Methylation: An Emerging Modification in Cancer Immunity

and Immunotherap,“ *Frontiers in Immunology*, Bd. 13, p. eCollection 2022., 14 April 2022.

- [329] S. Hopkins-Donaldson, A. Ziegler, S. Kurtz, C. Bigosch , D. Kandioler, C. Ludwig, u. Zangemeister-Wittke und R. Stahel, „Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation,“ *Cell Death and Differentiation*, Bd. 10, Nr. 3, pp. 356-364, 16 April 2003.

7 Veröffentlichungen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter:

1. Richter, Max* & **Wohlfromm, Fabian*** & Kähne, Thilo & Bongartz, Hannes & Seyrek, Kamil & Kit, Yuriy & Chinak, Olga & Richter, Vladimir & Koval, Olga & Lavrik, Inna. (2020). The Recombinant Fragment of Human κ -Casein Induces Cell Death by Targeting the Proteins of Mitochondrial Import in Breast Cancer Cells. *Cancer*. 12. 1427. DOI: 10.3390/cancers12061427
2. **Wohlfromm, Fabian*** & Richter, Max* & Otrin, Lado & Seyrek, Kamil & Vidaković-Koch, Tanja & Kuligina, Elena & Richter, Vladimir & Koval, Olga & Lavrik, Inna. (2021). Interplay Between Mitophagy and Apoptosis Defines a Cell Fate Upon Co-treatment of Breast Cancer Cells With a Recombinant Fragment of Human κ -Casein and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8. 617762. DOI: 10.3389/fcell.2020.617762.
3. **Wohlfromm, Fabian** & Seyrek, Kamil & Ivanisenko, Nikita & Troitskaya, Olga & Kulms, Dagmar & Richter, Vladimir & Koval, Olga & Lavrik, Inna, N. (2023) RL2 enhances doxorubicin-mediated elimination of breast cancer cells. *Cells*. 12. 2779. DOI:10.3390/cells12242779

* gleichberechtigte Autorenschaft

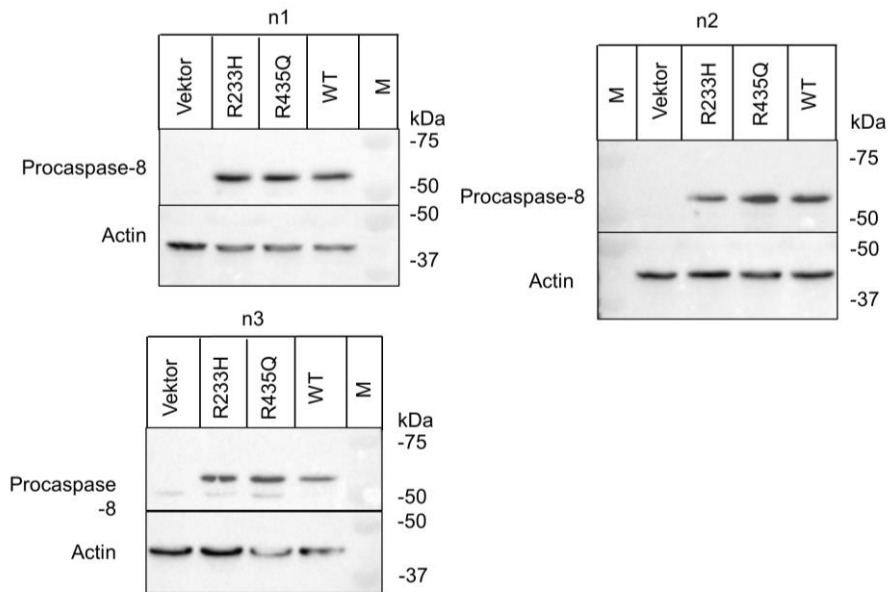
Weitere Veröffentlichungen:

Seyrek, Kamil & **Wohlfromm, Fabian** & Espe, Johannes & Lavrik, Inna. (2022). The cross-talk of autophagy and apoptosis in breast carcinoma: implications for novel therapies? *Biochemical Journal*. 479. 1581-1608. DOI:10.1042/BCJ20210676.

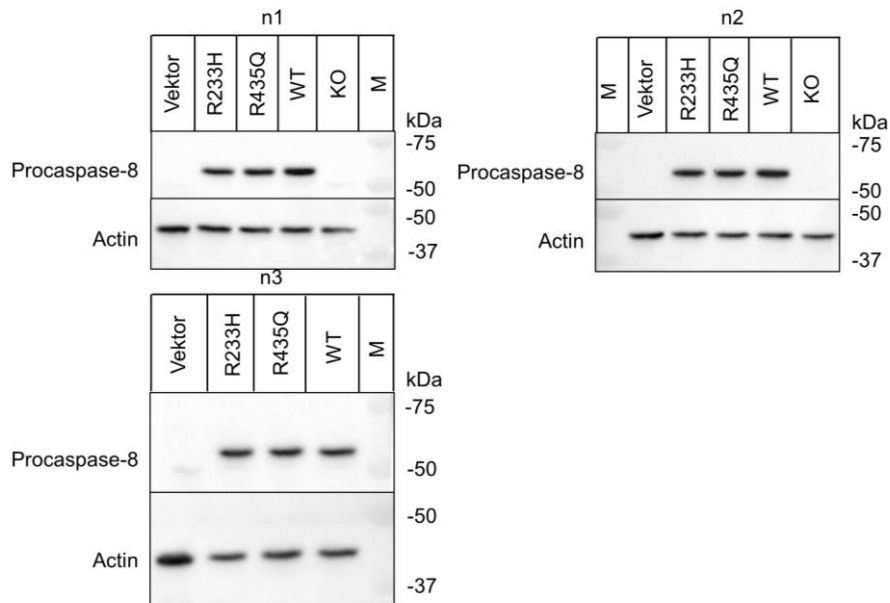
Seyrek, Kamil & Ivanisenko, Nikita & **Wohlfromm, Fabian** & Espe, Johannes & Lavrik, Inna. (2021). Impact of human CD95 mutations on cell death and autoimmunity: a model. *Trends in Immunology*. 43. DOI: 10.1016/j.it.2021.11.006.

Bagamanshina, Anastasia & Troitskaya, Olga & Nushtaeva, Anna & Yunusova, Anastasiya & Starykovych, Marina & Kuligina, Elena & Kit, Yuriy & Richter, Max & **Wohlfromm, Fabian** & Kähne, Thilo & Lavrik, Inna & Richter, Vladimir & Koval, Olga. (2019). Cytotoxic and Antitumor Activity of Lactaptin in Combination with Autophagy Inducers and Inhibitors. *BioMed Research International*. 2019. 1-16. DOI: 10.1155/2019/4087160.

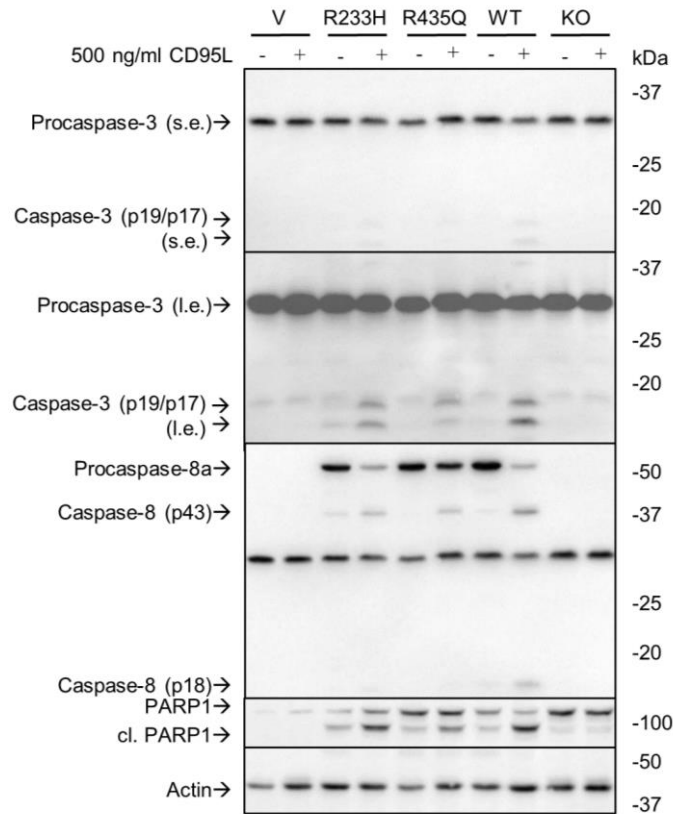
8 Anhang



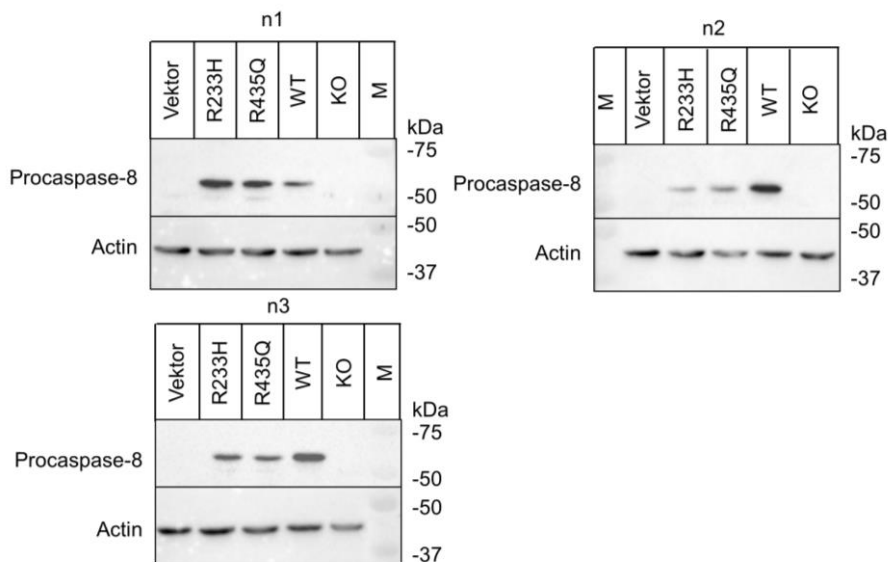
Anhang 1 Kontrollen der Expression von Caspase-8 in transfizierten Zellen der Caspase-8-Assays: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden mit den angegebenen Vektoren transfiziert. WT entspricht dem Wildtyp von Caspase-8, R233H und R435Q entsprechen Procaspase-8-Vektoren mit entsprechenden Punkt-Mutationen. Gezeigt sind die jeweiligen Kontrollen der drei unabhängigen Wiederholungen. Abkürzungen: V: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen.



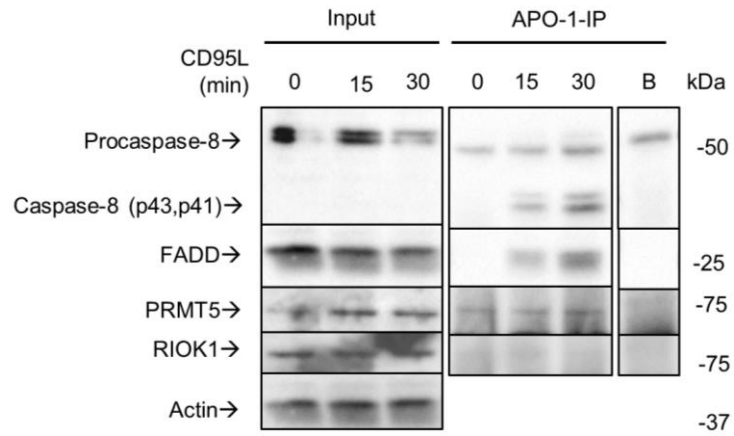
Anhang 2 Kontrollen der Expression von Caspase-8 in transfizierten Zellen der Caspase-3/7-Assays: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden mit den angegebenen Vektoren transfiziert. WT entspricht dem Wildtyp von Caspase-8, R233H und R435Q entsprechen Procaspase-8-Vektoren mit entsprechenden Punkt-Mutationen. Gezeigt sind die jeweiligen Kontrollen der drei unabhängigen Wiederholungen. Abkürzungen: V: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen.



Anhang 3 Mutation an potenzielle Methylierungsstellen reduziert CD95L-induzierte Caspase-3-Spaltung: A: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden nach der spezifischen Transfektion mit 500 ng/ml CD95L für drei Stunden stimuliert. Die Abbildungen zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen. Für Procaspase-3 werden sowohl kurze Belichtungen (s.e./ *short exposure*) als auch längere Belichtungen (l.e./ *long exposure*) gezeigt. Abkürzungen: V: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen; s.e.: *short exposure*; l.e.: *long exposure*.



Anhang 4 Kontrollen der Expression von Caspase-8 in transfizierten Zellen der Zellviabilitäts (MT und ATP) -Assays: HeLa-CD95-C8-KO Zellen werden mit den angegebenen Vektoren transfiziert. WT entspricht dem Wildtyp von Caspase-8, R233H und R435Q entsprechen Procaspase-8-Vektoren mit entsprechenden Punkt-Mutationen. Gezeigt sind die jeweiligen Kontrollen der drei unabhängigen Wiederholungen. Abkürzungen: V: HeLa-CD95-Vektor Zellen; R233H: HeLa-CD95-C8-R233H Zellen; R435Q: HeLa-CD95-C8-R435Q Zellen; WT: HeLa-CD95-C8-WT Zellen.



Anhang 5 PRMT5 bindet an den DISC: SKW 6.4 Zellen wurden mit 250 ng/ml CD95L für die angegebene Zeit stimuliert. Das Zelllysate (Input) wird einer IP mit APO-1-Antikörper unterzogen. Sowohl Lysat, als auch APO-1-IP werden dargestellt. Die Beadkontrolle wird durch „B“ markiert. Gezeigt wird das Ergebnis einer Untersuchung.

Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, 31.01.2024

Fabian Wohlfromm _____