

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***STEIGERUNG DER TODESREZEPTOR-VERMITTELTEN APOPTOSE DURCH
HYPEROSMOTISCHEN STRESS***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
SIMON SIRTIL

2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***STEIGERUNG DER TODESREZEPTOR-VERMITTELTEN APOPTOSE DURCH
HYPEROSMOTISCHEN STRESS***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
SIMON SIRTIL

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Dr. Martin Ehenschwender

2. Berichterstatter: PD Dr. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Allgemeine Struktur und Signaltransduktion von TRAIL und den Todesrezeptoren TRAIL-R1/-R2	4
1.2 Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs durch TRAIL	5
1.3 Crosslink extrinsischer und intrinsischer TRAIL-aktivierter Apoptoseweg ...	6
1.4 Resistenzmechanismen der TRAIL-induzierten Apoptose.....	7
1.5 Hyperosmolarer Stresseinfluss auf Tumorzellen	8
1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit	9
2 Methoden	10
2.1 MTT-Zytotoxizitätsassay	10
2.2 Caspase-Aktivitätsmessung	10
2.3 Durchflusszytometrie	11
2.4 Western Blot	11
2.5 Statistische Auswertung	12
3 Diskussion	13
3.1 Aktuelle Studienlage	13
3.2 Sensitiverung der Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose	14
3.3 Translationaler Ausblick und Zusammenfassung	15
4 Originalarbeit	13
5 Publikation, Vorträge & Preise	36
5.1 Vorträge	36
5.2 Wissenschaftliche Preise & Auszeichnungen	37
6 Literaturverzeichnis	38
7 Erklärung zum Promotionsverfahren	47
8 Danksagung	
9 Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Struktur und Signaltransduktion von TRAIL und den

Todesrezeptoren TRAIL-R1/-R2

Der „TNF-related-apoptosis-inducing-ligand“ (TRAIL) wurde 1995 als neues Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie (TNFSF) entdeckt und charakterisiert. In der humanen Form dienen 281 Aminosäuren als Grundstruktur des Typ II Transmembranproteins, dessen extrazellulärer C-terminaler Teil prozentual unterschiedlich sequenzhomolog zu anderen TNFSF-Mitgliedern (z.B. TNF α (23%), FasL (23%), LT α (22%), etc.) konserviert gestaltet ist (1). Die Tumor-Nekrose-Faktor-(Rezeptor)-Superfamilie (TNF(R)SF) subsumiert multiple Rezeptoren und Liganden mit unterschiedlichsten zellphysiologischen Steuerungsmöglichkeiten (2, 3). Bereits kurz nach der Klonierung des Proteins konnte das Apoptose-induzierende Potential des Todesliganden TRAIL detektiert werden (1, 4). In den therapeutischen Fokus rückte TRAIL nachdem gezeigt werden konnte, dass der Ligand als einziger Vertreter der TNF-Superfamilie selektiv in Tumorzellen Apoptose induzieren kann (5). Die humanen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 sind aufgrund ihrer intrazellulären „death domains“ (Todesdomänen) als Zellsignalt transferierende Rezeptoren funktionell vergleichbar, jedoch divergiert zelltypspezifisch der Beitrag zur Apoptoseinduktion. Das am TNF-Rezeptor 1 entdeckte Motiv der Todesdomäne, bestehend aus 60 - 80 Aminosäuren, spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Frage, ob eine Zelle eher proinflammatorisches oder proapoptotisches Signaling betreibt (6, 7). Strukturell weisen die Typ I Transmembranproteine als Subklassenvertreter der TNFRSF extrazellulär zudem drei cysteinreiche Domänen auf, deren sechs Cysteinreste durch Ausbildung von drei Disulfidbrücken zur Rezeptorstabilisierung und Ligandeninteraktion beitragen (6). Ein Nachweis der TRAIL-Rezeptor 1 und 2 Expression zeigte sich in verschiedensten Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Kolon-Karzinom (8), dem Mamma-Karzinom (9) oder dem Glioblastom (10). TRAIL-Rezeptor 1 dient dabei in Pankreaskarzinomzellen, bei der Chronisch Lymphatischen Leukämie oder beispielsweise dem Mantelzell-Lymphom als Transduktor des apoptotischen Signals (11, 12, 13). Die Vielfalt der Tumorentitäten, welche TRAIL Todesrezeptoren exprimieren, unterstreicht dabei die therapeutische Bandbreite einer möglichen TRAIL-induzierten Apoptose.

1.2 Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs durch TRAIL

Trimeres TRAIL mit konsekutiver Rezeptor-Trimerisierung von TRAIL-Rezeptor 1 oder 2 stellt das anfängliche Grundgerüst einer erfolgreichen „death inducing signaling complex“ (DISC) Bildung dar, welches dann als höhermolekuläre TRAIL-Formation eine effiziente Apoptoseinduktion einleitet. Das intrazelluläre Adapterprotein Fas-associated protein with death domain (FADD) wird über seine „death domain“ an die intrazelluläre „death domain“ des TRAIL-Rezeptors rekrutiert (14, 15). Stöchiometrisch wird dabei ein einzelnes FADD-Molekül an drei TRAIL-Rezeptoren räumlich assoziiert. Durch das Vorhandensein einer sogenannten „death effector domain“ (DED) rekrutiert nun wiederum das Adapterprotein FADD multiple, enzymatisch-inaktive Procaspasen (v.a. die Initiatorcaspase 8) über deren DEDs an den membranassoziierten Komplex heran. Ein Kettenmodell, bei dem die erste Procaspase direkt DED vermittelt mit FADD homotypisch interagiert und die räumlich folgenden Procaspasen untereinander über DEDs verbunden sind, wurde dabei publiziert (16). Beide Initiatorcaspasen 8 und 10 lokalisieren und aktivieren sich am DISC. Die entscheidende Initiatorcaspase innerhalb der ablaufenden Apoptose ist Caspase 8, deren signaltransduzierende Wirkung nicht von Caspase 10 generiert oder ersetzt werden kann (17). Die Aktivierung der Procaspase 8 erfolgt mittels Konformationsänderung, getriggert durch räumliche Nähe zum DISC, sowie anschließender autokatalytischer Aktivierung und Homodimerbildung (18). Der DISC als zentraler Steuerungsort und Regulator der Zelltodkaskade unterliegt variablen Aktivitätsmodulatoren. Cullin 3 polyubiquitiniert als E3-Ligase kleine katalytische Untereinheiten der Caspase 8 Moleküle, was p62 vermittelt zu einer Stabilisierung der aktivierten Initiatorcaspasen und damit auch zur gesteigerten DISC-Aktivierung führt (19). Das Ubiquitinsystem besitzt darüber hinaus auch DISC aktivitätsmindernde Eigenschaften, beispielsweise über die E3 Ligase TRAF 2 (TNF-receptor associated factor 2). Caspase 8 Moleküle werden mittels K48 konjugierter Ubiquitinketten an der großen katalytischen p18 Untereinheit markiert. Die DISC-Aktivität wird dann durch die TRAF 2 getriggerte proteosomale Degradation der Caspasen in Folge herabgesetzt (20). Eine weitere Regulationsmöglichkeit der TRAIL-induzierten Apoptose bieten die sogenannten cFLIP-Proteine (cellular FLICE-like inhibitory proteins).

Drei verschiedene Splicevarianten (cFLIP-long 55 kDa; -short 27kDa; -Raji 25 kDa) werden auf Proteinebene exprimiert und fungieren teils divergent zueinander. Je nach Expressionsniveau bieten die cFLIP-Isoformen der Zelle also die Möglichkeit, aufgrund der kurzen Proteinhalbwertszeit schnell auf eine veränderte Zellhomöostase reagieren oder Resistenzen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose ausbilden zu können. Die Isoformen cFLIP-short und -Raji können dabei an das Adapterprotein FADD binden, ohne dabei jedoch das proapoptotische Signal, wie Initiatorcaspase 8, weiterzuleiten. Die Isoform cFLIP-long zeigt je nach Expressionsniveau unterschiedliche Wirkungsweisen. Proapoptotisch wirksam bei eher geringeren Expressionsraten und konträr dazu antiapoptotisch wirksam bei hohen Expressionsniveaus (21, 22). Ziel der DISC-Bildung ist die Effektorcaspasen Aktivierung, um das am Todesrezeptor generierte Zelltodsignal innerhalb der Signalkaskade weiterführen zu können.

1.3 Crosslink extrinsischer und intrinsischer TRAIL-aktivierter Apoptoseweg

Das über den TRAIL-Todesrezeptor nach intrazellulär transportierte Zelltodsignal wird dabei abhängig vom Zelltyp auf zwei unterschiedlichen apoptotischen Signalkaskaden weitergeleitet. Typ-I Zellen erreichen eine DISC-Aktivierung, deren Stärke eine Initiatorcaspase-8 Aktivierung mitsamt konsekutiver Effektorcaspasen Beteiligung und Apoptoseinduktion initiiert. Typ-II Zellen, denen eine robuste Aktivierung von Effektorcaspase 3 auf direktem DISC-Wege nicht gelingt, nutzen das Mitochondrium als Amplifikationsort des Zelltodsignals. Die am DISC aktivierte Caspase 8 spaltet das BH3-only Protein Bid am Aspartatrest 60 proteolytisch, mit einer sich daran anschließenden Translokation von tBid zum Mitochondrium (23). Das 15 kDa große tBid enthält dabei den C-terminalen Bid-Proteinanteil (24). Die Proteine Bax und Bak liegen im nicht aktivierten Zustand als Monomere vor und wechseln erst nach erfolgter Konformationsänderung im Rahmen der Aktivierung in einen oligomerisierten Zustand (25, 26, 27). Eine von Bax und Bak induzierte Porenbildung führt final zur Permeabilisierung der äußeren Membran (MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization) und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c oder SMAC (second mitochondria derived activator of caspases) (28). Bax liegt dabei überwiegend im Zytosol lokalisiert vor und nur ein geringer Teil weist eine Membranassoziation auf.

Antiapoptotisch wirksame Proteine, wie beispielsweise Bcl-xL, sorgen durch eine Retranslokation dafür, dass Bax als potentiell porenbildendes Protein in ‚steady-state‘ Bedingungen nur sehr eingeschränkt zur Verfügung steht (29).

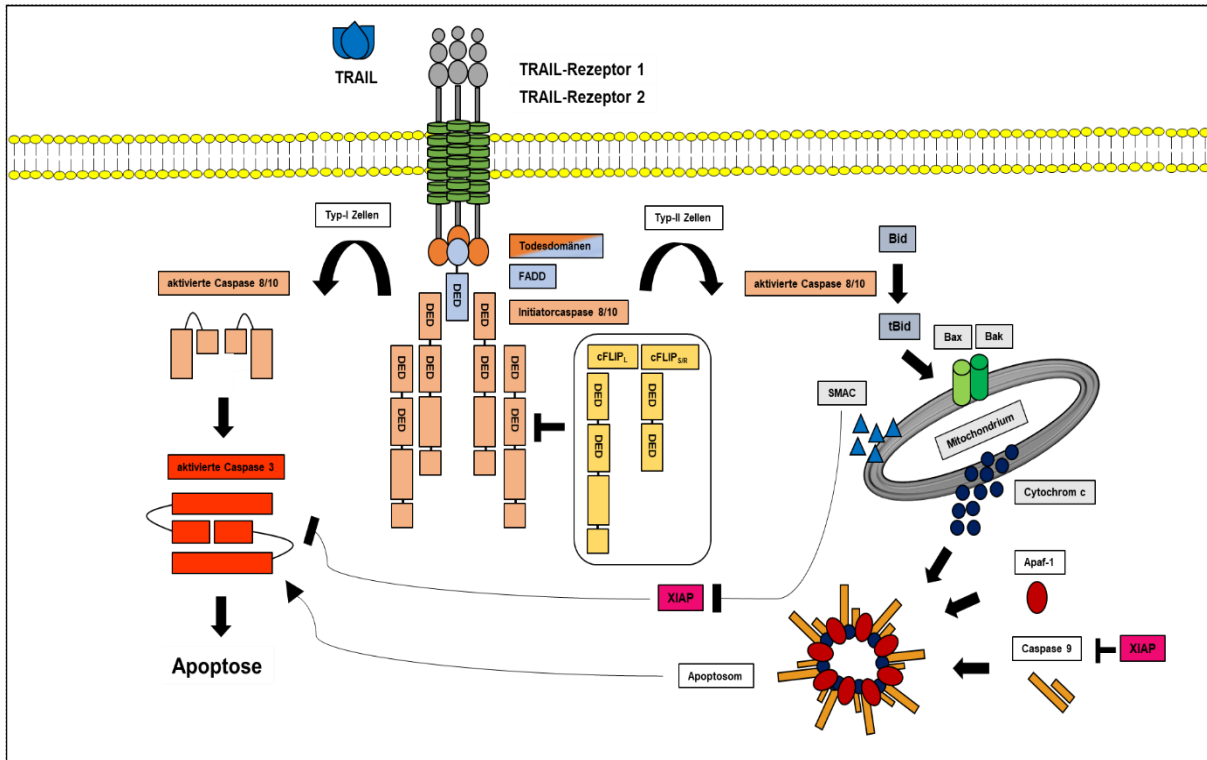


Abbildung: Schema der TRAIL-induzierten Apoptose. Modifiziert nach Karstedt, Montinaro et al (30).

Nach der Bindung von trimerem TRAIL an die trimerisierten TRAIL-Todesrezeptoren 1 oder 2, erfolgt über die Rezeptor-Todesdomänen („death domains“) die Rekrutierung des Adapterproteins FADD an den Rezeptorkomplex. Durch Interaktion der Todeseffektordomänen („death effector domains“) wird nun vor allem die Initiatorcaspase 8 im Anschluss an den membranassoziierten Komplex heranzurekrutiert. Typ-I Zellen aktivieren in der Folge direkt die Effektorcaspasen, während Typ-II Zellen das Mitochondrium nutzen, um das Zelltodsignal zu verstärken. Über tBid wird das Zelltodsignal zum Mitochondrium transferiert und dort mittels Bax und Bak induzierter Porenbildung durch konsekutive Freisetzung proapoptotischer Moleküle, wie bspw. Cytochrom c, verstärkt. Die gemeinsame Endstrecke erfolgt unter anderem über die aktivierte Effektorcaspase 3 und die letztliche Apoptoseinduktion.

1.4 Resistenzmechanismen der TRAIL – induzierten Apoptose

An der Zelloberfläche bietet die TRAIL-Rezeptorexpressionsrate einen Angriffspunkt, um eine TRAIL-Resistenz induzieren zu können. Bei Zellen der Akuten Lymphatischen Leukämie konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von TRAIL-Rezeptor 1 negativ mit der Zelltodrate korreliert (31). Mutationen an der intrazellulären Todesdomäne oder der Ligandenbindungstasche zeigten, dass die Rezeptorintegrität entscheidend für eine potente Apoptoseinduktion ist (32).

Auf verschiedene Art und Weise kann es den Tumorzellen gelingen, das transferierte Todessignal innerhalb der ablaufenden Signalkaskade zu inhibieren. Eine Möglichkeit die TRAIL-Sensitivität der Tumorzellen zu beeinflussen, besteht durch Modulation der sogenannten IAPs (inhibitor of apoptosis proteins). XIAP, cIAP1 und cIAP2 spielen dabei in der TRAIL-induzierten Zelltodkaskade eine besondere Rolle. Durch direkte Caspasenhemmung oder durch Ubiquitin vermittelte Markierung für den proteosomalen Abbau, greifen die IAPs antiapoptotisch in den Zelltodprozess ein. Eine erhöhte XIAP / cIAP Expressionsrate kann also ebenfalls mit einer gesteigerten Therapieresistenz von Tumorzellen assoziiert sein (33). Typ-II Zellen sind aufgrund ihrer mitochondrialen Abhängigkeit anfällig für eine Resistenzentwicklung durch die Hochregulation antiapoptotischer Proteine oder die Expressionsminderung proapoptotischer Proteine. Innerhalb der TRAIL-induzierten Signalkaskade wurde beispielsweise eine Hochregulation antiapoptotisch wirksamer Proteine, wie Bcl-2, Bcl-xL oder Mcl-1, sowie ein Bax Expressionsverlust als potentieller Resistenzgrund eruiert. Durch eine Aktivierungsblockade der porenbildenden Proteine Bax und Bak sorgen Bcl-2, Bcl-xL oder Mcl-1 dabei für eine Fehlregulation der apoptotischen Signalkaskade (34, 35, 36, 37).

1.5 Hyperosmolarer Stresseinfluss auf Tumorzellen

Erste Ergebnisse hinsichtlich eines Natriumchlorid spezifischen Effekts auf Tumorzellen wurden 1960 publiziert. An HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine Natriumchlorid Konzentration von 100-130 mM im Zellkulturmedium optimal für ein gesteigertes Wachstum nutzen können. Bei höheren Konzentrationen zeigten die HeLa Zellen allerdings eine deutlich verminderte Wachstumsrate. Bei eingesetzten NaCl Konzentrationen von 190 oder 220 mM Natriumchlorid konnten pro Zelle im Medium vermehrte RNA- und Proteinmengen detektiert werden, zusammen mit einer eher gleichbleibenden DNA-Menge ein Hinweis auf eine osmotisch induzierte Dysfunktion der Zelle (38). In Vorarbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass hyperosmotischer Stress beispielsweise HeLa Zellen, mit natürlicher Resistenz gegenüber einer TNF α -induzierten Apoptose, für eben selbige sensitivieren und eine veränderte Aktivierbarkeit des intrinsischen Apoptosewegs bedingen kann (39).

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Selektivität der Zelltodinduktion unterscheidet den Todesliganden TRAIL beispielsweise von anderen Mitgliedern der Tumornekrose-Superfamilie, wie TNF- oder Fas-Liganden, welche ihr proapoptotisches Tumorwirkspektrum mit teils letalen Nebenwirkungen kompromittierten (40, 41). Der alleinige TRAIL-Einsatz in nicht malignen Gewebsarten hingegen, zeigte primär keinen systemzytotoxischen Effekt und führte darüber hinaus bei den ersten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen in unterschiedlichen Tumorentitäten zu einer verminderten Tumorprogression und einer gesteigerten Tumorzelltodrate (42). Neben den Schwierigkeiten, das vielversprechende präklinische Potential in klinische Studien transferieren zu können, rückten zunehmend Resistenzmechanismen in den Mittelpunkt der TRAIL-Forschung. Die Mechanismen der TRAIL Resistenz sind dabei ein Grund für den bisher geringen klinischen Erfolg. Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen ob durch hyperosmotischen Stress die Apoptoseinduktion der TRAIL-Todesrezeptoren in Tumorzellen mit ansonsten geringer TRAIL-Responsivität gesteigert werden kann.

2 Methoden

2.1 MTT-Zytotoxizitätsassay

In 96-Multiwell-Platten wurden pro Well 2×10^4 Zellen in 50 μl Medium eingesetzt (bzw. 7×10^4 REH und TF-1-Zellen). Nach simultaner Stimulation von jeweils zwei Wells mit TRAIL und NaCl oder einer anderen osmotisch wirksamen Substanz, wurden die Zellen nach 18 h mit je 10 μl MTT pro Well pipettiert und die 96-Multiwell-Platte daraufhin für 2 h bei 37° C inkubiert. Um die Reduktion des MTTs zu stoppen wurden im Anschluss 90 μl MTT-Lysepuffer pro Well addiert und die Platte wiederum bei 37° C über Nacht inkubiert. Der Mittelwert eines unbehandelten Duplikats wurde als 100 % festgelegt und die Färbeintensität der Stimulationsgruppen darauf prozentual bezogen. Die Datenpunkte der Graphen entsprechen den Mittelwerten der zwei Wells von drei unabhängigen Experimenten.

2.2 Caspase-Aktivitätsmessung

Die zu messenden Zellen (2×10^4 bzw. 3×10^4 / Well) wurden in eine 96-Blackwell-Zellkulturplatte (Flachboden) ausgesät und nach Inkubation über Nacht für unterschiedliche Zeitspannen stimuliert. Um die entsprechende Caspasen-Aktivierung detektieren zu können, wurde das Caspase-spezifische Cell Meter™ Activity Apoptosis Assay Kit (AAT Bioquest Incorporated, Sunnyvale, Californien, USA) verwendet. Analog zum Hersteller-Protokoll wurde nach Ablauf der Zellstimulation das Caspase Substrat in Kombination mit dem Assay-Puffer in einer Menge von 100 μl pro Well dazugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur dunkelinkubiert. Die 96-Blackwell-Platte wurde im Anschluss für 3 Minuten bei 300 g abzentrifugiert und anschließend mit dem Victor³ Multilabel Reader (Perkin Elmer Incorporated, Waltham, MA, USA) ausgewertet.

2.3 Durchflusszytometrie

Phosphatidylserin, als physiologisch im Zytosol lokalisiertes Phospholipid, kann durch den Apoptose induzierten Zusammenbruch der Zellmembran mittels einer Annexin-V-Färbung calciumabhängig an der extrazellulären Seite der Zellmembran detektiert werden (43, 44). 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D) wird dabei zusätzlich als fluoreszierender Interkalator eingesetzt. Nur in permeabilisierten, avitalen Zellen kann 7-AAD an die DNA binden und eine im FACS detektierbare, spektrale Verschiebung generieren (45). $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden dafür pro Zellkulturschale ausgesät und nach 16 h Stimulation in ein 15 ml Falcon übertragen. Nach wiederholter Zentrifugation (500 g / 5 min) und zwischenzeitlicher Resuspension in jeweils 100 µl FACS-Puffer wurde jede Zellprobe mit 4 µl Annexin und 3 µl 7-AAD für 15 Minuten bei 4° C lichtgeschützt inkubiert (46). Nach Ablauf der Zeit wurden 300 µl Annexin-Färbepuffer pro Messgruppe addiert und die einzelnen Proben an einem Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Biosciences) ausgewertet. Durch Zugabe eines TRAIL-Rezeptor spezifischen Phycoerythrin(PE)-konjugierten Antikörpers (ProSci, Poway, Californien, USA) oder einer Isoform (R&D Systems, Minnesota, USA) konnte die zelloberflächliche Rezeptorexpressionsrate erfasst werden. BAX Konformationsänderungen wurden äquivalent wie in (47) beschrieben detektiert. Zur Messung mitochondrialen Membranpotentials wurde das MitoScreen Kit (#551302, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet.

2.4 Western Blot

Nach vierminütiger Zentrifugation (400 g, Eppendorf Centrifuge 5417R) wurde der Zellpelletüberstand mittels Vakuumpipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend mit 200 µl 1x Tritonlysepuffer (TBS mit 1 % Triton) resuspendiert und 40 Minuten auf Eis gelagert. Durch Zugabe des nicht-ionischen Detergens Triton X-100 bricht die Zellmembranintegrität zusammen und zytosolische Proteine können detektiert werden. Nach 40 Minuten wurde das Eppendorf-Cup mit den lysierten Zellen für 20 Minuten bei 4° C und 20.000 g erneut abzentrifugiert. 150 µl des Überstands wurden mit 50 µl 4 x Laemmli Puffer (+ 165 µl Mercaptoethanol frisch zugegeben) versetzt und im Anschluss bei 96° C für 5 Minuten aufgekocht. Nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Gele auf Polivenylfluorid-Membranen transferiert.

Nach Ablauf des Transfers wurde die Blot-Kassette aus dem Tankblot entnommen und die Membranen für 1-2 h in Blockpuffer (TBS (Tris-buffered saline) mit 5 % Magermilchpulver (w/v) und 0,1 % Tween 20 (v/v)) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen für Proteinbindungen auf der PVDF-Membran zu blocken. Die Membranen wurden danach mit dem spezifischen Primär-Antikörper (6-9 mL, gelöst in Roti®-Block) gegen das entsprechend gesuchte Protein über Nacht bei 4° C inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen zweimal mit je 10 mL TBS-T (0,05 %) gewaschen und dann für 2 h mit dem jeweils passenden HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper (6-9 mL, gelöst in Blockpuffer) bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T im Anschluss wurden die Membranen mit je 5 ml ECL-Western Blot Substrat Lösung bzw. 1 mL SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) (4 mL Luminol in 0,1 M TBS, 400 µl Dimethylsulfoxid, 1,3 µl H₂O₂ bzw. 500 µl SuperSignal® West Femto Stable Peroxide Buffer, 500 µl SuperSignal® West Femto Luminol Enhancer Solution) benetzt und daraufhin am INTAS Chemilux Pro via INTAS ChemoCam Western Blot Imaging System (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet.

2.9 Statistische Auswertung

Die aufgetragenen Datenpunkte entsprechen jeweils unabhängigen Experimenten, angegeben mit Mittelwert +/- Standardfehler. Verglichen wurde mittels Student's *t*-test (in den Graphiken mit **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001 und *****p* < 0.0001 gekennzeichnet).

3 Diskussion

3.1 Aktuelle Studienlage

TRAIL präsentiert im Vergleich mit anderen Vertretern der TNFSF ein relativ schmales Nebenwirkungsprofil. Eine letale Hepatotoxizität oder eine systemische Reaktion, wie unter Einsatz von rekombinanten Fas-Liganden oder Fas-agonistischen Antikörpern beobachtet, konnte nicht oder nur in abgeschwächter Form detektiert werden (48, 40). Mit dem Ziel das vielversprechende *in vitro*-Potential in klinische Studien transferieren zu können, wurden 1999 die erste Ergebnisse mit Dulanermin publiziert, der ersten und einzigen rekombinant-konstruierten und in klinischen Studien getesteten TRAIL-Variante (42). In den sich anschließenden Phase-I-Studien konnte die gute Verträglichkeit des synthetischen Todesliganden auch in Kombination mit Chemotherapeutika mehrfach bestätigt werden (49, 50). Die daraufhin angestrebten randomisiert-kontrollierten Studien zeigten allerdings, dass kein signifikant vermehrtes klinisches Ansprechen durch TRAIL und einen Kombinationspartner (wie Chemotherapeutika) generiert werden konnte. Weder beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, noch beim Non-Hodgkin Lymphom konnte beispielsweise ein gesteigertes, antitumoröses Ansprechen induziert werden (51, 52). Die bisher einzig publizierte Phase III Studie mit signifikant besserem Outcome mit Blick auf das progressionsfreie Überleben wurde allerdings auch an Patienten mit fortgeschrittenen Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen durchgeführt. Dabei zeigte der kombinatorische Ansatz mit Dulanermin, Cisplatin und Vinorelbin, verglichen mit der Kontrollgruppe, allerdings auch keinen signifikanten Vorteil im Gesamtüberleben (53). Durch die Entwicklung spezifischer Antikörper konnte selektiv, je nach Zelloberflächenprofil, über den jeweils dominierenden TRAIL-Todesrezeptor der Tumorentität Zelltod induziert werden. Mapatumumab ist bis heute der einzige TRAIL-R1 spezifische Antikörper mit klinischer Studienbeteiligung. Für TRAIL-R2 wurden mit Conatumumab, Lexatumumab, Tigatuzumab, Drozitumab und LBY-135 verschiedene agonistische Antikörper entwickelt, jedoch zeigte sich auch hier, wie bei Mapatumumab, dass in sämtlichen Phase I / II Studien nur ein mäßiger Erfolg mit Blick auf ein besseres Therapieansprechen verzeichnet werden konnte.

Weder singular, noch im kombinatorischen Ansatz mit einem Chemotherapeutikum oder dem Proteaseinhibitor Bortezomib konnte durch Dulanermin oder einen der TRAIL-spezifischen Antikörper ein signifikanter, antitumoröser Effekt erzielt werden (54, 55, 56, 57, 58, 59).

3.2 Sensitiverung der Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose

Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit konnten zum ersten Mal zeigen, dass osmotischer Stress gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensitivierend wirkt. Zahlreiche Studien wurden bisher durchgeführt, um das *in vitro* Potential des Todesliganden TRAIL quantifizieren zu können. Unterschiede, zu dem in dieser Arbeit durch TRAIL und osmotischen Stress erzielten apoptotischen Phänotyps, zeigten sich unter anderem in der Zelltodrate der Tumorzellen oder korrelierenden Veränderungen innerhalb der TRAIL-induzierten Signalkaskade. Während oftmals zwischen 10 und 70 Prozent der Tumorzellen, bei kombinatorischem Einsatz von TRAIL (oder einem TRAIL-Rezeptoragonisten) und einem weiteren sensitivierenden Stimulus in die Apoptose transferiert wurden, konnten unter Einsatz von Natriumchlorid und TRAIL, je nach Zelltyp 80 – 90 % der Tumorzellen eradiziert werden (60, 61, 62). Im Rahmen von Studien konnten viele Sensitivierungsmechanismen kausal auf zelloberflächliche bzw. zellinterne Veränderungen zurückgeführt werden. Hochregulation von TRAIL-Rezeptor 2 oder eine cFLIP-Modifikation wurden beispielsweise als korrelierende Zelladaptation im Rahmen einer gesteigerten TRAIL-induzierten Apoptose ermittelt (63, 64). Die Rezeptorexpression und die untersuchte Proteinkomposition der SK-Mel-3 und HCT116 Zellen, zeigten hingegen unter singularer Natriumchlorid Stimulation keine oder nur geringe Veränderungen, wie eine verminderte Mcl-1 Expression der HCT116 Zellen. Das sensitivierende Natriumchlorid führte im kombinatorischen Einsatz mit TRAIL zu einer potent ablaufenden Zelltodkaskade mit entsprechenden Proteinmodifikationen (z.B. Prozessierung von Bid), jedoch ohne, wie bei anderen Studien gezeigt, singular als Natriumchlorid quantitative Zellveränderungen bspw. auf Ebene der pro- oder antiapoptotischen Proteine zu initiieren. Der Signaltransport über Bid bzw. tBid hin zum Mitochondrium erwies sich dabei als entscheidend. Bei den kolorektalen HCT116 Karzinomzellen konnte so mittels Bid-Knockout Systemen gezeigt werden, dass die HCT116 Zellen zum einen Typ-II Zellen sind und die mitochondriale Amplifikation des TRAIL-induzierten Zelltodsignals bei den Typ-II HCT116 Zellen obligat Bid abhängig ist (65).

Bid als Schnittstelle zwischen extrinsischer und intrinsischer Apoptose scheint auch bei osmotischer Stressinduktion essentiell für eine potent ablaufende TRAIL-induzierte Signalkaskade zu sein. Durch den sehr geringen Zellviabilitätsabfall im Bid-Knockout System, konnte bei den HCT116 Zellen auch ein Wechsel von einem Typ-II hin zu einem Typ-I abhängigen Zelltodsystem unter osmotischer Stressinduktion ausgeschlossen werden. Voruntersuchungen im TRAIL sensitivierten HCT116 Zellsystem hatten teils einen Wechsel von Typ-II zu Typ-I Zellen beschrieben (66). Bax / Bak-Doppelknockout Zellsysteme und die nicht vorhandene gesteigerte Zelltodrate unter TRAIL und NaCl Einsatz, ließen Rückschlüsse zu auf die wichtige Rolle des Mitochondriums und der Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Tumorzellen durch hyperosmotischen Stress im Zellumfeld auf mitochondrialer Ebene eine Abhängigkeit von antiapoptotisch wirksamen Proteinen der BCL-2 Familie entwickelten. Bcl-xL konnte dabei unter anderem durch den Einsatz von selektiven Bcl-xL-Inhibitoren als entscheidendes Protein im HCT116 Zellsystem charakterisiert werden (Fig. 6g im Manuskript). Die antiapoptotische Bcl-xL-Kapazität, als direkter Regulator / Inhibitor der Effektorproteine Bax / Bak (z.B. durch eine Bax Retranslokation vom Zytosol ins Mitochondrium) reichte dann bei Zugabe des Todesliganden TRAIL nicht mehr aus, um eine Apoptoseinduktion verhindern zu können (29, 67). Hyperosmotischer Zellstress induziert also eine Art „mitochondriales Priming“, welches in einer möglicherweise zelltypspezifischen Bcl-2 Proteinabhängigkeit die antiapoptotischen Kapazitäten der Zelle herabsetzt. Dadurch kann die Zelle bei ankommendem Todessignal auf intrinsischem Weg die Permeabilisation des Mitochondriums nicht verhindern.

3.3 Translationaler Ausblick und Zusammenfassung

Der Todesligand TRAIL stellte nach seiner Entdeckung einen neuen Ansatz dar, selektiv in Tumorzellen Apoptose induzieren zu können. Vor dem Hintergrund, Therapieerfolge gerade auch bei Apoptose resistenten Tumorentitäten erzielen zu wollen, war es Ziel dieser Arbeit, TRAIL-resistente Zelllinien *in vitro* erneut für die Apoptose sensitivieren zu können. Wir konnten in unserer Arbeit osmotischen Stress im Tumorumfeld als neuen, verstärkenden Faktor einer TRAIL-induzierten Apoptose charakterisieren.

Viele bereits klinisch eingesetzte Zytostatika zielen wirkmechanistisch auf eine Deregulation der Bcl-2 kontrollierten, intrinsischen Apoptose ab und auch in Tumorzellen unter hypertonen Bedingungen zeigte sich, dass das Mitochondrium als Kontrollzentrum der intrinsischen Apoptose entscheidend für eine gesteigerte TRAIL-induzierte Apoptose ist (68). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung und Bindung antiapoptotischer Bcl-2 Proteine Tumorzellen in ihrer Fähigkeit proapoptotische Signale kompensieren zu können kompromittiert werden (69). Mechanistisch konnten wir auch bei hyperosmotischen gestressten Zellen eine Art „mitochondriales Priming“ detekieren, welches zusammen mit dem ankommenden TRAIL-induzierten Todessignal die Zellen vermehrt in die Apoptose treibt. Eine Bcl-xL-Abhängigkeit der mitochondrialen Integrität könnte dabei zelltypspezifisch sein und in anderen Zelllinien von differenten Proteinen abhängen. Ein Transfer in die Klinik könnte perspektivisch auf zwei Wegen erfolgen: Zum einen über weiterführende, mechanistische Untersuchungen mit dem Ziel den Wirkmechanismus des kombinatorischen TRAIL und Osmostress-Einsatzes molekular zu mimikrieren oder über die Generierung eines lokalen, hypertonen Kompartiments (bspw. beim Malignen Melanom). Hypertonizitäten (von ca. 40 mM Na⁺) wurden bisher beispielsweise im Rahmen von ablaufenden bakteriellen Entzündungen in der menschlichen Haut gemessen (70). Unter Hochsalzdiäten generierte Hyperosmolaritäten konnten zudem in der Haut, im Muskel- und anderen Gewebsarten beobachtet werden (71, 72). Gleichwohl physiologische Prozesse, wie eine Diffusion der Osmolyte, hierbei mit zu berücksichtigen wären.

4 Originalarbeit

Diese publikationsbasierte Dissertation beruht auf folgendem Originalartikel:

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

S. Sirtl et al.,

Oncogene, Nature Publishing Group, April 2018

5-year Journal Impact Factor: 6.429

doi: 10.1038/s41388-018-0265-5

Oncogene
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0265-5>

ARTICLE



Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

Simon Sirtl¹ · Gertrud Knoll¹ · Dieu Thuy Trinh¹ · Isabell Lang² · Daniela Siegmund² · Stefanie Gross³ · Beatrice Schuler-Thurner³ · Patrick Neubert¹ · Jonathan Jantsch¹ · Harald Wajant² · Martin Ehrenschrwender¹

Received: 18 October 2017 / Revised: 20 February 2018 / Accepted: 23 March 2018
 © The Author(s) 2018. This article is published with open access

Abstract

Attempts to exploit the cytotoxic activity of death receptors (DR) for treating cancer have thus far been disappointing. DR activation in most malignant cells fails to trigger cell death and may even promote tumor growth by activating cell death-independent DR-associated signaling pathways. Overcoming apoptosis resistance is consequently a prerequisite for successful clinical exploitation of DR stimulation. Here we show that hyperosmotic stress in the tumor microenvironment unleashes the deadly potential of DRs by enforcing BCL-2 addiction of cancer cells. Hypertonicity robustly enhanced cytotoxicity of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and other DR ligands in various cancer entities. Initial events in TRAIL DR signaling remained unaffected, but hypertonic conditions unlocked activation of the mitochondrial death pathway and thus amplified the apoptotic signal. Mechanistically, we demonstrate that hyperosmotic stress imposed a BCL-2-addiction on cancer cells to safeguard the integrity of the outer mitochondrial membrane (OMM), essentially exhausting the protective capacity of BCL-2-like pro-survival proteins. Deprivation of these mitochondrial safeguards licensed DR-generated truncated BH3-interacting domain death agonist (tBID) to activate BCL-2-associated X protein (BAX) and initiated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). Our work highlights that hyperosmotic stress in the tumor environment primes mitochondria for death and lowers the threshold for DR-induced apoptosis. Beyond TRAIL-based therapies, our findings could help to strengthen the efficacy of other apoptosis-inducing cancer treatment regimens.

Introduction

Death receptors (DR) stand out of the other tumor necrosis factor (TNF)-receptor superfamily members due to their capability to induce regulated forms of cell death (apoptosis and/or necroptosis). The discovery that DRs such as CD95 and TNF-related apoptosis-inducing receptor 1 (TRAIL-R1) and TRAIL-R2 are expressed on malignant cells rendered DRs a potential target in cancer therapy and spurred in-depth investigations of DR signaling networks [1–4]. Upon activation, the DRs CD95, TRAIL-R1, and TRAIL-R2 assemble a death-inducing signaling complex (DISC) to promote caspase-8 activation, the starting point of the extrinsically triggered apoptotic cascade. Caspase-8 promotes apoptosis either in a straightforward manner through robust activation of the caspase-3 (type-I cells), directly heralding the execution phase of apoptosis. Alternatively, active caspase-8 cleaves the BH3-interacting domain death agonist (BID) to truncated BID (tBID), which in turn stimulates BCL-2-associated X protein (BAX) and BCL-2-

These authors contributed equally: Simon Sirtl, Gertrud Knoll.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0265-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Martin Ehrenschrwender
martin.ehrenschrwender@ukr.de

¹ Institute of Clinical Microbiology and Hygiene, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, Regensburg 93053, Germany

² Division of Molecular Internal Medicine, Medical Clinic and Polyclinic II, University Hospital Würzburg, Röntgenring 11, Würzburg 97070, Germany

³ Department of Dermatology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Ulmenweg 18, Erlangen 91054, Germany

Published online: 30 April 2018

SPRINGER NATURE

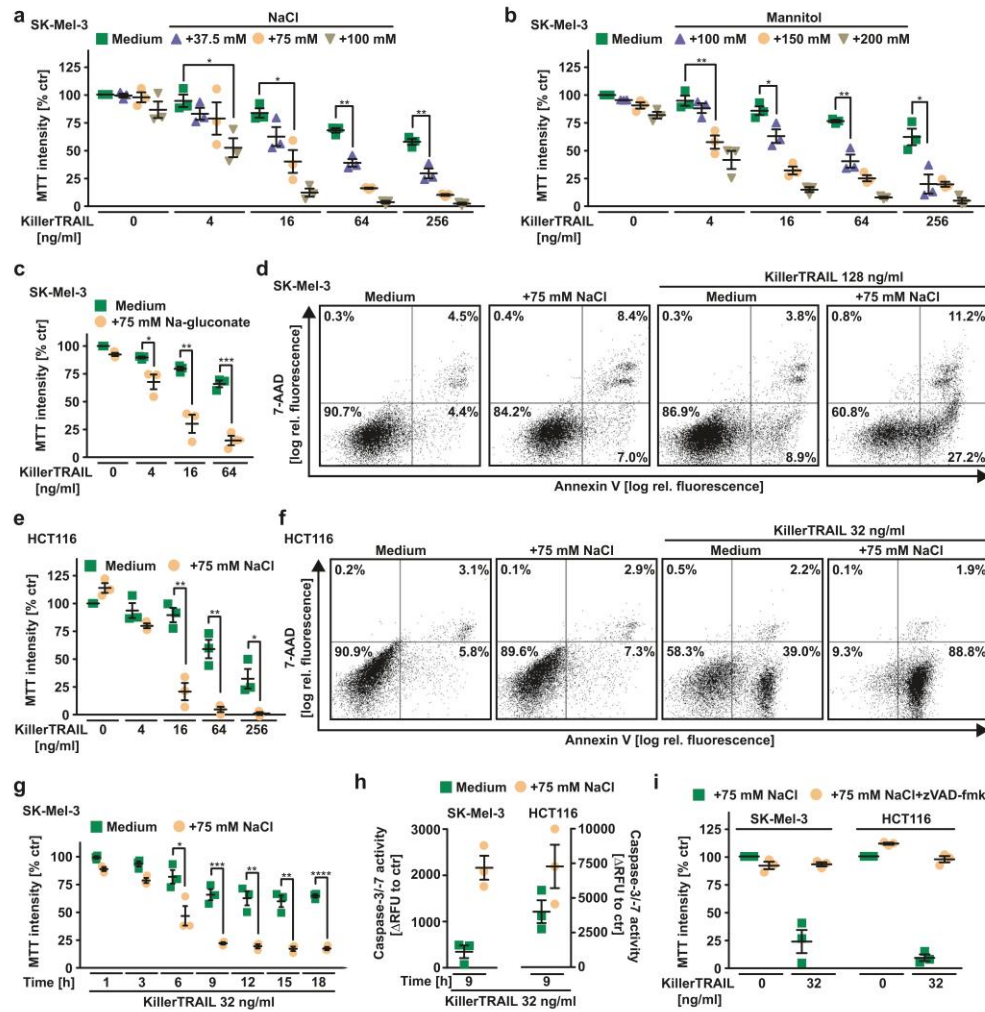


Fig. 1 Hyperosmotic stress enhances TRAIL-induced apoptosis. **a–c** and **e** SK-Mel-3 and HCT116 cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of the indicated concentrations of **a, e** NaCl, **b** mannitol, and **c** sodium gluconate. **d** and **f** SK-Mel-3 and HCT116 cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL for 6 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). Cells were subsequently analyzed by flow cytometry for 7-AAD- and annexin-V positivity. Data shown are representative of two experiments performed. **g** SK-Mel-3 cells were challenged with KillerTRAIL (32 ng/ml) for the indicated periods of

time in the presence and absence of NaCl (75 mM). **h** SK-Mel-3 (left side) and HCT116 cells (right side) were treated with KillerTRAIL (32 ng/ml) for 9 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). Caspase-3/7 activity was assessed using the fluorogenic substrate (DEVD)₂-R110. **i** SK-Mel-3 and HCT116 cells were challenged with KillerTRAIL (32 ng/ml) in the presence and absence of NaCl (75 mM) and zVAD-fmk (100 μ M). With the exception of **d** and **f**, data points and mean \pm SEM from three independent experiments are shown. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, * $p < 0.0001$, RFU, relative fluorescence units

antagonist/killer (BAK) activity [5, 6]. Subsequent mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) releases cytochrome c and second mitochondria-derived

activator of caspases (SMACs), triggering assembly of the caspase-9-activating apoptosome and antagonizing anti-apoptotic inhibitor of apoptosis (IAP) proteins, respectively.

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

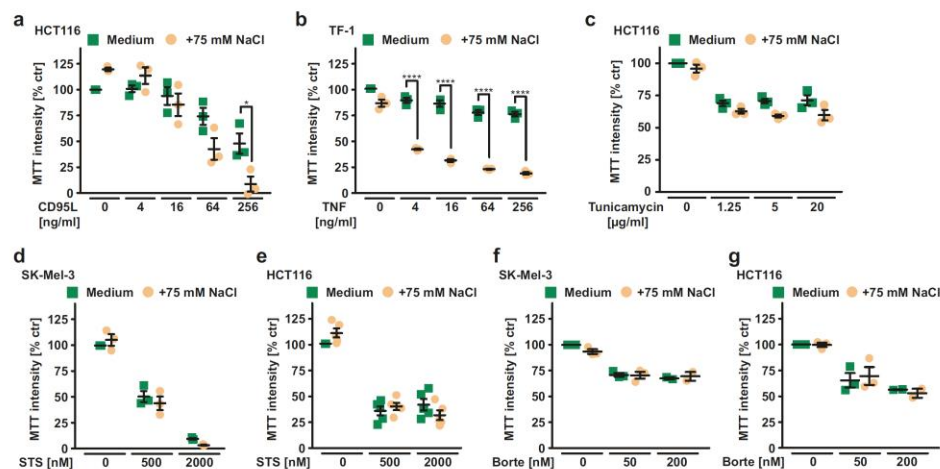


Fig. 2 Hypertonicity specifically sensitizes to death receptor-mediated cytotoxicity. **a–g** HCT116, TF-1, and SK-Mel-3 cells were challenged with the indicated concentrations of **a** CD95L, **b** TNF, **c** tunicamycin, **d** and **e** staurosporine, and **f** and **g** bortezomib in the presence and

absence of NaCl (75 mM). Shown are data points and mean \pm SEM from three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$, Borte, bortezomib; STS, staurosporine

Both events cooperate in caspase-3 activation and thus propagate cell death in a type-II mode.

Translating early *in vitro* and *in vivo* findings into strategies for DR-directed cancer therapy faces major challenges. Fulminant liver toxicity of CD95 agonists precluded further clinical evaluation [7, 8]. TRAIL, the cognate ligand of TRAIL-R1 and -R2, potently killed cancer cells without lethal adverse effects [3, 4], but TRAIL-based therapies thus far failed in clinical trials [9]. The latter was (among others) attributed to insufficient potency of the drug candidates to activate TRAIL DRs and resistance of many primary tumors to TRAIL-induced apoptosis [10]. Several cell intrinsic factors contribute to apoptosis resistance, e.g., high levels of anti-apoptotic proteins. Notably, a pivotal role for the tumor microenvironment is also emerging [11]. We previously reported that the hypoxic tumor environment regulates TRAIL sensitivity in colorectal cancer cells through mitochondrial autophagy [12]. Here we show that hyperosmotic stress in the tumor environment robustly enhances cytotoxicity of TRAIL and other DR ligands in various cancer entities. Early events in TRAIL DR signaling remained unaffected, but hypertonic conditions amplified the DR-triggered apoptotic signal by unlocking tBID-mediated activation of the mitochondrial death pathway. Hyperosmotic stress imposed a BCL-2 addiction on cancer cells to safeguard the integrity of the outer mitochondrial membrane (OMM). This overburdened the remaining protective capacity of BCL-2-like pro-survival proteins to neutralize DISC-generated tBID, which in turn activated BAX and

initiated MOMP. Mechanistically, our work identifies the osmotic pressure in the tumor microenvironment as a biophysical factor that affects mitochondrial priming and thus modulates the threshold for DR-induced apoptosis. Beyond TRAIL-based therapies, our findings could help to strengthen the efficacy of other apoptosis-inducing cancer treatment regimens.

Results

Hypertonic conditions robustly enhance DR-induced apoptosis

Exogenous addition or accumulation of osmotically active solutes that cannot passively diffuse across the plasma membrane (e.g., NaCl or mannitol) establishes an osmotic pressure gradient between the intra- and extracellular space (hyperosmotic stress or hypertonicity). Cellular adaption to hyperosmotic stress requires (among others) activation of nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5), an essential transcription factor for upregulation of osmoprotective genes (Supplementary Figure S1a) [13]. Treatment of melanoma cells (SK-Mel-3) with an oligomerized and highly bioactive TRAIL variant (KillerTRAIL, hereafter referred to as TRAIL) displayed significantly enhanced killing when hypertonic conditions were generated by adding NaCl, mannitol, or sodium gluconate (Fig. 1a–c). All osmolytes exerted no significant cytotoxic effect per se, but drastically

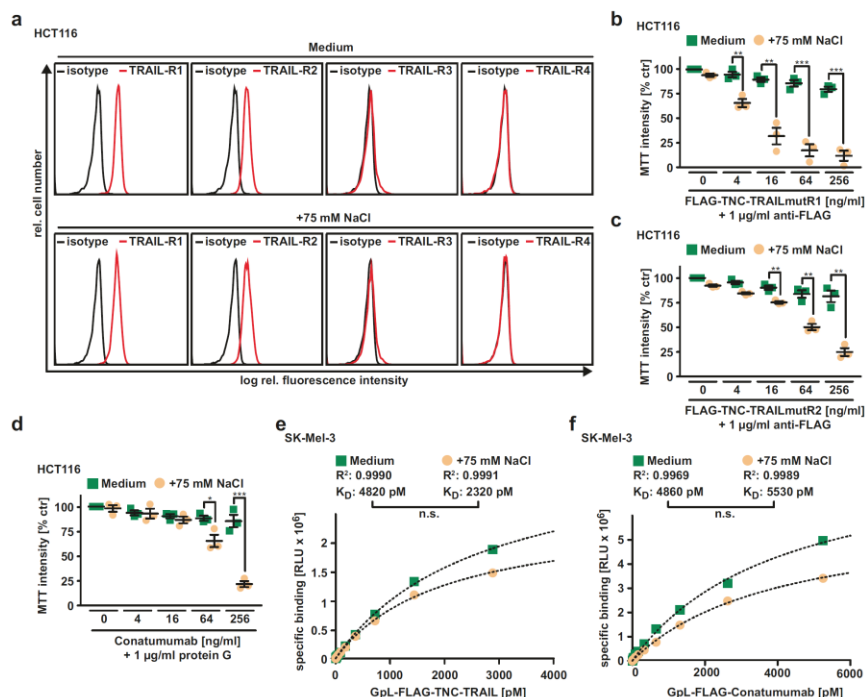


Fig. 3 Changes in tonicity do not affect TRAIL-receptor expression and receptor-ligand interaction. **a** Cell surface expression of TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, and TRAIL-R4 was analyzed in HCT116 cells using flow cytometry. Data shown are representative of two experiments performed. **b** and **c** HCT116 cells were challenged with the indicated concentrations of **b** FLAG-TNC-TRAILmutR1 and **c** FLAG-TNC-TRAILmutR2 (both artificially cross-linked by adding anti-FLAG antibody) in the presence and absence of NaCl (75 mM). **d** HCT116 cells were treated with the indicated concentrations of the TRAIL-R2 targeting, agonistic antibody conatumumab (artificially

cross-linked by adding protein G) in the presence and absence of NaCl (75 mM). For **b–d**, data points and mean \pm SEM from three independent experiments are shown. **e** and **f** Equilibrium binding studies were performed by incubating SK-Mel-3 cells with the indicated concentrations of **e** GpL-FLAG-TNC-TRAIL and **f** GpL-FLAG-conatumumab as detailed in “Materials and methods.” Binding curves and R^2 values shown are representative of three experiments performed; K_D values shown were calculated from three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$; n.s., not statistically significant; RLU, relative light units

increased the percentage of 7-aminoactinomycin D- and/or annexin-V-positive cells upon TRAIL treatment compared with isotonic conditions (Fig. 1d). We confirmed the hypertonicity-granted boost in TRAIL cytotoxicity in other cell lines established from malignant melanoma (IGR-1 and A2058, Supplementary Figure S1b and c), colorectal cancer (HCT116, Fig. 1e,f and HT-29, Supplementary Figure S1d), acute lymphoblastic leukemia (REH), oral squamous cell carcinoma (PCI-68, Supplementary Figure S1e and f), and spheroid cultures (HCT116 spheroids, Supplementary Figure S1g) cells to exclude cell line-, tumor entity- or cell culture technique-specific phenomena. Robust cell death occurred ~6–9 h following TRAIL stimulation under hypertonic conditions (Fig. 1g) and (compared with isotonic controls) was accompanied by strikingly higher activation of the effector caspases 3 and 7 (Fig. 1h). Blocking caspase

activation using the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)-fluoromethylketone) completely rescued SK-Mel-3 and HCT116 from TRAIL-induced cytotoxicity cells in the presence of NaCl (Fig. 1i). Notably, we also observed enhanced cytotoxicity of CD95L and TNF (Fig. 2a,b) under hypertonic conditions, whereas toxicity of pharmacological cell death inducers such as tunicamycin, staurosporine, and bortezomib remained unchanged (Fig. 2c–g). Together, our data indicated that hyperosmotic stress enhanced DR-mediated apoptosis.

Hypertonicity acts downstream of DISC formation to enhance TRAIL-induced apoptosis

In previous work, we demonstrated that hyperosmotic stress enhances cytotoxicity of SMAC mimetics (SMs) by

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

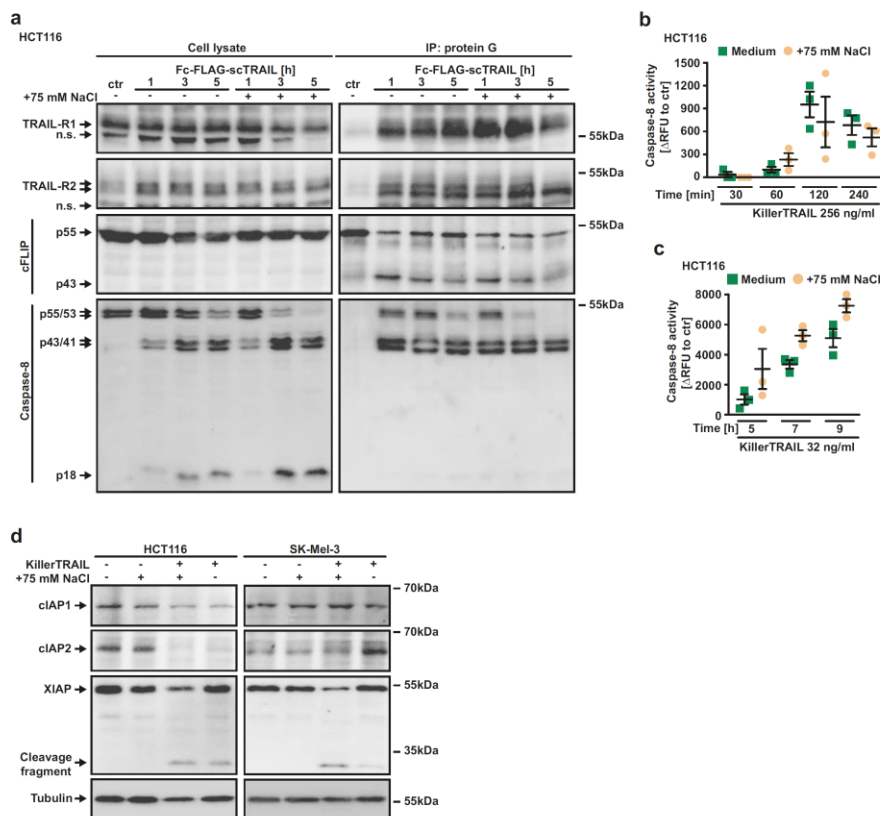


Fig. 4 TRAIL-induced receptor signaling complex formation and caspase-8 activation is equally effective under iso- and hypertonic conditions. **a** TRAIL-R1/R2 signaling complexes were induced in HCT116 cells by stimulation with Fc-FLAG-scTRAIL (1 μ g/ml) for the indicated periods of time in the presence and absence of NaCl (75 mM). Proteins associated with Fc-FLAG-scTRAIL were immunoprecipitated using protein G agarose and were analyzed together with the corresponding lysates by western blotting for the presence of the indicated proteins. Data shown are representative of two experiments performed. **b** and **c** HCT116 cells were treated with KillerTRAIL (32 ng/ml) in the presence and absence of NaCl (75 mM) for

the indicated periods of time. Caspase-8 activity was assessed using the fluorogenic substrate (IETD)₂-R110. Please note that different concentrations of recombinant TRAIL required for caspase activity assays and co-immunoprecipitation experiments could affect the kinetics of caspase-8 activation. Shown are data points and mean \pm SEM from three independent experiments. **d** HCT116 and SK-Mel-3 cells were challenged with KillerTRAIL (32 ng/ml) for 9 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). After washing and lysis, western blot analyses were performed with antibodies specific for the indicated proteins. Detection of tubulin served as a loading control. RFU, relative fluorescence units

increasing auto-/paracrine TNF secretion [14]. Adding TNF did not aggravate the cytotoxicity of TRAIL, whereas NaCl did (Supplementary Figure 2a and b). This excluded a pivotal role of hypertonicity-induced TNF production in TRAIL/NaCl-induced apoptosis. We next investigated the underlying molecular mechanism by assessing hypertonicity-associated alterations in the DR signaling cascade at various steps. Cell surface expression levels of TRAIL-R1 and -R2, as well as the decoy receptors TRAIL-

R3 and -R4 were comparable in the presence and absence of NaCl in HCT116 (Fig. 3a) and SK-Mel-3 cells (Supplementary Figure S2c). TRAIL-R1- and TRAIL-R2-specific TRAIL constructs (TRAILmutR1 and TRAILmutR2) revealed that both TRAIL DRs displayed enhanced cytotoxicity under hypertonic conditions (Fig. 3b,c). Similarly, TRAIL-R2 activation using the TRAIL-R2-specific agonistic antibody conatumumab in the presence of NaCl enhanced TRAIL-R2-induced cell death, suggesting that the

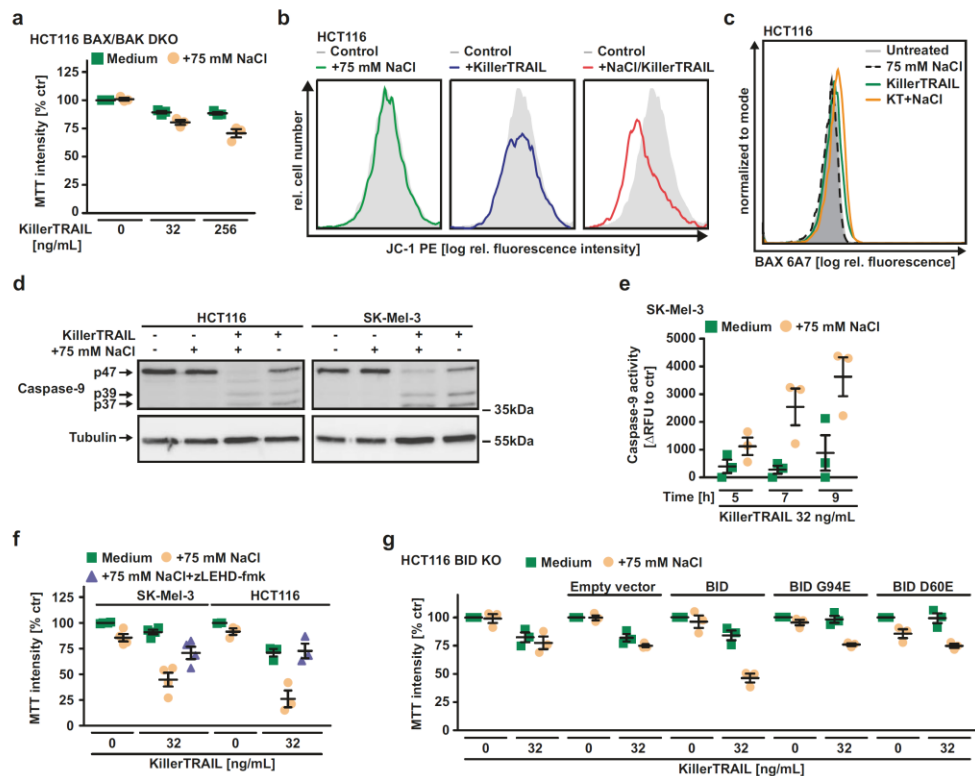


Fig. 5 Hypertonicity licenses TRAIL to unlock MOMP. **a** HCT116 BAX/BAK double-knockouts were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl (75 mM). **b** HCT116 cells were treated with NaCl (75 mM, first panel), KillerTRAIL (32 ng/ml, second panel), or a combination of both (third panel) for 3 h. Membrane potential of mitochondria was assessed by flow cytometry after staining with JC-1. **c** HCT116 cells were treated as in **b**. Conformational changes of BAX (indicative of ongoing activation) were measured using flow cytometry and the conformation-specific BAX antibody 6A7 [53]. Data shown for **b** and **c** are representative of three experiments performed. **d** HCT116 and SK-Mel-3 cells were challenged with KillerTRAIL (32 ng/ml) for 9 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). After washing and lysis, western blot analyses were performed with antibodies specific for the

indicated proteins. Detection of tubulin served as a loading control. Data shown are representative of two experiments performed. **e** SK-Mel-3 cells were treated with KillerTRAIL (32 ng/ml) in the presence and absence of NaCl (75 mM) for the indicated periods of time. Caspase-9 activity was assessed using the fluorogenic substrate (LEHD)₂-R110. **f** SK-Mel-3 and HCT116 cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl (75 mM) and the caspase-9 inhibitor zLEHD-fmk (50 μ M). **g** HCT116 BID knockout cells or variants thereof complemented with empty vector, wild-type BID, BID G94E (mutated BH3 domain) or BID D60E (caspase-8 resistant) [50] were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl (75 mM). For **a**, **e**–**g**, data points and mean \pm SEM from three independent experiments are shown

mode of TRAIL DR activation (ligand-mediated vs. agonistic antibody-mediated) was unimportant (Fig. 3d). In addition, equilibrium binding studies with *Gaussia princeps* luciferase (GpL)-tagged variants of TRAIL and conatumumab revealed no gross hypertonicity-induced changes in the equilibrium dissociation constant K_D , a characteristic for receptor–ligand and receptor–agonist affinity (Fig. 3e,f). In the light of these findings, changes in TRAIL DR expression and/or ligand/agonist-binding affinity seemed

unlikely to account for the hypertonicity-granted boost in TRAIL-induced apoptosis.

Immunoprecipitation experiments showed furthermore that TRAIL-induced recruitment of DISC components such as cFLIP and pro-caspase-8 occurred equally effective in isotonic and hypertonic conditions (Fig. 4a). DR-associated processing of caspase-8, indicative of DR-triggered caspase activation, was comparable in the absence and presence of NaCl (Fig. 4a, right panel) and correspondingly

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

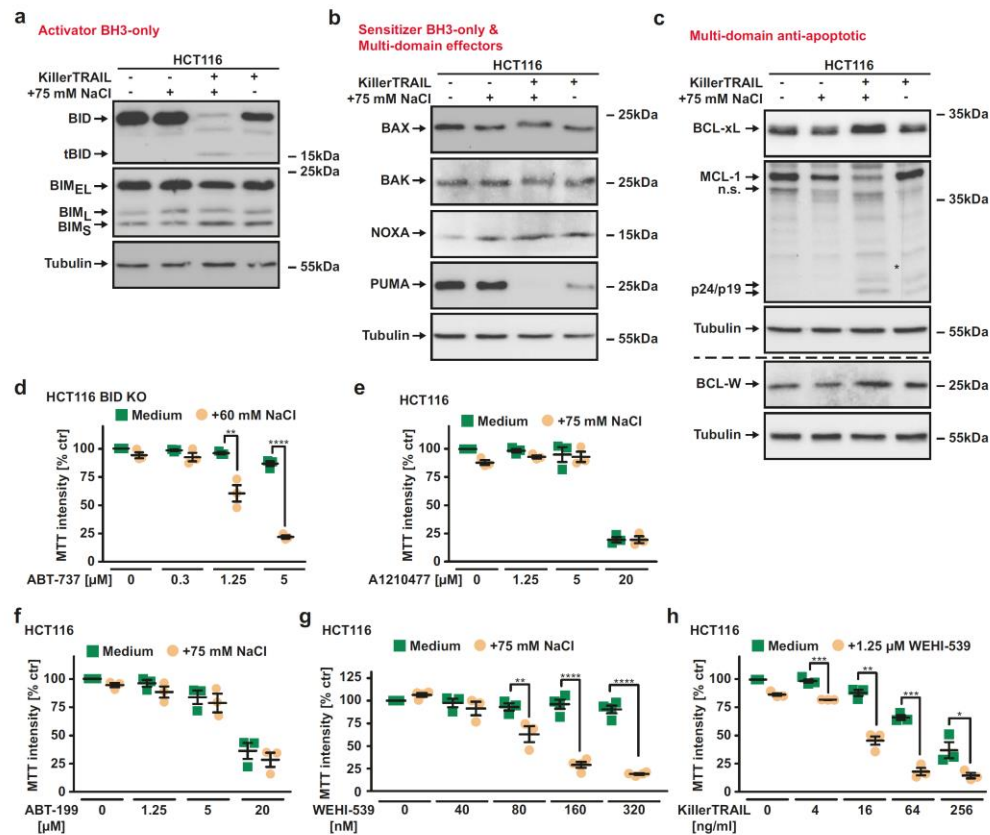


Fig. 6 Hyperosmotic stress drives BCL-2 addiction of cancer cells. **a–c** HCT116 cells were challenged with KillerTRAIL (32 ng/ml) for 9 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). After washing and lysis, western blot analyses were performed with antibodies specific for the indicated proteins. Detection of tubulin served as a loading control. The dashed line in **c** indicates that different cell lysates were used for BCL-W detection. The asterisk (*) in the MCL-1 blot indicates a defect in the CCD sensor of the western blot imaging system. All samples were run on the same gel, no gels were sliced. Data shown for **a–c** are representative of at least two experiments performed. **d–g**

HCT116 and HCT116 BID knockout cells were challenged with the indicated concentrations of **d** ABT-737 (targeting BCL-2, BCL-xL, and BCL-W), **e** A1210477 (targeting MCL-1), **f** ABT-199 (targeting BCL-2), and **g** WEHI-539 (targeting BCL-xL) in the presence and absence of the indicated concentrations of NaCl. **h** HCT116 cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of the BCL-xL inhibitor WEHI-539. For **d–h**, data points and mean \pm SEM from three independent experiments are shown. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$

no hypertonicity-mediated enhancement in caspase-8 activity was observable at early time points after TRAIL challenge (Fig. 4b). Five hours post stimulation, an apparently higher amount of the active p18 fragment of caspase-8 was detectable in lysates of TRAIL/NaCl treated cells (Fig. 4a, left panel), concomitant with higher caspase-8 activity (Fig. 4c). This observation not necessarily reflects enhanced DR-mediated caspase-8 activation, but could also be attributable to increasing effector caspase-mediated caspase-8 activation in the course of already ongoing

TRAIL/NaCl-induced apoptosis (Fig. 1g,h). Hypertonicity alone did not alter the cellular levels of the anti-apoptotic IAP family of proteins (Fig. 4d). In line with being caspase substrates [15, 16], cIAP1, cIAP2, and XIAP levels decreased proportionally to the strength (TRAIL vs. TRAIL/NaCl challenge) of the apoptotic stimulus (Fig. 4d). Thus far, our data suggested that TRAIL-induced signaling complex formation and initial caspase-8 activation was equally effective under iso- and hypertonic conditions.

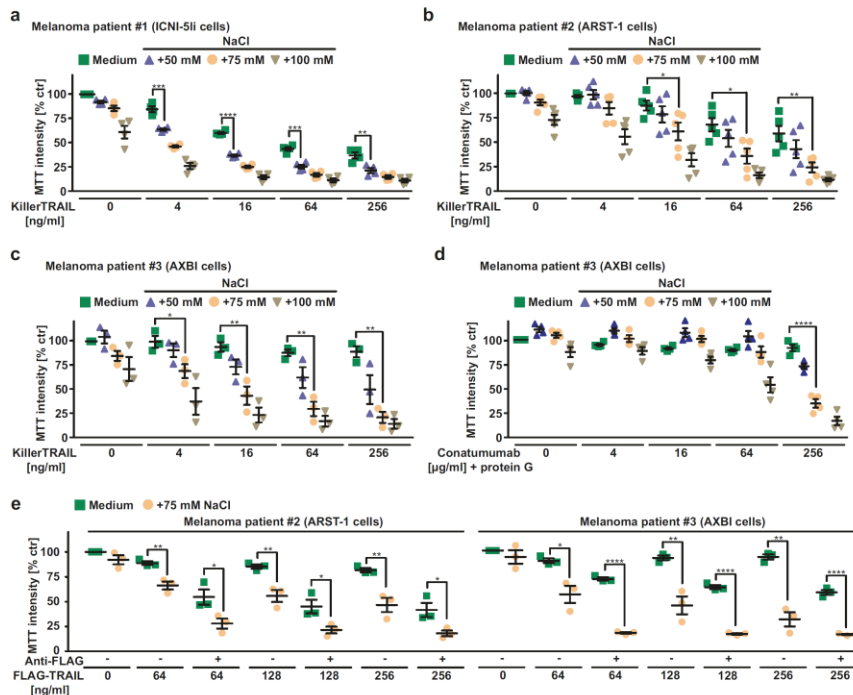


Fig. 7 Hypertonicity enhances TRAIL responsiveness of patient-derived melanoma cells. **a–c** ICNI-5li (derived from patient 1), ARST-1 (derived from patient 2), and AXBI (derived from patient 3) cells were treated with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl (50, 75, and 100 mM, respectively). **d** AXBI cells (derived from patient 3) were treated with the indicated concentrations of

conatumumab (cross-linked with 1 µg/ml protein G). **e** ARST-1 and AXBI cells (derived from patients 2 and 3) cells were challenged with either soluble trimeric FLAG-TRAIL or oligomerized FLAG-TRAIL (through incubation with 1 µg/ml anti-FLAG antibody) in the presence and absence of the indicated concentrations of NaCl. Shown are data points and mean \pm SEM from three independent experiments

Hypertonicity depends on tBID-induced MOMP to enhance TRAIL-induced apoptosis

Efficient DR-induced apoptosis in type-II cells (such as HCT116) requires BAX/BAK-mediated release of mitochondria-derived pro-apoptotic molecules. Deficiency in BAX/BAK or BAX alone attenuated or even abrogated TRAIL sensitivity under hypertonic conditions in HCT116 cells, whereas single loss of BAK was not protective (Fig. 5a and Supplementary Figure S3a-c). Apparently, MOMP remained a prerequisite for TRAIL DR-mediated apoptosis under hyperosmotic stress. In the presence of NaCl, TRAIL induced a rapid decrease in mitochondrial membrane potential (Fig. 5b) and activation-associated conformational changes in BAX (Fig. 5c and Supplementary Figure S3e), whereas TRAIL and NaCl alone had no effect. Concomitantly, NaCl increased TRAIL-induced caspase-9 processing and activity (Fig. 5d,e). Inhibiting caspase-9 using zLEDH-fmk completely rescued TRAIL/NaCl-challenged SK-Mel-3 and

HCT116 cells (Fig. 5f). The extrinsic (DR-initiated) and intrinsic (mitochondria-mediated) apoptotic pathway are interlinked via the BH3-only protein BID. BID deficiency protected HCT116 cells from cell death upon TRAIL/NaCl challenge (Fig. 5g). Complementing HCT116 BID KO cells with wild-type BID but not with the caspase-8-resistant BID D60E or BH3 defective BID G94E mutant restored TRAIL-induced apoptosis under hypertonic conditions (Fig. 5g and Supplementary Figure S3d). In sum, hyperosmotic stress enhanced amplification of the TRAIL DR-derived death signal at the mitochondrial level via BID-induced, BAX-mediated MOMP with subsequent caspase-9 activation.

Hyperosmotic stress enforces addition to anti-apoptotic BCL-2 family proteins

Caspase-mediated cleavage of BID and the integrity of its BH3 domain were indispensable for TRAIL/NaCl-induced killing of HCT116 cells (Fig. 5g). Hypertonicity could

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

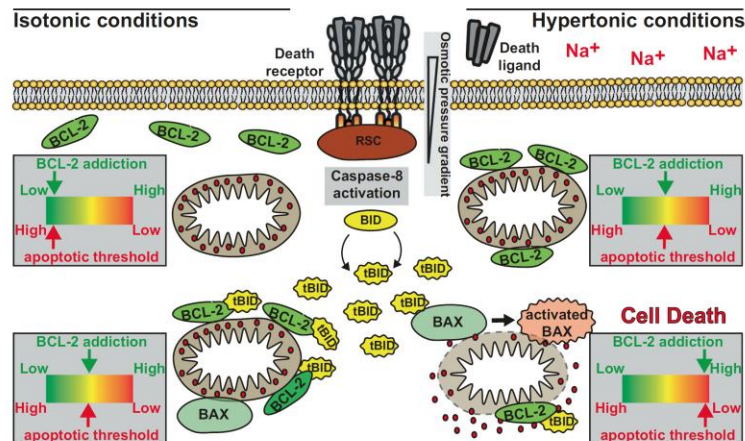


Fig. 8 Hypertonicity-enforced Bcl-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors in cancer cells. Left side: under isotonic conditions, BCL-2 addiction of cancer cells is low, yielding a high apoptotic threshold. Upon TRAIL DR activation, caspase-8 converts of BID into tBID. The potency of tBID to activate the pro-apoptotic effector BCL-2 protein family members BAX and BAK has to be counteracted by anti-apoptotic BCL-2-like proteins (such as BCL-2 itself or BCL-xL) to prevent MOMP. This augments BCL-2 addiction and lowers the apoptotic threshold, essentially priming mitochondria for death. However, the remaining capacity of anti-apoptotic BCL-2-

family proteins is still sufficient to cope with TRAIL DR-triggered death signals, which in type-II cells effectively abrogates TRAIL DR-induced cell death. Right side: hypertonic conditions impose a higher degree of BCL-2 addiction on cancer cells, which lowers the apoptotic threshold even under "steady-state" conditions. The capacity of anti-apoptotic BCL-2-family proteins is sufficient to prevent hypertonicity-induced MOMP, but additional mitochondria-directed apoptotic stimuli (such as DISC-mediated tBID generation) rapidly exhaust the remaining "neutralization capacity". This results in activation of BAX and MOMP, ultimately ending the cell's life

therefore enhance caspase-dependent tBID generation, a potent activator of BAX. Indeed, hyperosmotic stress enhanced loss of full-length BID upon TRAIL challenge (Fig. 6a), which is suggestive of caspase-8-mediated BID cleavage [17]. In our experimental setup, however, TRAIL-induced caspase-8 activation at early time points was comparable under iso- and hypertonic conditions (Fig. 4b), thus questioning whether the increase in BID cleavage is truly related to early TRAIL DR-associated events. Notably, caspase-3 is also capable to cleave BID [18] and is activated upon TRAIL/NaCl challenge (Fig. 1h). Enhanced TRAIL-induced BID cleavage under hypertonic conditions could therefore reflect already established MOMP and full-blown effector caspase activation rather than a hypertonicity-related boost in DISC-mediated tBID generation. Functionally, this raised the question at what level hypertonic conditions act to enforce the TRAIL DR-derived apoptotic signals in a mitochondria-dependent manner: (a) by enhancing DISC-mediated tBID generation or (b) by priming mitochondria for death downstream of tBID.

MOMP is governed by BCL-2 family interactions and primed mitochondria are dependent on anti-apoptotic members of the BCL-2 protein family to prevent loss of the mitochondrial membrane potential (BCL-2 addiction) [19]. Notably, total cellular levels of the different BCL-2 family subgroups

(activator and sensitizer BH3-only, multi-domain anti-apoptotic, and multi-domain effectors) did not grossly change under hypertonic conditions (Fig. 6a-c and Supplementary Figure S4a and b), although ongoing apoptosis following TRAIL/NaCl challenge expectedly revealed caspase-dependent cleavage/degradation of BID, MCL-1 and PUMA [17, 20, 21]. In BID-deficient HCT116 cells, the BCL-2-, BCL-xL-, and BCL-W-antagonizing BH3-mimetic ABT-737 was only marginally toxic under isotonic conditions, but robustly triggered cell death upon the addition of NaCl (Fig. 6d). Selective targeting of MCL-1 (A1210477), BCL-2 (ABT-199), and BCL-xL (WEHI-539) revealed that hyperosmotic stress apparently enforced BCL-xL addiction of cancer cells to survive (Fig. 6e-g). Conversely, combinatorial treatment with TRAIL and the BCL-xL inhibitor WEHI-539 under normotonic conditions resulted in robust cell death (Fig. 6h). Collectively, our data suggested that hypertonicity-enforced addiction to the anti-apoptotic functions of BCL-2 family members primes cancer cells for TRAIL DR-mediated apoptosis.

Hypertonicity enhances TRAIL responsiveness of patient-derived melanoma cells

Clinically, TRAIL-based therapies demonstrated a convincing safety profile but thus far displayed little success,

which has (among others) been attributed to resistance of tumors to TRAIL-induced apoptosis and insufficient agonistic activity of currently available drug candidates in the clinic. We therefore next validated our findings in melanoma cells derived from three patients with metastatic disease. Hyperosmotic stress unequivocally enhanced cell death induced by TRAIL (Fig. 7a–c). Hypertonicity also boosted cytotoxicity of the TRAIL-R2 agonist conatumumab (Fig. 7d) and soluble (trimeric) FLAG-TRAIL (Fig. 7e). Not surprisingly, antibody-mediated cross-linking of the trimeric ligand enhanced bioactivity under iso- and hypertonic conditions.

In sum, we demonstrated that hyperosmotic stress enforced BCL-2 addiction of cancer cells and lowered the threshold for engagement of the mitochondrial cell death pathway. Death-primed mitochondria readily amplified TRAIL DR-derived apoptotic signals, which in type-II cells is a prerequisite for efficient apoptosis induction (summarized in Fig. 8).

Discussion

TRAIL-based therapies are capable to specifically kill cancer cells without collateral damage in healthy tissue [3, 4]. Thus far, clinical trials largely failed as tumors evaded TRAIL-induced apoptosis and/or potency of TRAIL DR-activating molecules (soluble TRAIL, TRAIL-R1-, and TRAIL-R2-targeting agonistic antibodies) was modest [10]. Here we identify osmotic stress in the tumor microenvironment as a novel factor that aggravates DR-mediated apoptosis and boosts the deadly potential of “weak” TRAIL DR-targeting drug candidates. Mechanistically, hyperosmotic stress enforced BCL-2 addiction of cancer cells and thereby decreased the remaining capacity of mitochondria-safeguarding BCL-2-like proteins. Functionally, this lowered resistance of mitochondria to DR-generated OMM-targeting molecules such as tBID and thus unlocked amplification of the apoptotic signal. TRAIL DR-induced apoptosis under hypertonic conditions still followed a type-II mode (Fig. 5e–g), which contrasts other TRAIL DR-sensitizing strategies that enforced a switch to type-I mode of apoptosis [22, 23].

The modest potency of currently clinically used TRAIL-R1/-R2 agonists guarantees an excellent safety profile, but is obviously also a major cause for clinical failure. Substantial differences the cytotoxic activity of soluble trimeric TRAIL versus artificially oligomerized TRAIL variants and membrane TRAIL were early recognized [24–26]. Due to safety concerns, however, oligomerized forms of neither recombinant TRAIL nor TRAIL-R1/-R2-targeting agonists were moved forward to clinical development. A more potent “second-generation” of TRAIL and TRAIL-receptor

agonists is under way [27], but will this be paid for with detrimental off-target effects? Notably, there are alternative strategies to boost the TRAIL DR-activating potential of available drug candidates. Soluble TRAIL and the TRAIL-R2 targeting antibody conatumumab synergistically induced apoptosis with good tolerability *in vivo* [28, 29]. This is most likely attributable to antibody-assisted secondary aggregation of initially formed trimeric receptor–ligand complexes to fully active receptor clusters, an essential step in TRAIL DR signaling [30]. We observed aggravated cytotoxicity of soluble trimeric TRAIL under hypertonic conditions in the absence of any cross-linking agent (Fig. 7e). Thus, hypertonicity enhanced TRAIL DR signaling either by facilitating spontaneous self-aggregation of trimeric TRAIL/TRAIL DR complexes into receptor clusters or lowered the threshold of cellular responses to weakly active trimeric receptor–ligand complexes. We provide evidence for the latter inasmuch as BCL-2 addiction under hypertonic conditions (Fig. 6d,g) lowers the threshold for tBID-mediated MOMP by overburdening the remaining BCL-2-like proteins (Fig. 6h). Substantial changes in the cellular levels of some BCL-2 family proteins were only detectable in the course on ongoing apoptosis, but not due to hyperosmotic stress alone (Fig. 6a–c and Supplementary Figure S4a and b). This was also observed in an earlier study that (somehow conflictingly) linked hypertonicity-induced TNF sensitization of HeLa cells to decreased BCL-2 protein levels in apoptotic cells [31].

A spatially restricted hypertonic tumor microenvironment could, on the one hand, complement existing strategies to enhance activity of TRAIL DR targeting agents and, on the other hand, limit efficient TRAIL DR activation to the tumor area. Acute onset of hypertonicity exceeding a certain level is sufficient to cause apoptotic cell death [32, 33]. It is therefore important to note that in our experimental setting hypertonicity alone had no or only modest toxic effects (Fig. 1a,e, Supplementary Figure S1, and Fig. 5b). Is it possible to establish an osmotic pressure gradient for the time needed to deliver/complete a treatment? For solid tumors, injection of non-diffusible osmolytes or their continuous release from implantable devices is technically feasible and from a therapeutic view may have implications beyond TRAIL-based cancer treatments. Many apoptosis inducing signals (including most chemotherapies) physically converge at the mitochondria, rendering the BCL-2-regulated (or intrinsic) apoptotic pathway associated with these organelles decisive whether to live or die [34]. This has stimulated development of BH3-mimetics (reviewed in Delbridge et al. [35]), a novel class of therapeutics that induces apoptosis or primes mitochondria for death by binding and inhibiting anti-apoptotic BCL-2 family proteins [19]. Mitochondrial priming is directly correlated with clinical response to cytotoxic chemotherapy [36]. Our

finding that hypertonicity enforced BCL-2 addiction (and thus primed) cancer cells might therefore not only be of clinical relevance for TRAIL-based, but also other apoptosis-inducing cancer treatments.

Our experiments highlighted an essential role for BCL-xL (Fig. 6g), but not for BCL-2 and MCL-1 (Fig. 6e,f) to survive hypertonic conditions. BCL-xL retro-translocates BAX from the mitochondria into the cytosol and can sequester BAX-activating BH3-only proteins at subcellular membranes [37, 38]. BCL-xL also retro-translocates mitochondrial BAK (although significantly slower) [39], but HCT116 cells predominantly rely on BAX (and not the functionally redundant BAK) for apoptosis induction [40]. However, functions of anti-apoptotic BCL-2 family proteins can be at least partly redundant and dependency on BCL-xL or other safeguards might be cell-type specific. Nevertheless, this raises the question how hypertonicity enforces BCL-xL addiction in our experimental setup. Hyperosmotic stress enhanced activation of the effector protein BAX following TRAIL DR activation (Fig. 5c), but also upon ABT-737 treatment (data not shown). Perturbations in sensitizer and activator BH3-only proteins could be involved, although at least BID seems to be dispensable (Fig. 6d). In addition, MOMP in the absence of all BH3-only proteins has recently been demonstrated and in isolated mitochondria ionic strength influences the dynamics of BAX channel formation [41, 42]. Hypertonicity-induced biophysical alterations in the cell could thus already be sufficient to promote mitochondrial BAX translocation and subsequent activation, potentially facilitated by changing localization dynamics of BCL-xL to subcellular membranes [38]. Under otherwise steady-state conditions, BCL-xL still manages to safeguard the mitochondria, but is overburdened when challenged with BH3 mimetics or TRAIL DR-generated tBID (summarized in Fig. 8). Definitely, further work is required to solve these questions.

Beside cancer treatment, hypertonicity-induced mitochondrial priming might also affect immunomodulatory functions of TRAIL. TRAIL is expressed on various different immune cells such as monocytes, T cells, dendritic cells, and natural killer cells [43–46]. Recent studies elegantly demonstrated that hypertonic environments indeed occur *in vivo* (apart from the textbook example of the renal medulla). For example, bacterial skin infections in humans caused cutaneous Na⁺ accumulation (~40 mM Na⁺) and high dietary salt intake resulted in hyperosmolality in skin, muscle, and other tissues [47–49]. It is currently unclear whether “(patho-) physiologic hypertonicity” alters the response of TRAIL DR expressing non-malignant cells.

In sum, we provide evidence that tonicity of the cellular environment acts as a factor that co-determines the

apoptotic threshold by modulating death priming of mitochondria. Our work adds another layer of complexity in the sophisticated web of TRAIL DR signaling.

Material and methods

Cell lines, antibodies, and chemicals

HCT116, HT-29, TF-1, and REH cells were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). Sk-Mel-3 and IGR-1 cells were provided by Barbara Schmidt (University of Regensburg, Germany), A2058 cells by Jens Pietzsch (Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Germany), and authenticated using SNP-profiling (Multiplexion, Heidelberg, Germany). PCI-68 cells were a gift from Richard Bauer (University of Regensburg). BID-deficient HCT116 cells and the complemented variants thereof (HCT116 BID KO + empty vector, HCT116 BID KO + wt BID, HCT116 BID KO + BID D60E, HCT116 BID KO + BID G94E) were a kind gift from Xu Luo (University of Nebraska Medical Center, Nebraska, USA) [50]. HCT116 BAX/BAK DKO and HCT116 BAK KO cells were kindly provided by Richard Youle (National Institutes of Health, Bethesda, USA) [40]. HCT116 BAX KO cells were obtained from Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MA, USA) [51]. All cell lines were grown in RPMI 1640 medium (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Sigma, Steinheim, Germany). AXBI, ARST-1, and ICNI-5li cell lines were (after informed consent) established from metastatic lesions of melanoma patients as described previously (approved by the ethics committee of the Medical Faculty, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, EK 4602) [52]. These cell lines were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Sigma). HCT116 spheroids (3000 cells/spheroid) were grown in Nunclon Sphera 96-well plates (Thermo Fisher) for 72 h, according to manufacturer’s instructions, and subsequently challenged with KillerTRAIL for another 48 h. Viability of the spheroids was assessed using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) staining. Antibodies used in the study were as follows: TRAIL-R1 (#854.853.020), TRAIL-R2 (#854.863.020) (Diaclone SAS, Besancon, France); cFLIP (#3210), caspase-8 (#9746), caspase-9 (#9502), cIAP1 (#7065), cIAP2 (#3130), XIAP (#2045), BID (#2002), BIM (#2933), BAX (#5023), BAK (#12105), PUMA (#12450), BCL-xL (#2764), MCL-1 (#5453), and BCL-W (#2724) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA); tubulin (#MS-581) (Dunnlab, Asbach,

Germany); conformation-specific [53] BAX (6A7, #sc-23959), NOXA (114C307, #sc-56169) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA); FLAG (M2, #F3165) (Sigma); NFAT5 (#PA1-023) (Thermo Fisher). Chemicals were as follows: MTT (Biomol, Hamburg, Germany); zVAD-fmk (Bachem, Bubendorf, Switzerland); zLEHD-fmk (BD Biosciences, Heidelberg, Germany); tunicamycin, ABT-737, ABT-199, A1210477, and WEHI-539 (Hycultec, Beutelsbach, Germany); staurosporine (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA); and bortezomib (US Biological, Swampscott, MA, USA).

Recombinant proteins

KillerTRAIL was purchased from Apronex (Jesenice u Prahy, Czech Republic), CD95L (ACRP30*headless*-CD95L, #AG-40B-0130-C010) and FLAG-TRAIL were purchased from Adipogen (Liestal, Switzerland). TNF was a kind gift from Daniela Männel (University of Regensburg). Production and purification of TRAIL variants harboring mutations conferring specificity for TRAIL-R1 (FLAG-TNC-TRAILmutR1, mutations G131R/R149I/S159R/N199R/K201H/S215D) [54] and TRAIL-R2 (FLAG-TNC-TRAILmutR2, mutations Y189Q/R191K/Q193R/H264R/I266L/D267Q) [55], and GpL-tagged variants thereof, was performed as described previously [56]. Expression plasmids encoding the heavy chain and light chain of conatumumab were derived from pCR3 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The light-chain expression construct encodes a protein composed of the human IgG1 leader sequence followed by the amino acids QL, the FLAG epitope, the amino acids EL, the variable light chain sequence of conatumumab (KEGG database entry: D09329, light chain pos. 1–105; (<http://www.genome.jp/kegg/>)), the amino acid sequence GSEIKR and the amino acid sequence of the partial immunoglobulin κ -chain constant region (GenBank accession number: AAA58989.1). The heavy chain expression construct encodes an protein composed of the human IgG1 leader sequence followed by the amino acids QL, the FLAG epitope, the amino acids EL, the heavy chain sequence of conatumumab (KEGG database entry: D09329, heavy chain pos. 1–122), the amino acid sequence RSSS, and the amino acid sequence of the immunoglobulin heavy constant region γ 1 (GenBank accession number P01857). Conatumumab was produced by co-transfection of light and heavy chain-encoding plasmids into HEK293 cells essentially as described elsewhere [57]. GpL-Conatumumab was obtained by co-transfection of the heavy chain-encoding plasmid and a variant of the light chain-encoding plasmid in which the amino acids LE and amino acids 18–185 of GpL (GenBank accession number GM037681) were inserted following the constant light chain part.

SPRINGER NATURE

MTT-based cell viability assay

Cells were seeded in 96-well plates (REH and TF-1 cells: 7×10^4 cells/well; all other cell lines: 2×10^4 cells/well) and challenged with the indicated concentrations of the indicated substances in duplicates (technical replicates). In case NaCl or other osmotically active solutes were used, these were simultaneously added. Unless indicated otherwise, cell viability was determined 18 h after stimulation using MTT staining (2 h at 37 °C). Staining intensity was measured at 595 nm and the mean was calculated from the technical replicates of each experiment. The mean value for untreated controls was set to 100%. For any other condition, the MTT staining intensity is given relative to the corresponding untreated group (% of control). Data points shown are mean values (calculated from two technical replicates) of independent experiments ($n \geq 3$).

Western blot analysis

Cells were collected, spun down, and were directly dissolved in $4 \times$ Laemmli sample buffer (8% (w/v) SDS, 0.1 M dithiothreitol, 40% (v/v) glycerol, 0.2 M Tris, pH 8.0) supplemented with phosphatase inhibitor cocktails-I and -II (Sigma). Samples were sonicated and boiled for 5 min at 96 °C before proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. To block nonspecific binding sites, membranes were incubated in Tris-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) dry milk before primary antibodies of the specificity of interest were added. Antigen-antibody complexes were visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako, Hamburg, Germany) and ECL technology (Pierce, Rockford, IL, USA).

Caspase activity assays

Caspase activity was measured using the caspase-3/–7, caspase-9 and caspase-8 activity kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Emitted fluorescence was quantified using a Victor3 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Flow cytometry

Cell death was assessed by annexin-V and 7-AAD staining. In brief, cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl for 16 h. Afterwards, cells were stained with 7-AAD and annexin-V (4 °C for 15 min in the dark) following standard procedures [58], and analyzed immediately using a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences). For measuring cell surface expression of TRAIL-Receptors, cells

were incubated for 30 min on ice with phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies specific for the indicated TRAIL receptors (ProSci, Poway, CA, USA) or an appropriate isotype control (R&D Systems). Conformational changes in BAX indicating activation was measured as described previously [59]. Mitochondrial membrane potential was measured using the MitoScreen Kit (#551302, BD Biosciences) according to manufacturer's instructions.

Binding studies using GpL fusion proteins

Binding studies using the bioluminescent fusion proteins GpL-Flag-TNC-TRAIL and GpL-FLAG-conatumumab were essentially performed as described elsewhere [60]. Cells (typically 2×10^5 per well in 24-well plates) were cultured overnight. For equilibrium binding experiments, cells were split in two groups to determine total and non-specific binding. Cells of the "nonspecific binding" groups were pre-incubated with an excess of conventional TRAIL and conventional conatumumab (1 h at 37 °C), cells of the "total binding" groups remained untreated. Cells of both groups were subsequently pairwise incubated with increasing concentrations of GpL-Flag-TNC-TRAIL and GpL-FLAG-conatumumab for 1 h at 37 °C. Unbound ligand was removed by washing the plates 10 times for ~5 s in ice-cold phosphate-buffered saline. Next, cells were collected, resuspended in 50 μ l RPMI 1640 medium (0.5% v/v fetal bovine serum), and transferred to black 96-well plates. GpL activity was quantified by measuring luminescence using the Gaussia luciferase assay kit (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) and a luminometer (AnthosLabtec Instruments, Krefeld, Germany). To obtain specific binding values, nonspecific binding values were subtracted from the corresponding total binding values. The maximum of specifically bound GpL activity (B_{max}) and the dissociation constant (K_D) were obtained by analysis of the specific binding values (non-linear regression analysis, one site specific binding model) using GraphPad Prism5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Co-immunoprecipitation

Immunoprecipitation was performed as described previously [12].

Statistics

Unless otherwise specified, data are presented as individual data points from independent experiments and mean \pm SEM. Comparisons were performed with a Student's *t*-test whose values are denoted in the figures as * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

Acknowledgements ME is supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Grant EH 465/2-1), the Roggenbuck Stiftung, the Universitätsstiftung Angela Schötz-Keilholz, and the Medical Faculty of the University of Regensburg (ReForM-B-program). JJ is supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Grant JA 1993/4-1). HW is supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Grant WA 1025/24-1) and Deutsche Krebshilfe (Grant 111703).

Authors contributions: ME, GK, HW, DS, JJ, and IL designed experiments. ME, GK, IL, PN, and SS performed experiments. ME, GK, IL, DS, JJ, PN, and HW analyzed data. BS-T and SG obtained informed consent from patients and established melanoma cell lines. ME wrote the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

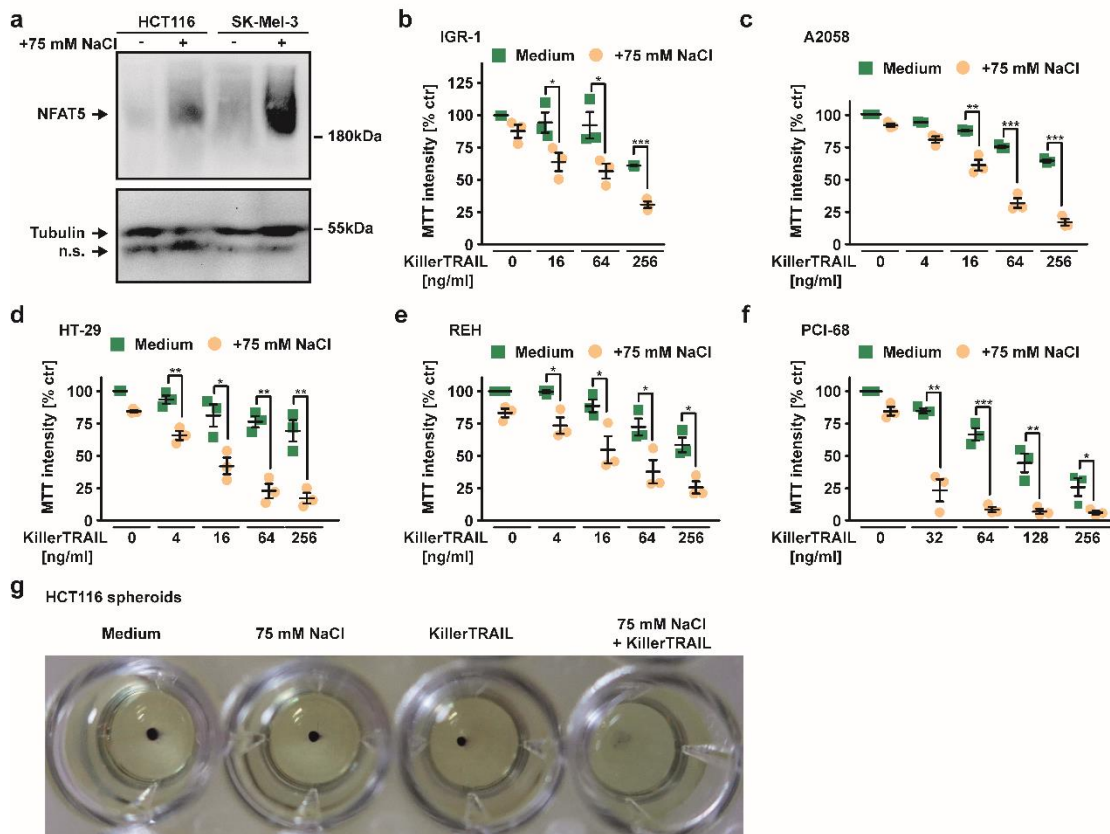
1. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991;66:233–43.
2. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem*. 1992;267:10709–15.
3. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*. 1999;5:157–63.
4. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*. 1999;104:155–62.
5. Schug ZT, Gonzalez F, Houtkooper RH, Vaz FM, Gottlieb E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ*. 2011;18:538–48.
6. Westphal D, Kluck RM, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2014;21:196–205.
7. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 1993;364:806–9.
8. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med*. 1997;3:409–13.

9. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2014;21:1350–64.
10. von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILS less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:352–66.
11. Yaacoub K, Pedoux R, Tarte K, Guillaudeux T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Lett.* 2016;378:150–9.
12. Knoll G, Bittner S, Kurz M, Jantsch J, Ehrenschrwender M. Hypoxia regulates TRAIL sensitivity of colorectal cancer cells through mitochondrial autophagy. *Oncotarget.* 2016;7:41488–504.
13. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:2538–42.
14. Bittner S, Knoll G, Ehrenschrwender M. Hyperosmotic stress enhances cytotoxicity of SMAC mimetics. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2967.
15. Clem RJ, Sheu TT, Richter BW, He WW, Thornberry NA, Duckett CS, et al. c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem.* 2001;276:7602–8.
16. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 1999;18:5242–51.
17. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491–501.
18. Slee EA, Keogh SA, Martin SJ. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ.* 2000;7:556–65.
19. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell.* 2006;9:351–65.
20. Herrant M, Jaquet A, Marchetti S, Belhacene N, Colosetti P, Luciano F, et al. Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene.* 2004;23:7863–73.
21. Callus BA, Moujallad DM, Silke J, Gerl R, Jabbour AM, Ekert PG, et al. Triggering of apoptosis by Puma is determined by the threshold set by prosurvival Bcl-2 family proteins. *J Mol Biol.* 2008;384:313–23.
22. Ehrenschrwender M, Bittner S, Seibold K, Wajant H. XIAP-targeting drugs re-sensitize PIK3CA-mutated colorectal cancer cells for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1570.
23. Gillissen B, Richter A, Overkamp T, Essmann F, Hemmati PG, Preissner R, et al. Targeted therapy of the XIAP/proteasome pathway overcomes TRAIL-resistance in carcinoma by switching apoptosis signaling to a Bax/Bak-independent 'type I' mode. *Cell Death Dis.* 2013;4:e643.
24. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205–13.
25. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995;3:673–82.
26. Wajant H, Moosmayer D, Wuest T, Bartke T, Gerlach E, Schonherr U, et al. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene.* 2001;20:4101–6.
27. de Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H, Martinez-Lostao L. Onto better TRAILS for cancer treatment. *Cell Death Differ.* 2016;23:733–47.
28. Graves JD, Kordich JJ, Huang TH, Piasecki J, Bush TL, Sullivan T, et al. Apo2L/TRAIL and the death receptor 5 agonist antibody AMG 655 cooperate to promote receptor clustering and antitumor activity. *Cancer Cell.* 2014;26:177–89.
29. Tuthill MH, Montinaro A, Zinngrebe J, Prieske K, Draber P, Prieske S, et al. TRAIL-R2-specific antibodies and recombinant TRAIL can synergise to kill cancer cells. *Oncogene.* 2015;34:2138–44.
30. Wajant H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ.* 2015;22:1727–41.
31. Franco DL, Nojek IM, Molinero L, Coso OA, Costas MA. Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002;9:1090–8.
32. Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, et al. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res.* 2001;304:279–85.
33. Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2000;278:F209–218.
34. Bhola PD, Letai A. Mitochondria-judges and executioners of cell death sentences. *Mol Cell.* 2016;61:695–704.
35. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:99–109.
36. Ni Chonghaile T, Sarosiek KA, Vo TT, Ryan JA, Tammareddi A, Moore Vdel G, et al. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science.* 2011;334:1129–33.
37. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnould D, Wang C, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 2011;145:104–16.
38. Pecot J, Maillet L, Le Pen J, Vuillier C, Trecesson SC, Fetiveau A, et al. Tight sequestration of BH3 proteins by BCL-xL at sub-cellular membranes contributes to apoptotic resistance. *Cell Rep.* 2016;17:3347–58.
39. Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Emschermann F, Lauterwasser J, Kaiser A, et al. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J.* 2015;34:67–80.
40. Wang C, Youle RJ. Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene.* 2012;31:3177–89.
41. O'Neill KL, Huang K, Zhang J, Chen Y, Luo X. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev.* 2016;30:973–88.
42. Ganesan V, Walsh T, Chang KT, Colombini M. The dynamics of Bax channel formation: influence of ionic strength. *Biophys J.* 2012;103:483–91.
43. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med.* 1999;190:1155–64.
44. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med.* 1999;189:1343–54.

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors

45. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol.* 1999;163:1906–13.
46. Mariani SM, Krammer PH. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol.* 1998;28:1492–8.
47. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schroder A, Kopp C, Siegert I, et al. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* 2015;21:493–501.
48. Nikpey E, Karlsen TV, Rakova N, Titze JM, Tenstad O, Wiig H. High-salt diet causes osmotic gradients and hyperosmolality in skin without affecting interstitial fluid and lymph. *Hypertension.* 2017;69:660–8.
49. Fischereder M, Michalke B, Schmoekel E, Habicht A, Kunisch R, Pavelic I, et al. Sodium storage in human tissues is mediated by glycosaminoglycan expression. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2017;313:F319–F325.
50. Huang K, Zhang J, O'Neill KL, Gurumurthy CB, Quadros RM, Tu Y, et al. Cleavage by Caspase 8 and mitochondrial membrane association activate the BH3-only protein Bid during TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2016;291:11843–51.
51. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science.* 2000;290:989–92.
52. Thomann S, Boscheinen JB, Vogel K, Knipe DM, DeLuca N, Gross S, et al. Combined cytotoxic activity of an infectious, but non-replicative herpes simplex virus type 1 and plasmacytoid dendritic cells against tumour cells. *Immunology.* 2015;146:327–38.
53. Hsu YT, Youle RJ. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem.* 1997;272:13829–34.
54. Reis CR, van der Sloot AM, Natoni A, Szegezdi E, Szegezdi R, Meijer M, et al. Rapid and efficient cancer cell killing mediated by high-affinity death receptor homotrimerizing TRAIL variants. *Cell Death Dis.* 2010;1:e83.
55. MacFarlane M, Kohlhaas SL, Sutcliffe MJ, Dyer MJ, Cohen GM. TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Res.* 2005;65:11265–70.
56. Trebing J, El-Mesery M, Schafer V, Weisenberger D, Siegmund D, Silence K, et al. CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1035.
57. Kums J, Nelke J, Ruth B, Schafer V, Siegmund D, Wajant H. Quantitative analysis of cell surface antigen-antibody interaction using *Gaussia princeps* luciferase antibody fusion proteins. *MAbs.* 2017;9:506–20.
58. Telford W, Tamul K, Bradford J. Measurement and characterization of apoptosis by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2016;77:9 49 41–49 49 28.
59. Dewson G. Detection of Bak/Bax activating conformation change by intracellular flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015:477–80.
60. Fick A, Lang I, Schafer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, et al. Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem.* 2012;287:484–95.

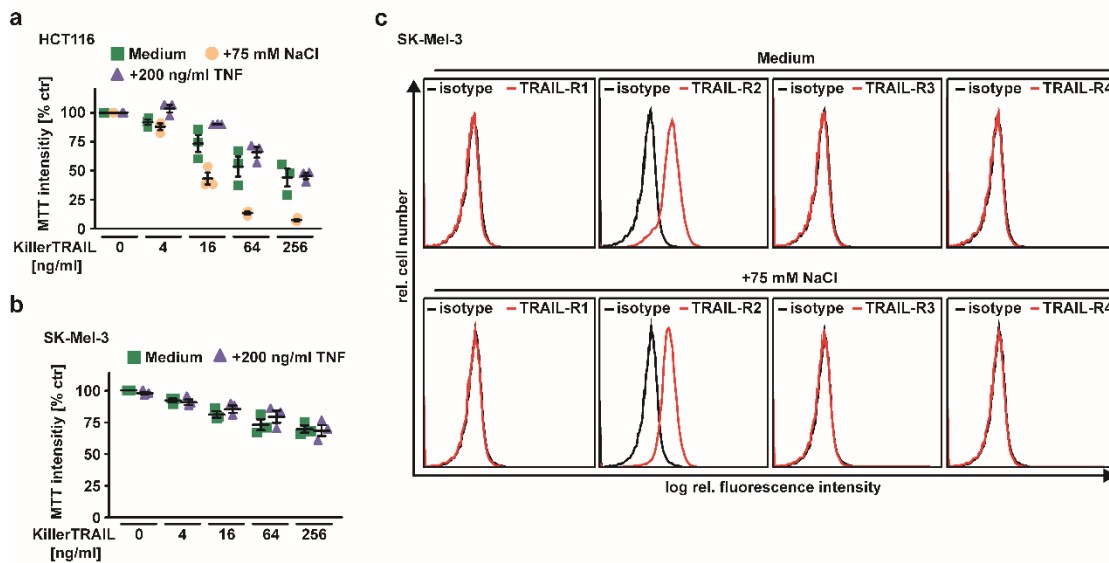
Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S1: Hyperosmotic stress enhances TRAIL-induced apoptosis in various cancer cell lines.

(a) HCT116 and SK-Mel-3 cells were cultured in the presence and absence of NaCl (75 mM). After washing and lysis, Western blot analyses were performed with antibodies specific for the indicated proteins. Data shown are representative of 2 experiments performed. (b-f) IGR-1, A2058, HT-29, REH and PCI-68 cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of the NaCl (75 mM). Shown are data points and mean±S.E.M. from three independent experiments. (g) HCT116 spheroids were challenged with KillerTRAIL (128 ng/ml) in the presence and absence of NaCl (75 mM) and subsequently stained with MTT (4 h). Data shown are representative of 3 experiments performed. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, * $p < 0.0001$.

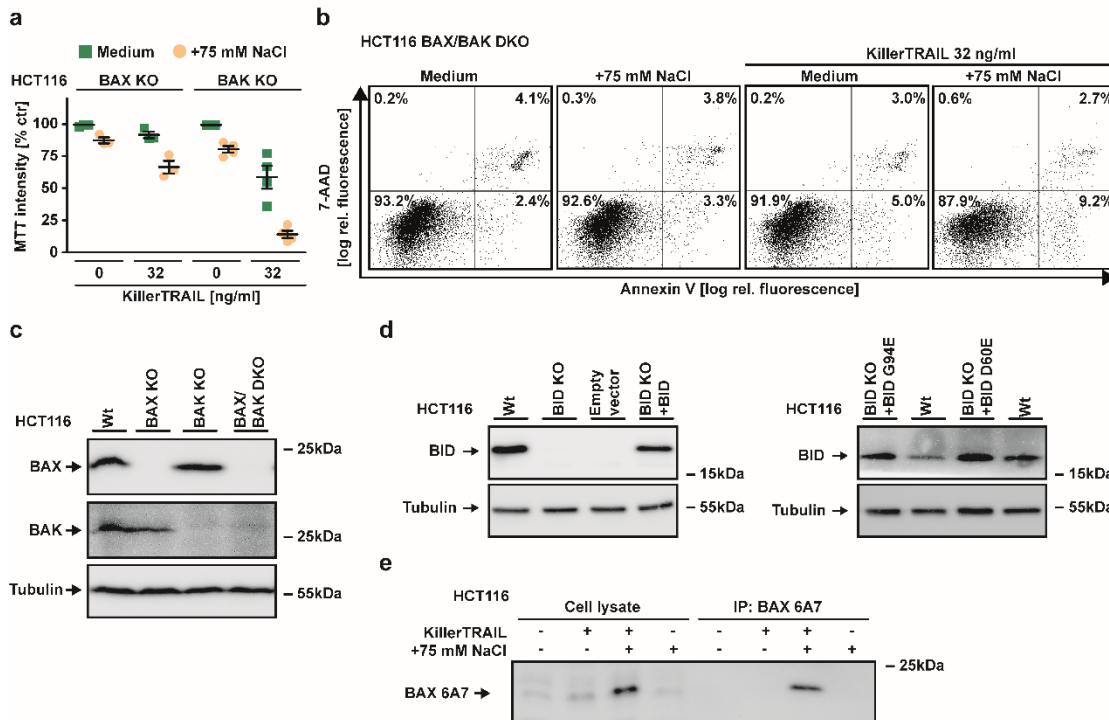
Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2: Enhanced TRAIL cytotoxicity under hypertonic conditions is not attributable to TNF secretion or changes in TRAIL-receptor expression.

(a and b) HCT116 and SK-Mel-3 cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl (75 mM) or TNF (200 ng/ml). Shown are data points and mean±S.E.M. from three independent experiments. (c) Cell surface expression of TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 and TRAIL-R4 was analyzed in HCT116 cells using flow cytometry. Data shown are representative of two experiments performed.

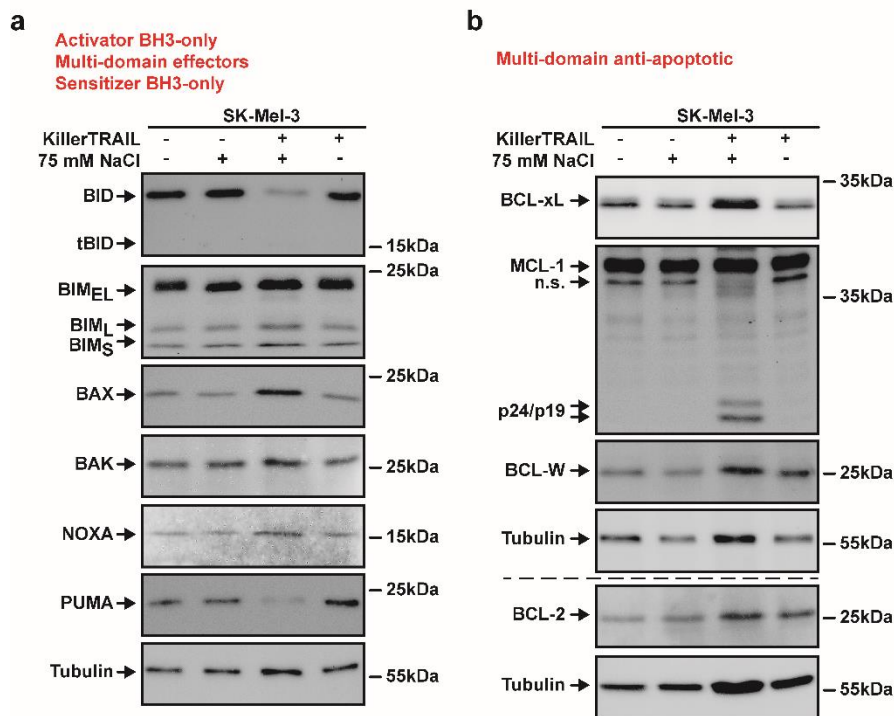
Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3: tBID-triggered MOMP is essential for hypertonicity-mediated enhancement of TRAIL-induced apoptosis.

(a) HCT116 BAX knockout cells and HCT116 BAK knockout cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL in the presence and absence of NaCl (75 mM). Shown are data points and mean \pm S.E.M. from three independent experiments. (b) HCT116 BAX/BAK double-knockout cells were challenged with the indicated concentrations of KillerTRAIL for 6 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). Cells were subsequently analyzed by flow cytometry for 7-AAD- and annexin-V-positivity. Data shown are representative of two experiments performed. (c) Lysates from HCT116 wild-type, BAX KO, BAK KO and BAX/BAK DKO were analyzed using Western blot with antibodies specific for the indicated proteins. (d) Lysates from HCT116 wild-type, BID KO and BID KO reconstituted with BID wt, BID G94E and BID D60E were analyzed using Western blot with antibodies specific for the indicated proteins. Detection of tubulin served as a loading control. Data shown are representative of two experiments performed.

Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S4: Hyperosmotic stress does not change expression levels of BCL-2 family proteins.

(a and b) SK-Mel-3 cells were challenged with KillerTRAIL (32 ng/ml) for 9 h in the presence and absence of NaCl (75 mM). After washing and lysis, Western blot analyses were performed with antibodies specific for the indicated proteins. Detection of tubulin served as a loading control. The dashed line in (b) indicates that different cell lysates were used for BCL-2 detection. Data shown are representative of at least two experiments performed.

5 Publikation

Sirtl S, Knoll G, Trinh DT, Lang I, Siegmund D, Gross S, Schuler-Thurner B, Neubert P, Jantsch J, Wajant H, Ehrenschwender M

Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors.

Oncogene. 2018 April. doi: 10.1038/s41388-018-0265-5 (JIF 6.429)

5.1 Vorträge

- | | |
|-----------|---|
| 07 / 2018 | Forschungsretreat Kloster Kostenz,
Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene |
| 06 / 2018 | 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in
Bayern e.V.,
Klinikum Großhadern, München
(mit Reisestipendium) |
| 04 / 2018 | 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin
Congress Center Rosengarten, Mannheim
(mit Reisestipendium) |
| 07 / 2016 | Forschungsretreat Kloster Kostenz,
Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene |

5.2 Wissenschaftliche Preise & Auszeichnungen

- 07 / 2018 **1. Platz Regensburger Onkologie-Preis 2018**
Auswahlverfahren durch das Comprehensive
Cancer Center Ostbayern
Titel: *“Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction
unleashes the cytotoxic potential of death receptors”*
- 06 / 2018 **Posterpreis der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern**
Kategorie: „Grundlagenforschung“ (Klinikum Großhadern)
S. Sirtl, M.Ehrenschwender
Titel: *“Hyperosmolarer Stress potenziert die TRAIL-Sensitivität
bei kolorektalen Karzinomzellen“*
- 04 / 2018 **Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin**
Kategorie: „Young investigators – the future is now“ (Mannheim)
S. Sirtl, M.Ehrenschwender
Titel: *“Hyperosmolarer Stress potenziert die TRAIL-Sensitivität
bei kolorektalen Karzinomzellen“*

6 Literaturverzeichnis

1. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang C-P, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673–82. doi:10.1016/1074-7613(95)90057-8
2. Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002;27(1):19–26. doi:10.1016/S0968-0004(01)01995-8
3. Ware CF. The TNF Superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003;14(3-4):181–4. doi:10.1016/S1359-6101(03)00032-7
4. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *J. Biol. Chem.* 1996;271(22):12687–90. doi:10.1074/jbc.271.22.12687
5. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*. 1999;5(2):157–63. doi:10.1038/5517
6. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487–501.
7. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993;74(5):845–53.
8. Bavi P, Prabhakaran SE, Abubaker J, Qadri Z, George T, Al-Sanea N, Abduljabbar A, Ashari LH, Alhomoud S, Al-Dayel F, Hussain AR, Uddin S, Al-Kuraya KS. Prognostic significance of TRAIL death receptors in Middle Eastern colorectal carcinomas and their correlation to oncogenic KRAS alterations. *Mol Cancer*. 2010;9:203. doi:10.1186/1476-4598-9-203
9. Ganten TM, Sykora J, Koschny R, Batke E, Aulmann S, Mansmann U, Stremmel W, Sinn H-P, Walczak H. Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med*. 2009;87(10):995–1007. doi:10.1007/s00109-009-0510-z

10. Kuijlen JMA, Mooij JJA, Platteel I, Hoving EW, van der Graaf WTA, Span MM, Hollema H, den Dunnen WFA. TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2006;78(2):161–71. doi:10.1007/s11060-005-9081-1
11. Lemke J, Noack A, Adam D, Tchikov V, Bertsch U, Röder C, Schütze S, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J Mol Med.* 2010;88(7):729–40. doi:10.1007/s00109-010-0619-0
12. Stadel D, Mohr A, Ref C, MacFarlane M, Zhou S, Humphreys R, Bachem M, Cohen G, Möller P, Zwacka RM, Debatin K-M, Fulda S. TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2010;16(23):5734–49. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0985
13. MacFarlane M, Kohlhaas SL, Sutcliffe MJ, Dyer MJS, Cohen GM. TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Res.* 2005;65(24):11265–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2801
14. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity.* 2000;12(6):611–20. doi:10.1016/S1074-7613(00)80212-5
15. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity.* 2000;12(6):599–609. doi:10.1016/S1074-7613(00)80211-3
16. Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JWR, Cain K, MacFarlane M. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell.* 2012;47(2):291–305. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.004
17. Sprick MR. 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. *The EMBO Journal.* 2002;21(17):4520–30. doi:10.1093/emboj/cdf441

18. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(4):558–63. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.026
19. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*. 2009;137(4):721–35. doi:10.1016/j.cell.2009.03.015
20. Gonzalez F, Lawrence D, Yang B, Yee S, Pitti R, Marsters S, Pham VC, Stephan J-P, Lill J, Ashkenazi A. TRAF2 Sets a threshold for extrinsic apoptosis by tagging caspase-8 with a ubiquitin shutoff timer. *Mol Cell*. 2012;48(6):888–99. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.031
21. Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2005;280(15):14507–13. doi:10.1074/jbc.M414425200
22. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem*. 2001;276(23):20633–40. doi:10.1074/jbc.M101780200
23. Schug ZT, Gonzalez F, Houtkooper RH, Vaz FM, Gottlieb E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ*. 2011;18(3):538–48. doi:10.1038/cdd.2010.135
24. Li H, Zhu H, Xu C-j, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491–501. doi:10.1016/S0092-8674(00)81590-1
25. O'Neill JW, Manion MK, Maguire B, Hockenbery DM. BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. *J Mol Biol*. 2006;356(2):367–81. doi:10.1016/j.jmb.2005.11.032
26. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*. 2008;18(4):157–64. doi:10.1016/j.tcb.2008.01.007
27. Leber B, Lin J, Andrews DW. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*. 2010;29(38):5221–30. doi:10.1038/onc.2010.283

28. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000;14(16):2060–71.
29. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 2011;145(1):104–16. doi:10.1016/j.cell.2011.02.034
30. Karstedt S v., Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(6):352–66. doi:10.1038/nrc.2017.28
31. Cheng J, Hylander BL, Baer MR, Chen X, Repasky EA. Multiple mechanisms underlie resistance of leukemia cells to Apo2 Ligand/TRAIL. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(7):1844–53. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0050
32. Dechant MJ, Fellenberg J, Scheuerpflug CG, Ewerbeck V, Debatin K-M. Mutation analysis of the apoptotic "death-receptors" and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *Int J Cancer.* 2004;109(5):661–7. doi:10.1002/ijc.20008
33. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67. doi:10.1186/1476-4598-5-67
34. Munshi A, Pappas G, Honda T, McDonnell TJ, Younes A, Li Y, Meyn RE. TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2. *Oncogene.* 2001;20(29):3757–65. doi:10.1038/sj.onc.1204504
35. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kalthoff H, Ungefroren H. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2000;19(48):5477–86. doi:10.1038/sj.onc.1203936
36. Clohessy JG, Zhuang J, Boer J de, Gil-Gómez G, Brady HJM. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006;281(9):5750–9. doi:10.1074/jbc.M505688200

37. LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A. Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med.* 2002;8(3):274–81. doi:10.1038/nm0302-274
38. Elton Stubblefield, Gerald C. Mueller. Effects of Sodium Chloride Concentration on Growth, Biochemical Composition, and Metabolism of HeLa Cells [Internet] [cited 2017 Sep 28]. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/20/11/1646.full.pdf#zoom=75>
39. Franco DL, Nojek IM, Molinero L, Coso OA, Costas MA. Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1090–8. doi:10.1038/sj.cdd.4401074
40. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 1993;364(6440):806–9. doi:10.1038/364806a0
41. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med.* 1997;3(4):409–13.
42. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* 1999;104(2):155–62. doi:10.1172/JCI6926
43. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1996;24(2):131–9. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19960601)24:2<131:AID-CYTO5>3.0.CO;2-M
44. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods.* 1995;184(1):39–51.
45. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi JV. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* 1994;170(2):145–57. doi:10.1016/0022-1759(94)90390-5

46. Telford W, Tamul K, Bradford J. Measurement and Characterization of Apoptosis by Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2016;779.49.1-9.49.28. doi:10.1002/cpcy.1
47. Dewson G. Detection of Bak/Bax activating conformation change by intracellular flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015(5):477–80. doi:10.1101/pdb.prot086462
48. Roberts NJ, Zhou S, Diaz LA, Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget.* 2011;2(10):739–51. doi:10.18632/oncotarget.344
49. Wainberg ZA, Messersmith WA, Peddi PF, Kapp AV, Ashkenazi A, Royer-Joo S, Portera CC, Kozloff MF. A phase 1B study of dulanermin in combination with modified FOLFOX6 plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2013;12(4):248–54. doi:10.1016/j.clcc.2013.06.002
50. Soria J-C, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu C-P, Reese D, Wiezorek J, Blackhall F. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1527–33. doi:10.1200/JCO.2009.25.4847
51. Soria J-C, Márk Z, Zatloukal P, Szima B, Albert I, Juhász E, Pujol J-L, Kozielski J, Baker N, Smethurst D, Hei Y-j, Ashkenazi A, Stern H, Amler L, Pan Y, Blackhall F. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(33):4442–51. doi:10.1200/JCO.2011.37.2623
52. Belada D, Mayer J, Czuczman MS, Flinn IW, Durbin-Johnson B, Bray GL. Phase II study of dulanermin plus rituximab in patients with relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *JCO.* 2010;28(15_suppl):8104. doi:10.1200/jco.2010.28.15_suppl.8104
53. Ouyang X, Shi M, Jie F, Bai Y, Shen P, Yu Z, Wang X, Huang C, Tao M, Wang Z, Xie C, Wu Q, Shu Y, Han B, Zhang F, Zhang Y, Hu C, Ma X, Liang Y, Wang A, Lu B, Shi Y, Chen J, Zhuang Z, Wang J, Huang J, Wang C, Bai C, Zhou X, Li Q, Chen F, Yu H, Feng J. Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined

- with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2018;36(2):315–22. doi:10.1007/s10637-017-0536-y
54. Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, Köhne C-H, Przyborek M, Schulz C, Sneller V, Gallant G, Kanzler S. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(3):506–12. doi:10.1038/sj.bjc.6605507
55. Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CNAM, Gietema JA, Fox NL, Miceli R, Eskens FALM, Loos WJ, Vries EGE de, Sleijfer S. Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: A phase I study. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5584–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0996
56. Cohn AL, Tabernero J, Maurel J, Nowara E, Sastre J, Chuah BYS, Kopp MV, Sakaeva DD, Mitchell EP, Dubey S, Suzuki S, Hei Y-J, Galimi F, McCaffery I, Pan Y, Loberg R, Cottrell S, Choo S-P. A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant KRAS metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(7):1777–85. doi:10.1093/annonc/mdt057
57. Forero-Torres A, Infante JR, Waterhouse D, Wong L, Vickers S, Arrowsmith E, He AR, Hart L, Trent D, Wade J, Jin X, Wang Q, Austin T, Rosen M, Beckman R, Roemeling R v., Greenberg J, Saleh M. Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Med*. 2013;2(6):925–32. doi:10.1002/cam4.137
58. Merchant MS, Geller JI, Baird K, Chou AJ, Galli S, Charles A, Amaoko M, Rhee EH, Price A, Wexler LH, Meyers PA, Widemann BC, Tsokos M, Mackall CL. Phase I trial and pharmacokinetic study of lexatumumab in pediatric patients with solid tumors. *J Clin Oncol*. 2012;30(33):4141–7. doi:10.1200/JCO.2012.44.1055

59. Sharma S, Vries EG de, Infante JR, Oldenhuis CN, Gietema JA, Yang L, Bilic S, Parker K, Goldbrunner M, Scott JW, Burris HA. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the DR5 antibody LBY135 alone and in combination with capecitabine in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2014;32(1):135–44. doi:10.1007/s10637-013-9952-9
60. Carr RM, Qiao G, Qin J, Jayaraman S, Prabhakar BS, Maker AV. Targeting the metabolic pathway of human colon cancer overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Discov*. 2016;216067. doi:10.1038/cddiscovery.2016.67
61. Fleten KG, Florenes VA, Prasmickaite L, Hill O, Sykora J, Maelandsmo GM, Engesaeter B. hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell Death Discov*. 2016;216081. doi:10.1038/cddiscovery.2016.81
62. Berger A, Quast S-A, Plotz M, Kammermeier A, Eberle J. Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by BMS-345541 correlates with altered phosphorylation and activation of Bax. *Cell Death Dis*. 2013;4e477. doi:10.1038/cddis.2012.198
63. Chen L, Wolff DW, Xie Y, Lin M-F, Tu Y. Cyproterone acetate enhances TRAIL-induced androgen-independent prostate cancer cell apoptosis via up-regulation of death receptor 5. *BMC Cancer*. 2017;17(1):179. doi:10.1186/s12885-017-3153-4
64. Lin W-C, Tsai H-F, Liao H-J, Tang C-H, Wu Y-Y, Hsu P-I, Cheng A-L, Hsu P-N. *Helicobacter pylori* sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP. *Cell Death Dis*. 2014;5e1109. doi:10.1038/cddis.2014.81
65. Huang K, Zhang J, O'Neill KL, Gurumurthy CB, Quadros RM, Tu Y, Luo X. Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate the BH3-only Protein Bid during TRAIL-induced Apoptosis. *J Biol Chem*. 2016;291(22):11843–51. doi:10.1074/jbc.M115.711051

66. Gillissen B, Richter A, Overkamp T, Essmann F, Hemmati PG, Preissner R, Belka C, Daniel PT. Targeted therapy of the XIAP/proteasome pathway overcomes TRAIL-resistance in carcinoma by switching apoptosis signaling to a Bax/Bak-independent 'type I' mode. *Cell Death Dis.* 2013;4e643. doi:10.1038/cddis.2013.67
67. Pécot J, Maillet L, Le Pen J, Vuillier C, Trécesson SdC, Fétiveau A, Sarosiek KA, Bock FJ, Braun F, Letai A, Tait SWG, Gautier F, Juin PP. Tight Sequestration of BH3 Proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance. *Cell Rep.* 2016;17(12):3347–58. doi:10.1016/j.celrep.2016.11.064
68. Bhola PD, Letai A. Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Mol Cell.* 2016;61(5):695–704. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.019
69. Bittner S, Knoll G, Ehrenschwender M. Hyperosmotic stress enhances cytotoxicity of SMAC mimetics. *Cell Death Dis.* 2017;8(8):e2967. doi:10.1038/cddis.2017.355
70. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schröder A, Kopp C, Siegert I, Maronna A, Wendelborn D, Linz P, Binger KJ, Gebhardt M, Heinig M, Neubert P, Fischer F, Teufel S, David J-P, Neufert C, Cavallaro A, Rakova N, Küper C, Beck F-X, Neuhofer W, Muller DN, Schuler G, Uder M, Bogdan C, Luft FC, Titze J. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* 2015;21(3):493–501. doi:10.1016/j.cmet.2015.02.003
71. Nikpey E, Karlsen TV, Rakova N, Titze JM, Tenstad O, Wiig H. High-Salt Diet Causes Osmotic Gradients and Hyperosmolality in Skin Without Affecting Interstitial Fluid and Lymph. *Hypertension.* 2017;69(4):660–8. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08539
72. Fischereder M, Michalke B, Schmöckel E, Habicht A, Kunisch R, Pavelic I, Szabados B, Schönermarck U, Nelson PJ, Stangl M. Sodium storage in human tissues is mediated by glycosaminoglycan expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313(2):F319-F325. doi:10.1152/ajprenal.00703.2016

7 Erklärung zum Promotionsverfahren

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung

der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.
- Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 19.10.2019

Simon Sirtl

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Dr. rer. nat. Martin Ehenschwender. Dank für eine exzellente Betreuung der Arbeit, eine immer fortwährende Geduld und eine wunderbare Zeit im Labor. Der Austausch mit dir hat mir immer sehr viel Motivation und Inspiration gegeben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. André Gessner für die Möglichkeit die Doktorarbeit am Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene durchführen zu können und für viele Ratschläge und Tipps rund um die Arbeit.

Vielen Dank an Dr. rer. nat. Gertrud Knoll, Dr. rer. nat. Sebastian Bittner und Maria Kurz für eine extrem schöne und gerade deswegen viel zu kurze, gemeinsame Zeit im Labor. Die Arbeit mit euch hat mir immer sehr viel Spaß gemacht und eure Hilfestellungen waren essentiell für das Gelingen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Barbara Schmidt und bei PD Dr. med. univ. Beatrice Schuler-Thurner für die zur Verfügung gestellten Melanomzelllinien.

Bedanken möchte ich von ganzem Herzen bei meinem Bruder Felix und bei meinen Eltern Dominique und Johann, die mich das gesamte Studium und die Promotion hindurch immer unterstützt haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Bei meinem Opa und bei meiner Tante möchte ich mich für die Korrektur der Arbeit bedanken. Ein spezieller Dank geht auch an meine Oma und meinen Opa. Vielen Dank für eure Unterstützung in all den Jahren.

Viele Personen haben mich in den letzten Jahren auf dem Weg zur Promotion unterstützt und begleitet. Im Besonderen bedanken möchte ich mich bei Simon, Pati, Xaver, Simon, Bernhard, Lubi und Daniel.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meiner Freundin Franziska bedanken. Danke für deine liebevolle Unterstützung während der Examensphase und der Promotion. Ich bin sehr glücklich, eine so wunderbare Partnerin wie dich an meiner Seite zu haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 09. März 1994
Geburtsort Bad Reichenhall (Bayern)
Nationalität Deutsch
E-Mail Adresse simon.sirtl@web.de

Beruflicher Werdegang

seit 09 / 2019 Facharztweiterbildung, Medizinische Klinik II, Klinikum der Universität München,
Campus Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität (Prof. Dr. Julia Mayerle)

Schulische & universitäre Ausbildung

06 / 2019 Erhalt der Approbation 09 / 2004 – 07 / 2012 Karls gymnasium Bad Reichenhall
06 / 2019 3. Staatsexamen 09 / 2000 – 07 / 2004 Grundschule Marzoll
04 / 2018 2. Staatsexamen
03 / 2015 1. Staatsexamen

Praktisches Jahr

01 / 2019 – 04 / 2019 Medizinische Klinik 1, Universitätsklinikum Erlangen
11 / 2018 – 12 / 2018 Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg
09 / 2018 – 11 / 2018 Department of Surgery, University Teaching Hospital Lusaka (Fakultätsstipendium)
05 / 2018 – 09 / 2018 Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Regensburg

Famulaturen

09 / 2017 Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg (Famulatur, 4 Wochen)
09 / 2016 Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg (Famulatur, 4 Wochen)
08 / 2016 Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg (Hospitation, 2 Wochen)
03 / 2016 Allgemeinmedizin, Dr. Hoschka, Teisendorf (Famulatur, 4 Wochen)
08 / 2015 Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Regensburg (Famulatur, 4 Wochen)

Promotion

Titel: "Steigerung der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose durch hyperosmotischen Stress"

Arbeitsgruppe: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Martin Ehrenschwender, Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene

Wissenschaftliche Preise und Auszeichnungen

07 / 2018 1. Platz Regensburger Onkologie-Preis (verliehen durch das Comprehensive Cancer Center Ostbayern)
06 / 2018 Posterpreis der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V. (Kategorie: Grundlagenforschung)
04 / 2018 Posterpreis der Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (Kategorie: Young Investigators)
11 / 2017 Stipendium der Fakultät für Medizin (PJ-Austauschprogramm mit dem UTH Lusaka, Sambia)