

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD Dr. Dr. Martin Ehrenschwender
Medizinische Mikrobiologie, Virologie
und Infektionsepidemiologie

STEIGERUNG DER WIRKSAMKEIT APOPTOSE-INDUZIERENDER
CHEMOTHERAPEUTIKA DURCH HYPEROSMOTISCHEN STRESS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Petra Riffelsberger

2022

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
PD Dr. Dr. Martin Ehrenschwender
Medizinische Mikrobiologie, Virologie
und Infektionsepidemiologie

STEIGERUNG DER WIRKSAMKEIT APOPTOSE-INDUZIERENDER
CHEMOTHERAPEUTIKA DURCH HYPEROSMOTISCHEN STRESS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Petra Riffelsberger

2022

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Dr. rer. nat. Martin Ehenschwender
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Richard Bauer
Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Apoptose	6
1.1.1	Die Caspasekaskade	7
1.1.2	Intrinsischer Apoptoseweg: Regulation und Ziel in der Tumorthherapie	8
1.2	Bedeutende Signalwege in der Tumorentstehung	10
1.2.1	p53	10
1.2.2	NF-κB	11
1.3	Ziel der Arbeit	12
2	Material	13
2.1	Geräte	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.3	Chemikalien und Reagenzien	14
2.4	Puffer und Lösungen	15
2.5	Antikörper	16
2.6	Kits	16
2.7	Zelllinien	17
2.8	Software	17
3	Methoden	17
3.1	Zellbiologische Methoden	17
3.1.1	Zellkultur	17
3.1.2	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	17
3.1.3	Zytotoxizitätsassay (MTT-Assay)	18
3.1.4	Caspase-3/7-Aktivitätsassay	18
3.1.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	18
3.2	Molekularbiologische Methoden	19
3.2.1	Extraktion von Ribonukleinsäuren	19

3.2.2	Umschreibung der RNA in cDNA	19
3.2.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	19
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	20
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten	20
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	20
3.3.3	Western Blot-Analyse und immunologischer Nachweis von Proteinen	21
4	Ergebnisse	22
4.1	Hyperosmotischer Stress verstärkt die Zytotoxizität BCL-XL-inhibierender BH3-Mimetika	22
4.2	Hyperosmotischer Stress steigert die durch BH3-Mimetika vermittelte Caspase-Aktivierung	24
4.3	p53 ist am mitochondrialen Priming unter hyperosmotischem Stress beteiligt.....	26
4.3.1	p53 wird unter hyperosmotischem Stress stabilisiert	26
4.3.2	p53-Defizienz führt bei Behandlung mit BCL-XL-Inhibitoren zu verminderter Apoptose	26
4.4	Stabilisierung von p53 unter hyperosmotischem Stress	29
4.4.1	Hyperosmotischer Stress führt zur Aktivierung von p38 MAPK	29
4.4.2	Rolle von p38 für die p53-Stabilisierung unter hyperosmotischem Stress	31
4.4.3	p38 trägt zur Transkription von BAX bei.....	32
4.5	Einfluss von hyperosmotischem Stress auf den antiapoptotischen NF- κ B- Signalweg	34
4.5.1	Hyperosmotischer Stress verringert die Sekretion des NF- κ B-Zielgens IL-8	34
4.5.2	Unveränderte Aktivierbarkeit des NF- κ B-Signalwegs unter hyperosmotischem Stress	36
5	Diskussion	37

6	Zusammenfassung	42
7	Anhang	43
	7.1 Abbildungsverzeichnis	43
	7.2 Apoptosis-Library	44
8	Literaturverzeichnis	45
9	Danksagung	

1 Einleitung

Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (1). Unter anderem aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung hat sich die Zahl an Krebsneuerkrankungen seit den 1970er-Jahren in Deutschland fast verdoppelt (2). Dieser Umstand stellt die Krebsforschung vor enorme Herausforderungen, um die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und Medikamente voranzutreiben. Die Entstehung von malignen Tumoren (Karzinogenese) unterliegt einem mehrstufigen Prozess. Die Zellproliferation wird dabei von zwei Gen-Gruppen kontrolliert, den Protoonkogenen und deren Gegenspielern, den Tumorsuppressorgenen. Genprodukte der Tumorsuppressorgene sind an Signalwegen beteiligt, die Zellzyklus und Zelltod regulieren und so wachstumshemmend wirken. Viele dieser Tumorsuppressorgene wurden aufgrund ihrer charakteristischen Inaktivierung in bestimmten Krebsentitäten entdeckt. Das Retinoblastomprotein Rb beispielsweise spielt als Tumorsuppressor eine entscheidende Rolle im Zellzyklus, indem es den Eintritt der Zelle in die S-Phase kontrolliert. Krebszellen mit Defekten im Retinoblastom-Gen entkommen dieser Regulation, was zur persistierenden Proliferation führt. Der mitunter bedeutendste Tumorsuppressor p53 kann bei einer DNA-Schädigung die weitere Progression im Zellzyklus stoppen oder bei irreparabilem Schaden eine regulierte Form des Zelltods (Apoptose) einleiten. Nicht nur Mutationen in Tumorsuppressorgenen, sondern auch in Genen, die für die DNA-Reparatur zuständig sind, können so zur Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle beitragen (3). Tumorzellen entwickeln außerdem verschiedene Strategien, um Apoptose zu limitieren oder gar zu umgehen. Durch vermehrte Expression antiapoptotischer bzw. Herabregulation proapoptotischer Proteine kommt es schließlich zur Apoptoseresistenz, was neben der Tumorprogression in vielen Fällen auch zur Therapieresistenz führt. Ein Eingreifen in diese Resistenzmechanismen ist ein vielversprechendes Therapiekonzept für die Zukunft (4).

1.1 Apoptose

Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods, spielt eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht zwischen der Proliferation von Zellen und deren Tod. Defekte in der Apoptoseregulation sind an der Entstehung vieler Krankheiten beteiligt, weshalb Apoptose einen zentralen Angriffspunkt in der Therapie dieser Erkrankungen darstellt

(5). Auch die derzeit in der Krebstherapie verwendeten Chemotherapeutika eliminieren Tumorzellen vor allem durch Induktion von Apoptose (6). Morphologisch zeichnen sich apoptotische Zellen durch Schrumpfen, Zellkernfragmentierung und Membranausstülpungen aus. Durch Erhaltung der Membranintegrität dringt der Zellinhalt nicht nach außen und eine Entzündungsreaktion wird vermieden. Die abgeschnürten apoptotischen Vesikel werden von Phagozyten aufgenommen und schließlich verdaut (7).

1.1.1 Die Caspasekaskade

Apoptose kann durch Aktivierung bestimmter Rezeptoren an der Zelloberfläche (extrinsisch) oder durch zytotoxischen Stress (intrinsisch) ausgelöst werden (7). Sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Weg kommt es letztlich zur Aktivierung sogenannter Caspasen, Aspartat-spezifischer Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 stehen am Anfang der Signalkaskade und leiten damit die Apoptose ein, wohingegen die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 durch die proteolytische Spaltung ihrer Substrate zum Zelltod führen. Zu den Substraten der Effektorcaspasen zählen unter anderem Proteine des Zytoskeletts, die für die Struktur der Zelle wichtig sind. Caspasen werden als inaktive Vorstufen (Procaspasen) exprimiert und kaskadenartig proteolytisch aktiviert (8). Die Aktivierung der Initiatorcaspasen erfolgt dabei über den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg. Der extrinsische Apoptoseweg beginnt mit der Bindung eines Liganden an sog. Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Familie. Nachfolgend kommt es zur Oligomerisierung der Rezeptoren und intrazellulär zur Rekrutierung des Adapterproteins Fas-associated Death Domain (FADD). Dieser als DISC (Death-inducing signalling complex) bezeichnete Komplex kann Procaspase 8 binden, was zu deren autokatalytischer Spaltung (und damit Aktivierung) führt und die Freisetzung enzymatisch aktiver Caspase 8 zur Folge hat (9). In sog. Typ I-Zellen werden große Mengen aktiver Caspase 8 am DISC freigesetzt, wodurch unmittelbar eine ausreichende Aktivierung von Effektorcaspasen (vor allem Caspase 3) erreicht und Zelltod induziert wird. In Typ II-Zellen wird am DISC nur eine geringe Menge an Caspase 8 aktiviert, sodass die nachfolgende Aktivierung von Effektorcaspasen ineffizient verläuft. Für die Apoptoseinduktion sind diese Zellen auf eine Verstärkung des initialen Zelltodsignals über den Mitochondrien-assoziierten, intrinsischen Apoptoseweg angewiesen (10). Die Verknüpfung von extrinsischem und

intrinsischem Signalweg erfolgt über die Caspase 8-vermittelte Spaltung des proapoptotischen BCL-2-Proteins BID (BH3-interacting domain death agonist) zu tBID (truncated BID). tBID ist in der Lage, den intrinsischen Apoptoseweg zu initiieren (11).

1.1.2 Intrinsischer Apoptoseweg: Regulation und Ziel in der Tumorthherapie

Intrazelluläre Signale wie DNA-Schädigung, oxidativer Stress oder die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren können den intrinsischen Apoptoseweg aktivieren. Die Aktivierung wird von pro- und antiapoptotischen Proteinen der BCL-2-Familie reguliert (12). Diese bestehen aus bis zu vier gleichen BCL-2 Homology (BH)-Domänen. Die antiapoptotischen BCL-2-Proteine BCL-2, BCL-XL, BCL-W und MCL-1 besitzen vier BH-Domänen (BH1-4) und können die Apoptose verhindern, indem sie proapoptotische BCL-2-Proteine binden und so deren Funktion antagonisieren. Die proapoptotischen Effektorproteine BAX (BCL-2-associated X protein) und BAK (BCL-2-antagonist/killer) bestehen ebenso aus diesen vier BH-Domänen. Die proapoptotischen BH3-only-Proteine (z. B. BIM, PUMA, NOXA, BID, BAD) hingegen besitzen nur eine BH3-Domäne. Sie hemmen einerseits antiapoptotische BCL-2-Proteine („Sensitizers“) oder aktivieren (wie beispielsweise tBID und BIM) direkt BAX und/oder BAK („Activators“).

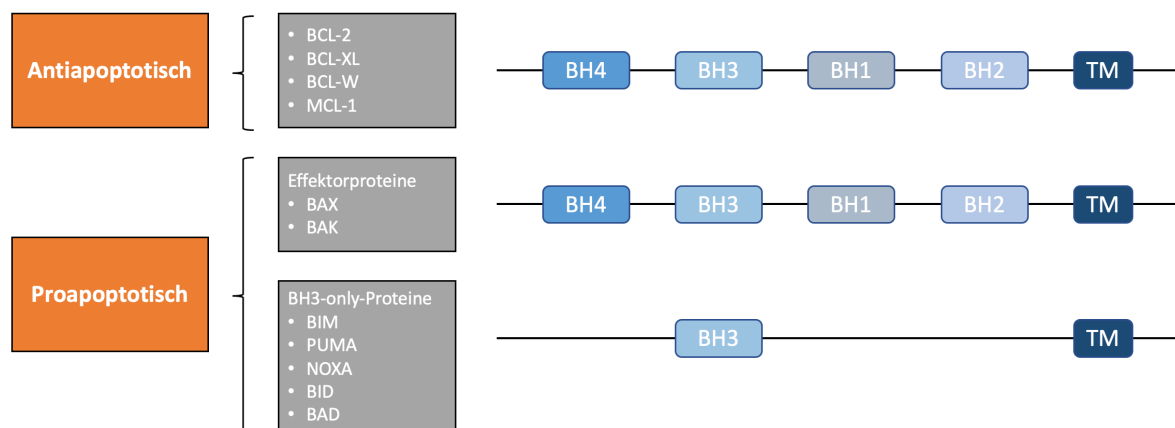


Abb. 1: Pro- und antiapoptotische Proteine der BCL-2-Familie

In Anlehnung an (13). Die Abbildung zeigt die BCL-2 Homology (BH)-Domänen der drei Untergruppen von BCL-2-Proteinen. Die BH3-Domäne von BH3-only-Proteinen wirkt als Ligandendomäne und vermittelt die Interaktion mit anderen Untergruppen. Viele pro- und antiapoptotische BCL-2-Proteine verfügen außerdem über eine Transmembrandomäne (TM), um die Assoziation mit der äußeren Mitochondrienmembran zu ermöglichen.

BH3-Mimetika, eine neue Klasse von Chemotherapeutika, sind in der Lage, die Wirkung bestimmter BH3-only-Proteine nachzuahmen. Somit können BH3-Mimetika

direkt die mitochondriale Apoptose induzieren, indem sie an antiapoptotische BCL-2-Proteine binden und diese neutralisieren (14). BH3-Mimetika wirken so vor allem als „Sensitizer“ durch mitochondriales Priming (d. h. leichtere BAX-/BAK-Aktivierung) und verbessern damit die Wirksamkeit konventioneller Chemotherapeutika (15). Interessanterweise korreliert das mitochondriale Priming direkt mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie (16). In Abwesenheit der porenbildenden Proteine BAX und/oder BAK entkommen Tumorzellen jedoch sowohl dem mitochondrialen Priming als auch der Aktivierung der intrinsischen Apoptose, was auf eine Abhängigkeit von BAX/BAK schließen lässt (17).

ABT-737, das BCL-2, BCL-XL und BCL-W bindet, war die erste Substanz der BH3-Mimetika (13). Kürzlich wurde der BCL-2-Inhibitor Venetoclax (ABT-199) für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) von der US-amerikanischen FDA zugelassen. Obwohl diese Wirkstoffe bereits großes Potenzial bei hämatologischen Krebserkrankungen gezeigt haben, stellt deren Einsatz bei soliden Tumoren noch eine Herausforderung dar (15).

Die Aktivierung von BAX und BAK führt schließlich zu deren Oligomerisierung und zur Ausbildung eines Porenkomplexes in der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization = MOMP) (14). Dadurch gelangen weitere apoptosefördernde Proteine wie Cytochrom c oder Smac/DIABLO aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytosol. Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1), wodurch das Apoptosom gebildet wird. Das Apoptosom dient als Protein-Protein-Interaktionsplattform. Die Rekrutierung und Aktivierung der Initiatorcaspase 9 führt wiederum zur Aktivierung der nachgeschalteten Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Zusätzlich verstärkt wird die Aktivierbarkeit von Caspasen durch die Freisetzung von Smac/DIABLO aus dem Mitochondrium. Smac/DIABLO antagonisiert sog. IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), welche im Zytosol vorkommen und eine inhibitorische Wirkung auf Caspasen haben (5).

Neben zelleigenen Faktoren können auch die biophysikalischen Gegebenheiten der direkten Tumorumgebung (Tumormilieu) den Ablauf der intrinsischen und extrinsischen Apoptose beeinflussen (18). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen unter hyperosmotischem Stress eine verringerte Schwelle für die

Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs aufweisen (19-22). Ursächlich könnten hypertonzitätsbedingte Veränderungen im Netzwerk der BCL-2-Familie sein. Bisher wurde der Einfluss von hyperosmotischem Stress auf Tumorzellen nicht umfassend untersucht, jedoch gibt es Hinweise auf eine gesteigerte Cisplatin-Sensitivität (23).

1.2 Bedeutende Signalwege in der Tumorentstehung

1.2.1 p53

Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist in etwa 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert und somit das häufigste mutierte Gen in der Tumorentstehung. *TP53* kodiert für den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53, der unter anderem an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt ist. Die Inaktivierung von p53 hat zur Folge, dass Zellen erhebliche DNA-Schäden tolerieren, wodurch genetische Mutationen entstehen, die eine maligne Progression bewirken können (24). In vitalen Zellen ist der p53-Spiegel sehr niedrig, da es für den proteasomalen Abbau durch die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 markiert (ubiquityliert) wird (25). Zellstress führt über posttranslationale Modifikationen zur Stabilisierung von p53, was in einer verminderten proteasomalen Degradation resultiert. So führt die Phosphorylierung von p53 am Serin-15 zu einer Stabilisierung, indem die Wechselwirkung mit MDM2 reduziert wird (26). Nach der Aktivierung kann p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben und bindet als Homotetramer an die Promotoren seiner Zielgene (27).

p53 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von BCL-2-Proteinen. Es initiiert Apoptose als Reaktion auf DNA-Schäden (z. B. durch Bestrahlung, chemische Substanzen oder oxidativen Stress) durch die Induktion proapoptotischer BH3-only-Proteine wie BIM, PUMA (p53-upregulated mediator of apoptosis) (28) und NOXA (7, 29). Darüber hinaus kann p53 direkt die Expression des Effektormoleküls BAX induzieren (7, 27, 30). Aus Vorarbeiten geht hervor, dass konstitutives p53 das mitochondriale Priming unter isotonen Bedingungen unabhängig von der Hochregulation an PUMA verstärkt und die Induktion der Apoptose durch BCL-XL-Inhibitoren begünstigt (31). In murinen NIH3T3-Zellen zeigte sich bei steigender Osmolarität eine Zunahme der p53-Expression, was auf eine Beteiligung von p53 am mitochondrialen Priming unter hyperosmotischem Stress hindeutet (32).

1.2.2 NF- κ B

NF- κ B (nuclear factor- κ B) ist als Transkriptionsfaktor an der Regulation von Entzündungen sowie der Immunabwehr beteiligt und praktisch in jedem Zelltyp vorhanden. Dessen fünf Untereinheiten werden als p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) und NF- κ B2 (p52/p100) bezeichnet und bilden Homo- oder Heterodimere. Diese sind in den meisten ruhenden Zellen an inhibitorische I κ B (Inhibitoren von NF- κ B)-Moleküle gebunden. Alle NF- κ B-Untereinheiten besitzen eine N-terminale Rel-Homologiedomäne (RHD), die den DNA-Kontakt sowie die Dimerisierung der Untereinheiten vermittelt. Die vier I κ B-Proteine I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ und BCL-3 sind durch Ankyrin-Wiederholungen gekennzeichnet, über die sie an die RHD von NF- κ B binden. p105 und p100, die Vorläufer von p50 und p52, verfügen ebenso über Ankyrin-Wiederholungen. Diese werden durch das Proteasom gespalten, wodurch die reifen Proteine p50 und p52 freigesetzt werden. Durch extrazelluläre Stimuli wie TNF α , Interleukin-1 oder LPS kommt es zur raschen Phosphorylierung, Ubiquitylierung und letztlich zum proteolytischen Abbau von I κ B, wodurch NF- κ B in den Zellkern translozieren kann und dort die Transkription seiner Zielgene reguliert. Die Phosphorylierung von I κ B an N-terminalen Serinresten übernimmt der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex, welcher sich aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (auch NEMO) zusammensetzt (33).

NF- κ B induziert unter anderem antiapoptotische Zielproteine wie BCL-2, IAPs und c-FLIP (cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) inhibitory protein). Ein weiteres Zielgen ist I κ B α selbst. Über eine negative Rückkopplung wird somit die NF- κ B-Aktivierung wieder beendet.

Eine abweichende oder konstitutive Aktivierung von NF- κ B wurde in vielen Malignomen nachgewiesen (34). NF- κ B und von ihm regulierte Proteine können somit die Tumorentstehung durch Unterdrückung der Apoptose fördern (5).

1.3 Ziel der Arbeit

Aus Vorarbeiten geht hervor, dass durch Veränderung der direkten Tumorumgebung (z. B. durch hyperosmotischen Stress) eine Verminderung der Schwelle von Tumorzellen für die Aktivierung der intrinsischen Apoptose („mitochondriales Priming“) erreicht werden kann (19-22). Im Konkreten zeigte sich unter hyperosmotischem Stress eine erhöhte Zytotoxizität des proapoptotischen BH3-Mimetikums ABT-737 (19). Bisher ungeklärt ist jedoch, bei welchen Chemotherapeutika hyperosmotischer Stress die Wirksamkeit erhöht bzw. welcher Mechanismus dem zugrunde liegt. Einerseits entkommen Tumorzellen in Abwesenheit der Effektormoleküle BAX und/oder BAK sowohl dem mitochondrialen Priming als auch der Aktivierung der intrinsischen Apoptose (17) und andererseits kann p53 direkt die Expression von BAX induzieren (7, 27, 30). Beides weist darauf hin, dass sowohl BAX/BAK als auch p53 eine entscheidende Rolle im Ablauf des mitochondrialen Primings unter hyperosmotischem Stress innehaben.

Hyperosmotischer Stress entsteht, wenn Osmolyte wie beispielsweise NaCl nicht passiv durch die Zellmembran diffundieren können und somit einen osmotischen Druckgradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum aufbauen. Dies wiederum aktiviert osmoadaptive Mechanismen für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, um das Zellüberleben zu sichern (35). Versagen diese Anpassungsreaktionen auf die veränderte Zellumgebung, so kommt es durch persistierenden hyperosmotischen Stress zu Zellzyklusarrest, DNA-Schädigung, Hemmung der Transkription/Translation und schließlich zur Apoptoseinduktion (36). Die Regulation der durch hyperosmotischen Stress induzierten Apoptose erfolgt dabei durch Mitochondrien sowie Proteine der BCL-2-Familie (37).

Ziel dieser Arbeit ist es, über das Screening einer Bibliothek mit 113 verschiedenen Apoptose-induzierenden Substanzen im Zellkulturmodell herauszufinden, ob die unter hyperosmotischem Stress verstärkte Zytotoxizität für bestimmte Substanzklassen spezifisch ist. Zudem soll die Rolle von p53 in der Apoptose unter hyperosmotischem Stress genauer untersucht werden. Demgegenüber soll stellvertretend für die antiapoptotischen Signalwege ergründet werden, ob die mögliche Herabregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B einen Beitrag zum mitochondrialen Priming unter hyperosmotischem Stress leistet.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blockthermostat	BT 100	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ECL-Imager	ChemiluxPro	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Elektrophorese-Kammer	Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Laminar-Flow-Werkbank	Antair BSK	Weiss Pharmatechnik GmbH, Oldenburg
Magnetrührer	RH basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Microplate Reader	Model 680	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Microplate Reader	VIKTOR ³ 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer, Waltham, USA
Mikroskop	Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Netzgerät	E425	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Netzgerät	POWER PAC 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pipette	Multipette® E3	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette	PIPETMAN Classic P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Incorporated, Middleton, WI, USA
Pipette	Research pro 0,5-10 µl / 5-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetboy NI-MH 9V	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Schüttelgerät	DUOMAX 2030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Schüttelgerät	MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tankblotter	Peqlab	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermocycler	ABI PRISM™ 7900HT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Quebec, Kanada
Ultraschallbad	Diagenode Bioruptor	Diagenode SA, Seraing, Belgien
Vakuum-Pumpe	BVC 21	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Zählkammer	BLAUBRAND®	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Modell / Größe	Hersteller
ELISA-Platten	96 Well (442404)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Eppendorf Tubes	1,5 / 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Tubes	5 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Falcon Tubes	50 / 15 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
PCR Tubes	0,1 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
PCR-Platten	384 Well (04-082-0640)	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen	10 / 20 / 200 / 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Combitips advanced® 1 / 2,5 / 5 / 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran		VWR International GmbH, Darmstadt
Serologische Pipetten	5 / 10 / 25 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Whatman Paper		GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Zellkulturflaschen	T175 (83.3912.002) T75 (83.3911.002)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturplatten	Falcon® 96-well Black Flat Bottom (353376)	Corning Incorporated, NY, USA
Zellkulturplatten	TC-Platte Standard, F 48 Well (83.3923) 96 Well (83.3924)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturschalen	TC-Schale 60 (83.3901)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellschaber	25 cm (83.1830)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
ABT-737 (S1002)	Selleck Chemicals, München
Acrylamid 4K-Solution (30 %) Mix 37.5:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (10 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BD OptEIA™ Substrate Reagent A	BD Biosciences, San Diego, USA
BD OptEIA™ Substrate Reagent B	BD Biosciences, San Diego, USA
BIRB 796	Selleck Chemicals, München
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
FastStart Universal Probe Master (Rox) (04 913 957 001)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gibco™ DPBS (1x) (14190094)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
H ₂ O ₂ (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Humanes TNFα	D. Männel, Universität Regensburg
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)	Biomol GmbH, Hamburg

Natriumchlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P5726)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (P0044)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease Inhibitor (Complete EDTA-free)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNase-freies Wasser	Horizon Discovery, Cambridge, UK
Roti®-Block-Konzentrat (10x)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640 (P04-16500)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
TaqMan® Sonde huBAX (Hs00180269_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan® Sonde huHPRT1 (Hs02800695_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA in PBS (P10-023500)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
WEHI-539	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
zVAD-fmk (Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-methyl]-Fluoromethylketon)	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung / Herstellung
2x SDS-PAGE-Ladepuffer	125 mM Tris 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerol 0,01 (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
4x SDS-PAGE-Ladepuffer	250 mM Tris 8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol 0,004 % Bromphenolblau 20 (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)
ECL-Detektionsreagenz 1	50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 8,6)
ECL-Detektionsreagenz 2	11 mg p-Coumarsiure in 10 ml DMSO
MCBL-Lysepuffer	0,5 % (v/v) NP-40 150 mM NaCl 50 mM Tris; pH 7,4
MTT-Lysepuffer	10 % (w/v) SDS in 10 mM HCl
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris; pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer	144 g Glycin (192 mM) 30 g Tris (250 mM) 10 g SDS (1 % [w/v]) ad 1 l H ₂ O

TBS	50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl; pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween® 20
Trenngelbuffer	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol

2.5 Antikörper

Antikörper	Spezies	Artikelnummer	Verdünnung	Hersteller
Caspase-3	Rabbit	9662S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	Goat	170-6516	1:4000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Goat	172-1019	1:4000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
IκBα (44D4)	Rabbit	4812S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
P-IκBα (S32) (14D4)	Rabbit	2859S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
P-p38 MAPK	Rabbit	9211S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
P-p53 (S15)	Rabbit	9284S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
p38 MAPK	Rabbit	9212S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
p53 (1C12)	Mouse	2524S	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
p70 S6 Kinase	Rabbit	2708	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Tubulin-α Ab-2 (DM1A)	Mouse	MS-581-P1	1:2000	NeoMarkers, Fremont, CA, USA

2.6 Kits

Kit	Artikelnummer	Hersteller
Apoptosis Compound Library	HY-L003	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set	555244	BD Biosciences, San Diego, USA
RNeasy® Mini Kit (50)	74104	QIAGEN GmbH, Hilden
Cell Meter™ Caspase 3/7 Activity Apoptosis Assay Kit	22796	AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA

2.7 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HCT116 p53 KO	Ursprung: humanes Kolonkarzinom Horizon Discovery, Cambridge, UK
HCT116 Wildtyp	Ursprung: humanes Kolonkarzinom Leibniz-Institut DSMZ
SW480	Ursprung: humanes kolorektales Adenokarzinom Leibniz-Institut DSMZ

2.8 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ (1.51f)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Intas ChemoStar	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Microplate Manager ELISA-Reader (5.2.1)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop 1000 (3.8.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RQ Manager (1.2.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS 2.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wallac 1420 Manager	PerkinElmer, Waltham, USA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

Die verwendeten adhärenenten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen unter einem Laminar Flow gehandhabt und bei 37 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 95 % Luftfeuchte kultiviert. Das Zellkultur-Medium RPMI wurde zuvor mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Je nach Konfluenz der Zellen wurden diese nach zwei bis drei Tagen passagiert. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung benetzt und bei 37 °C für drei bis fünf Minuten inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 7,5 ml Medium aufgenommen, in neue Kulturflaschen gesplittet und mit frischem Medium überschichtet.

3.1.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Auszählung aller vier Quadranten, wobei daraus der Mittelwert gebildet wurde. Je nach Experiment wurde

die Zellsuspension anschließend auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und für die jeweiligen Versuche in entsprechende Kulturgefäße ausgesät.

3.1.3 Zytotoxizitätsassay (MTT-Assay)

Die geernteten Zellen wurden auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät (pro Well 20.000 Zellen in 50 µl Medium) und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit den jeweiligen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach etwa 20 Stunden wurden in jedes Well 10 µl MTT pipettiert und die Zellkulturplatte für eineinhalb Stunden wieder in den Brutschrank gestellt. Zum Stoppen der Reaktion (Reduktion von MTT) wurden schließlich je Well 100 µl MTT-Lysepuffer zugegeben und die Zellen wiederum bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur photometrischen Auswertung am Bio-Rad Microplate Reader wurde die Software Microplate Manager ELISA-Reader verwendet. Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde die Extinktion ermittelt und daraus das prozentuale Zellüberleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism 5.

3.1.4 Caspase-3/7-Aktivitätsassay

Auf eine 96-Well-Blackwell-Platte wurden 30.000 Zellen pro Well ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Behandlung mit verschiedenen Substanzen folgte je nach Versuch eine Stimulationszeit von vier bis sieben Stunden im Brutschrank. Gemäß Herstellerprotokoll wurden nach Ablauf der Zellstimulation pro Well 80 bis 85 µl Substrat in Kombination mit dem Assay-Puffer zugegeben und erneut inkubiert (1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur). Die Fluoreszenz-Emission wurde am VIKTOR³ 1420 Multilabel Counter mit der Software Wallac 1420 Manager detektiert.

3.1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der Menge an sezerniertem Interleukin-8 (IL-8) wurde der Überstand von zuvor mit NaCl und TNF stimulierten HCT116-Zellen untersucht. Es wurden 15.000 Zellen in 150 µl Medium auf 96-Well-Platten ausgesät. Vor der Stimulation wurde das Medium gewechselt, um bereits sezerniertes, endogenes IL-8 zu entfernen. Die Quantifizierung der Überstände erfolgte mit dem BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set gemäß den Vorgaben des Herstellers und dem Microplate Reader von Bio-Rad.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Extraktion von Ribonukleinsäuren

Die RNA-Isolierung aus den kultivierten Zellen erfolgte mithilfe des RNeasy® Mini Kits der Firma Qiagen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 8000 g und Raumtemperatur. Das Zellpellet wurde zuerst mobilisiert und dann in 350 µl RLT-Lysepuffer homogenisiert. Die weiteren Reaktionsschritte wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es folgte die Bestimmung der RNA-Konzentrationen am Spektrophotometer NanoDrop 1000. Die isolierte RNA wurde dann bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Hierfür wurden 2 µg RNA mittels der reversen Transkriptase MultiScribe™ der Firma Thermo Fisher Scientific in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Der Reaktionsansatz besteht aus 25 µl verdünnter RNA und 25 µl Mastermix. Der Mastermix wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit wie folgt pipettiert: 25 µl 10x RT Buffer, 10 µl 25x dNTP-Mix (100 mM), 25 µl 10x RT Random Primer, 13 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase sowie 53 µl Wasser. Die reverse Transkription wurde im Thermocycler PTC-200 der Firma MJ Research mit folgendem Programm durchgeführt: 10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C, 5 min bei 85 °C (Reaktions-Stopp durch Hitzeinaktivierung des Enzyms) und schließlich Abkühlung auf 4 °C. Die gewonnene cDNA wurde bis zur quantitativen Real-Time-PCR bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte im Thermocycler ABI PRISM™ 7900HT von Thermo Fisher Scientific. Das Programm für den PCR-Lauf startet mit einer Temperatur von 50 °C für 2 Minuten und einer anschließenden 10-minütigen Polymerase-Aktivierung bei 95 °C. Es folgen 40 Zyklen mit abwechselnd 95 °C für 15 Sekunden (Denaturierung) und 60 °C für eine Minute (Annealing/Extension). Die Ansätze wurden in Dubletten pipettiert, wobei ein Well (Gesamtvolumen 10 µl) aus 5,5 µl TaqMan-Mastermix und 4,5 µl cDNA-Verdünnung besteht. Der TaqMan-Mastermix beinhaltet 110 µl FastStart Universal Probe Master (Rox) und 11 µl der TaqMan-Sonde des gewünschten Gens. Als Referenzgen diente das Haushaltsgen HPRT. Die Auswertung der mRNA-Level erfolgte mit der Software RQ-Manager und der relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Pro Zellkulturschale (6 cm) wurden eine bzw. zwei Millionen Zellen ausgesät und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach erfolgter Stimulation und gewünschter Inkubationsdauer wurden die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch abgelöst und die Zellsuspension in ein Falcon (15 ml) überführt. Die gewonnenen Proben wurden für 5 Minuten bei 400 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Je nach Methode (Triton- oder Gesamtzelllysate) folgten weitere Schritte:

Tritonlysate (Detektion zytoplasmatischer Proteine)

Diese Methode beruht auf der Detergens-basierten Lyse der Plasmamembran. Je nach Größe der Zellpellets wurden 100 bis 120 µl MCBL-Lysepuffer (mit 25x Proteaseinhibitor versetzt, um den proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern) zugegeben und die Zellsuspension in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach 30-minütiger Lyse auf Eis wurden die Proben bei 4 °C für 10 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand mit einer äquivalenten Menge an 4x Laemmli-Puffer für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und bei -20 °C bis zur SDS-PAGE aufbewahrt.

Gesamtzelllysate (Detektion phosphorylierter Proteine)

Das Zellpellet wird in 100 µl 2x Laemmli-Puffer (mit jeweils 1:100 Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3 versetzt) aufgenommen und bei 95 °C für 10 Minuten aufgeköcht. Anschließend wird das Lysat für 10 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert und die Proben bis zur SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Es wurde das Mini PROTEAN® Elektrophorese-System der Firma Bio-Rad verwendet. Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zu zerstören, wurden die Proben bei 95 °C in Laemmli-Puffer aufgeköcht und dadurch denaturiert. Das ebenfalls im Puffer enthaltene Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) lagert sich an die Proteine an und maskiert deren Eigenladung, sodass alle Proteine negativ geladen sind. Durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol werden außerdem Disulfidbrücken reduziert und Glycerin sowie Bromphenolblau erleichtern das Auftragen der Proben auf das Gel.

Je nach Größe des zu detektierenden Proteins erfolgte das Gießen von 12%igen bzw. 15%igen Polyacrylamid-Trenngelen, welche mit Isopropanol überschichtet wurden. Nach der Polymerisation des Gels und der Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel darübergegossen und ein Kamm eingefügt. Nach vollständiger Polymerisation und Entfernung des Kamms wurden die Geltaschen mit den Proben sowie einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V und 25 mA pro Gel. Dabei wird zuerst das Sammelgel durchlaufen, wodurch die Proteine bei neutralem pH-Wert konzentriert werden und bei Erreichen des Trenngels vom gleichen Startpunkt aus durch das basische Trenngel wandern. Im Anschluss an die SDS-PAGE folgte ein Western Blot.

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Bestandteile	Sammelgel (4 ml)	12 % Trenngel (10 ml)
H ₂ O	2,7 ml	3,2 ml
30 % Acryl-Bisacrylamid-Mix	0,67 ml	4 ml
1,5 M Tris pH 6,8 (Sammelgel) pH 8,8 (Trenngel)	0,5 ml	2,6 ml
10 % SDS	0,04 ml	0,1 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,04 ml	0,1 ml
TEMED	0,008 ml	0,02 ml

3.3.3 Western Blot-Analyse und immunologischer Nachweis von Proteinen

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (0,2 µm) transferiert. Die PVDF-Membran wird kurz in Methanol äquilibriert, um die Hydrophobie der Membranoberfläche zu reduzieren. Vier Whatman-Filterpapiere werden dann zusammen mit der PVDF-Membran in Transferpuffer getaucht und der Blot wie folgt zusammengebaut:

Sandwich-Pad
2 Lagen Whatman-Papier
Trenngel mit Proteinen
PVDF-Membran
2 Lagen Whatman-Papier
Sandwich-Pad

Die Blot-Kassetten wurden in einen Tankblotter von Peqlab gegeben und eine

Stromstärke von 330 mA bei 140 V eingestellt. Nach dem 54-minütigen Proteintransfer wurden die Membranen für mindestens eine Stunde in 1x Roti®-Block gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein bei 4 °C auf dem Schüttler über Nacht. Die Primärantikörper wurden 1:1000 in Roti®-Block verdünnt (Tubulin 1:2000). Nach drei Waschschritten von je 10 Minuten mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für eineinhalb bis zwei Stunden bei 4 °C. Die Zweitantikörper wurden ebenfalls in Roti®-Block verdünnt (1:4000). Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 5 Minuten mit einem Luminol-basierten Substrat (ECL-Detektionsreagenz 1 und 2 sowie H₂O₂) benetzt. Die Chemolumineszenz wurde unmittelbar danach über einen ECL-Imager (Intas ChemiluxPro) mit der Software Intas ChemoStar detektiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mithilfe der Software ImageJ.

4 Ergebnisse

4.1 Hyperosmotischer Stress verstärkt die Zytotoxizität BCL-XL-inhibierender BH3-Mimetika

Aus Vorversuchen war bekannt, dass hyperosmotischer Stress (generiert durch Zugabe von osmotisch aktiven Substanzen wie NaCl) die Toxizität des BH3-Mimetikums ABT-737 in HCT116-Zellen erhöht (Abb. 3 A). ABT-737 wirkt dabei über die Hemmung der BAX-/BAK-inhibierenden Proteine BCL-2, BCL-W und BCL-XL proapoptotisch. Unbekannt war jedoch, ob es weitere Substanzen gibt, bei denen durch NaCl-Zugabe ebenfalls eine bessere Wirksamkeit erzielt werden kann. Um dies zu überprüfen, erfolgte das Screening einer Apoptosis Compound Library mit 113 Apoptose-induzierenden Substanzen, die an unterschiedlichen apoptotischen Signalwegen und Proteinen ansetzen (Abb. 2). Das Screening erfolgte in der Zelllinie HCT116 mittels Zytotoxizitätsassays. NaCl allein zeigte allenfalls marginale zytotoxische Effekte.

Neben ABT-737 wiesen drei weitere Substanzen eine verstärkte Zytotoxizität unter hyperosmotischem Stress auf (Abb. 3). Alle diese drei Substanzen hemmen gewisse antiapoptotische Proteine der BCL-2-Familie: A-1155463 und A-1331852 hemmen selektiv BCL-XL, Navitoclax hemmt wie ABT-737 BCL-2, BCL-W sowie BCL-XL. Das Screening zeigte also, dass die Wirksamkeit der Substanzen unter NaCl-Zugabe nur

erhöht wird, wenn sie unter anderem BCL-XL hemmen, sei es selektiv oder zusätzlich zu anderen BCL-2-Proteinen.

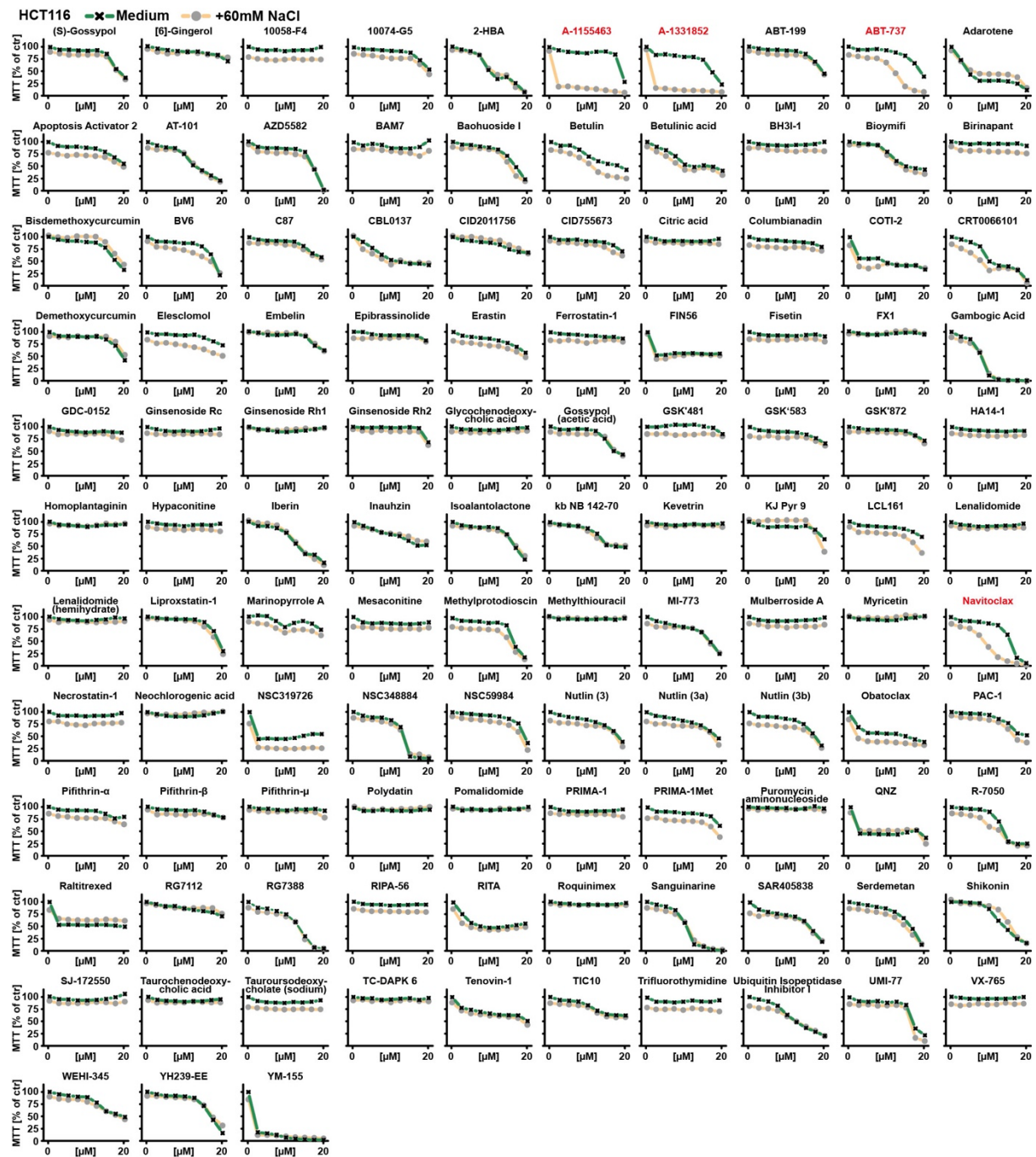


Abb. 2: Library-Screening mittels MTT-Assays

Die Zellen wurden in steigender Konzentration (0-20 μM) mit der jeweiligen Substanz in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl behandelt. In roter Schrift sind die Substanzen markiert, bei denen eine gesteigerte Zytotoxizität unter hyperosmotischem Stress zu sehen ist. Die MTT-Intensität gilt als Maß für die Zellviabilität. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

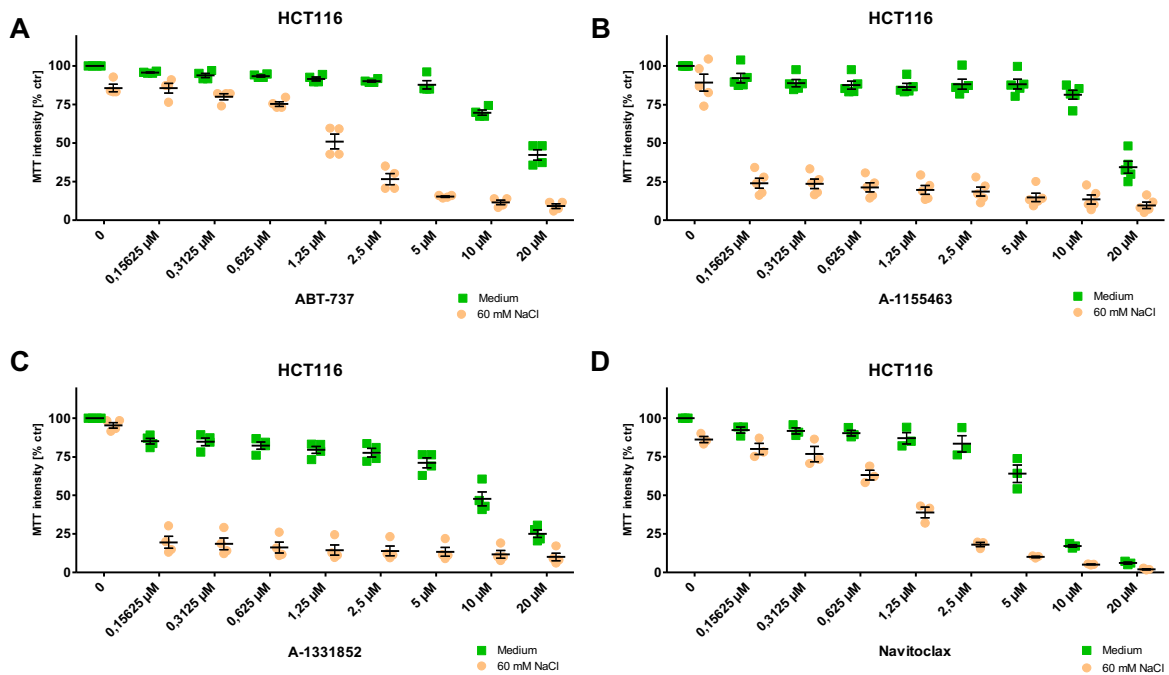


Abb. 3: BCL-XL-Inhibitoren verstärken ihre Toxizität durch NaCl-Zugabe

HCT116-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen ABT-737 (A), A-1155463 (B), A-1331852 (C) und Navitoclax (D) in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl behandelt. Datenpunkte mit Mittelwert \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

4.2 Hyperosmotischer Stress steigert die durch BH3-Mimetika vermittelte Caspase-Aktivierung

In den MTT-basierten Viabilitätsassays zeigte sich eine erhöhte Zytotoxizität von BCL-XL-inhibierenden BH3-Mimetika unter hyperosmotischem Stress, was mit einer verstärkt ablaufenden Apoptose vereinbar sein könnte. Daher wurde die gesteigerte Zytotoxizität von ABT-737 unter hyperosmotischem Stress über die Detektion der beiden Apoptosemarker Caspase 3 und p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase) im Western Blot weiter untersucht (Abb. 4). p70S6K spielt eine wichtige Rolle in der Translation und Zellproliferation und wird von Caspase 3 proteolytisch gespalten (38). Nach Stimulation mit 5 μ M ABT-737 zeigte sich in beiden Zelllinien, dass eine ausgeprägte Spaltung von Caspase 3 (welche mit einer Aktivierung derselben einhergeht) und p70S6K nur bei Zugabe von 60 mM NaCl erreicht wird. ABT-737 allein ist somit bezüglich der Apoptoseinduktion weniger wirksam. Die im Western Blot unter hyperosmotischem Stress verstärkte proteolytische Prozessierung von Caspase 3 spiegelte sich auch in den durchgeführten Caspase-3/7-Aktivitätsassays wider (Abb. 5). Im Vergleich zur Mediumgruppe wurde unter hyperosmotischem Stress eine

erhöhte Caspase-3/7-Aktivität nach Behandlung mit ABT-737 gemessen. Die Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk diente als Negativ-/Spezifitätskontrolle und senkte erwartungsgemäß die nach NaCl-/ABT-737-Behandlung gemessene Fluoreszenzintensität deutlich. Insgesamt zeigte sich, dass hyperosmotischer Stress die Schwelle für die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs herabsetzt.

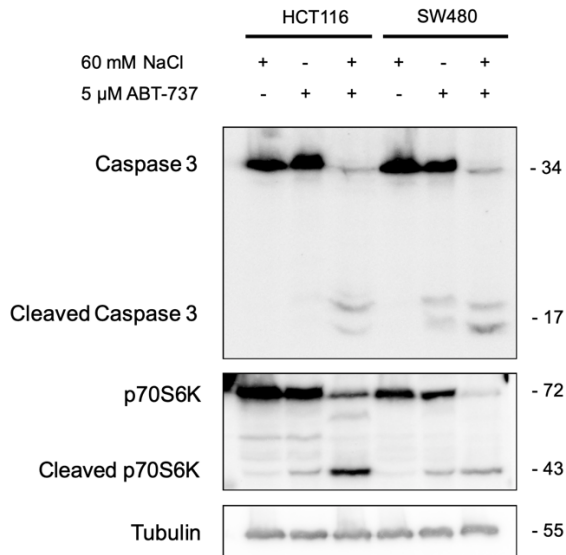


Abb. 4: Hyperosmotischer Stress steigert die ABT-737-induzierte Prozessierung von Caspase 3 und p70S6K

HCT116- und SW480-Zellen wurden für 6 h mit 5 μ M ABT-737 in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl behandelt und mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

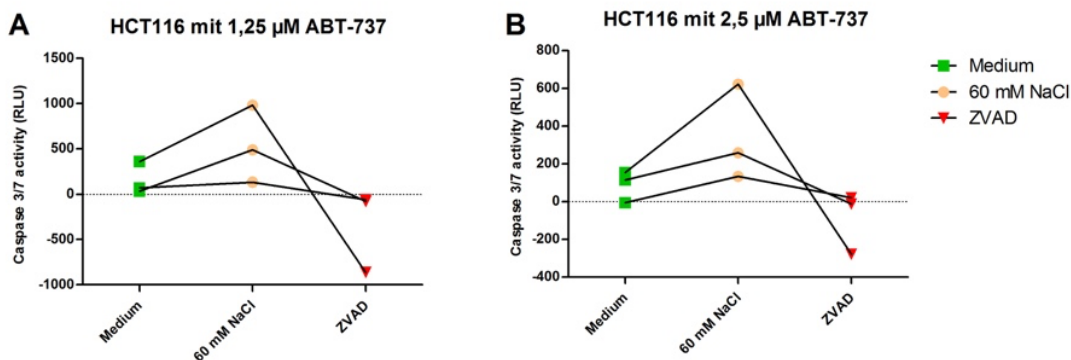


Abb. 5: Hyperosmotischer Stress erhöht die Caspase-3/7-Aktivität nach ABT-737-Behandlung

HCT116-Zellen wurden für 5 h mit 1,25 μ M (A) und 2,5 μ M ABT-737 (B) in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl und dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (100 μ M) behandelt. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrats (DEVD)₂-R110 bestimmt. Datenpunkte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Linien verbinden die Datenpunkte aus einem Experiment.

4.3 p53 ist am mitochondrialen Priming unter hyperosmotischem Stress beteiligt

p53 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Expression von BCL-2-Proteinen reguliert und somit eine entscheidende Rolle in der intrinsischen Apoptose spielt (7). Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Rolle von p53 unter hyperosmotischem Stress genauer untersucht.

4.3.1 p53 wird unter hyperosmotischem Stress stabilisiert

Normalerweise ist die Menge an p53 in Zellen sehr gering, da es ständig über das Proteasom abgebaut wird (25). Im Western Blot zeigte sich bei Stimulation mit 30, 60 und 90 mM NaCl eine konzentrationsabhängige vermehrte Expression von p53 (Abb. 6). Auch die Menge an phosphoryliertem p53 am N-terminalen Serin 15 ist bei 90 mM NaCl angestiegen. Unter hyperosmotischem Stress ist demnach eine Stabilisierung von p53 zu sehen.

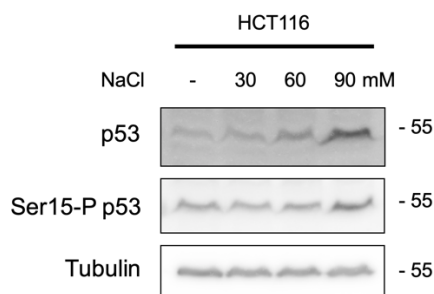


Abb. 6: p53-Stabilisierung unter hyperosmotischem Stress

HCT116-Zellen wurden über Nacht mit den angegebenen Konzentrationen an NaCl behandelt. Mit den generierten Gesamtzelllysaten wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern für die angegebenen Proteine durchgeführt. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

4.3.2 p53-Defizienz führt bei Behandlung mit BCL-XL-Inhibitoren zu verminderter Apoptose

Heimer et al. konnten zeigen, dass BAX-/BAK-defiziente HCT116-Zellen bei Behandlung mit ABT-737 sowohl mit als auch ohne NaCl-Zugabe vor Apoptose weitgehend geschützt sind (19). Als zentraler Modulator der intrinsischen Apoptose induziert p53 als Transkriptionsfaktor unter anderem direkt die Expression proapoptotischer BCL-2-Proteine wie BAX (30), PUMA (28) und NOXA (29). Um den Einfluss von p53 auf das mitochondriale Priming unter hyperosmotischem Stress zu untersuchen, wurde deshalb die Zytotoxizität dreier BCL-XL-Inhibitoren in der p53-Wildtyp- sowie p53-Knockout-Zelllinie miteinander verglichen.

Dazu wurde die Zytotoxizität der selektiven BCL-XL-Inhibitoren A-1155463, A-1331852 und WEHI-539 mittels MTT-Assay sowohl in HCT116-Wildtyp- (wt) als auch in p53-defizienten HCT116-Zellen (p53 KO) unter hyperosmotischem Stress untersucht (Abb. 7). Die Abwesenheit von p53 führte bei Behandlung mit den BCL-XL-Inhibitoren sowie 60 mM NaCl im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen zu einem geringeren Zelltod. Jedoch waren die zytotoxischen Effekte in den p53-Knockout-Zellen nicht vollständig aufgehoben. Im Caspase-3/7-Aktivitätsassay wurden die beiden Zelllinien jeweils mit den gleichen BCL-XL-Inhibitoren mit sowie ohne NaCl behandelt (Abb. 8). In den Wildtyp-Zellen konnte verglichen mit der Mediumgruppe bei allen drei Substanzen durch NaCl-Zugabe eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität gemessen werden. In den p53-Knockout-Zellen hingegen zeigte sich analog zu den Viabilitätsassays eine geringere NaCl-vermittelte Steigerung der Caspase-Aktivierung nach Behandlung mit BCL-XL-selektiven BH3-Mimetika. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse in p53-defizienten Zellen eine Reduktion der Zytotoxizität von BCL-XL-inhibierenden BH3-Mimetika unter hyperosmotischen Bedingungen. Somit ist p53 am mitochondrialen Priming unter NaCl-induziertem Osmostress beteiligt.

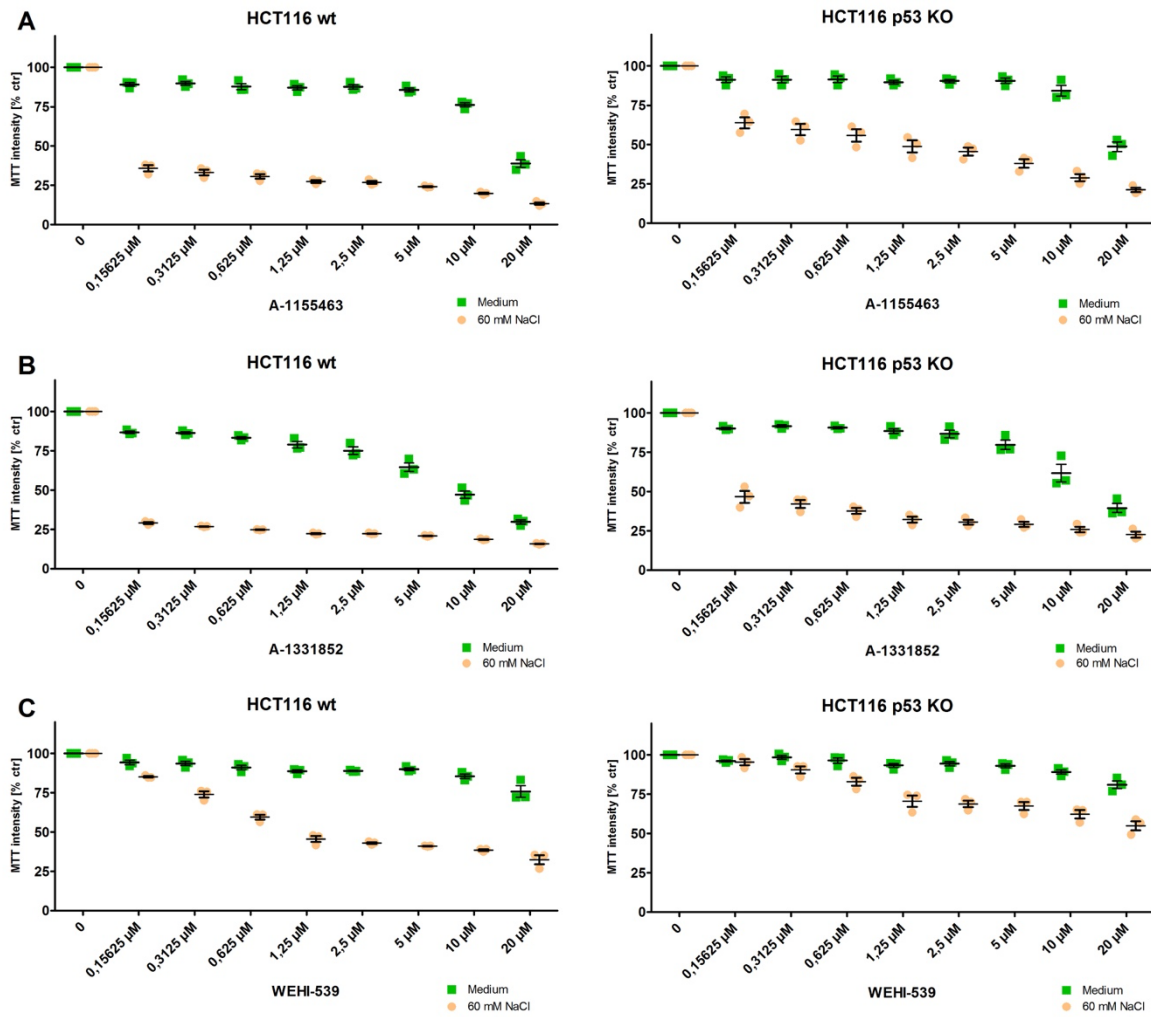


Abb. 7: p53-Defizienz führt bei Behandlung mit BCL-XL-Inhibitoren zu verminderter Apoptose

HCT116-Wildtyp- (wt) und p53-defiziente Zellen (p53 KO) wurden mit den angegebenen Konzentrationen der BCL-XL-Inhibitoren A-1155463 (A), A-1331852 (B) und WEHI-539 (C) in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl behandelt. Datenpunkte mit Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

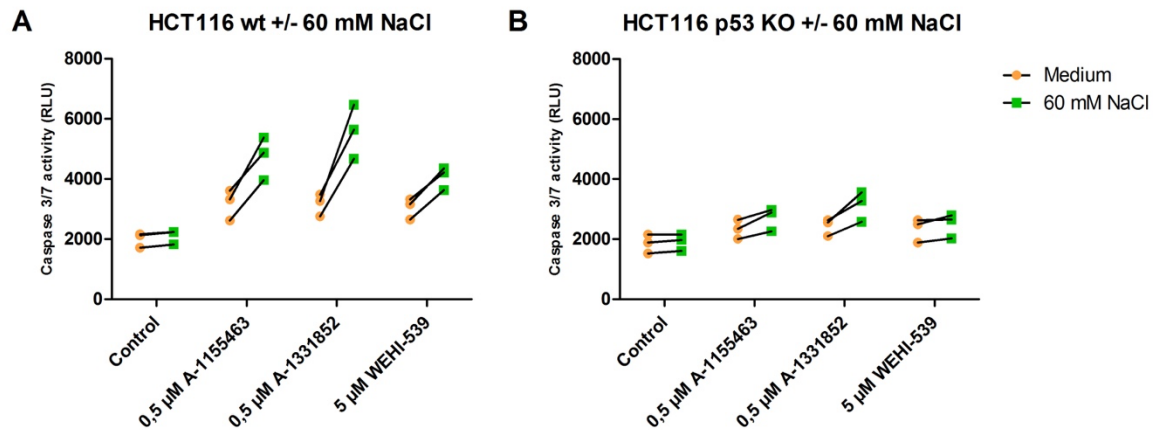


Abb. 8: p53-Defizienz schützt vor gesteigerter Caspase-Aktivierung unter hyperosmotischem Stress

HCT116-Wildtyp- (wt, A) und p53-defiziente Zellen (p53 KO, B) wurden für 6 h mit den angegebenen Substanzen in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl behandelt. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde unter Verwendung des fluorogenen Substrats (DEVD)₂-R110 bestimmt. Datenpunkte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

4.4 Stabilisierung von p53 unter hyperosmotischem Stress

Bisher konnte gezeigt werden, dass p53 eine essenzielle Komponente für den Ablauf der intrinsischen Apoptose unter hyperosmotischem Stress darstellt. Unklar ist jedoch, wodurch p53 am Serinrest 15 phosphoryliert und damit stabilisiert wird (Abb. 6). p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) reguliert wichtige Prozesse in der Immunantwort sowie im Zellzyklus und ist an der Adaption auf hyperosmotischen Stress beteiligt (39). Zudem gibt es Hinweise auf eine p38-Aktivierung unter hyperosmotischem Stress (22, 40). p38 MAPK spielt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von p53 durch Chemotherapeutika-induzierten, genotoxischen Stress. Die Transkriptionsaktivität von p53 wird einerseits durch Hemmung von p38 verhindert und andererseits führt die Stimulation des p38-Signalwegs durch Chemotherapeutika zur vermehrten Expression von p53 (41, 42). Zudem ist aktiviertes (phosphoryliertes) p38 in der Lage, p53 unter hyperosmotischem Stress durch Phosphorylierung am Serin 15 zu stabilisieren. Umgekehrt vermindert die Hemmung von p38 unter hyperosmotischem Stress die Aktivierung von p53 und Caspase 3 (40).

4.4.1 Hyperosmotischer Stress führt zur Aktivierung von p38 MAPK

Um p38 als einen möglichen Kandidaten für die p53-Stabilisierung unter hyperosmotischem Stress zu untersuchen, wurde zunächst die p38-Aktivierung (Phosphorylierung) unter hypertonen Bedingungen überprüft. Dazu wurden die Level

an p38 MAPK und phosphoryliertem p38 im Western Blot analysiert. HCT116-Wildtyp- und p53-Knockout-Zellen wurden mit 60 bzw. 90 mM NaCl für 15, 30 und 60 Minuten behandelt (Abb. 9). Die Menge an p38 MAPK blieb erwartungsgemäß unverändert, wobei die Expression an phosphoryliertem p38 (pp38) eine zeitabhängige Veränderung zeigte. So nimmt die Menge an phosphoryliertem p38 in den Wildtyp-Zellen bei Exposition mit 90 mM NaCl nach 15 min zu, sinkt nach 30 min und steigt nach 60 min wieder an. Ebenso zeigt sich in den p53-defizienten Zellen in Anwesenheit von 90 mM NaCl nach 30 min ein Abfall von phosphoryliertem p38.

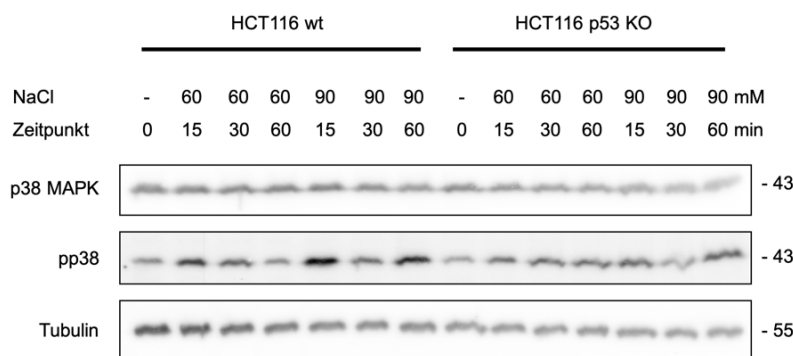


Abb. 9: Hyperosmotischer Stress führt zur Phosphorylierung von p38 MAPK

HCT116-Wildtyp- (wt) und p53-Knockout-Zellen (p53 KO) wurden für 15, 30 und 60 min mit 60 bzw. 90 mM NaCl stimuliert. Mit den generierten Gesamtzelllysaten wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern für die angegebenen Proteine durchgeführt. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Durch Zugabe des selektiven p38 MAPK-Inhibitors BIRB 796 in verschiedenen Konzentrationen konnte die Phosphorylierung von p38 unter hyperosmotischem Stress deutlich verringert werden (Abb. 10).

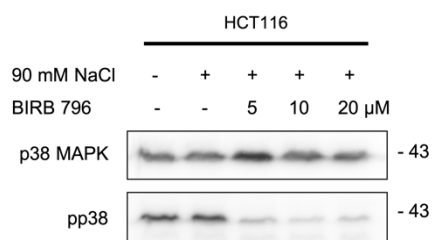


Abb. 10: Der p38-Inhibitor BIRB 796 hemmt die Phosphorylierung von p38 unter hyperosmotischem Stress

HCT116-Zellen wurden für 15 min mit 90 mM NaCl und den angegebenen Konzentrationen des selektiven p38 MAPK-Inhibitors BIRB 796 (Vorinkubation für 30 min) behandelt. Mit den generierten Gesamtzelllysaten wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern für die angegebenen Proteine durchgeführt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

4.4.2 Rolle von p38 für die p53-Stabilisierung unter hyperosmotischem Stress

Es zeigte sich eine transiente Stabilisierung von p38 unter hyperosmotischem Stress. Die Fragestellung war nun, ob die p38-Aktivierung an der p53-Stabilisierung unter hypertonen Bedingungen beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurden HCT116-Zellen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen BIRB 796 mit 90 mM NaCl behandelt und die Menge an p53, Ser15-phosphoryliertem p53, p38 MAPK und phosphoryliertem p38 detektiert (Abb. 11). Durch Zugabe des p38-Inhibitors BIRB 796 scheint sich an der Ser15-Phosphorylierung von p53 wenig zu ändern, jedoch zeigte BIRB 796 trotz höherer Konzentrationen bei Stimulation über Nacht eine deutlich schlechtere Wirkung als im Vorversuch für 15 Minuten (Abb. 10). Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die Ladekontrolle (Tubulin) in den Spuren nicht ganz gleich ist.

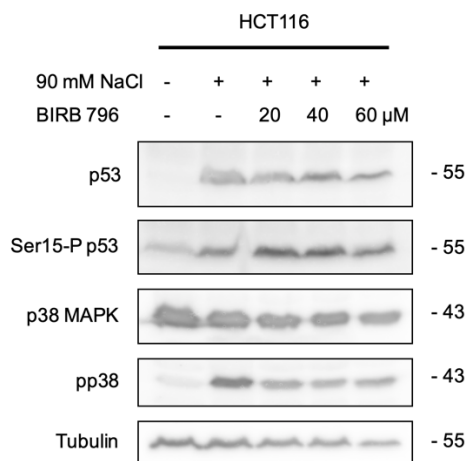


Abb. 11: Unveränderte Phosphorylierung von p53 unter hyperosmotischem Stress und Exposition mit BIRB 796

HCT116-Zellen wurden über Nacht mit 90 mM NaCl und den angegebenen Konzentrationen des p38-Inhibitors BIRB 796 (Vorinkubation für 30 min) behandelt. Mit den generierten Gesamtzelllysaten wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern für die angegebenen Proteine durchgeführt. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Um das Zellüberleben zu untersuchen, wurden HCT116-Zellen im MTT-Assay mit dem selektiven BCL-XL-Inhibitor WEHI-539 sowie Medium und 60 mM NaCl in An- und Abwesenheit von 10 μ M BIRB 796 behandelt (Abb. 12). Hierbei zeigte sich in Anwesenheit von BIRB 796 eine verstärkte Zytotoxizität von WEHI-539/NaCl.

Durch die Zugabe von BIRB 796 wäre aufgrund der Hemmung von p38 eigentlich ein höheres Zellüberleben zu erwarten als bei alleiniger Stimulation mit Medium oder NaCl. Vermutlich hat p38 neben einer möglichen Stabilisierung von p53 bei der Bewältigung von Zellstress (wie z. B. in den durchgeführten Experimenten nach NaCl-Zugabe) eine (überlebens-)wichtige Funktion.

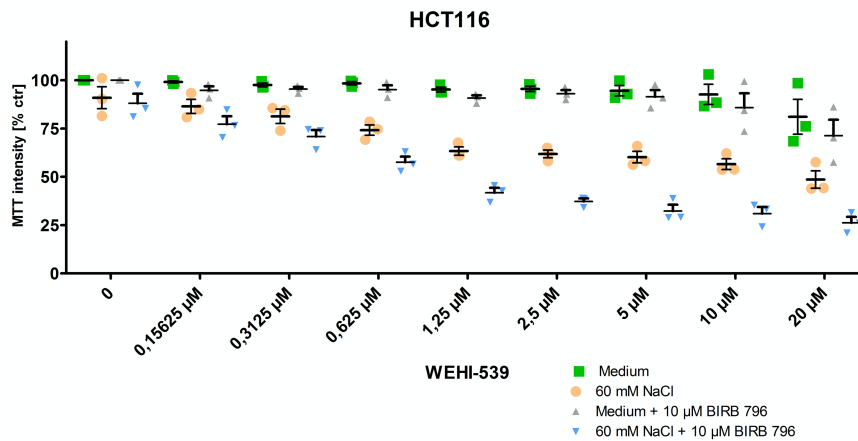


Abb. 12: Verstärkte Zytotoxizität von WEHI-539/NaCl bei Zugabe von BIRB 796

HCT116-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen WEHI-539 in An- und Abwesenheit von 60 mM NaCl und 10 µM des p38-Inhibitors BIRB 796 behandelt. Datenpunkte mit Mittelwert ± SEM bzw. + SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

4.4.3 p38 trägt zur Transkription von BAX bei

p53 ist in der Lage, BAX zu transkribieren (30). Gertrud Knoll aus der AG Ehrenschwender konnte zeigen, dass p53-defiziente HCT116-Zellen (p53 KO) im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen bei Stimulation mit NaCl und Nutlin-3 (MDM2-Antagonist) weniger BAX-mRNA induzieren (Abb. 13).

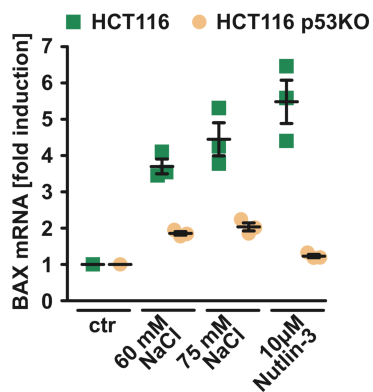


Abb. 13: p53-defiziente HCT116-Zellen induzieren weniger BAX-mRNA

HCT116-Wildtyp- und p53-defiziente Zellen (p53 KO) wurden mit 60 mM NaCl, 75 mM NaCl und 10 µM Nutlin-3 behandelt. Die Induktion der BAX-mRNA wurde mittels qPCR analysiert. Datenpunkte und Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Im Folgenden wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR untersucht, wie sich die Behandlung von HCT116-Zellen mit NaCl und/oder BIRB 796 (p38-Inhibitor) auf den Gehalt an BAX-mRNA auswirkt. Dazu wurde die RNA von HCT116-Zellen isoliert, die mit Medium, 60 mM NaCl, 60 mM NaCl und 20 µM BIRB 796 sowie 20 µM BIRB 796

behandelt wurden. Durch die NaCl-Behandlung wurden im Vergleich zur Mediumgruppe in etwa 4-fach höhere BAX-mRNA-Level erreicht. In Zusammenschau mit der p53-Stabilisierung unter NaCl-induziertem Osmostress (Abb. 6) könnte dies auf eine p53-vermittelte Transkription des proapoptotischen Effektormoleküls BAX hinweisen. Passend zu den Daten der in Gegenwart des p38-Inhibitors BIRB 796 weiterhin detektierbaren p53-Phosphorylierung unter hyperosmotischem Stress zeigte sich auch auf mRNA-Ebene nach Zugabe von BIRB 796 eine NaCl-induzierte Steigerung der Menge an BAX-mRNA. In der mit NaCl/BIRB 796 behandelten Gruppe war die detektierte mRNA-Menge durchwegs etwas niedriger als in der lediglich mit NaCl behandelten Gruppe. Dies könnte zumindest auf einen gewissen Beitrag von p38 zur p53-vermittelten BAX-Transkription hinweisen. Die Inhibition von p38 mittels BIRB 796 unter hyperosmotischem Stress reduzierte die Menge an BAX-mRNA leicht. Diese Daten deuten darauf hin, dass p38 zur BAX-Transkription beiträgt, aber noch andere Faktoren beteiligt sind.

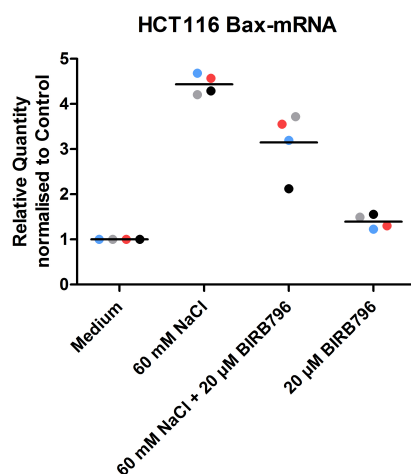


Abb. 14: p38 trägt zur BAX-Transkription bei

HCT116-Zellen wurden über Nacht mit 60 mM NaCl, 60 mM NaCl + 20 µM BIRB 796 (p38-Inhibitor) und 20 µM BIRB 796 behandelt. Die Induktion der BAX-mRNA wurde mittels qPCR analysiert. Datenpunkte und Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Farben kodieren für die einzelnen Experimente.

4.5 Einfluss von hyperosmotischem Stress auf den antiapoptotischen NF- κ B-Signalweg

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass hyperosmotischer Stress über die Stabilisierung von p53 zur vermehrten Induktion von BAX-mRNA führt. Das hierdurch gesteigerte mitochondriale Priming steigert wiederum die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber BCL-XL-inhibierenden BH3-Mimetika. Unbekannt ist bislang, ob durch hyperosmotischen Stress auch antiapoptotische Signalwege gehemmt werden. Stellvertretend dafür wurde der Prototyp der antiapoptotisch wirksamen Signalwege NF- κ B unter hyperosmotischem Stress genauer untersucht.

4.5.1 Hyperosmotischer Stress verringert die Sekretion des NF- κ B-Zielgens IL-8

Interleukin-8 (IL-8) ist eines der Zielgene von NF- κ B, welches nach Stimulation mit einem NF- κ B-aktivierenden Zytokin, z. B. Tumornekrosefaktor (TNF), sezerniert wird und im Überstand detektiert werden kann (43). p53 ist in der Lage, die Aktivierbarkeit des NF- κ B-Signalwegs zu hemmen (44), weshalb im folgenden Versuch HCT116-Wildtyp- sowie p53-Knockout-Zellen miteinander verglichen wurden. Um den Einfluss von NaCl-induziertem Osmostress auf die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs zu untersuchen, wurden die beiden Zelllinien einerseits mit NaCl allein (Abb. 15 A und C) und andererseits mit einer Kombination aus TNF und NaCl (Abb. 15 B und D) stimuliert. Die alleinige Stimulation mit TNF diente als Positivkontrolle für die NF- κ B-Aktivierung. Die Zugabe von NaCl allein ergab keine IL-8-Freisetzung über das Niveau der Kontrollgruppe hinaus. Es zeigte sich, dass die p53-defizienten Zellen grundsätzlich weniger IL-8 sezernieren als die Wildtyp-Zellen. Außerdem ist unter NaCl-Zugabe konzentrationsabhängig eine Abnahme der IL-8-Sekretion zu beobachten, was für eine verminderte NF- κ B-Aktivierung sprechen kann. Um auszuschließen, dass die zugegebene Menge an NaCl zytotoxisch wirkt und die verminderte IL-8-Menge durch die Abnahme der Zellzahl bedingt ist, wurden parallel Zytotoxizitätsassays in HCT116-Wildtyp- und p53-Knockout-Zellen durchgeführt (Abb. 16). Hierbei wurde durch die Kombination aus 90 mM NaCl und TNF in beiden Zelllinien die Zellviabilität um ca. 50 % gesenkt. Bei niedrigeren NaCl-Konzentrationen (30 und 60 mM) hat die TNF-Behandlung kaum Einfluss auf die Zellviabilität. Die verringerte IL-8-Sekretion durch die Zugabe von 90 mM NaCl sollte deshalb nicht überschätzt werden, weil auch deutlich weniger Zellen IL-8 sezernieren. Trotzdem ist

bereits bei geringeren NaCl-Konzentrationen (30 und 60 mM) eine verminderte TNF-induzierte IL-8-Freisetzung zu sehen, was auf eine verringerte Aktivierung von NF- κ B hindeutet.

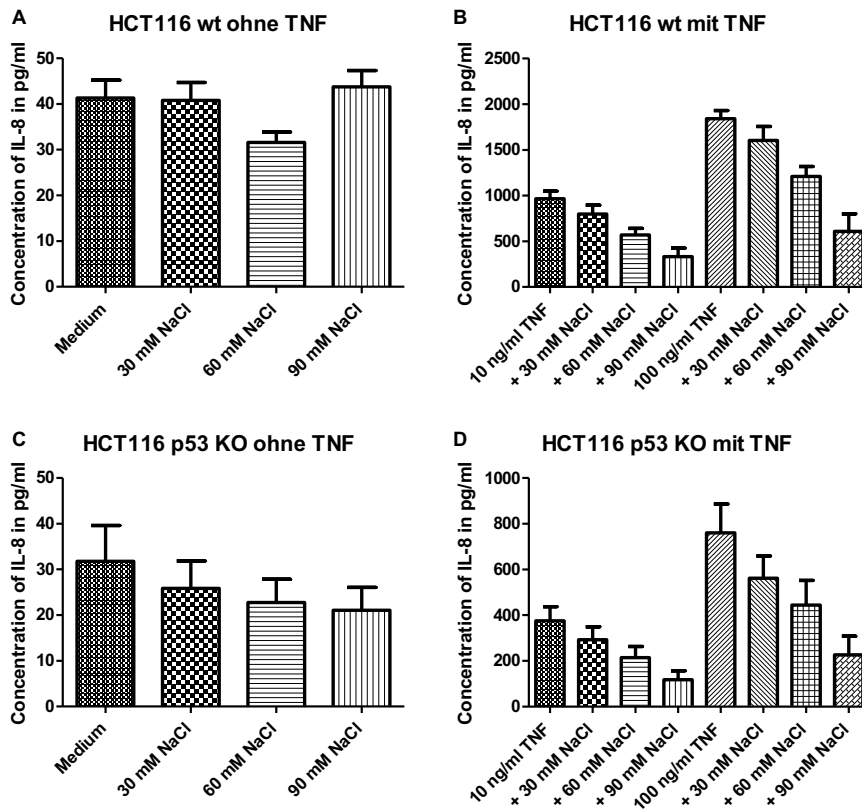


Abb. 15: Abnahme der TNF-induzierten IL-8-Sekretion unter hyperosmotischem Stress

HCT116-Wildtyp- (wt) und p53-Knockout-Zellen (p53 KO) wurden über Nacht mit den angegebenen Konzentrationen an NaCl (A, C) und einer Kombination aus 10 bzw. 100 ng/ml TNF und verschiedenen Konzentrationen an NaCl (B, D) behandelt. Die Überstände wurden abgenommen und die IL-8-Sekretion mittels ELISA quantifiziert. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

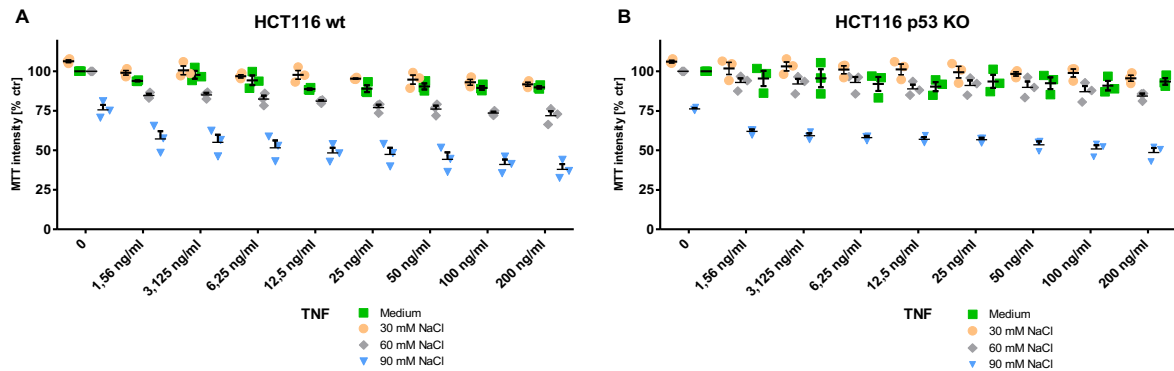


Abb. 16: Zytotoxizität von TNF unter iso- und hypertonen Bedingungen

HCT116-Wildtyp- (wt, A) und p53-defiziente Zellen (p53 KO, B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen TNF sowie 30, 60 und 90 mM NaCl behandelt. Datenpunkte mit Mittelwert \pm SEM bzw. + SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

4.5.2 Unveränderte Aktivierbarkeit des NF- κ B-Signalwegs unter hyperosmotischem Stress

Die verminderte Sekretion des NF- κ B-Zielgens IL-8 unter hyperosmotischen Bedingungen könnte durch eine reduzierte Aktivierung von NF- κ B bedingt sein. Daher wurde die Aktivierbarkeit von NF- κ B über die Detektion der beiden Surrogatmarker I κ B α und P-I κ B α im Western Blot weiter untersucht. HCT116-Zellen wurden mit bzw. ohne 90 mM NaCl sowie 100 ng/ml TNF (Positivkontrolle) versetzt und die Level an I κ B α und P-I κ B α bestimmt (Abb. 17). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der NaCl- und Mediumgruppe, sodass es unter hyperosmotischem Stress keinen Hinweis auf eine verminderte TNF-vermittelte NF- κ B-Aktivierung gibt.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der NF- κ B-Signalweg wahrscheinlich nicht an der gesteigerten Aktivierbarkeit des Apoptosesignals unter hyperosmotischem Stress beteiligt ist bzw. im Gegensatz zu BAX keine entscheidende Rolle spielt.

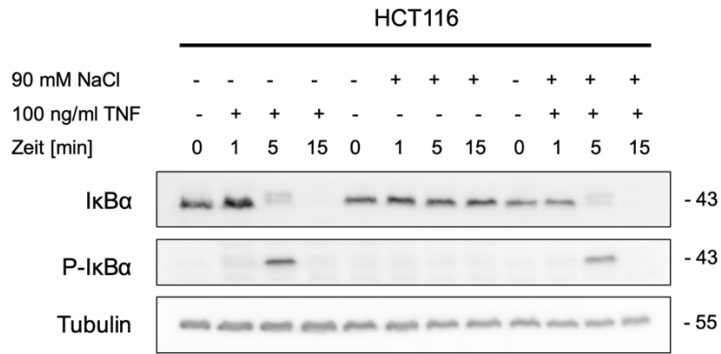


Abb. 17: Unveränderte Aktivierbarkeit von NF- κ B unter hyperosmotischem Stress

HCT116-Zellen wurden für 1, 5 und 15 min mit 90 mM NaCl sowie 100 ng/ml TNF stimuliert. Mit den generierten Gesamtzelllysaten wurde ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern für die angegebenen Proteine durchgeführt. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass hyperosmotischer Stress die Zytotoxizität BCL-XL-inhibierender BH3-Mimetika verstärkt. Als zumindest eine entscheidende Komponente für das gesteigerte mitochondriale Priming unter hyperosmotischem Stress wurde p53 identifiziert, wobei von einer NaCl-induzierten, p53-vermittelten Transkription des proapoptotischen Effektormoleküls BAX auszugehen ist.

5 Diskussion

Der Einfluss von hyperosmotischem Stress auf Tumorzellen und die daraus resultierende verringerte Schwelle für die Apoptoseinduktion sind bisher nicht umfassend untersucht, allerdings könnte die Modulation der Tumorumgebung zu einem erhöhten Therapieansprechen auf einige Chemotherapeutika führen (19-22). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hyperosmotischer Stress spezifisch die Wirksamkeit BCL-XL-inhibierender BH3-Mimetika steigert (Abb. 3). Die Abhängigkeit der kolorektalen Tumorzellen von BCL-XL war offensichtlich unter hyperosmotischen Bedingungen erhöht. Die Zugabe von NaCl allein hatte keinen toxischen Effekt, war aber ausreichend, um die Wirkung von BCL-XL-Inhibitoren zu verstärken. Die BCL-XL-spezifische verstärkte Zytotoxizität unter Salzstress stimmt mit Ergebnissen von Heimer et al. überein: Unter hyperosmotischem Stress zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Zytotoxizität des selektiven BCL-XL-Inhibitors WEHI-539, allerdings galt dies nicht für BH3-Mimetika, die selektiv BCL-2 und MCL-1 hemmen (19).

Die funktionelle Redundanz zwischen antiapoptotischen BCL-2-Proteinen kann zu Ko-Abhängigkeiten (z. B. BCL-XL/MCL-1) führen, wodurch eine effiziente Eliminierung von Tumorzellen bei Hemmung eines einzigen antiapoptotischen BCL-2-Proteins verhindert wird. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei HCT116-Zellen: Die Behandlung mit ABT-737 führte zu keiner ausreichenden Eliminierung von Tumorzellen, wohingegen bei gleichzeitiger Anwesenheit von hyperosmotischem Stress eine alleinige BCL-XL-Abhängigkeit forciert werden konnte, was wiederum in einer verbesserten Wirksamkeit resultierte (Abb. 3 A). Verschiedene Studien demonstrierten, dass deshalb die Hemmung zweier oder mehrerer BCL-2-Proteine notwendig ist, um eine suffiziente Apoptoseinduktion zu erreichen (45, 46). Mechanistische Erkenntnisse diesbezüglich zeigen zwei weitere Studien, in denen durch hyperosmotischen Stress in der Tumorumgebung die Ko-Abhängigkeit von BCL-XL und MCL-1 aufgehoben werden konnte. Die durch hyperosmotischen Stress getriggerte transiente Hochregulation des BH3-only-Proteins NOXA wirkt der antiapoptotischen Funktion von MCL-1 entgegen und führt zur alleinigen BCL-XL-Abhängigkeit. Die gleichzeitige Hemmung von BCL-XL ist folglich ausreichend, um die intrinsische Apoptose von Krebszellen zu induzieren (47, 48).

In verschiedenen Sarkomentitäten konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von BCL-XL Tumorzellen für konventionelle Chemotherapeutika (z. B. Doxorubicin, Vincristin, Cyclophosphamid) sensibilisiert. Dies ist insofern von Relevanz, da es durch die Überexpression von antiapoptotischen BCL-2-Proteinen und die damit verbundene Blockierung der intrinsischen Apoptose oftmals zur Therapieresistenz kommt (15, 49-51). Zudem kann die vermehrte Expression von antiapoptotischen BCL-2-Proteinen zur Tumorentstehung und -progression beitragen (52).

Biophysikalische Faktoren in der Tumorumgebung (z. B. hyperosmotischer Stress) erzwingen die Anpassung von Krebszellen, um deren Überleben sicherzustellen (35). Umgekehrt ist die Störung dieser adaptiven Zellreaktionen für Krebszellen häufig tödlich, woraus sich potenzielle Therapieansätze ergeben (53). Technisch könnten hyperosmotische Bedingungen in der Tumorumgebung durch direkte Gabe osmotisch aktiver, gelöster Stoffe von außen (bei einfach erreichbaren Tumoren) oder durch kontinuierliche Freisetzung aus implantierbaren Geräten realisiert werden. Dies wäre denkbar für solide Tumoren, jedoch kaum für systemische Krebserkrankungen wie etwa Leukämien. Unabhängig davon ist zu beachten, dass eine intakte intrinsische

Apoptose essenziell für eine effiziente Eliminierung von Krebszellen mittels BH3-Mimetika ist.

Trotz großer Bemühungen für den klinischen Einsatz von BH3-Mimetika ist bis dato lediglich der BCL-2-Inhibitor Venetoclax von der FDA für die Therapie hämatologischer Tumoren zugelassen. Navitoclax, die oral bioverfügbare Weiterentwicklung von ABT-737, hemmt BCL-2, BCL-XL sowie BCL-W. Die Überexpression von BCL-XL könnte mit einer Resistenz gegenüber Venetoclax und anderen Chemotherapeutika verbunden sein, weshalb spezifische BCL-XL-Inhibitoren (z. B. A-1331852) entwickelt wurden. Die Wirksamkeit von Navitoclax und anderen BH3-Mimetika, die BCL-XL hemmen, ist jedoch aufgrund einer BCL-XL-vermittelten, dosisabhängigen Thrombozytopenie limitiert (52). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass hyperosmotischer Stress in der Tumorumgebung die Zytotoxizität BCL-XL-inhibierender BH3-Mimetika deutlich erhöht. Klinisch könnte dieses Erkenntnis genutzt werden, um durch hyperosmotischen Stress eine Dosisreduktion von BCL-XL-Inhibitoren zu erreichen. Dies wiederum könnte das Auftreten dosislimitierender Nebenwirkungen wie die der Thrombozytopenie bei Patientinnen und Patienten verhindern. Insgesamt wäre es möglich, durch den Einsatz von hyperosmotischem Stress im Tumormilieu eine Verbesserung der Wirksamkeit sowie des Therapieansprechens zu erzielen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass p53 am mitochondrialen Priming unter hyperosmotischem Stress beteiligt ist. In p53-defizienten Zellen zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen unter hyperosmotischem Stress eine Reduktion der Zytotoxizität selektiver BCL-XL-Inhibitoren (Abb. 7 und Abb. 8), was darauf hindeutet, dass p53 eine essenzielle Komponente für den Ablauf der intrinsischen Apoptose unter hyperosmotischem Stress darstellt. Somit schützt das Fehlen von p53 die Tumorzellen gewissermaßen vor Apoptose. Allerdings ist anzumerken, dass in den p53-defizienten HCT116-Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen auch geringere Mengen an BAX exprimiert werden (54). Dies könnte generell zu einer verringerten Apoptose führen, weshalb der Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien nicht abschließend bewertet werden kann.

In Übereinstimmung mit einer weiteren Studie (32) zeigte sich unter steigenden Konzentrationen an NaCl eine Zunahme der p53-Expression (Abb. 6). Zudem konnte

mittels quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesen werden, dass bei NaCl-Behandlung im Vergleich zur Mediumgruppe in etwa 4-fach höhere BAX-mRNA-Level erreicht werden (Abb. 14). In Zusammenschau mit der zuvor erwähnten p53-Stabilisierung unter NaCl-induziertem osmotischen Stress, könnte dies auf eine p53-vermittelte Transkription des proapoptischen Effektormoleküls BAX hinweisen.

Unter hyperosmotischem Stress gibt es außerdem Hinweise auf eine Aktivierung von p38 (22, 40), weshalb ein Zusammenhang zwischen der Stabilisierung von p53 und p38 vorstellbar wäre. Vielmehr konnte in einer vorangegangenen Publikation demonstriert werden, dass phosphoryliertes, also aktiviertes p38 unter hyperosmotischem Stress p53 durch Phosphorylierung am Serinrest 15 hochreguliert (40).

Hyperosmotischer Stress führte sowohl in den Wildtyp- als auch in den p53-defizienten Zellen zu einer transienten Aktivierung von p38 (Abb. 9). Umgekehrt konnte der selektive p38-Inhibitor BIRB 796 bei Inkubation für 15 Minuten die Aktivierung von p38 unter hyperosmotischem Stress deutlich verringern (Abb. 10), jedoch war dies bei Inkubation über Nacht trotz höherer Konzentrationen an BIRB 796 nicht der Fall, sodass sich entgegen unseren Erwartungen die Expression von phosphoryliertem p53 nicht verringerte (Abb. 11). Passend zur in Gegenwart von BIRB 796 weiterhin detektierbaren p53-Phosphorylierung zeigte sich auch auf mRNA-Ebene nach Zugabe von BIRB 796 eine NaCl-induzierte Steigerung der Menge an BAX-mRNA (Abb. 14). Durch die p38-Hemmung unter hyperosmotischem Stress mittels BIRB 796 konnte die Transkription von BAX etwas reduziert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass p38 zumindest eine Rolle in der p53-vermittelten BAX-Transkription spielt, aber noch andere, bisher nicht bekannte Faktoren beteiligt sind.

In einer vorangegangenen Studie wurde beschrieben, dass BIRB 796 aufgrund seines langsamen Bindungsverhaltens die p38-Aktivität zeitabhängig hemmt und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) mit zunehmender Vorinkubation abnimmt (55). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stimmen mit der darin beschriebenen zeitlichen Kinetik überein, denn die p38-Aktivierung mittels BIRB 796 über einen längeren Zeitraum zu blockieren, scheint technisch schwierig zu sein. Um dieser Frage nachzugehen wären einerseits eine längere Vorinkubation mit BIRB 796 und andererseits Untersuchungen mit weiteren p38-Inhibitoren (z. B. SB203580) notwendig. So wurde in der oben genannten Studie (40) mit dem p38-Inhibitor

SB203580 vorinkubiert, gefolgt von einer 4,5-stündigen Inkubation unter hyperosmotischen Bedingungen, sodass die in dieser Arbeit gewählte Inkubationsdauer über Nacht wahrscheinlich zu lange war, um eine Abnahme der Ser15-Phosphorylierung von p53 zu sehen. Insgesamt bleibt der Beitrag der p38-Aktivierung für die Stabilisierung von p53 über die Phosphorylierung am Serin 15 also unklar, jedoch ist eine transiente Regulation sehr wahrscheinlich.

Es ist denkbar, dass neben der Hochregulation von p53 unter hyperosmotischem Stress gleichzeitig auch antiapoptotische Signalwege wie NF- κ B gehemmt werden, was ebenso in einer verstärkt ablaufenden Apoptose resultieren würde. Zum Einfluss von hyperosmotischem Stress auf die Aktivierbarkeit von NF- κ B gibt es bisher keine Daten, allerdings zeigte sich unter hyperosmotischen Bedingungen eine verminderte Sekretion des NF- κ B-Zielgens IL-8 (Abb. 15). Dies könnte durch eine reduzierte Aktivierung von NF- κ B bedingt sein. Im Western Blot konnte jedoch keine Herabregulation von NF- κ B unter hyperosmotischem Stress festgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass NF- κ B als Transkriptionsfaktor im Gegensatz zu BAX keinen entscheidenden Beitrag für das mitochondriale Priming unter hyperosmotischem Stress leistet.

6 Zusammenfassung

Die Wirkung vieler Chemotherapeutika basiert auf der Induktion der intrinsischen, durch die Mitochondrien kontrollierten Apoptose. Ein Netzwerk aus pro- und antiapoptischen Proteinen der BCL-2-Familie entscheidet letztendlich darüber, ob Tumorzellen empfindlich oder resistent gegenüber einer Krebstherapie sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hyperosmotischer Stress zu einer erhöhten Zytotoxizität BCL-XL-inhibierender BH3-Mimetika führt und damit eine Wirkverstärkung erzielt werden kann. Als zumindest eine entscheidende Komponente für das gesteigerte mitochondriale Priming unter hyperosmotischem Stress wurde p53 identifiziert. Mit steigenden NaCl-Konzentrationen zeigte sich einerseits eine Stabilisierung von p53 und andererseits ein Anstieg von BAX-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf eine NaCl-induzierte, p53-vermittelte Transkription des proapoptischen Effektormoleküls BAX hin. Um herauszufinden, wodurch p53 hochreguliert wird, sind weitere Untersuchungen notwendig. Umgekehrt zur Aktivierung von p53 zeigte sich unter hyperosmotischem Stress keine Herabregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B, sodass dieser antiapoptische Signalweg am mitochondrialen Priming unter hyperosmotischem Stress nicht beteiligt ist.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pro- und antiapoptotische Proteine der BCL-2-Familie.....	8
Abb. 2: Library-Screening mittels MTT-Assays	23
Abb. 3: BCL-XL-Inhibitoren verstärken ihre Toxizität durch NaCl-Zugabe	24
Abb. 4: Hyperosmotischer Stress steigert die ABT-737-induzierte Prozessierung von Caspase 3 und p70S6K.....	25
Abb. 5: Hyperosmotischer Stress erhöht die Caspase-3/7-Aktivität nach ABT-737-Behandlung	25
Abb. 6: p53-Stabilisierung unter hyperosmotischem Stress.....	26
Abb. 7: p53-Defizienz führt bei Behandlung mit BCL-XL-Inhibitoren zu verminderter Apoptose	28
Abb. 8: p53-Defizienz schützt vor gesteigerter Caspase-Aktivierung unter hyperosmotischem Stress	29
Abb. 9: Hyperosmotischer Stress führt zur Phosphorylierung von p38 MAPK.....	30
Abb. 10: Der p38-Inhibitor BIRB 796 hemmt die Phosphorylierung von p38 unter hyperosmotischem Stress	30
Abb. 11: Unveränderte Phosphorylierung von p53 unter hyperosmotischem Stress und Exposition mit BIRB 796.....	31
Abb. 12: Verstärkte Zytotoxizität von WEHI-539/NaCl bei Zugabe von BIRB 796	32
Abb. 13: p53-defiziente HCT116-Zellen induzieren weniger BAX-mRNA.....	32
Abb. 14: p38 trägt zur BAX-Transkription bei	33
Abb. 15: Abnahme der TNF-induzierten IL-8-Sekretion unter hyperosmotischem Stress	35
Abb. 16: Zytotoxizität von TNF unter iso- und hypertonen Bedingungen	36
Abb. 17: Unveränderte Aktivierbarkeit von NF-κB unter hyperosmotischem Stress .	37

7.2 Apoptosis-Library

Compound	CAS number
(S)-Gossypol	1189561-66-7
[6]-Gingerol	23513-14-6
10058-F4	403811-55-2
10074-G5	413611-93-5
2-HBA	131359-24-5
A-1155463	1235034-55-5
A-1331852	1430844-80-6
ABT-199	1257044-40-8
ABT-737	852808-04-9
Adarotene	496868-77-0
Apoptosis Activator 2	79183-19-0
AT-101	866541-93-7
AZD5582	1258392-53-8
BAM7	331244-89-4
Baohuoside I	113558-15-9
Betulin	473-98-3
Betulinic acid	472-15-1
BH3I-1	300817-68-9
Bioymifi	1420071-30-2
Binapant	1260251-31-7
Bisdemethoxycurcumin	33171-05-0
BV6	1001600-56-1
C87	332420-90-3
CBL0137	1197397-89-9
CID2011756	638156-11-3
CID755673	521937-07-5
Citric acid	77-92-9
Columbianadin	5058-13-9
COTI-2	1039455-84-9
CRT0066101	1883545-60-5
Demethoxycurcumin	22608-11-3
Elesclomol	488832-69-5
Embelin	550-24-3
Epibrassinolide	78821-43-9
Erastin	571203-78-6
Ferrostatin-1	347174-05-4
FIN56	1083162-61-1
Fisetin	528-48-3
FX1	1426138-42-2
Gambogic Acid	2752-65-0
GDC-0152	873652-48-3
Ginsenoside Rc	11021-14-0
Ginsenoside Rh1	63223-86-9
Ginsenoside Rh2	78214-33-2
Glycochenodeoxycholic acid	640-79-9
Gossypol (acetic acid)	12542-36-8
GSK'583	1346547-00-9
GSK'481	1622849-58-4
GSK'872	1346546-69-7
HA14-1	65673-63-4
Homoplantagin	17680-84-1
Hypaconitine	6900-87-4
Iberin	505-44-2
Inauhzin	309271-94-1
Isoalantolactone	470-17-7
kb NB 142-70	1233533-04-4
Kevetrin (hydrochloride)	66592-89-0

Compound	CAS number
KJ Pyr 9	581073-80-5
LCL161	1005342-46-0
Lenalidomide	191732-72-6
Lenalidomide (hemihydrate)	847871-99-2
Liproxstatin-1	950455-15-9
Marinopyrrole A	1227962-62-0
Mesaconitine	2752-64-9
Methylprotodioscin	54522-52-0
Methylthiouracil	56-04-2
MI-773	1303607-07-9
Mulberroside A	102841-42-9
Myricetin	529-44-2
Navitoclax	923564-51-6
Necrostatin-1	4311-88-0
Neochlorogenic acid	906-33-2
NSC319726	71555-25-4
NSC348884	81624-55-7
NSC59984	803647-40-7
Nutlin (3)	548472-68-0
Nutlin (3a)	675576-98-4
Nutlin (3b)	675576-97-3
Obatoclax	803712-79-0
PAC-1	315183-21-2
Pifithrin- α (hydrobromide)	63208-82-2
Pifithrin- β (hydrobromide)	511296-88-1
Pifithrin- μ	64984-31-2
Polydatin	27208-80-6
Pomalidomide	19171-19-8
PRIMA-1	5608-24-2
PRIMA-1Met	5291-32-7
Puromycin aminonucleoside	58-60-6
QNZ	545380-34-5
R-7050	303997-35-5
Raltitrexed	112887-68-0
RG7112	939981-39-2
RG7388	1229705-06-9
RIPA-56	1956370-21-0
RITA	213261-59-7
Roquinimex	84088-42-6
Sanguinarine	5578-73-4
SAR405838	1303607-60-4
Serdemetan	881202-45-5
Shikonin	517-89-5
SJ-172550	431979-47-4
Taurochenodeoxycholic acid	516-35-8
Tauroursodeoxycholate (sodium)	35807-85-3
TC-DAPK 6	315694-89-4
Tenovin-1	380315-80-0
TIC10	1616632-77-9
Trifluorothymidine	70-00-8
Ubiquitin Isopeptidase Inhibitor I, G5	108477-18-5
UMI-77	518303-20-3
VX-765	273404-37-8
WEHI-345	1354825-58-3
YH239-EE	1364488-67-4
YM-155	781661-94-7

8 Literaturverzeichnis

1. Richter-Kuhlmann E. Krebsgeschehen in Deutschland: Mehr Erkrankte, längeres Überleben. Deutsches Ärzteblatt. 2016;113(49).
2. Koch-Institut R. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin; 2016.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
4. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2002;2(4):277-88.
5. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biol Ther. 2005;4(2):139-63.
6. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. Biomed Res Int. 2014;2014:150845.
7. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. N Engl J Med. 2009;361(16):1570-83.
8. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. Biochem Soc Trans. 2008;36(Pt 1):1-9.
9. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(4):a008656.
10. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. Curr Opin Immunol. 1998;10(5):545-51.
11. 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(4):491-501.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.
13. 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(2):99-109.
14. Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. Cell Death Differ. 2015;22(7):1071-80.
15. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019;20(3):175-93.

16. 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(6059):1129-33.
17. Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell*. 2018;34(6):879-91.
18. Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(6):359-76.
19. Heimer S, Knoll G, Steixner C, Calance DN, Trinh DT, Ehrenschwender M. Hypertonicity-imposed BCL-XL addiction primes colorectal cancer cells for death. *Cancer Lett*. 2018;435:23-31.
20. Calance DN, Steixner C, Gross S, Schuler-Thurner B, Knoll G, Ehrenschwender M. Hypertonicity primes malignant melanoma cells for apoptosis.
21. Sirtl S, Knoll G, Trinh DT, Lang I, Siegmund D, Gross S, et al. Hypertonicity-enforced BCL-2 addiction unleashes the cytotoxic potential of death receptors.
22. Bittner S, Knoll G, Ehrenschwender M. Hyperosmotic stress enhances cytotoxicity of SMAC mimetics. *Cell Death Dis*. 2017;8(8):e2967.
23. Chen X, Zhou C, Yan C, Ma J, Zheng W. Hyperosmotic stress induces cisplatin sensitivity in ovarian cancer cells by stimulating aquaporin-5 expression. *Exp Ther Med*. 2015;10(6):2055-62.
24. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(1):13-30.
25. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997;387(6630):299-303.
26. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 1997;91(3):325-34.
27. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*. 2018;25(1):104-13.
28. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001;7(3):683-94.
29. Hudson CD, Morris PJ, Latchman DS, Budhram-Mahadeo VS. Brn-3a transcription factor blocks p53-mediated activation of proapoptotic target genes Noxa and Bax in vitro and in vivo to determine cell fate. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11851-8.

30. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80(2):293-9.
31. Le Pen J, Maillet L, Sarosiek K, Vuillier C, Gautier F, Montessuit S, et al. Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL. *Cell Death Dis*. 2016;7(2):e2083.
32. Lambert IH, Enghoff MS, Brandi ML, Hoffmann EK. Regulation of p53 in NIH3T3 mouse fibroblasts following hyperosmotic stress. *Physiol Rep*. 2015;3(6).
33. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
34. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005;446(5):475-82.
35. Alfieri RR, Petronini PG. Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses. *Pflugers Arch*. 2007;454(2):173-85.
36. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1441-74.
37. Criollo A, Galluzzi L, Maiuri MC, Tasdemir E, Lavandro S, Kroemer G. Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis*. 2007;12(1):3-18.
38. Dhar R, Persaud SD, Mireles JR, Basu A. Proteolytic cleavage of p70 ribosomal S6 kinase by caspase-3 during DNA damage-induced apoptosis. *Biochemistry*. 2009;48(7):1474-80.
39. Ben Messaoud N, Katzarova I, López JM. Basic Properties of the p38 Signaling Pathway in Response to Hyperosmotic Shock. *PLoS One*. 2015;10(9):e0135249.
40. Friis MB, Friberg CR, Schneider L, Nielsen MB, Lambert IH, Christensen ST, et al. Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. *J Physiol*. 2005;567(Pt 2):427-43.
41. Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. 2000;60(9):2464-72.
42. Khedri A, Khaghani S, Kheirollah A, Babaahmadi-Rezaei H, Shadboorestan A, Zangoeei M, et al. Signaling Crosstalk of FHIT, p53, and p38 in etoposide-induced apoptosis in MCF-7 cells. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):9125-37.
43. Kunsch C, Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol*. 1993;13(10):6137-46.

44. Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol.* 1999;19(5):3485-95.
45. Kehr S, Haydn T, Bierbrauer A, Irmer B, Vogler M, Fulda S. Targeting BCL-2 proteins in pediatric cancer: Dual inhibition of BCL-X(L) and MCL-1 leads to rapid induction of intrinsic apoptosis. *Cancer Lett.* 2020;482:19-32.
46. Ow TJ, Fulcher CD, Thomas C, Broin P, López A, Reyna DE, et al. Optimal targeting of BCL-family proteins in head and neck squamous cell carcinoma requires inhibition of both BCL-xL and MCL-1. *Oncotarget.* 2019;10(4):494-510.
47. Knoll G, Riffelsberger P, Raats D, Kranenburg O, Ehrenschrwender M. NOXA-dependent contextual synthetic lethality of BCL-XL inhibition and "osmotic reprogramming" in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2020;11(4):257.
48. Heimer S, Knoll G, Neubert P, Hammer KP, Wagner S, Bauer RJ, et al. Hypertonicity counteracts MCL-1 and renders BCL-XL a synthetic lethal target in head and neck cancer. *Febs j.* 2020.
49. Baranski Z, de Jong Y, Ilkova T, Peterse EF, Cleton-Jansen AM, van de Water B, et al. Pharmacological inhibition of Bcl-xL sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget.* 2015;6(34):36113-25.
50. Faqar-Uz-Zaman SF, Heinicke U, Meister MT, Vogler M, Fulda S. BCL-x(L)-selective BH3 mimetic sensitizes rhabdomyosarcoma cells to chemotherapeutics by activation of the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cancer Lett.* 2018;412:131-42.
51. Rello-Varona S, Fuentes-Guirado M, López-Aleman R, Contreras-Pérez A, Mulet-Margalef N, García-Monclús S, et al. Bcl-xL inhibition enhances Dinaciclib-induced cell death in soft-tissue sarcomas.
52. D'Aguzzo S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells.* 2020;9(5).
53. Chan N, Pires IM, Bencokova Z, Coackley C, Luoto KR, Bhogal N, et al. Contextual synthetic lethality of cancer cell kill based on the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2010;70(20):8045-54.
54. Sonnemann J, Marx C, Becker S, Wittig S, Palani CD, Krämer OH, et al. p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors.
55. Kuma Y, Sabio G, Bain J, Shpiro N, Márquez R, Cuenda A. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19472-9.

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Martin Ehenschwender für die großartige Betreuung dieser Arbeit herzlich bedanken. Er war stets engagiert und motivierte mich zu jeder Zeit bei der Entstehung dieser Dissertation. Ich konnte mich mit jeder Fragestellung an ihn wenden und auf seine Unterstützung zählen.

Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene durchführen zu können.

Vielen Dank an Dr. Gertrud Knoll und Dr. Dr. Dr. Sina Heimer für die kurzweilige und äußerst lehrreiche Zeit im Labor. Danke für all eure Ratschläge und Hilfestellungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Arbeit mit euch hat mir immer sehr viel Spaß gemacht.

Besonders danken möchte ich meinem Freund Martin, der mir das ganze Studium über stets zur Seite gestanden ist und immer zu mir gehalten hat. Ohne seine kritische Durchsicht wäre diese Arbeit so nicht gelungen. Auch all meinen Freunden möchte ich meinen Dank aussprechen. Ihr habt mir durch eure moralische Unterstützung und der notwendigen Ablenkung in schwierigen Zeiten immer viel Kraft gegeben.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich seit jeher bedingungslos unterstützt und mir immer Rückhalt gegeben haben. Danke, dass ihr mir diesen Weg ermöglicht habt.