

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

**DIE ROLLE VON HSP90 ALS SUBSTRAT VON CATHEPSIN D
IN DEN SIGNALWEGEN VERSCHIEDENER TODESREZEPTOREN**

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

vorgelegt von

Ricarda Fickers

aus Osnabrück

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Schütze, Institut für Immunologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Krause, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.19

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.10.18

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Apoptose.....	3
2.2	TNF-α.....	4
2.3	Fas und FasLigand.....	5
2.4	TRAIL.....	6
2.5	HSP90.....	8
2.6	Ziel der Studie.....	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Material.....	12
3.1.1	Zelllinien.....	12
3.1.2	Kulturmedium.....	12
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	13
3.1.4	Antikörper.....	13
3.1.5	Kits.....	14
3.1.6	Geräte.....	14
3.1.7	Ver- und Gebrauchsmaterialien.....	14
3.2	Methoden.....	15
3.2.1	Zellkultur.....	15
3.2.2	Apoptose-Assay.....	16
3.2.3	Messung der Apoptoserate am ImageStream.....	17

3.2.4	Stimulation von Zellen	17
3.2.5	Herstellung von Zelllysaten	18
3.2.6	BCA-Proteinbestimmung.....	18
3.2.7	SDS-PAGE.....	18
3.2.8	Western-Blot	19
3.2.9	Caspase-Glo Assay.....	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Apoptose-Induktion durch TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid	20
4.2	Sensitivierung für TNF-induzierte Apoptose durch HSP90-Inhibition.....	21
4.3	Spaltung von HSP90 in U-937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen .	23
4.4	TNF-induzierte Aktivierung von Caspase 9 und Bid	25
4.5	TNF-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3/7 und Caspase 9	27
4.6	Spaltung von HSP90 in Panc-1-, Colo-357-, Panc-TU-I- und Panc-89-Zellen.....	28
4.7	TRAIL-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 7	29
4.8	TRAIL-induzierte Aktivierung von Caspase 3 und 9.....	32
5	Diskussion	33
6	Zusammenfassung.....	39
7	Literaturverzeichnis	40

Eidesstattliche Erklärung.....	52
Danksagung.....	53
Lebenslauf.....	54

1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

17-AAG	17- <i>N</i> -allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
AHA1	Activator of HSP90 ATPase protein 1
AML	Akute myeloische Leukämie
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
APO-1	Apoptosis antigen 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aq. dest.	Aqua destillata
A-SMase	Acid sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRC	Colorectal cancer, kolorektales Karzinom
CTSD	Cathepsin D
DcR	Decoy receptor
DED	Death effector domain
DD	Death domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DR	Death receptor
ECL	Electrochemoluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	FasLigand
Fc	Fragment crystallizable region
FCS	Fetal calf serum
FLICE	FADD-like IL-1 β -converting enzyme, entspricht Caspase 8
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
grp94	entspricht Heat shock protein 90kDa beta member 1, HSP90B1
HDAC	Histone deacetylase 1
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2

HSP	Heat shock protein
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate-buffered saline
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIP-1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIP3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNF-8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF8
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
si-RNA	Small interfering RNA
t-Bid	truncated Bid
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

2 Einleitung

2.1 Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, charakterisiert durch Schrumpfen der Zelle, dem sogenannten "blebbing" der Zellmembran, Chromatinkondensation und DNS-Fragmentierung, und schließlich Zerstörung der Zelle durch Auflösung in kleine Vesikel (Bhardwaj & Aggarwal 2003). Diese Art des Zelltods wurde zuerst 1842 von Carl Vogt beschrieben (Vogt 1842). Kerr, Wyllie und Currie schlugen 1972 den Begriff „Apoptose“ vor, der aus dem Griechischen entlehnt ist und sich auf die fallenden Blätter im Herbst bezieht. Sie beobachteten zwei Stufen von morphologischen Veränderungen: Zuerst kondensieren Zellkern und Zytoplasma und die Zelle zerfällt in membrangebundene Fragmente; dann werden diese Fragmente vom Epithel abgeschert oder durch benachbarte Zellen phagozytiert (Kerr et al. 1972).

Apoptose kann extrinsisch über Todesrezeptoren wie TNF- α - (Tumornekrosefaktor- α), Fas- und TRAIL-Rezeptoren (TNF related apoptosis inducing ligand) oder intrinsisch über einen mitochondrialen Signalweg ausgelöst werden. In beiden Fällen vermitteln Cystein-Aspartyl-Proteasen, sogenannte Caspasen, die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung der DNS. So entsteht die charakteristische Morphologie der apoptotischen Zelle: Sie erscheint abgerundet oder pyknotisch, das Chromatin ist kondensiert und der Kern fragmentiert. Sogenannte „apoptotic bodies“, Vakuolen mit Zytoplasma und intakten Organellen, werden von der Zelle abgegeben (Nikoletopoulou et al. 2013).

Funktion der Apoptose ist es, überflüssige, ektope, geschädigte oder mutierte Zellen zu eliminieren (Kroemer et al. 2007). Embryonalentwicklung, Alterung, Reifung des Immunsystems, Virusabwehr, Zellumsatz oder Reproduktion sind Beispiele für physiologische Prozesse, für die Apoptose essentiell ist. Die Dysregulation der Apoptose hingegen spielt eine Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen, Autoimmunität, Infektionen und kardiovaskulären Erkrankungen (Reed 2002). Krebszellen können beispielsweise durch die Überexpression von anti-apoptotischen Molekülen die Fähigkeit verlieren, Apoptose auszuführen, was zur unkontrollierten

Proliferation führt (Mohammad et al. 2015). Das macht die Apoptoseresistenz eines der „hallmarks of cancer“ (Hanahan & Weinberg 2011).

2.2 TNF- α

Zu TNF wird seit Jahrzehnten intensiv geforscht. TNF vermittelt pro-inflammatorische Signale, Zelldifferenzierung und Zelltod. Veränderungen im TNF-Haushalt oder Signalwegen werden unter anderem in Verbindung gebracht mit Autoimmunität und Krebs (Brenner et al. 2015). 1975 wurde zuerst von Carswell ein „tumor necrosis factor“ (TNF) beschrieben, der in BCG-infizierten Mäusen die Nekrotisierung von verschiedenen transplantierten Tumoren auslösen konnte (Carswell et al. 1975). Aggarwal et al konnten 1985 das Molekül klonieren, aufreinigen und charakterisieren. Zwei TNF-bindende Moleküle wurden zuerst 1990 isoliert (Engelmann et al. 1990). Die zwei Rezeptoren sind TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor 1), der von praktisch allen Zelltypen exprimiert wird, und TNF-R2, der in erster Linie auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (van Herreweghe et al. 2010). TNF-R2 hat im Gegensatz zu TNF-R1 keine zytoplasmatische Todesdomäne und kann an sich keine Apoptose vermitteln; allerdings gibt es Möglichkeiten der Überschneidung der Signalwege von TNF-R1 und TNF-R2, sodass unter Umständen auch durch TNF-R2 Apoptose ausgelöst werden kann (Faustman & Davis 2010).

Beide Rezeptoren können den NF- κ B-Signalweg über Rekrutierung von TRADD (TNF-R1) oder TRAF1/TRAF2 (TNF-R2) aktivieren und so Überleben und Proliferation der Zelle begünstigen. TNF-R1 kann zusätzlich über TRADD die Apoptose der Zelle auslösen (Brenner et al. 2015). Das NF- κ B-Signal wird durch die K48-Ubiquitinierung von RIP-1 und darauf folgendem Abbau von RIP-1 und TRAF2 beendet, vermittelt durch die E3-Ubiquitinligase CARP-2 (Liao et al. 2008). Für das pro-apoptotische Signal von TNF-R1 ist die Internalisierung des Rezeptors Voraussetzung (Schneider-Brachert et al. 2004). Aktivierter TNF-R1 rekrutiert die E3-Ubiquitinligase RNF8 und das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc13. RNF8 und Ubc13 modifizieren den TNF-R1 durch Anhängen von mindestens zwei K63-verbundenen Ubiquitinmolekülen, was die Internalisierung des Rezeptors auslöst (Fritsch et al. 2014). Daraufhin wird der DISC aus TRADD, FADD und Procaspase 8 am Rezeptor gebildet (Schneider-Brachert et al. 2004). Die an den DISC gebundene Caspase 8 wird autokatalytisch aktiviert. Die aktive Caspase 8 kann einerseits direkt

Effektorcaspasen (Caspase 3) spalten und so die Apoptose auslösen, andererseits, falls die Aktivierung der Caspase 8 nicht ausreichend für eine effektive Caspase-3-Aktivierung ist, kann das Apoptosesignal über einen mitochondrialen Weg verstärkt werden (Tchikov et al. 2011). Dabei verbinden sich Trans-Golgi-Vesikel mit Pro-A-SMase mit den Endosomen, die den internalisierten TNF-R1-Rezeptor enthalten (TNF-R1-Rezeptosomen). Diese Fusion geschieht innerhalb von fünf Minuten nach TNF-R1-Internalisierung. Innerhalb der TNF-Rezeptosomen aktiviert Caspase 8 Caspase 7, die wiederum pro-A-SMase proteolytisch aktiviert (Edelmann et al. 2011). Die Protease Cathepsin D wird aktiviert durch A-SMase-generiertes Ceramid. Aktiviertes Cathepsin D wiederum spaltet Bid zu tBid (Heinrich et al. 2004). tBid vermittelt über die Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran die Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytosol (Lovell et al. 2008). So wird die Bildung des Apoptosoms (Cytochrom c, APAF-1, Caspase 9 und ATP) initiiert, welches schließlich die Effektorcaspasen aktiviert und Apoptose auslöst (Bratton & Salvesen 2010).

2.3 Fas und FasLigand

Ein weiterer Vertreter der Todesrezeptoren ist der Fas-Rezeptor, auch CD95, APO-1 oder TNFRSF6 genannt (Lavrik & Krammer 2012). Fas wird auf allen Zelltypen exprimiert; insbesondere in Leber-, Nieren-, Hirn- und Thymusgewebe, auf Lymphozyten und aktivierten reifen T-Zellen. Der Fas-Rezeptor findet sich in erster Linie membranständig, obwohl durch alternatives Splicing auch lösliche Formen entstehen können. Der FasLigand wird vor allem als Homotrimer auf der Plasmamembran von aktivierten T-Zellen exprimiert. Eine Metalloprotease kann den Liganden an der extrazellulären Domäne zu seiner löslichen Form spalten (Guicciardi & Gores 2009). Die beiden Formen des Liganden haben unterschiedliche Effekte: In Synovialozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte mit membrangebundenem Fas in Apoptose induziert werden, während lösliches Fas die Zellen zur Proliferation anregt (Audo et al. 2014).

In sensitiven Zellen löst die Bindung von membrangebundenem Fas mit dem FasLiganden Apoptose aus. Bindung von FasL an Fas induziert die Bildung eines Signalkomplexes, des DISC. Der DISC besteht aus oligomerisierten Fas-Rezeptoren, FADD, Procaspasen 8 und 10 und c-FLIP. Die Interaktionen zwischen den Molekülen

des DISC sind homotypisch, das heißt, die Todesdomäne (DD, death domain) des Rezeptors interagiert mit der DD von FADD, die Todeseffektordomäne (DED, death effector domain) von FADD interagiert mit den DED von Procaspase 8, Procaspase 10 und c-FLIP. Durch die DISC-Bildung wird Procaspase 8 zu aktivierter Caspase 8 gespalten, was zur Apoptose führt. Für die Fas-induzierte Apoptose sind zwei Signalwege beschrieben: In Typ-I-Zellen findet viel DISC-Bildung und darüber die Caspase-8-Aktivierung statt. Die aktivierte Caspase 8 aktiviert die Effektorcaspasen direkt. Dabei findet die DISC-Bildung in den Typ-I-Zellen überwiegend statt, nachdem der Rezeptor internalisiert und in ein frühes endosomales Kompartiment übergegangen ist. Während die Initiierung der DISC-Bildung auch unabhängig von der Rezeptorinternalisierung stattfinden kann, ist für die effektive DISC-Bildung und die Induktion von Apoptose in Typ-I-Zellen die Internalisierung von CD95 vonnöten (Lee et al. 2006). In Typ-II-Zellen mit niedrigerem Level von DISC-Bildung und auf diese Art aktivierter Caspase 8 benötigt das Apoptose-Signal mitochondriale Verstärkung. Dabei spaltet Caspase 8 Bid zu tBid, tBid vermittelt die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Cytochrom C bildet das Apoptosom und aktiviert Caspase 9, die schließlich die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert (Lavrik & Krammer 2012).

In vielen Zelltypen löst Fas nicht Apoptose, sondern Zellproliferation, -migration, und Zytokinbildung aus. Die Fas-induzierte Aktivierung der extracellulär signal-regulierten Kinase ERK spielt eine wichtige Rolle in der Regeneration von Neuronen und stimuliert die Proliferation von ruhenden Ito-Zellen nach Lebertrauma. Fas vermittelt die Proliferation von TCR-stimulierten T-Zellen und Thymozyten über einen Caspase-abhängigen, FADD-vermittelten Signalweg. Über Fas lösen Lymphozyten in Tumorzellen Apoptose aus (Guicciardi & Gores 2009). In vielen Tumoren finden sich inaktivierende Mutationen des Fas-Rezeptors, die mit einer Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose verbunden sind (Takakuwa et al. 2002; Takayama et al. 2002a; Takayama et al. 2002b). In Tumorzellen kann FasL außerdem nicht-apoptotische, karzinogene Signalwege wie NF- κ B und MAPK/ERK aktivieren (Barnhart et al. 2004).

2.4 TRAIL

1995 wurde TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand, als weiteres Mitglied der TNF-Familie entdeckt (Wiley et al. 1995). TRAIL kann an zwei proapoptotische

Rezeptoren mit Todesdomänen binden: TRAIL-R1 (TRAIL-receptor 1), auch DR4 (death receptor 4) genannt, und TRAIL-R2, auch DR5 genannt (Pan et al. 1997); (Walczak et al. 1997). Außerdem bindet TRAIL an drei sogenannte „decoy“- oder „Köder-Rezeptoren“: TRAIL-R3/DcR1 und TRAIL-R4/DcR2, beide membrangebunden, und an den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin. TRAIL-R3 besitzt keine und TRAIL-R4 keine funktionierende Todesdomäne, somit lösen die Rezeptoren nach Stimulation keine Apoptose aus, sondern hemmen die Apoptose-Induktion (Schneider et al. 1997; Marsters et al. 1997). Osteoprotegerin hat eine osteoklastenhemmende Wirkung im Knochenstoffwechsel (Emery et al. 1998).

Wenn TRAIL-R1 oder -R2 durch Ligandenbindung aktiviert werden, bilden die Rezeptoren Trimere und agieren als Plattform für die Rekrutierung des DISC (Andera 2009). Der DISC besteht aus den trimerisierten Rezeptoren, FADD, Procaspase 8, Procaspase 10 und FLIP (FLICE-inhibitory protein) (Lavrik et al. 2005). Innerhalb des DISC wird die Caspase 8 aktiviert und wandert ins Zytosol, wo sie Bid zu tBid spaltet. tBid löst über Interaktion mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran aus und verstärkt so das Signal zur Apoptose (Andera 2009). Die Frage nach der Internalisierung der TRAIL-Rezeptoren wird kontrovers diskutiert: Während einerseits Kohlhaas et al. zeigen konnten, dass TRAIL-Rezeptoren ein apoptotisches Signal vermitteln können, ohne dafür internalisiert zu werden, gibt es zahlreiche Nachweise für die Internalisierung von DR-4 und DR-5 zur Induktion von Apoptose (Kohlhaas et al. 2007; Akazawa et al. 2009; Horova et al. 2013; Mazurek et al. 2012).

TRAIL und seine Rezeptoren haben vielfältige Funktionen im Immunsystem: als Effektormechanismus der NK-Zellen, in der Regulation von T-Helferzellen und Hämatopoese, als Schutz vor Autoimmunität und in der Abwehr von Virusinfektionen und Tumoren über die Induktion von Apoptose (Falschlehner et al. 2009). Die Eigenschaft von TRAIL, spezifisch in Tumorzellen Zelltod auszulösen und gesunde Zellen zu verschonen, zeichnete das Protein als Kandidaten für die Krebstherapie aus (Walczak et al. 1999). Rekombinantes TRAIL und agonistische Antikörper gegen TRAIL-Rezeptoren werden in klinischen Studien als Therapie für solide und hämatologische Tumoren getestet (Forero-Torres et al. 2013; Leng et al. 2016; Reck et al. 2013).

2.5 HSP90

Hitzeschockproteine (HSPs, heat shock proteins) sind eine Familie von Chaperonen, von denen einige durch Hitze, Sauerstoffmangel oder oxidativen Stress induziert werden können. Die schnelle Expression der Hitzeschockproteine unter Stress bezeichnet man als Hitzeschockreaktion (HSR, heat shock response) (Beck et al. 2011). Als Chaperone interagieren HSPs mit Proteinen, um diese zu stabilisieren oder ihnen zu helfen, ihre korrekte Faltung einzunehmen, ohne selber Teil des Proteins zu sein (Hartl et al. 2011). Hitzeschockproteine stellen die korrekte biologisch aktive Konformation von neu synthetisierten Proteinen sicher, sind am Auf- und Abbau von makromolekularen Komplexen beteiligt, sorgen für Korrektur von falsch gefalteten Proteinen, lösen Proteinaggregate auf und vermitteln Proteine zum proteosomalen Abbau (Taipale et al. 2010). Hitzeschockproteine werden anhand ihres Molekulargewichts in kDa klassifiziert: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und kleine HSPs (15-30 kDa). Kleine Hitzeschockproteine arbeiten ATP-unabhängig, die großen ATP-abhängig. Sie bilden mit Co-Chaperonen und anderen Molekülen große Proteinkomplexe (Beck et al. 2011).

HSP90 wird konstitutiv exprimiert und macht 1-2% der Gesamtproteinmenge einer Zelle aus. In Säugetieren finden sich folgende HSP90-Isoformen: HSP90 α und HSP90 β im Zytosol, grp94 im endoplasmatischen Retikulum und TRAP1 in den Mitochondrien. Als Chaperon stellt HSP90 die korrekte Konformation seiner Interaktionspartner sicher und schützt sie vor dem Abbau (Beck et al. 2011). HSP90 arbeitet als Dimer von Untereinheiten, die am C-Terminus verbunden sind. Eine N-terminale Domäne bindet und hydrolysiert ATP und ist über eine mittlere Domäne mit der C-terminalen Domäne verbunden. Die mittlere Domäne wirkt an der Substratbindung mit und interagiert mit dem Co-Chaperon AHA1. Wie andere Chaperone hat HSP90 einen ATP-abhängigen Reaktionszyklus, der mit Konformationsänderungen des Proteins einhergeht. ATP-Bindung führt zur Dimerisierung der N-terminalen Domänen, die eine "molekulare Klemme" bilden ("molecular clamp"). So wird das Dimer kompakter, die Monomere wickeln sich umeinander. ATP-Spaltung führt zur Dissoziation der ATPase-Domänen und der gesamten Monomere (Hartl et al. 2011). HSP90 interagiert mit mehr als 20 Co-Chaperonen, die seine Interaktion mit Proteinen und seine Aktivität beeinflussen. Die Co-Chaperone koordinieren das Zusammenspiel von HSP90 und anderen Chaperonen, stimulieren oder hemmen die ATPase-Aktivität von HSP90, rekrutieren

verschiedene Interaktionspartner zu HSP90 und beeinflussen den Funktionszyklus des Chaperons (Taipale et al. 2010).

In vielen soliden und hämatologischen Tumoren werden Hitzeschockproteine im Vergleich zu gesundem Gewebe vermehrt exprimiert. Die Überexpression von Hitzeschockproteinen korreliert mit einer schlechteren Prognose in AML und myelodysplastischem Syndrom (Lanneau et al. 2008). In verschiedenen Krebsarten tritt HSP90 zu 10-fach höheren Leveln auf, was das Protein zu einem interessanten Ziel für therapeutische Inhibition macht (Beck et al. 2011). HSP90 stabilisiert viele Proteine, die eine Rolle für das Überleben oder für Resistenzmechanismen gegenüber induzierter Apoptose von Krebszellen spielen. Beispielsweise wird nach HSP90-Inhibition der HER2/neu-Rezeptor vermehrt abgebaut, der in vielen Mammakarzinomen überexprimiert ist und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Miller et al. 1994). HSP90 schützt außerdem RIP vor dem Abbau und sichert so die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch TNF; Inhibition von HSP90 wiederum sensitiviert HeLa-Zellen für TNF-induzierte Apoptose (Lewis et al. 2000). HSP90 schützt transformierte Astrozyten vor TRAIL-induzierter Apoptose, indem es FLIPs zum DISC der TRAIL-Rezeptoren rekrutiert, was über Inhibition von HSP90 mittels siRNA verhindert werden kann (Panner et al. 2007). Auch Vimentin, ein Bestandteil des Zytoskeletts, interagiert mit HSP90 und wird dadurch vor dem Abbau geschützt (Zhang et al. 2006). HSP90 bindet APAF-1 und hemmt so die Bildung des Apoptosoms und die Caspase-9-Aktivierung (Pandey et al. 2000). Die HSP90-Inhibitoren können spezifisch transformierte Zellen schädigen, da mutierte Proteine instabiler und eher von HSP90 abhängig sind (Beck et al. 2011). HSP90 ist deshalb ein vielversprechendes Zielprotein für die Krebstherapie, da es eine zentrale Rolle in den dysregulierten Signalwegen von Tumorzellen spielt, und so viele Onkoproteine in Stabilität und Aktivität von HSP90 abhängig sind (Zhang & Burrows 2004). HSP90 in transformierten Zellen scheint sich außerdem von dem in gesunden Zellen zu unterscheiden: Der HSP90-Inhibitor 17-AAG bindet in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen mit 100-mal höherer Affinität an sein Ziel (Kamal et al. 2003). In Tumorzellen scheint es eine spezialisierte Form von HSP90 zu geben, genannt teHsp90 ("tumor-enriched HSP90"), die den Abbau von Onkogenen blockiert (Zong et al. 2015).

Aus diesen Gründen wurden verschiedene HSP90-Inhibitoren entwickelt und in klinischen Studien getestet. Eine Möglichkeit der HSP90-Hemmung ist über Bindung an die N-terminale ATP-Bindestelle. Inhibitoren, die an die N-terminale ATPase-Bindetasche binden, sind z.B. Ansamycinderivate wie Geldanamycin, 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-AAG) oder 17-Dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-DMAG). Wenn diese Inhibitoren binden, nehmen sie in der ATP-Bindestelle eine gebogene Konformation ein. Das Chaperon kann seinen Zyklus von Konformationsänderungen nicht mehr vollziehen und die Interaktionspartner von HSP90 werden im Proteasom abgebaut. Diese Inhibitoren wurden als erstes entdeckt und in klinischen Studien getestet. Eine andere Möglichkeit ist Bindung an den C-Terminus über ein Novobiocinderivat und damit Hemmung einer zweiten ATP-bindenden Domäne. Hemmung von HSP90 ist ebenfalls möglich über HDAC-Inhibitoren (Histon-Deacetylase), die die postranslationale Modifikation des Chaperons ändern, indem sie seine Acetylierung induzieren und so seine Funktion hemmen (Chiosis 2006). Ein humaner rekombinanter Antikörper gegen HSP90 wurde in der Therapie von Candidiasis getestet (Bugli et al. 2013). Das Peptidomimetikum Shepherdin hemmt die Bindung von HSP90 und Survivin, und induziert so Apoptose in Tumorzellen (Plescia et al. 2005).

Die Geldanamycin-Derivate 17-AAG (Tanespimycin) und 17-DMAG (Alvespimycin) zeigten in klinischen Studien Hepatotoxizität und Induktion von Effluxpumpen (multidrug resistance). In verschiedenen klinischen Studien (metastasiertes Melanom, metastasiertes Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom) zeigte 17-AAG alleine keinen Effekt, weshalb weitere Studien in Kombination mit mindestens einem Chemotherapeutikum durchgeführt wurden (Beck et al. 2011). 17-AAG kann beispielsweise Gliomzellen für Cisplatin-induzierte Apoptose sensitivieren (Ohba et al. 2010). 17-AAG in Kombination mit Trastuzumab scheint effektiv bei HER2-positivem metastasiertem Brustkrebs zu sein (Modi et al. 2011). Ein Nachteil der N-terminalen HSP90-Inhibitoren ist die Induktion von Hitzeschutzfaktoren, die die Überexpression von Hitzeschockproteinen auslösen. Deren antiapoptotische Effekte, vor allem von HSP70, sind der Wirksamkeit der Inhibitoren als Krebstherapie abträglich (Beck et al. 2011).

Zu den HSP90-Inhibitoren der zweiten Generation gehört Ganetespib, ein Resorcin-Derivat, das ebenfalls an die N-terminale ATP-Bindestelle bindet, und NVP-AUY922, ebenfalls ein Resorcin-Derivat. Diese Inhibitoren zeigen im Vergleich zu ihren Vorgängern geringere Leber- und Augentoxizität und eine höhere Wirksamkeit (Parimi & Tsang 2014). In CRC-Zelllinien (kolorektales Karzinom) konnte gezeigt werden, dass Inhibition von HSP90 mittels Ganetespib die epithelial-mesenchymale Transition, Motilität und Invasion der Tumorzellen hemmen kann (Nagaraju et al. 2015). Ganetespib scheint außerdem effektiv in AML-Zellen Apoptose auszulösen (Lazenby et al. 2015). In CRC-Zellen erzielt der HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 einen synergistischen Effekt auf TRAIL-induzierte Apoptose. Die Kombination von TRAIL und NVP-AUY922 zeigt ebenfalls einen Synergismus in der Wirksamkeit gegen Leukämie- und Gliomazellen (Lee et al. 2015).

2.6 Ziel der Studie

Bekannt ist, dass Cathepsin D (CTSD) Teil der TNF-vermittelten Apoptose ist: Die Protease wird durch ASMase-generiertes Ceramid aktiviert und spaltet daraufhin Bid, wodurch das Apoptosesignal über den mitochondrialen Weg verstärkt wird (Heinrich et al. 2004). HSP90 wurde als Substrat von CTSD identifiziert. In U-937-Zellen wird HSP90 nach TNF-Stimulation in zwei stabile Fragmente gespalten, was durch Inhibition von CTSD mittels Pepstatin A verhindert werden kann. Gleichzeitig wird die TNF-induzierte Apoptose in U-937-Zellen durch CTSD-Inhibition gehemmt, durch HSP90-Inhibition über 17-AAG gesteigert (Fritsch et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Fragestellungen verfolgt: Wird die Spaltung von HSP90 auch durch andere Todesrezeptoren und in anderen Zelllinien ausgelöst? Gibt es einen Zusammenhang mit der Apoptose-Induktion? Welche Funktion hat HSP90 im Signalweg der TNF-induzierten Apoptose? Zusätzlich zu den Suspensionszelllinien wurden außerdem Pankreaskarzinomzellen untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die U937-Zelllinie wurde 1976 aus Tumorzellen eines Patienten mit histiozytärem Lymphom gewonnen. Es handelt sich um eine menschliche hämatopoetische Linie mit monozytären Eigenschaften (Sundström & Nilsson 1976) (bezogen von der DSMZ).

Jurkat-Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines 14-Jährigen mit akuter lymphoblastärer Leukämie isoliert. Die lymphozytäre Zelllinie zeigt T-Zell-Merkmale (Schneider et al. 1977) (bezogen von der DSMZ).

Raji ist eine B-lymphozytäre Zelllinie und wurde aus Burkitt-Lymphomen isoliert (Pulvertaft 1964) (bezogen von der DSMZ).

Die HDLM2-Zelllinie stammt aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit Hodgkin-Lymphom von T-Zell-Ursprung (Drexler et al. 1989) (bezogen von der DSMZ).

Panc-1 und Panc-Tu-I sind epitheloide Zelllinien aus den primären Tumoren von Patienten mit duktalem Adenokarzinomen des Pankreas (Lieber et al. 1975; Moore et al. 2001).

Colo-357 und Panc-89 entstammen aus Lymphknotenmetastasen eines PDAC (Morgan et al. 1980; Okabe et al. 1983).

3.1.2 Kulturmedium

RPMI-1640-Kulturmedium, +L-Glutamin, +25mM HEPES	Life Technologies
Fötale Kälberserum	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

3.1.3 Puffer und Lösungen

PBS

Mod. RIPA-Puffer	0,05 M TRIS-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 1% NP-40; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 0,25% Natriumdesoxycholat
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
SDS-PAGE Auftragspuffer 5x	50 mM TRIS pH 6,8; 10% SDS; 25-28% Glycerol; 1 Prise Bromphenolblau; +DTT vor Gebrauch: 40 µl 1 M DTT auf 500 µl LB
SDS-PAGE Laufpuffer 10x	144 g Glycin; 30 g TRIS; 10 g SDS in 1 L aq. dest.
Transblotpuffer 10x	144 g Glycin; 30 g TRIS in 1 L aq. dest.
Transblotpuffer 1x	70% H ₂ O; 20% Methanol; 10% Transblotpuffer 10x
TBST 10x	58 g NaCl; 50 ml 2 M TRIS pH 7,5; 10 ml Tween20 in 1L aq. dest.
Paraformaldehyd	2% Formaldehyd, Merck Millipore in PBS
Fc-TNF α	
Fc-FasLigand	
TNF	
KillerTRAIL	Enzo
17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin	Tocris
DNS-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258	Sigma
Proteinstandard, bovine serum albumin	Thermo Scientific

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primäre Antikörper

Anti-HSP 90 mouse monoclonal Antibody	Santa Cruz, Kat.-Nr. sc-69703
Anti-HSP 90 rabbit polyclonal Antibody	Cell Signaling, Kat.-Nr. 4874
Anti-Bid rabbit polyclonal Antibody	Santa Cruz, Kat.-Nr. sc-11423
Anti-Caspase 9 (human specific) rabbit polyclonal Antibody	Cell Signaling, Kat.-Nr. 9502
Anti-Cleaved Caspase 3 rabbit monoclonal	Cell Signaling, Kat.-Nr. 9664

Antibody

HRP-conjugated Anti- α -Tubulin mouse monoclonal Antibody Proteintech, Kat.-Nr. HRP-66031

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

HRP-conjugated Mouse Anti-Rabbit light chain monoclonal Antibody Merck Millipore, Kat.-Nr. MAB201P

HRP-conjugated Goat Anti-Mouse light chain polyclonal Antibody Dianova, Kat.-Nr. 115-035-174

3.1.5 Kits

Pierce™ BCA Protein Assay Thermo Scientific

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Thermo Scientific

Molekulargewichtstandard

Amersham™ ECL™ Western Blotting GE Healthcare

Detection Reagents

Caspase-Glo® 3/7 Assay Promega

Caspase-Glo® 9 Assay Promega

3.1.6 Geräte

Heracell™ 150i CO₂ Incubator Thermo Scientific

LaminAir HB 2472K Sterilbank Heraeus Instruments

Lichtmikroskop Olympus

Zentrifuge Minifuge RF Heraeus Sepatech

Zentrifuge Sigma 1-14 Sigma

Zentrifuge 5417R Eppendorf

ImageStream© Amnis

Infinite® M200 microplate reader TECAN

Thermomixer comfort Eppendorf

Electrophoresis power supply EV265 PEQLAB

Entwicklermaschine

3.1.7 Ver- und Gebrauchsmaterialien

Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Greiner Bio-One

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Röhrchen 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
650 ml Kulturflaschen	Greiner Bio-One
Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Hecht Assistent
Deckplättchen, 20x26 mm	Thermo Scientific
Zellkultur Multiwellplatten, transparent, 12- Well- und 24-Well-Platten	Greiner Bio-One
Nunc-Immuno™-96-Well-Platten, transparent	Thermo Scientific
Lumitrac™-96-Well-Mikroplatten, weiß	Greiner Bio-One
Roti®-PVDF-Transfermembran, Porengröße 0,45 µm	Roth
Blottingpapier 1 mm	Roth
Amersham Hyperfilm™ ECL Röntgenfilme	GE Healthcare
SDS-Polyacrylamid-Gele: Trenngel	Acrylamid; 1,5 M TRIS pH 8,8; 20% Glycerin; SDS 10%; TEMED; APS 10%
SDS-Polyacrylamid-Gele: Sammelgel	Acrylamid; 0,5 M TRIS 6,8 pH; H ₂ O; SDS 10%; TEMED; APS 10%

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Suspensionszellen wurden in 650 ml Flaschen bei 37°C und in 5%-CO₂-Atmosphäre kultiviert; das RPMI-Kulturmedium wurde mit 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

Die adhärenenten Pankreas-Zelllinien wurden ebenfalls bei 37°C und in 5%-CO₂-Atmosphäre in 250- und 650 ml-Flaschen kultiviert. Das Kulturmedium wurde mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Die Zellen wurden dreimal die Woche abgelöst und ca. 1x10⁶ Zellen in neue Flaschen ausgesät, dafür wurde das alte Medium abgegossen und die Kulturflaschen mit etwas PBS ausgewaschen. Die Zellkultur wurde mit 10% Trypsin/EDTA in aq. dest. behandelt, dabei wurden die

Zellen für 3 bis 25 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Boden der Flasche ablösen ließen. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde mittels frischem Medium + FCS geblockt, die Zellen wurden gezählt und die entsprechende Zahl in eine neue Kulturflasche überführt.

3.2.2 Apoptose-Assay

Der Apoptose-Assay mittels ImageStream wurde nur mit den Suspensionszelllinien durchgeführt.

Alle Zelllinien wurden jeweils zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Well in eine 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Dafür wurde zunächst die Zelldichte in der Zellkulturflasche bestimmt mittels Neubauer-Zählkammer, die mit $10 \mu\text{l}$ der Zellsuspension aus der Kulturflasche befüllt wurde. Es wurden die Zellen innerhalb 16 großer Quadrate der Zählkammer mithilfe eines Mikroskops ausgezählt, woraus man nach folgender Formel die Zelldichte pro Milliliter der Zellsuspension berechnen kann:

$\text{Gezählte Zellen} \times 10^4 / \text{benötigte Zellzahl} = \text{benötigtes Volumen der Zellsuspension}$

Das entsprechende Volumen wurde aus der Kulturflasche entnommen und bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, danach wurde das überschüssige Medium abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen, jeweils 1 ml pro Well, und die Suspension auf die 24-Wellplatte verteilt.

Die verschiedenen Zelllinien wurden anfangs mit unterschiedlichen Todesliganden behandelt. Fc-TNF und Fc-FasLigand wurde in einer Konzentration von 1.000 ng/ml Zellsuspension eingesetzt, Etoposid in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{l/ml}$, TRAIL in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$. Für die Versuche mit 17-AAG wurde der Wirkstoff in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eine Stunde vor Zugabe der Todesliganden zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit den Liganden 18-20 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Zur Vorbereitung auf die Messung im ImageStream wurden die Zellen für 30 Minuten mit $1 \mu\text{l}$ Hoechst-DNS-Farbstoff in 1 ml Zellsuspension gefärbt, der Farbstoff wurde vorher 1:1 mit PBS verdünnt. Danach wurde die Zellsuspension aus der Well-Platte pipettiert und in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt. Nach dem Abzentrifugieren für vier

Minuten bei 300xg und dem Abnehmen des überschüssigen Mediums wurde das Zellpellet in 20 µl PFA aufgenommen. So fixiert waren die Proben bereit zur Messung.

3.2.3 Messung der Apoptoserate am ImageStream

Das ImageStream ist eine Kombination aus Durchflusszytometer, Licht- und Fluoreszenzmikroskop.

Ein wesentliches und zwingendes Merkmal der Apoptose ist DNS-Fragmentierung und –Kondensation; apoptotische Zellkerne sind kleiner und unregelmäßiger im Vergleich zu denen lebender Zellen. Mithilfe des Hoechst-Farbstoffs wurden die Zellkerne angefärbt, sodass deren Morphologie beurteilt werden konnte.

Die Proben wurden mit dem 405 nm-Laser angeregt und je Probe 10.000 Bilder von einzelnen Zellen gesammelt. Die Daten wurden mit der IDEAS Software mithilfe des Apoptosis Wizards ausgewertet. Es wurde ein Streudiagramm erzeugt mit Hellfeld-Kontrast der Zelle als x- und Größe des Zellkerns als y-Achse. Apoptotische Zellen zeigen einen höheren Kontrast im Hellfeld und einen verkleinerten Zellkern. Sie stellen sich im Streudiagramm als Punktwolke unterhalb der 30%-Grenze der y-Achse dar.

3.2.4 Stimulation von Zellen

Um Zellysate für die Gelelektrophorese und Western Blotting herzustellen, wurden die Zellen wie für den Apoptose-Assay gezählt, das benötigte Volumen der Zellsuspension abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium auf eine Well-Platte verteilt. Für diese Versuche wurden für die Suspensionszellen je Well 1x10⁷ Zellen benötigt, die in jeweils 3 ml Kulturmedium auf 12-Well-Zellkulturplatten verteilt wurden. Die adhärenenten Zellen wurden am Tag vor der Stimulation zu je 1x10⁶ Zellen in 3 ml Kulturmedium auf 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Für die HSP90-Blots wurden die verschiedenen Zelllinien mit TNF, FasLigand, TRAIL Etoposid, in denselben Konzentrationen wie im Apoptose-Assay, für je vier und sechs Stunden stimuliert. Außerdem wurden U937-Zellen mit Fc-TNF, 1.000 ng pro

1 ml Zellsuspension, und Fc-TNF mit 17-AAG, 1 μ M, für je 30, 60 und 120 Minuten behandelt, wobei 17-AAG immer eine Stunde vor dem Fc-TNF hinzugegeben wurde.

3.2.5 Herstellung von Zelllysaten

Am Ende der Stimulation wurden die Zellsuspensionen aus den 6-Wellplatten in 15 ml-Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt, bei 1200 rpm für 5 Minuten in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Zellpellets wurden in 200 μ l modifiziertem RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen, mehrmals auf- und abpipettiert, um die Zellen zu lysieren, und über Nacht bei -20°C eingefroren.

3.2.6 BCA-Proteinbestimmung

Zur Proteingehaltbestimmung wurden die Zelllysate auf Eis gestellt, bis sie aufgetaut waren. Nachdem sie in einer auf 2°C gekühlten Zentrifuge bei 1000xg für 5 Minuten zentrifugiert wurden, um die DNS der Zellen auf den Boden der Reagiergefäße zu bringen, wurde vom Überstand jeder Probe je zweimal 2 μ l in eine transparente 96-Well-Platte überführt. Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin in Konzentrationen in sechs Stufen von 0 – 1 mg/ml verwendet, wovon jeweils zweimal 10 μ l pipettiert wurden. Es wurde der Pierce™ BCA Protein Assay verwendet, die Absorption wurde mittels des Infinite M200 microplate reader ausgelesen.

3.2.7 SDS-PAGE

Um die Proben für die Gelelektrophorese vorzubereiten, die jeweils 20 μ g Protein enthalten sollten, wurde das entsprechende Volumen des Zelllysats zu je 5 μ l Laemmli-Puffer in ein Reagiergefäß pipettiert und für 5 Minuten auf 100°C erhitzt, sodass die Proteine denaturieren. Kurz vor der Überführung in das Polyacrylamidgel wurden die Proben nochmals für zwei Minuten auf 100°C im Heizblock erhitzt und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden in selbst gegossene SDS-Polyacrylamidgele mit 5% Acrylamidanteil im Sammel- und 12,5% im Trenngel überführt. Die Elektrophorese wurde bei 40 mA und unbegrenzter Spannungseinstellung

durchgeführt, bis die Lauffront der Protein-Puffer-Lösung am Ende des Gels angekommen war.

3.2.8 Western-Blot

Die so aufgetrennten Zelllysate wurden mittels Western Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Es wurde ein „Sandwich“ in einer Kassette gebaut aus Schwamm, Blotting-Papier, Gel und PVDF-Membran. In einer Blottingkammer, gefüllt mit Blotting-Puffer, wurde für 75 Minuten bei 100 V und unbegrenzter Stromstärke-Einstellung der Blot durchgeführt (Goldman et al. 2001).

Die fertigen Membranen wurden für eine Stunde in TBST mit 5% Magermilchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Danach wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen primären Antikörpern ebenfalls in TBST mit 5% Milchpulver inkubiert. Alle primären Antikörper wurden in 1:1000 verdünnt.

Am nächsten Tag wurden die Membranen für eine halbe Stunde in TBST gewaschen, welches dabei mehrmals ausgetauscht wurde. Mit den sekundären Antikörpern wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden 1:10.000 in TBST mit 5% Milchpulver verdünnt.

Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Membranen für eine Minute mit ECL-Lösung behandelt und mit der so erzeugten Chemilumineszenz Röntgenfilme belichtet. Die Filme wurden entwickelt und eingescannt und von einigen wurde die Signalstärke mittels des ImageJ-Programms quantifiziert.

3.2.9 Caspase-Glo Assay

Mit den Caspase-Glo 3/7 und Caspase-Glo 9 Assays wurde die Aktivität von Caspase 3 und 7 beziehungsweise 9 als Index für Apoptose gemessen. Die Assays enthalten ein Caspasen-Substrat mit einer DEVD-Sequenz, die von Caspasen gespalten wird, eine Luciferase, die aus dem gespaltenen Substrat ein Lumineszenzsignal erzeugt, und ein zelllysierendes Reagenz. Die Stärke der Lumineszenz korreliert mit der Caspasen-Aktivität, die wiederum als Maß für

apoptotische Aktivität in den untersuchten Zellen genommen werden kann (Kurokawa & Kornbluth 2009).

Für diese Assays wurden je Messwert dreimal 10.000 Zellen in je 50 µl Kulturmedium in eine weiße 96-Well-Platte gesät, außerdem dreimal ein Blindwert mit 100 µl Kulturmedium. 17-AAG wurde in einer Konzentration von 1 µM in 50 µl Medium eine Stunde vor den anderen Liganden dazugegeben, TNF wurde in einer Konzentration von 1.000 ng/ml, TRAIL in einer Konzentration von 1 µM verwendet. Die Zellen wurden für zwei Stunden mit den Liganden im Brutschrank inkubiert, danach wurde je 100 µl Caspase-Glo-Substrat, was zuvor mit dem beigefügten Puffer gemischt wurde, hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenz wurde mittels Mikroplattenleser gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Apoptose-Induktion durch TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid

Die Zelllinien U-937, Jurkat, Raji und HDLM2 wurden zunächst hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber TNF-, FasLigand- und TRAIL-induzierter Apoptose untersucht. Neben den Todesliganden wurde als Positivkontrolle das Zytostatikum Etoposid verwendet, welches durch Hemmung der Topoisomerase II DNS-Strangbrüche erzeugt und auf diese Weise Apoptose auslöst. U-937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen wurden jeweils für 18 Stunden mit TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid behandelt. Die Induktion von Apoptose wurde anhand der Fragmentierung und Kondensation des Zellkerns bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen in den Proben wurde gemessen, indem die Zellen erst mittels DNS-Farbstoff angefärbt und dann diejenigen mit pyknotischen Zellkernen im ImageStream als apoptotische Zellen ausgezählt wurden.

Abbildung 1 stellt dar, welche Zellen auf welche der vier Stimuli mit Apoptose reagieren. Die Apoptoseraten der mit TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid behandelten Zellen wurden zu denen der unbehandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich, dass in U-937- und Jurkat-Zellen alle drei Todesliganden zu

einer gesteigerten Apoptoserate führen. In der Raji-Zelllinie konnte mit FasLigand vermehrt Apoptose ausgelöst werden, hingegen waren die Zellen gegenüber TNF und TRAIL resistent. In diesen drei Zelllinien hat FasLigand den stärksten apoptoseinduzierenden Effekt. HDLM2-Zellen sind unempfindlich gegenüber TNF-, FasLigand- und TRAIL-induzierter Apoptose; durch Etoposid allerdings kann in HDLM2-Zellen ebenso wie in den anderen drei Zelllinien Apoptose ausgelöst werden.

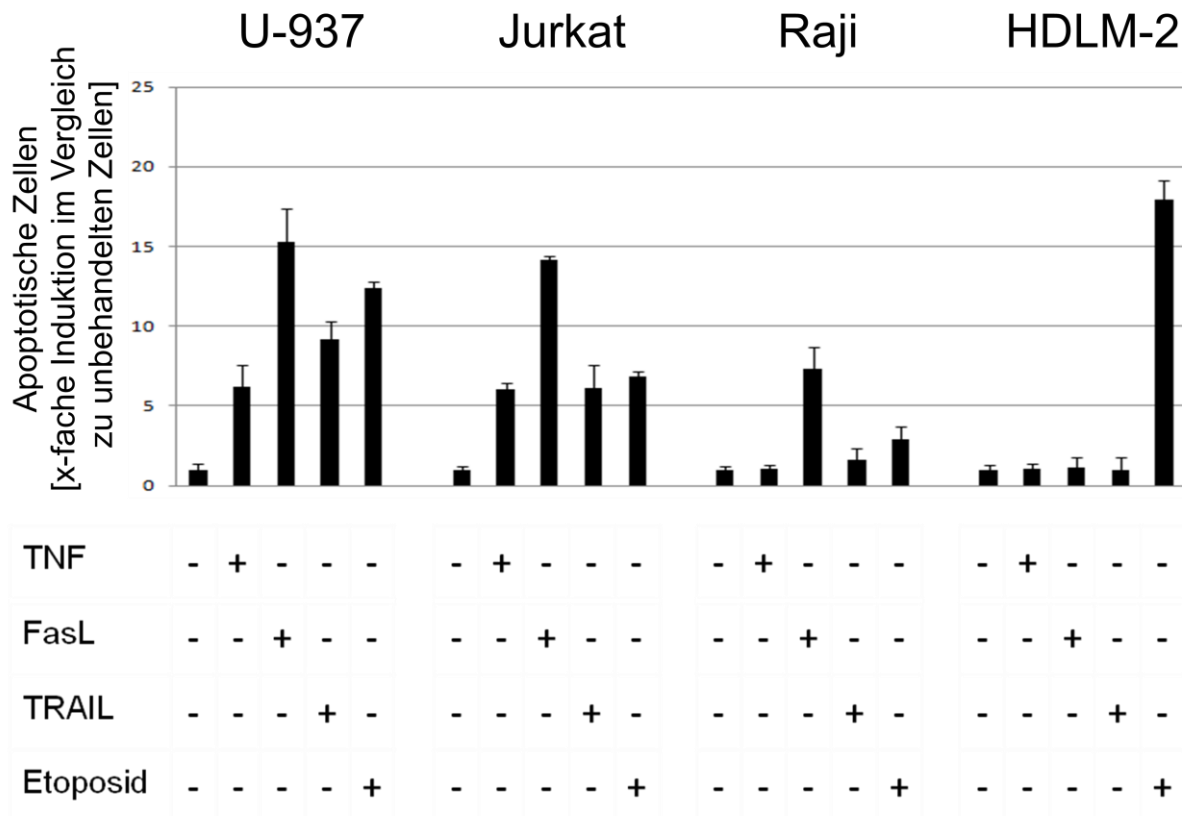


Abb. 1 : Suszeptibilität vier ausgewählter Zelllinien für TNF, FasLigand, TRAIL und das Zytostatikum Etoposid als Positivkontrolle. U-937- und Jurkat-Zellen reagieren auf alle Liganden mit vermehrter Apoptose. Raji-Zellen sind unempfindlich gegenüber TNF und TRAIL, aber Inkubation mit FasLigand löst Apoptose aus. In HDLM2-Zellen führt nur Etoposid zu einer gesteigerten Apoptoserate.

4.2 Sensitivierung für TNF-induzierte Apoptose durch HSP90-Inhibition

Im Unterschied zu Raji- oder HDLM2-Zellen sind U-937- und Jurkat-Zellen empfindlich gegenüber dem Apoptosestimulus durch TNF. Um einen möglichen Einfluss von HSP90 auf die TNF-induzierte Apoptose nachzuweisen, wurde

bestimmt, ob und wie die Hemmung der Funktion von HSP90 mittels 17-AAG die apoptotische Antwort auf TNF in den TNF-sensitiven und TNF-resistenten Zellen verändert. Dazu wurden U-937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen für 18 Stunden mit TNF und mit TNF plus 17-AAG inkubiert und die Auslösung von Apoptose als Zellkernfragmentierung und -kondensation mittels ImageStream analysiert.

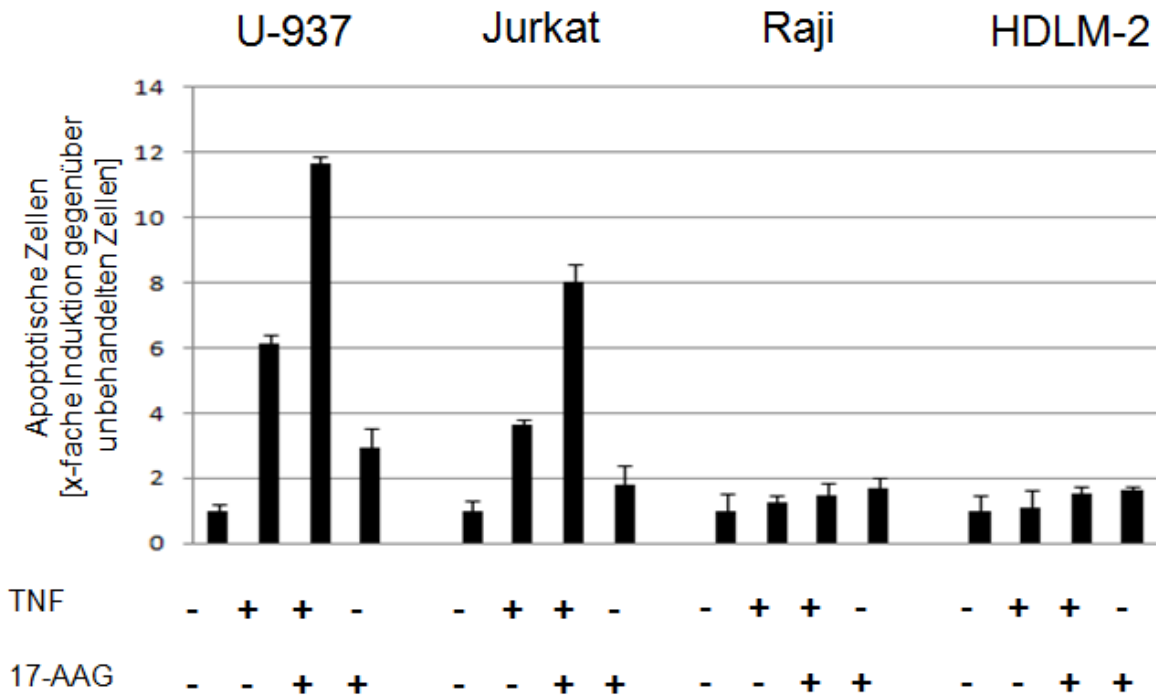


Abb. 2: Sensitivierung für die TNF-induzierten Apoptose durch HSP90-Inhibition. In U-937- und Jurkat-Zellen wird die Induktion von Apoptose durch TNF nach Vorbehandlung mit 17-AAG, einem HSP90-Inhibitor, um mehr als das Doppelte gesteigert. Auf Raji- und HDLM2-Zellen, die auf Stimulation mit TNF nicht mit Apoptose reagieren, hat auch die Kombination von TNF mit 17-AAG keinen Apoptose-induzierenden Effekt.

In Abbildung 2 werden die Veränderungen des Anteils apoptotischer Zellen in TNF- und TNF- plus 17-AAG-behandelten Proben im Verhältnis zu unbehandelten Zellen dargestellt. In U-937- und Jurkat-Zellen lässt sich in Übereinstimmung mit dem ersten Experiment durch TNF Apoptose auslösen. Durch die zusätzliche Inhibition von HSP90 wird in diesen Zellen mehr als doppelt so effektiv Apoptose induziert. Auch 17-AAG hat einen zytotoxischen Effekt auf U-937- und Jurkat-Zellen, doch die Apoptoseinduktion durch Kombination von TNF und 17-AAG ist stärker als der rein additive Effekt beider Substanzen. Raji- und HDLM2-Zellen hingegen, die gegenüber

TNF-induzierter Apoptose unempfindlich sind, zeigen auch nach HSP90-Inhibition auf TNF-Behandlung keine Apoptose.

Somit könnte HSP90 in TNF-sensitiven Zellen einen protektiven Effekt vor der Apoptose-Induktion durch TNF haben, der durch 17-AAG aufgehoben wird. Da in den TNF-resistenten Zellen die Inhibition von HSP90 keine Steigerung der TNF-induzierten Apoptose zur Folge hat, scheint HSP90 nach diesen Befunden nur in der per se reagiblen Tumorzelle zu wirken.

4.3 Spaltung von HSP90 in U-937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen

In U-937-Zellen induziert TNF-Stimulation die Spaltung von HSP90 durch die Protease Cathepsin D. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Reaktion auch in anderen Zelllinien auftritt und ob sie auch durch andere Todesrezeptoren vermittelt wird. Dazu wurden U-937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen mit TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid behandelt und mittels Western Blot gegen zwei verschiedene Anteile des HSP90-Proteins dessen Spaltung nachgewiesen.

Abbildung 3 zeigt den Western Blot auf HSP90 in U-937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen, die für je vier und sechs Stunden mit TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid stimuliert wurden. Es wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, die sich gegen zwei verschiedene Epitope des HSP90-Proteins richten. Bei 90 kDa zeigen sie eine starke Bande, die dem intakten HSP90-Anteil entspricht. Zwei weitere Banden treten bei ungefähr 53 und 37 kDa auf: Sie stellen die zwei stabilen Fragmente dar, in die HSP90 durch Cathepsin D gespalten wird. In U-937- und Jurkat-Zellen werden diese HSP90-Spaltfragmente nach der Stimulation mit TNF, FasLigand und TRAIL beobachtet. In Raji-Zellen tritt die HSP90-Spaltung nur nach FasLigand-Behandlung auf, in HDLM2-Zellen durch keinen der Liganden. Etoposid führt in U-937- und Jurkat-, aber nicht in Raji- und HDLM2-Zellen zur HSP90-Spaltung.

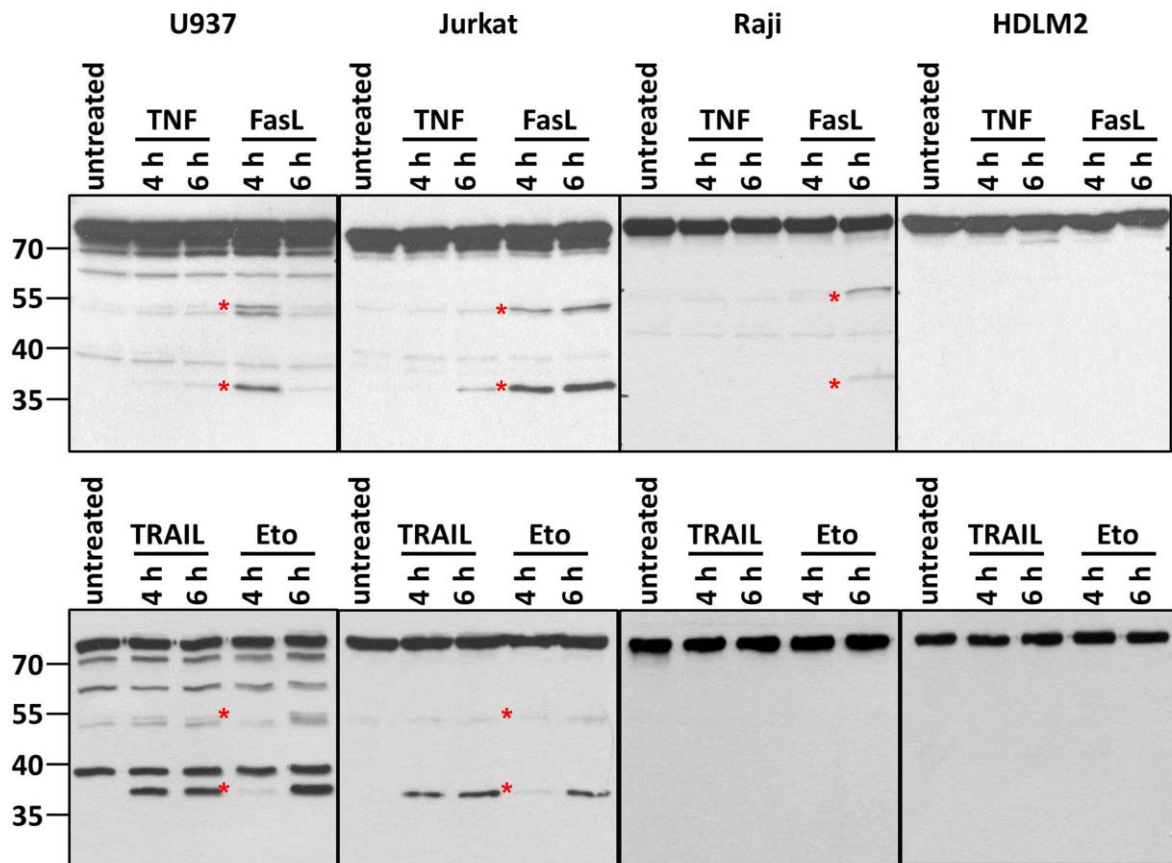


Abb. 3: Spaltung von HSP90 nach TNF-, FasLigand- und TRAIL-Stimulation. Im Western Blot auf HSP90 zeigen sich nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Liganden zwei Fragmente bei ca. 53 und 37 kDa (rote Markierung). Diese Spaltfragmente treten bei U-937- und Jurkat-Zellen nach Stimulation mit TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid auf, in Raji-Zellen nur durch FasLigand und in HDLM2-Zellen werden sie nicht beobachtet. Das Auslösen von Apoptose durch die Todesliganden in diesen Zelllinien korrespondiert mit der Spaltung von HSP90. Bei Etoposid-Behandlung von Raji- und HDLM2-Zellen treten allerdings keine Spaltfragmente auf, obwohl sie mit Apoptose reagieren.

Bezogen auf die Todesliganden korrespondiert in allen vier untersuchten Zelllinien das Auslösen von Apoptose durch TNF, FasLigand oder TRAIL mit dem Auftreten der Spaltung von HSP90 nach TNF-, FasLigand- oder TRAIL-Stimulation. Lösen die Todesliganden in der entsprechenden Zelllinie Apoptose aus, führen sie auch zur Spaltung von HSP90; ist die Zelllinie hingegen resistent gegenüber der TNF-, FasLigand- oder TRAIL-induzierten Apoptose, tritt durch denselben Liganden keine HSP90-Spaltung auf. Etoposid allerdings führt nur in U-937- und Jurkat-Zellen zur HSP90-Spaltung, obwohl das Zytostatikum in allen vier Zelllinien Apoptose induziert, vermutlich über einen anderen Mechanismus.

4.4 TNF-induzierte Aktivierung von Caspase 9 und Bid

Nachdem ein protektiver Effekt von HSP90 vor der TNF-induzierten Apoptose festgestellt wurde, sollten nun nachgeschaltete Interaktionspartner von HSP90 innerhalb des TNF-R1-Signalwegs identifiziert werden. Dazu wurde in U-937-Zellen mittels Western Blot die Aktivierung von Caspase 9 und Bid nach TNF-Stimulation und nach TNF-Stimulation mit zusätzlicher HSP90-Inhibition untersucht.

In Abbildung 4 wird der Western Blot für Procaspase 9, aktivierte Caspase 9, Bid und Tubulin in U-937-Zellen gezeigt. Die Zellen wurden je 30, 60 und 120 Minuten mit TNF und TNF plus 17-AAG behandelt, außerdem für 180 Minuten ausschließlich mit 17-AAG. Dazu wird die Intensität der Banden von Procaspase 9, gespaltener Caspase 9 und Bid im Verhältnis zur Tubulinbande dargestellt.

TNF-Behandlung induziert in den Zellen durch die Induktion von Apoptose eine Aktivierung der Caspase 9, was sich im Western Blot sowohl in der Abnahme der Procaspase 9-Bande als auch der Zunahme der aktivierten Caspase 9-Bande zeigt. Bid wird nach TNF-Stimulation zu t-Bid gespalten, was an einer Abnahme der Bandenintensität zu erkennen ist. Nachdem die Zellen zusätzlich mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG behandelt wurden, tritt im Vergleich zur alleinigen Gabe von TNF sowohl eine stärkere Aktivierung der Caspase 9 als auch eine vermehrte Spaltung von Bid auf.

Intaktes HSP90 schützt Bid vor der Spaltung und somit der Aktivierung. Da die Aktivierung der Caspase 9 durch t-Bid getriggert wird, interagiert HSP90 entweder ebenfalls direkt mit Caspase 9 oder verhindert die Aktivierung der Protease allein über Interaktion mit Bid. Somit kann HSP90 U-937-Zellen vor der TNF-induzierten Apoptose schützen, indem es die Aktivierung von Bid und konsekutiv der Caspase 9 verhindert.

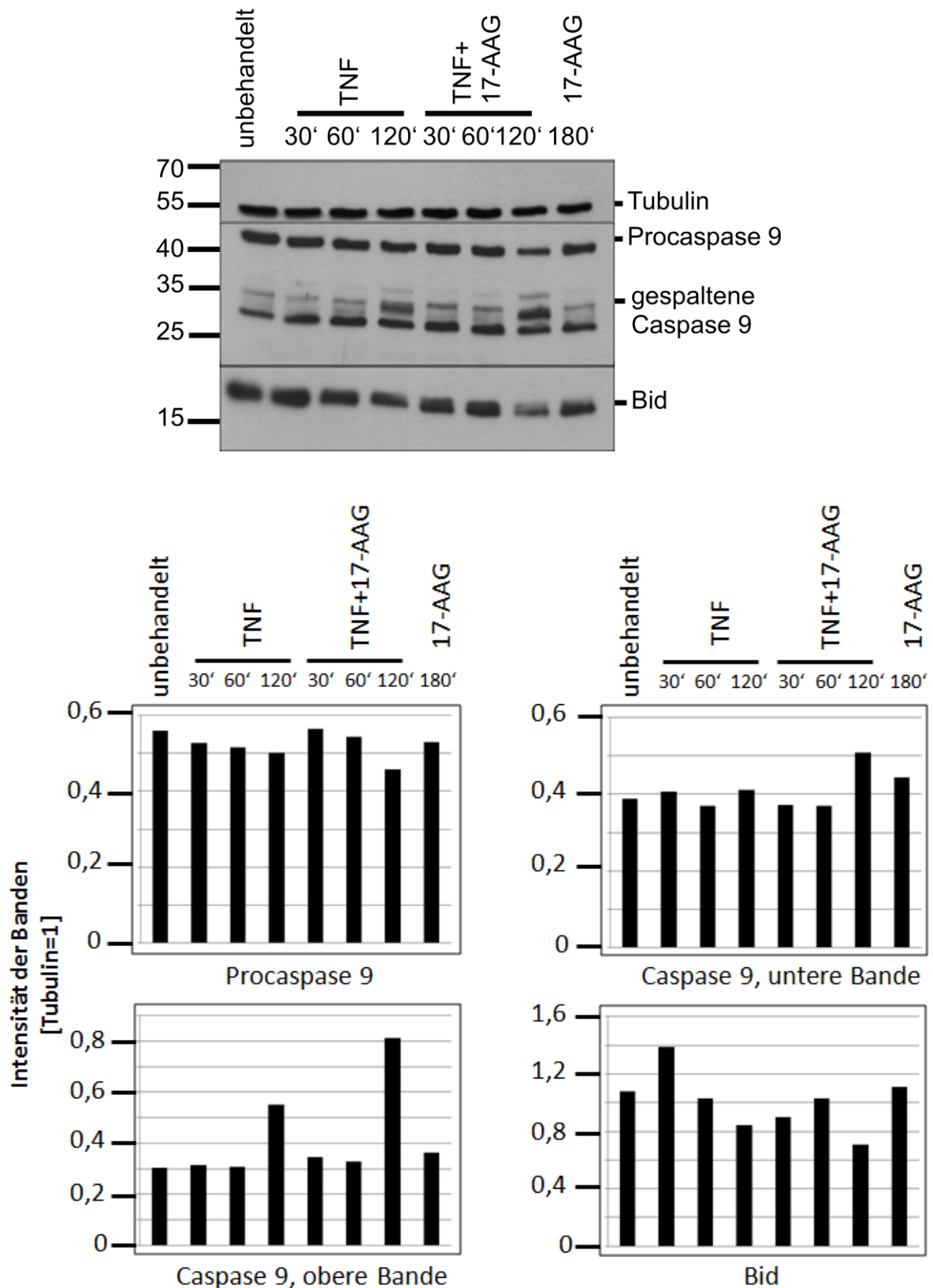
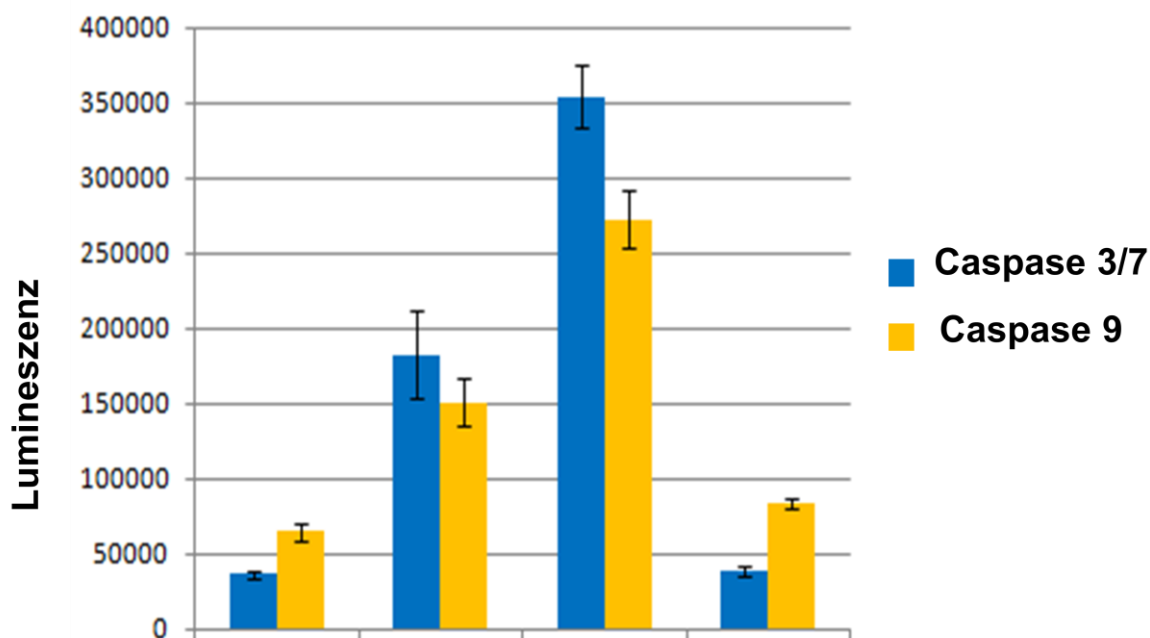


Abb. 4: TNF-induzierte Aktivierung von Caspase 9 und Bid. In U-937-Zellen löst die Inkubation mit TNF eine Spaltung der Procaspase 9 zur aktivierten Caspase 9 und eine Spaltung von Bid aus. Beides wird durch die zusätzliche Inhibierung von HSP90 mittels 17-AAG verstärkt. 17-AAG alleine hat keinen derartigen Effekt.

4.5 TNF-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3/7 und Caspase 9

Eine weitere Möglichkeit des Apoptose-Nachweises neben der Darstellung der Kernfragmentierung ist die enzymatische Messung der Caspasen-Aktivität. Die Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 9 wurde in U-937-Zellen mittels Caspase-Glo-Enzymaktivitätsassay untersucht, um den Einfluss von HSP90-Hemmung auf die TNF-induzierte Apoptose zu analysieren. Dazu wurden die Zellen für je zwei Stunden mit TNF und mit TNF plus 17-AAG behandelt.



TNF	-	+	+	-
17-AAG	-	-	+	+

Abb. 5: TNF-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3/7 und 9. Im Caspase-Glo-Assay zeigen U937-Zellen nach TNF-Stimulation eine vermehrte Aktivität von Caspase 3/7 und 9. Zusätzliche HSP90-Hemmung führt zu einer Verdopplung der Aktivität der Caspasen.

Abbildung 5 zeigt die Aktivierung der Caspasen 3/7 und 9 in U-937-Zellen, die mit TNF, TNF plus 17-AAG und 17-AAG alleine behandelt wurden. Dargestellt wird die

Intensität der durch die Luciferase erzeugten Lumineszenz, die mit der enzymatischen Aktivität der Caspasen korreliert.

Die Caspasen 3, 7 und 9 sind in U-937-Zellen nach TNF-Stimulation vermehrt aktiv. Werden die Zellen zusätzlich mit dem HSP90-Inhibitor behandelt, steigt die Aktivität der Caspasen nochmals um etwa das Doppelte an. Der HSP90-Inhibitor 17-AAG alleine vermag keine verstärkte Aktivierung der Caspasen auszulösen. Somit kann bestätigt werden, dass in TNF-sensitiven U937-Zellen die Inhibition von HSP90 zu einer verstärkten TNF-induzierten Apoptose führt, während der HSP90-Inhibitor alleine keine vermehrte Apoptose auslöst.

4.6 Spaltung von HSP90 in Panc-1-, Colo-357-, Panc-TU-I- und Panc-89-Zellen

Die TNF-, FasLigand- und TRAIL-induzierte Spaltung von HSP90 sollte neben den hämatopoetischen Zelllinien U-937, Jurkat, Raji und HDLM2 auch in den vier Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, Colo-357, Panc-TU-I und Panc-89 untersucht werden. Dazu wurden diese Zelllinien ebenfalls für vier und sechs Stunden mit den drei Todesliganden und mit Etoposid behandelt und dann ein Western Blot für HSP90 angefertigt.

In Panc-1-Zellen wurden die Spaltfragmente nach Behandlung mit TRAIL beobachtet; TNF, FasLigand oder Etoposid löste in diesen Zellen keine Spaltung von HSP90 aus. In den drei anderen Zelllinien, Colo-357, Panc-TU-I und Panc-89, wird HSP90 nach FasLigand-, TRAIL- und Etoposid-Stimulation gespalten. TNF hat in keiner der PDAC-Zelllinien HSP90-Spaltfragmente induziert.

In den PDAC-Zelllinien tritt ebenfalls die Spaltung von HSP90 nach der Stimulation mit Todesliganden auf, aber im Gegensatz zu den hämatopoetischen Zellen U-937, Jurkat, Raji und HDLM2 sind diese Zellen resistent gegenüber TNF-induzierter HSP90-Spaltung.

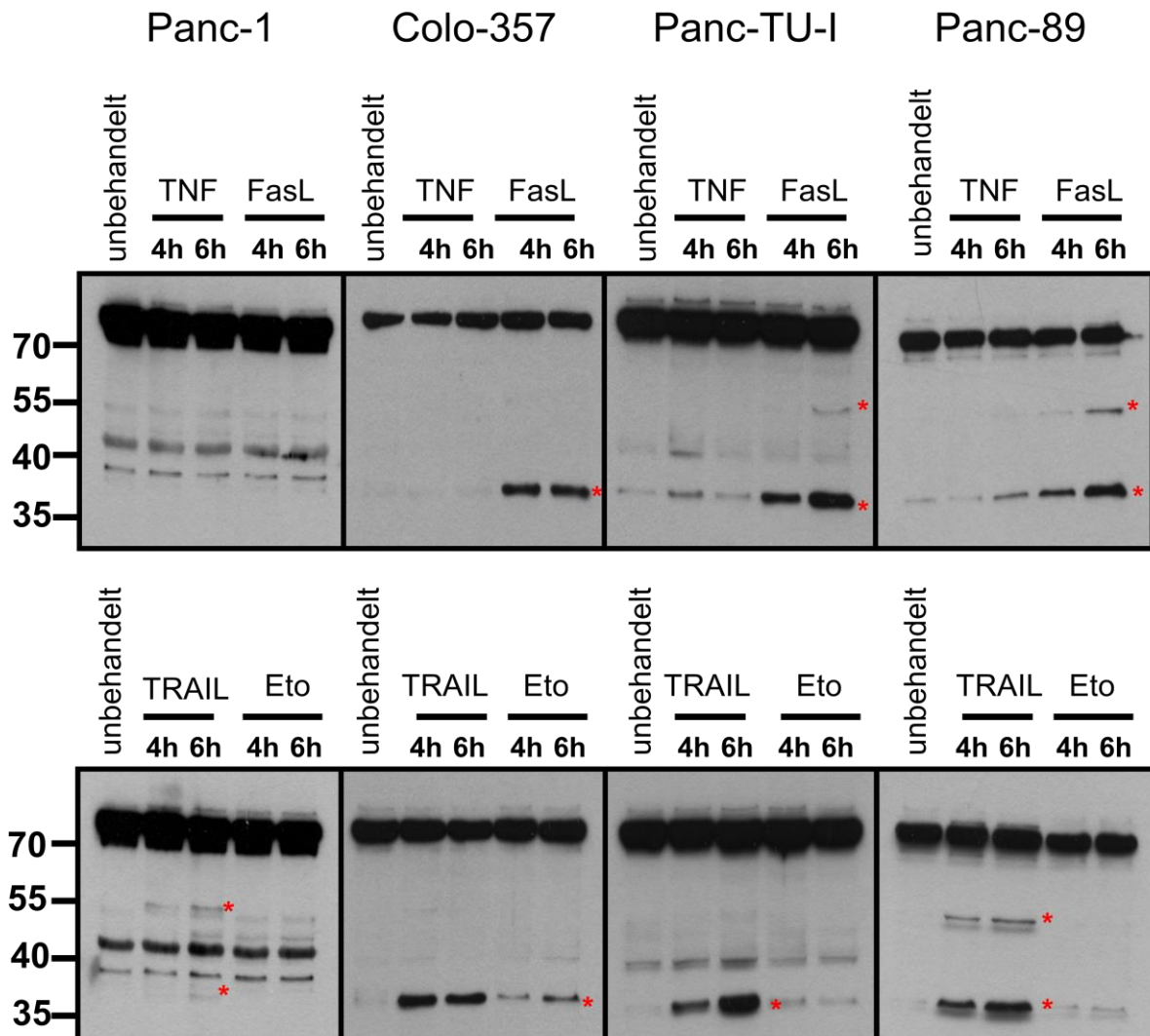


Abb. 6: HSP90-Spaltung durch TNF, FasLigand, TRAIL und Etoposid in den Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Colo-357, Panc-TU-I und Panc-89. Auch in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien lässt sich nach Stimulation mit Todesliganden ein Auftreten von HSP90-Spaltfragmenten beobachten (rote Markierungen). In Panc-1-Zellen wird HSP90 nach TRAIL-Behandlung gespalten, in Colo-357-, Panc-TU-I- und Panc-89-Zellen durch FasL, TRAIL und Etoposid. TNF löst in keiner dieser Zelllinien eine HSP90-Spaltung aus.

4.7 TRAIL-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 7

Alle vier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zeigen eine Spaltung von HSP90 nach TRAIL-Stimulation. Um herauszufinden, ob in diesen Zellen ebenfalls die Spaltung des Chaperons im Zusammenhang mit der Auslösung von Apoptose auftritt, sollte nun die Sensitivität der PDAC-Zellen gegenüber TNF- und TRAIL-induzierter Apoptose untersucht werden. Da diese adhärennten Zelllinien schlecht für

die Analyse im ImageStream geeignet sind, wurde hier die Apoptoseinduktion mittels enzymatischer Messung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 ermittelt. Dafür wurde der Enzymaktivitätsassay Caspase-Glo in Panc-89 und Colo-357-Zellen verwendet, die je mit TNF, TRAIL und TNF/TRAIL plus 17-AAG stimuliert wurden.

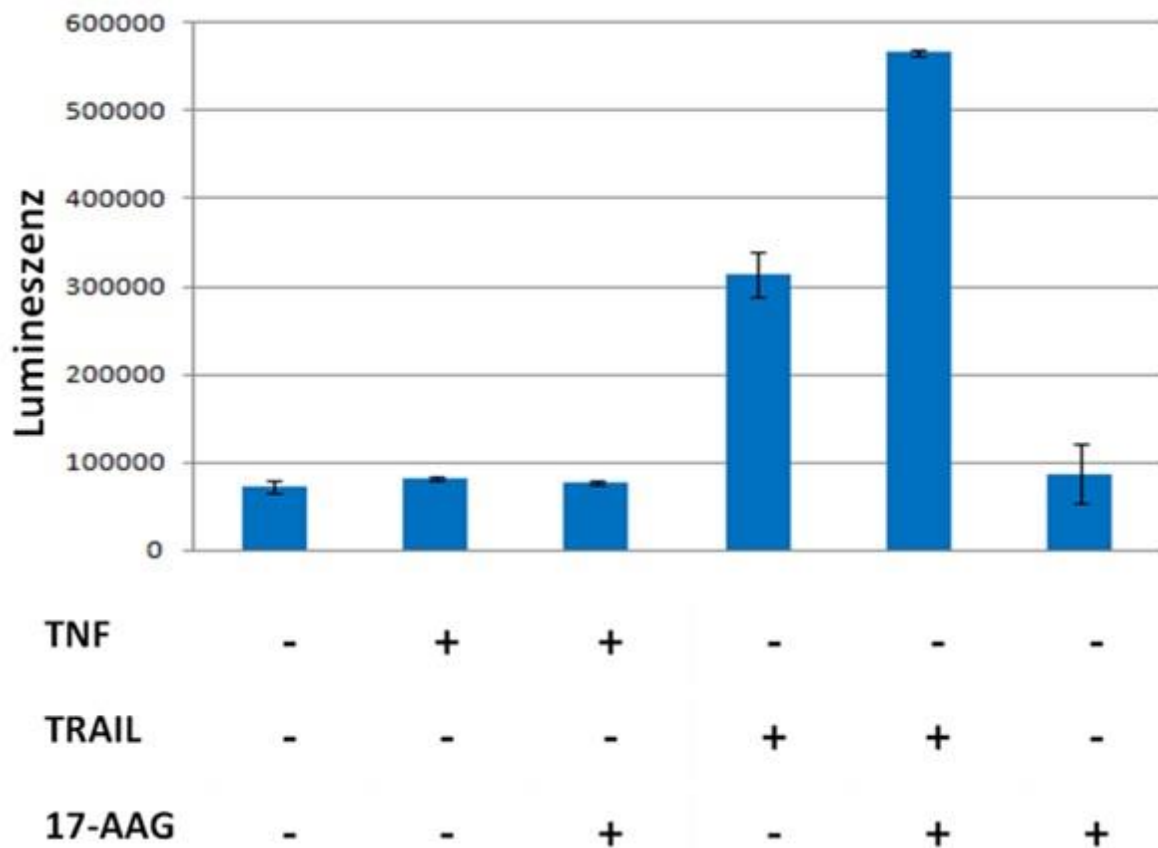


Abb. 7: TRAIL-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3/7 in Colo-357-Zellen. In Colo-357-Zellen wird weder nach alleiniger TNF-Stimulation noch in Kombination mit 17-AAG eine Aktivierung der Caspasen 3/7 festgestellt. Mittels TRAIL allerdings lässt sich eine Steigerung der Caspasen-Aktivität induzieren, die durch zusätzliche 17-AAG-Behandlung noch erhöht werden kann.

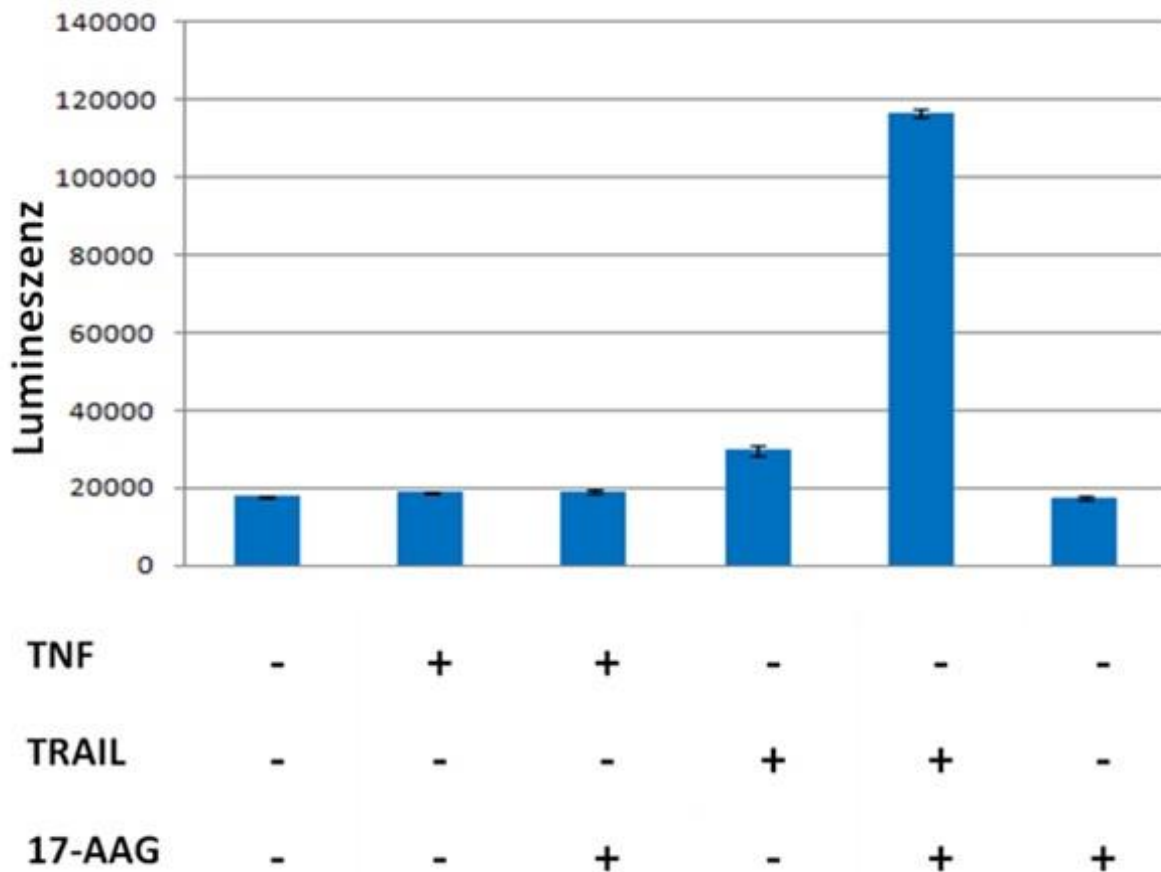


Abb. 8: TRAIL-induzierte enzymatische Aktivierung von Caspase 3/7 in Panc-89-Zellen. TNF mit oder ohne HSP90-Inhibition hat in Panc-89-Zellen keinen Effekt auf die Caspase3/7-Aktivität, während TRAIL eine Steigerung der Enzymaktivität erzielt. Nach Vorstimulation mit 17-AAG wird eine deutlich höhere Caspase 3/7-Aktivität beobachtet.

In beiden Zelllinien hat weder TNF alleine noch TNF in Kombination mit 17-AAG zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und somit zur Induktion von Apoptose geführt. TRAIL-Stimulation hingegen führt in Panc-89-Zellen zu einer geringen und in Colo-357-Zellen zu einer größeren Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität. Durch Vorbehandlung mit dem HSP90-Inhibitor lässt sich die TRAIL-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nochmals deutlich steigern. Diese Zelllinien werden also durch die Hemmung der HSP90-Funktion gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensitiviert.

In Colo-357- und Panc-89-Zellen korreliert also - wie in U937-, Jurkat-, Raji und HDLM2-Zellen - die Sensitivität für TNF-induzierte Apoptose mit der Spaltung von HSP90. Überdies wird in diesen Zelllinien, die gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensibel sind, auch die HSP90-Spaltung durch TRAIL ausgelöst.

4.8 TRAIL-induzierte Aktivierung von Caspase 3 und 9

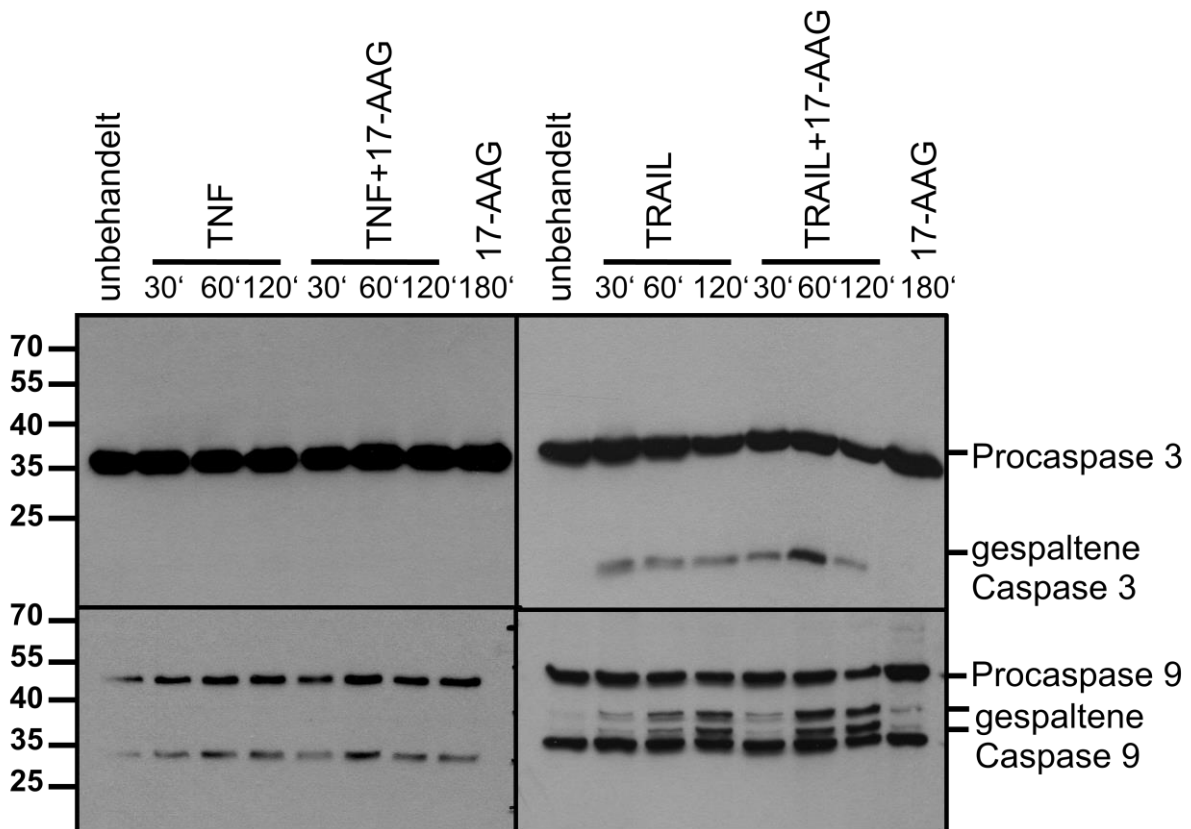


Abb. 9: TRAIL-induzierte Aktivierung der Caspasen 3 und 9. Im Western Blot zeigt sich eine vermehrte Aktivierung der Caspase 3 in Colo-357-Zellen nach TRAIL- und 17-AAG-Stimulation im Vergleich zur alleinigen TRAIL-Stimulation. Caspase 9 wird in Colo-357-Zellen ebenfalls durch TRAIL-, Behandlung aktiviert. Durch zusätzliche Inkubation mit 17-AAG scheint mehr Procaspase 9 gespalten zu werden. TNF hingegen erzeugt weder alleine noch in Kombination mit 17-AAG eine Aktivierung der Caspasen 3 oder 9 in Colo-357-Zellen.

In Colo-357-Zellen wurde zusätzlich zum Enzymaktivitätsassay die Aktivierung der Caspase 3 als Nachweis der TNF-/TRAIL-induzierten Apoptose unter HSP90-Hemmung mittels Western Blot untersucht. Analog zum Nachweis der durch HSP90-Inhibition verstärkten TNF-induzierten Aktivierung der Caspase 9 wurde in den Colo-357-Zellen außerdem untersucht, ob sich die Hemmung der HSP90-Funktion auf die Aktivierung der Caspase 9 durch TNF oder TRAIL auswirkt. Für beide Experimente wurden die Zellen für je 30, 60 und 120 Minuten mit TNF, TRAIL und TNF/TRAIL in Kombination mit 17-AAG behandelt, und für 180 Minuten nur mit 17-AAG als Kontrolle.

TNF löst in Colo-357-Zellen keine Aktivierung der Caspasen 3 oder 9 aus, auch durch die zusätzliche Hemmung von HSP90 mittels 17-AAG zeigt sich keine Aktivierung der Caspasen. Nach TRAIL-Stimulation hingegen wird vermehrt aktivierte Caspase 3 und 9 im Western Blot sichtbar. Durch Vorstimulation mit 17-AAG kann die TRAIL-induzierte Aktivierung von Caspase 3 und 9 noch weiter verstärkt werden.

5 Diskussion

Proteolyse ist ein wesentlicher Bestandteil des programmierten Zelltods durch Apoptose. Neben Caspasen sind auch lysosomale Aspartat-Proteasen wie Cathepsin D an der Vermittlung des Apoptose-Signals beteiligt. Diese Protease ist entscheidend für die Permeabilisierung der Lysosomen-Membran (lysosomal membrane permeabilization, LMP) zur Amplifizierung des Apoptose-Signals; sie kann aber auch der initiale Auslöser des Apoptose-Signals sein (Aits & Jäätelä 2013; Repnik et al. 2014).

Cathepsin D ist ebenfalls Teil des Signalwegs der TNF-induzierten Apoptose. Nach der Internalisierung des TNF-R1 wird Cathepsin D im endolysosomalen Kompartiment über die konsekutive Aktivierung von Caspase 8, Caspase 7, saurer Sphingomyelinase (A-SMase) und darauf folgender Ceramid-Produktion aktiviert. Ceramid löst die autoproteolytische Aktivierung des Cathepsin-D-Vorläufers und die Verlagerung des Enzyms vom Endolysosom ins Zytosol aus. Im Zytosol spaltet Cathepsin D Bid zu tBid, welches den Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien vermittelt (Schneider-Brachert et al. 2004; Fritsch et al. 2014; Heinrich et al. 1999; Edelmann et al. 2011; Heinrich et al. 2004). Die Cathepsin D-katalysierte Aktivierung von Bid und dessen Spaltstelle wurde später von Appelqvist et al. bestätigt (Appelqvist et al. 2012). Auf Ebene der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) konvergieren der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg. Cystein-Cathepsine spalten neben Bid auch weitere antiapoptotische Proteine wie Bcl-2-Proteine und XIAP (Repnik et al. 2014).

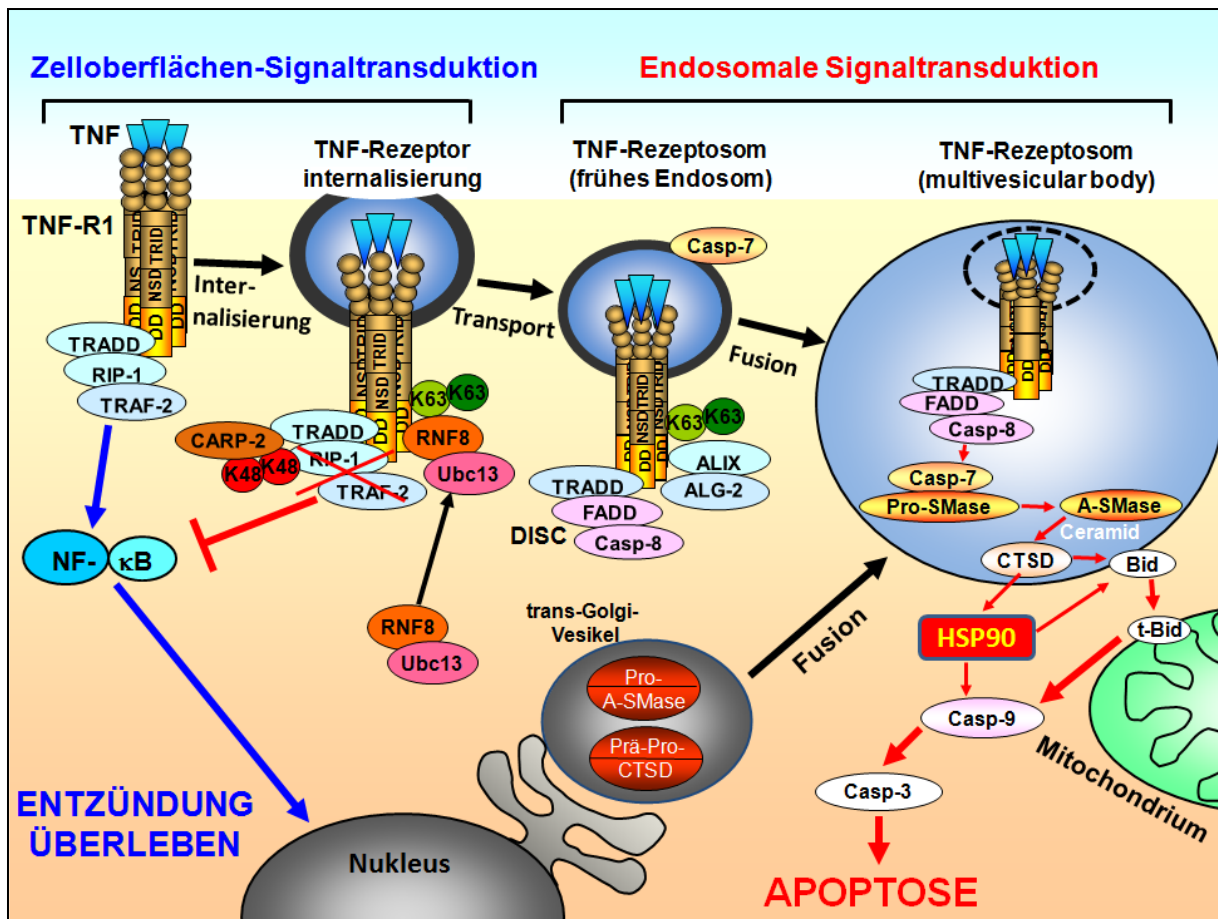


Abb. 10: Schema der TNF-R1-Signalwege. Bindet TNF an den TNF-R1, wird zuerst ein Überlebenssignal über TRADD/RIP1/TRAF2 und die Aktivierung von NF-κB vermittelt. Die K63-Ubiquitinierung des TNF-R1 bewirkt die Internalisierung des Rezeptors und die Bildung von TNF-Rezeptosomen. Das NF-κB-Signal wird beendet und die DISC-Proteine FADD und Caspase 8 zum Rezeptosom rekrutiert, welches sich darauf mit Trans-Golgi-Vesikeln zu einem multivesikulären Körper verbindet. Darin wird Cathepsin D aktiviert und in das Zytosol entlassen, wo es Bid und HSP90 spaltet. Die Spaltung von HSP90 durch Cathepsin D oder seine Inhibition durch 17-AAG wiederum führt zu einer verstärkten Bid-Spaltung, Caspase-9-Aktivierung und Apoptose-Induktion.

Neben Bid ist auch HSP90 ein Substrat von Cathepsin D. Die Spaltung von HSP90 in zwei stabile Fragmente von ungefähr 53 und 37 kDa³ kann in U397-Zellen durch TNF ausgelöst werden; durch Vorbehandlung mit dem Cathepsin-D-Inhibitor Pepstatin A kann diese TNF-induzierte HSP90-Spaltung verhindert werden. Werden die HSP90-Spaltfragmente überexprimiert, zeigen sie für sich keine proapoptotische Aktivität. Punktmutationen der zwei möglichen Spaltstellen von HSP90 und Überexpression dieser HSP90-Konstrukte schützt U937-Zellen teilweise vor TNF-induzierter Apoptose (Fritsch et al. 2016).

Die Spaltung von HSP90 tritt in U937-Zellen nicht nur nach TNF-Stimulation, sondern auch nach FasLigand- und TRAIL-Behandlung auf, zu einem geringeren Ausmaß wird sie auch nach Etoposid-Stimulation beobachtet. Neben U937-Zellen zeigt sich die HSP90-Spaltung durch TNF-Stimulation auch in den Zelllinien Jurkat und Raji, aber nicht in HDLM2-Zellen. Die HSP90-Spaltung nach Todesligandenstimulation ist somit ein Zelltyp- und Todesliganden-übergreifendes Phänomen. U937-, Jurkat-, Raji- und HDLM2-Zellen zeigen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den verschiedenen Apoptose-induzierenden Todesliganden, wobei interessanterweise die Spaltung von HSP90 nach TNF-, FasL oder TRAIL-Stimulation in diesen Zellen mit ihrer Sensitivität für TNF-, FasL- und TRAIL-induzierter Apoptose korreliert. Das deutet darauf hin, dass HSP90 Teil der proapoptischen Signalwege dieser Todesrezeptoren sein könnte.

Die Hemmung der HSP90-Funktion mittels des Geldanamycin-Analogons 17-AAG führt in U937- und Jurkat-Zellen zu einer Verdopplung der Apoptoseantwort auf TNF. Während diese TNF-sensitiven Zelllinien durch HSP90-Inhibition weiter gegenüber TNF-induzierter Apoptose sensitiviert werden, kann die TNF-Resistenz in Raji- und HDLM2-Zellen damit allerdings nicht durchbrochen werden. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine schützende Funktion von HSP90 vor der extrinsischen TNF-vermittelten Apoptose in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien.

Auch in den PDAC-Zelllinien Panc-1, Colo-357, Panc-TU-I und Panc-89 kann man eine Spaltung von HSP90 nach Stimulation mit Todesliganden beobachten. Dabei löst TNF allerdings in keiner der getesteten Zelllinien die Spaltung von HSP90 aus, TRAIL hingegen in allen vier. FasLigand induziert eine Spaltung in Colo-357, Panc-TU-I und Panc-89, aber nicht in Panc-1. In den Zelllinien Colo-357 und Panc-89 wurde exemplarisch die enzymatische Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nach TNF- und TRAIL-Stimulation getestet, da die Messung der Apoptose mittels ImageStream an den adhären Zellen nicht möglich war. Beide Zelllinien sind resistent gegenüber TNF-, aber empfindlich für TRAIL-induzierte Apoptose. Das geht einher mit der Beobachtung, dass TRAIL, aber nicht TNF in diesen Zelllinien die Spaltung von HSP90 auslöst. Diese Korrelation von TRAIL-vermittelter HSP90-Spaltung und Apoptose in den TRAIL-sensitiven PDAC-Zellen könnte auf eine mögliche kausale Funktion von HSP90 im Signalweg der TRAIL-induzierten Apoptose in diesen Tumorzelllinien hindeuten.

Mittels Vorbehandlung mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG kann in den TRAIL-sensitiven PDAC-Zellen die TRAIL-induzierte Apoptose gesteigert werden, was für eine protektive Rolle von HSP90 innerhalb des Apoptose-Signalwegs von TRAIL wie in der TNF-induzierten Apoptose spricht. In der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 wurde bereits die Spaltung von Bid durch Cathepsin D innerhalb der TRAIL-vermittelten Apoptose beobachtet (Jancekova et al. 2016). Möglicherweise wird, analog zur TNF-induzierten Apoptose, durch Stimulation von TRAIL-Todesrezeptoren die Spaltung von HSP90 durch Cathepsin D als Teil des Signalwegs der TRAIL-vermittelten Apoptose induziert.

Auf der anderen Seite ist die Zelllinie Panc-1 resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, trotzdem zeigt sie HSP90-Spaltung nach TRAIL-Stimulation. Als Resistenzmechanismus wurde in Panc-1-Zellen beobachtet, dass nach TRAIL-Stimulation weniger TRAIL-R1 und -R2 exprimiert und vermehrt Osteoprotegerin ausgeschüttet wird (Beyer et al. 2017). Denkbar ist, dass die HSP90-Spaltung in TRAIL-resistenten Zellen unabhängig von Todesrezeptoren ausgelöst wird. Als Resistenzmechanismus von PDAC-Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose ist auch die Überexpression von Bcl-X_L, einem antiapoptotischen Protein der Bcl-2-Familie, beschrieben. Da Bcl-X_L nachgeschaltet von Cathepsin D auf Ebene der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran agiert, ist auch eine Suszeptibilität der PDAC-Zellen für TRAIL-induzierte HSP90-Spaltung bei gleichzeitiger Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose möglich (Hinz et al. 2000).

Die Stimulation mit FasLigand löst in U937-Zellen ebenfalls HSP90-Spaltung aus, die Vorbehandlung mit 17-AAG resultiert allerdings nicht in gesteigerter Apoptose. Chen et al. haben gezeigt, dass Caspase 10 HSP90 als Reaktion auf UVB-induzierte FasLigand-Sekretion und Apoptose spalten kann (Chen et al. 2009). Interessanterweise hatte in diesem Bericht ein resultierendes Fragment eine Größe von ungefähr 50 kDa, ähnlich der Größe der oberen Bande des gespaltenen HSP90, die in den vorliegenden Experimenten beobachtet wurde. Für die FasLigand-vermittelte Apoptose ist die Internalisierung des Fas-Rezeptors nur für Typ-I- und nicht Typ-II-Zellen beschrieben. Desweiteren ist die apoptotische Antwort auf FasLigand viel stärker als auf TNF, weshalb die Inhibition von HSP90 möglicherweise nicht zu einer weiteren Steigerung der Apoptose-Induktion beitragen kann. Dasselbe könnte auch für TRAIL gelten. Die Internalisierung der Fas- und

TRAIL-Rezeptoren als Zelltodsignal scheint zelllinienabhängig zu sein und wird immer noch kontrovers diskutiert (Lee et al. 2006; Schütze et al. 2008; Zhang et al. 2009; Akazawa et al. 2009; Mazurek et al. 2012; Austin et al. 2006; Kohlhaas et al. 2007).

Zwei Studien konnten zeigen, dass die Inhibition von HSP90 mittels Radicicol oder NVP-AUY922 in Kombination mit TRAIL in Zellen des kolorektalen Karzinoms und Ovarialkarzinoms zu verstärkter Apoptose führt (Lee et al. 2015; Kim et al. 2012). Zhang et al. berichteten, dass Celastrol im Gegensatz zu 17-AAG Panc-1-Zellen für Apoptoseinduktion sensitivieren kann (Zhang et al. 2008). Daher könnte es interessant sein, weitere HSP90-Inhibitoren mit anderen Wirkweisen zu untersuchen. Eine weitere Herausforderung ist die Analyse der HSP90-Spaltung durch FasLigand und rezeptorspezifische TRAIL-Varianten mit und ohne Pepstatin A, um herauszufinden, ob in diesen Signalwegen andere Proteasen als Cathepsin D an der HSP90-Spaltung beteiligt sind. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Rezeptoren CD95, TRAIL-R1 und -R2 für die Vermittlung der HSP90-Spaltung internalisiert werden müssen.

Beck et al. berichteten von HSP90-Spaltung, die abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stattfindet und zu einem Spaltfragment von ungefähr 70 kDa führt (Beck et al. 2012). Redlak und Miller zeigten, dass HSP90 nach Desoxycholsäure-Behandlung gespalten wird (Redlak & Miller 2011). Zudem könnte auch die Exposition von Zellen gegenüber H₂O₂ oder anderen ROS die Spaltung von HSP90 induzieren (Pantano et al. 2003; Panopoulos et al. 2005). Mittels des Proteasom-Inhibitors MG132 konnte in der CML-Zelllinie K562 ebenfalls über die Induktion von ROS HSP90-Spaltung ausgelöst werden (Park et al. 2017). Rodina et al. konnten zeigen, dass HSP90 den intrinsischen Apoptose-Signalweg in Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms hemmt (Rodina et al. 2007). Somit scheint der Abbau von HSP90 mit dem Ziel, dessen zytoprotektive Funktion aufzuheben, eine Gemeinsamkeit zwischen verschiedenen Zelltodsignalwegen zu sein.

Neben der Spaltung von HSP90, die relativ spät innerhalb der TNF-vermittelten Apoptose-Induktion stattzufinden scheint, haben Vanden Berghe et al. gezeigt, dass die Hemmung von HSP90 Apoptose anstatt Nekrose in L929sA-Zellen induziert (Vanden Berghe et al. 2003). Dies stimmt überein mit mehreren kürzlich veröffentlichten Studien, in denen zum Beispiel Zhao et al. gezeigt haben, dass

funktionierendes HSP90 für die TNF-induzierte Nekroptose notwendig ist, da es den proteosomalen Abbau von MLKL und RIP3 verhindert (Zhao et al. 2016). Li et al. zeigten, dass die Inhibition von HSP90 mittels Kongensin A Todesrezeptor-unabhängig verschiedene Zelllinien für Apoptose anstelle von Nekroptose sensitiviert (Li et al. 2015; Li et al. 2016).

Als ein Teil der mitochondrialen Verstärker-Signalkaskade der Apoptoseinduktion durch Todesrezeptoren wird Bid zu tBid gespalten und vermittelt mit anderen Proteinen der Bcl2-Familie die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Diese Aktivierung kann durch TNF in U-937-Zellen induziert werden. Da nach Inhibition von HSP90 die TNF-induzierte Spaltung von Bid stärker ausfällt als durch TNF alleine, scheint HSP90 Bid vor der Spaltung zu schützen und somit das apoptotische Signal abzuschwächen. Auch in Mausfibroblasten konnte gezeigt werden, dass Überexpression von HSP90 die Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützt und Inhibition über Geldanamycin die Zellen für Apoptose sensitiviert (Zhao & Wang 2004). Caspase 9 wird ebenfalls nach TNF-Stimulation stärker aktiviert, wenn gleichzeitig HSP90 gehemmt wird, was eine direkte Folge der vermehrten Bid-Aktivierung ist.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass HSP90 RIP1 binden und damit stabilisieren kann. Daher könnte die Spaltung von HSP90 auch ein Weg sein, das TNF-induzierte proapoptotische Signal zu verstärken, indem RIP1 degradiert wird, und damit der über RIP1 vermittelte antiapoptotische NF- κ B-Signalweg blockiert wird. (Lewis et al. 2000).

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass HSP90 eine Zelltyp- und Todesrezeptor-spezifische regulatorische Rolle in der Cathepsin-D-vermittelten Apoptose spielt. Die Verstärkung der TNF-induzierten Apoptose durch HSP90-Inhibition zeichnet das Chaperon als mögliches Ziel einer Kombinationstherapie von HSP90-Inhibitor und Todesligand aus, was bereits in zahlreichen Studien getestet wurde (Pedersen et al. 2015; Schenk et al. 2013; Saif et al. 2013; Wagner et al. 2013; Hendrickson et al. 2012; Gartner et al. 2012; Iyer et al. 2012; Modi et al. 2013). Für die Zukunft wird es interessant sein, ob die Hemmung von HSP90 in Kombination mit Todesliganden in weiteren, vor allem in per se resistenten Tumorarten Apoptose auslösen kann.

6 Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppe Schütze im Institut für Immunologie konnte in ersten Versuchen zeigen, dass in U937-Zellen HSP90 TNF-induziert durch CTSD gespalten wird, und der HSP90-Inhibitor 17-AAG wiederum Zellen für die TNF-vermittelte Apoptose sensitivieren kann.

Diese Arbeit sollte nun darauf aufbauend untersuchen, ob die HSP90-Spaltung durch CTSD ebenfalls Teil anderer Todesrezeptorsignalwege ist und auch in anderen Zelllinien, sowohl lymphozytäre als auch PDAC-Zellen, stattfinden kann. Weiterhin sollte die Funktion von HSP90 innerhalb der TNF-vermittelten Apoptose beleuchtet werden.

Die Apoptose-Assays wurden am ImageStream-Durchflusszytometer mittels Kernfärbung und Auszählung der apoptotischen Nuklei durchgeführt. Caspasen- und Bid-Aktivierung wurde durch Westernblotanalyse bestimmt und die Caspasenaktivität zusätzlich durch den CaspaseGlo-Enzymaktivitätsassay gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von HSP90 sowohl durch die Todesliganden TRAIL und FasL als auch durch das Zytostatikum Etoposid ausgelöst werden kann und außerdem neben U937 in den Zelllinien Jurkat, Raji und HDLM2 auftreten kann. Die Sensitivität dieser Zelllinien für TNF-, TRAIL- oder FasL-induzierte Apoptose korreliert dabei mit der Sensitivität der Zellen für HSP90-Spaltung induziert durch den entsprechenden Liganden.

Die Inhibition von HSP90 verstärkt in U937-Zellen die TNF-induzierte Aktivierung der Caspasen 9 und 3 und von Bid. Daraus kann man schließen, dass intaktes HSP90 innerhalb der TNF-vermittelten Apoptose eine Bid-inhibierende Rolle spielt, da das Protein den Caspasen vorgeschaltet agiert.

In den PDAC-Zellen, die gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sensibel sind, lässt sich ebenfalls eine TRAIL-induzierte Spaltung von HSP90 beobachten, und der HSP90-Inhibitor 17-AAG sensitiviert diese Zellen für die TRAIL-vermittelte Apoptose.

Die Ergebnisse weisen auf eine zellprotektive Rolle von HSP90 innerhalb der Signalwege von TNF- und TRAIL-vermittelten Apoptose hin, die mittels des HSP90-Inhibitors 17-AAG durchbrochen werden kann.

7 Literaturverzeichnis

- Aits, S., Jäättelä, M. (2013): Lysosomal cell death at a glance. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 9), 1905–1912.
- Akazawa, Y., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Kahraman, A., Guicciardi, M.E., Meng, X.W., Kohno, S., Shah, V.H., Kaufmann, S.H., McNiven, M.A., Gores, G.J. (2009): Death receptor 5 internalization is required for lysosomal permeabilization by TRAIL in malignant liver cell lines. In: *Gastroenterology* 136 (7), 2365-2376.e1-7.
- Andera, L. (2009): Signaling activated by the death receptors of the tnfr family. In: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 153 (3), 173–180.
- Appelqvist, H., Johansson, A.-C., Linderöth, E., Johansson, U., Antonsson, B., Steinfeld, R., Kagedal, K., Ollinger, K. (2012): Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. In: *Annals of clinical and laboratory science* 42 (3), 231–242.
- Audo, R., Calmon-Hamaty, F., Papon, L., Combe, B., Morel, J., Hahne, M. (2014): Distinct effects of soluble and membrane-bound fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66 (12), 3289–3299.
- Austin, C.D., Lawrence, D.A., Peden, A.A., Varfolomeev, E.E., Totpal, K., Maziere, A.M. de, Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R.H., Ashkenazi, A. (2006): Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27), 10283–10288.
- Barnhart, B.C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G., Peter, M.E. (2004): CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. In: *The EMBO journal* 23 (15), 3175–3185.
- Beck, R., Dejeans, N., Glorieux, C., Creton, M., Delaive, E., Dieu, M., Raes, M., Levêque, P., Gallez, B., Depuydt, M., Collet, J.-F., Calderon, P.B., Verrax, J. (2012): Hsp90 is cleaved by reactive oxygen species at a highly conserved N-terminal amino acid motif. In: *PloS one* 7 (7), e40795.
- Beck, R., Dejeans, N., Glorieux, C., Pedrosa, R.C., Vasquez, D., Valderrama, J.A., Calderon, P.B., Verrax, J. (2011): Molecular chaperone Hsp90 as a target for oxidant-based anticancer therapies. In: *Current medicinal chemistry* 18 (18), 2816–2825.

- Beyer, K., Partecke, L.I., Roetz, F., Fluhr, H., Weiss, F.U., Heidecke, C.-D., Bernstorff, W. von (2017): LPS promotes resistance to TRAIL-induced apoptosis in pancreatic cancer. In: *Infectious agents and cancer* 12, 30.
- Bhardwaj, A., Aggarwal, B.B. (2003): Receptor-mediated choreography of life and death. In: *Journal of clinical immunology* 23 (5), 317–332.
- Bratton, S.B., Salvesen, G.S. (2010): Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. In: *Journal of cell science* 123 (Pt 19), 3209–3214.
- Brenner, D., Blaser, H., Mak, T.W. (2015): Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. In: *Nature reviews. Immunology* 15 (6), 362–374.
- Bugli, F., Cacaci, M., Martini, C., Torelli, R., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Paroni, S.F. (2013): Human monoclonal antibody-based therapy in the treatment of invasive candidiasis. In: *Clinical & developmental immunology* 2013, 403121.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9), 3666–3670.
- Chen, H., Xia, Y., Fang, D., Hawke, D., Lu, Z. (2009): Caspase-10-mediated heat shock protein 90 beta cleavage promotes UVB irradiation-induced cell apoptosis. In: *Molecular and cellular biology* 29 (13), 3657–3664.
- Chiosis, G. (2006): Targeting chaperones in transformed systems--a focus on Hsp90 and cancer. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 10 (1), 37–50.
- Drexler, H.G., Gignac, S.M., Hoffbrand, A.V., Leber, B.F., Norton, J., Lok, M.S., Minowada, J. (1989): Characterization of Hodgkin's disease derived cell line HDLM-2. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 117, 75–82.
- Edelmann, B., Bertsch, U., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Perrotta, C., Jakob, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Schütze, S. (2011): Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. In: *The EMBO journal* 30 (2), 379–394.
- Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C., Young, P.R. (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (23), 14363–14367.

- Engelmann, H., Novick, D., Wallach, D. (1990): Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (3), 1531–1536.
- Falschlehner, C., Schaefer, U., Walczak, H. (2009): Following TRAIL's path in the immune system. In: *Immunology* 127 (2), 145–154.
- Faustman, D., Davis, M. (2010): TNF receptor 2 pathway. Drug target for autoimmune diseases. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (6), 482–493.
- Forero-Torres, A., Infante, JR, Waterhouse, D., Wong, L., Vickers, S., Arrowsmith, E., He, A.R., Hart, L., Trent, D., Wade, J., Jin, X., Wang, Q., Austin, T., Rosen, M., Beckman, R., Roemeling, R. von, Greenberg, J., Saleh, M. (2013): Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naive patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. In: *Cancer medicine* 2 (6), 925–932.
- Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Särchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., Schütze, S. (2016): TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death. In: *Oncotarget* 7 (46), 75774–75789.
- Fritsch, J., Stephan, M., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Gubkina, S., Kabelitz, D., Schütze, S. (2014): Cell fate decisions regulated by K63 ubiquitination of tumor necrosis factor receptor 1. In: *Molecular and cellular biology* 34 (17), 3214–3228.
- Gartner, E.M., Silverman, P., Simon, M., Flaherty, L., Abrams, J., Ivy, P., Lorusso, P.M. (2012): A phase II study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in metastatic or locally advanced, unresectable breast cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 131 (3), 933–937.
- Goldman, A., Ursitti, J.A., Mozdzanowski, J., Speicher, D.W. (2001): Electroblothing from Polyacrylamide Gels. In: Coligan (Hg.): *Current Protocols in Protein Science Online*, 10.7.1-10.7.16. Hoboken, Mississauga: Current Protocols [Imprint]; John Wiley & Sons, Incorporated; John Wiley & Sons Canada, Limited [distributor].
- Guicciardi, M.E., Gores, G.J. (2009): Life and death by death receptors. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (6), 1625–1637.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. In: *Cell* 144 (5), 646–674.

- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In: *Nature* 475 (7356), 324–332.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., Schütze, S. (2004): Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. In: *Cell death and differentiation* 11 (5), 550–563.
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Krönke, M., Schütze, S. (1999): Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. In: *The EMBO journal* 18 (19), 5252–5263.
- Hendrickson, A.E.W., Oberg, A.L., Glaser, G., Camoriano, J.K., Peethambaram, P.P., Colon-Otero, G., Erlichman, C., Ivy, S.P., Kaufmann, S.H., Karnitz, L.M., Haluska, P. (2012): A phase II study of gemcitabine in combination with tanespimycin in advanced epithelial ovarian and primary peritoneal carcinoma. In: *Gynecologic oncology* 124 (2), 210–215.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., Ungefroren, H. (2000): Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. In: *Oncogene* 19 (48), 5477–5486.
- Horova, V., Hradilova, N., Jelinkova, I., Koc, M., Svadlenka, J., Brazina, J., Klima, M., Slavik, J., Hyrslova Vaculova, A., Andera, L. (2013): Inhibition of vacuolar ATPase attenuates the TRAIL-induced activation of caspase-8 and modulates the trafficking of TRAIL receptosomes. In: *The FEBS journal* 280 (14), 3436–3450.
- Iyer, G., Morris, M.J., Rathkopf, D., Slovin, S.F., Steers, M., Larson, S.M., Schwartz, L.H., Curley, T., DeLaCruz, A., Ye, Q., Heller, G., Egorin, M.J., Ivy, S.P., Rosen, N., Scher, H.I., Solit, D.B. (2012): A phase I trial of docetaxel and pulse-dose 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 69 (4), 1089–1097.
- Jancekova, B., Ondrouskova, E., Knopfova, L., Smarda, J., Benes, P. (2016): Enzymatically active cathepsin D sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (8), 10685–10696.

- Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M.F., Fritz, L.C., Burrows, F.J. (2003): A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. In: *Nature* 425 (6956), 407–410.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *British journal of cancer* 26 (4), 239–257.
- Kim, Y.J., Lee, S.A., Myung, S.C., Kim, W., Lee, C.S. (2012): Radicol, an inhibitor of Hsp90, enhances TRAIL-induced apoptosis in human epithelial ovarian carcinoma cells by promoting activation of apoptosis-related proteins. In: *Molecular and cellular biochemistry* 359 (1-2), 33–43.
- Kohlhaas, S.L., Craxton, A., Sun, X.M., Pinkoski, M.J., Cohen, G.M. (2007): Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (17), 12831–12841.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007): Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. In: *Physiological reviews* 87 (1), 99–163.
- Kurokawa, M., Kornbluth, S. (2009): Caspases and Kinases in a Death Grip. In: *Cell* 138 (5), 838–854.
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C. (2008): Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 12 (3), 743–761.
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H. (2005): Death receptor signaling. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 2), 265–267.
- Lavrik, I.N., Krammer, P.H. (2012): Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. In: *Cell death and differentiation* 19 (1), 36–41.
- Lazenby, M., Hills, R., Burnett, A.K., Zabkiewicz, J. (2015): The HSP90 inhibitor ganetespib: A potential effective agent for Acute Myeloid Leukemia in combination with cytarabine. In: *Leukemia research* 39 (6), 617–624.
- Lee, D.-H., Sung, K.S., Bartlett, D.L., Kwon, Y.T., Lee, Y.J. (2015): HSP90 inhibitor NVP-AUY922 enhances TRAIL-induced apoptosis by suppressing the JAK2-STAT3-Mcl-1 signal transduction pathway in colorectal cancer cells. In: *Cellular signalling* 27 (2), 293–305.

- Lee, K.H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schütze, S., Peter, M.E., Chan, A.C. (2006): The role of receptor internalization in CD95 signaling. In: *The EMBO journal* 25 (5), 1009–1023.
- Leng, Y., Qiu, L., Hou, J., Zhao, Y., Zhang, X., Yang, S., Xi, H., Huang, Z., Pan, L., Chen, W. (2016): Phase II open-label study of recombinant circularly permuted TRAIL as a single-agent treatment for relapsed or refractory multiple myeloma. In: *Chinese journal of cancer* 35 (1), 86.
- Lewis, J., Devin, A., Miller, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Neckers, L., Liu, Z.G. (2000): Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (14), 10519–10526.
- Li, D., Li, C., Li, L., Chen, S., Wang, L., Li, Q., Wang, X., Lei, X., Shen, Z. (2016): Natural Product Kongensin A is a Non-Canonical HSP90 Inhibitor that Blocks RIP3-dependent Necroptosis. In: *Cell chemical biology* 23 (2), 257–266.
- Li, D., Xu, T., Cao, Y., Wang, H., Li, L., Chen, S., Wang, X., Shen, Z. (2015): A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (16), 5017–5022.
- Liao, W., Xiao, Q., Tchikov, V., Fujita, K., Yang, W., Wincovitch, S., Garfield, S., Conze, D., El-Deiry, W.S., Schütze, S., Srinivasula, S.M. (2008): CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin ligase for RIP and regulates TNF-induced NF-kappaB activation. In: *Current biology : CB* 18 (9), 641–649.
- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., Todaro, G. (1975): Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 15 (5), 741–747.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., Andrews, D.W. (2008): Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. In: *Cell* 135 (6), 1074–1084.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A. (1997): A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. In: *Current biology : CB* 7 (12), 1003–1006.

- Mazurek, N., Byrd, J.C., Sun, Y., Hafley, M., Ramirez, K., Burks, J., Bresalier, R.S. (2012): Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. In: *Cell death and differentiation* 19 (3), 523–533.
- Miller, P., DiOrio, C., Moyer, M., Schnur, R.C., Bruskin, A., Cullen, W., Moyer, J.D. (1994): Depletion of the erbB-2 gene product p185 by benzoquinoid ansamycins. In: *Cancer research* 54 (10), 2724–2730.
- Modi, S., Saura, C., Henderson, C., Lin, N.U., Mahtani, R., Goddard, J., Rodenas, E., Hudis, C., O'Shaughnessy, J., Baselga, J. (2013): A multicenter trial evaluating retaspimycin HCL (IPI-504) plus trastuzumab in patients with advanced or metastatic HER2-positive breast cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 139 (1), 107–113.
- Modi, S., Stopeck, A., Linden, H., Solit, D., Chandarlapaty, S., Rosen, N., D'Andrea, G., Dickler, M., Moynahan, M.E., Sugarman, S., Ma, W., Patil, S., Norton, L., Hannah, A.L., Hudis, C. (2011): HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (15), 5132–5139.
- Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., Yang, H., Samadi, A.K., Russo, G.L., Spagnuolo, C., Ray, S.K., Chakrabarti, M., Morre, J.D., Coley, H.M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Helferich, W.G., Yang, X., Boosani, C.S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Keith, W.N., Bilsland, A., Halicka, D., Nowsheen, S., Azmi, A.S. (2015): Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. In: *Seminars in cancer biology* 35 Suppl, S78-S103.
- Moore, P.S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F.X., Lemoine, N.R., Gress, T., Bassi, C., Klöppel, G., Kalthoff, H., Ungefroren, H., Löhr, M., Scarpa, A. (2001): Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 439 (6), 798–802.

- Morgan, R.T., Woods, L.K., Moore, G.E., Quinn, L.A., McGavran, L., Gordon, S.G. (1980): Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 25 (5), 591–598.
- Nagaraju, G.P., Long, T.E., Park, W., Landry, J.C., Taliaferro-Smith, L., Farris, A.B., Diaz, R., El-Rayes, B.F. (2015): Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal transition, invasion, and migration in colorectal cancer. In: *Molecular carcinogenesis* 54 (10), 1147–1158.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2013): Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (12), 3448–3459.
- Ohba, S., Hirose, Y., Yoshida, K., Yazaki, T., Kawase, T. (2010): Inhibition of 90-kD heat shock protein potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in human glioma cells. In: *Journal of neurosurgery* 112 (1), 33–42.
- Okabe, T., Yamaguchi, N., Ohsawa, N. (1983): Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. In: *Cancer* 51 (4), 662–668.
- Pan, G., O'Rourke, K., Am Chinnaiyan, Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M. (1997): The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. In: *Science (New York, N.Y.)* 276 (5309), 111–113.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S. (2000): Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. In: *The EMBO journal* 19 (16), 4310–4322.
- Panner, A., Murray, J.C., Berger, M.S., Pieper, R.O. (2007): Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. In: *Cancer research* 67 (19), 9482–9489.
- Panopoulos, A., Harraz, M., Engelhardt, J.F., Zandi, E. (2005): Iron-mediated H₂O₂ production as a mechanism for cell type-specific inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced but not interleukin-1beta-induced I κ B kinase complex/nuclear factor-kappaB activation. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (4), 2912–2923.
- Pantano, C., Shrivastava, P., McElhinney, B., Janssen-Heininger, Y. (2003): Hydrogen peroxide signaling through tumor necrosis factor receptor 1 leads to

- selective activation of c-Jun N-terminal kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (45), 44091–44096.
- Parimi, S., Tsang, R.Y. (2014): Hsp90 inhibitors in oncology: ready for prime time? In: *Current oncology (Toronto, Ont.)* 21 (5), e663-7.
- Park, S., Park, J.-A., Yoo, H., Park, H.-B., Lee, Y. (2017): Proteasome inhibitor-induced cleavage of HSP90 is mediated by ROS generation and caspase 10-activation in human leukemic cells. In: *Redox biology* 13, 470–476.
- Pedersen, K.S., Kim, G.P., Foster, N.R., Wang-Gillam, A., Erlichman, C., McWilliams, R.R. (2015): Phase II trial of gemcitabine and tanespimycin (17AAG) in metastatic pancreatic cancer: a Mayo Clinic Phase II Consortium study. In: *Investigational new drugs* 33 (4), 963–968.
- Plescia, J., Salz, W., Xia, F., Pennati, M., Zaffaroni, N., Daidone, M.G., Meli, M., Dohi, T., Fortugno, P., Nefedova, Y., Di Gabrilovich, Colombo, G., Altieri, D.C. (2005): Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. In: *Cancer cell* 7 (5), 457–468.
- Pulvertaft, J.V. (1964): Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). In: *Lancet (London, England)* 1 (7327), 238–240.
- Reck, M., Krzakowski, M., Chmielowska, E., Sebastian, M., Hadler, D., Fox, T., Wang, Q., Greenberg, J., Beckman, R.A., Pawel, J. von (2013): A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with chemotherapy-naive metastatic/unresectable non-small cell lung cancer. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 82 (3), 441–448.
- Redlak, M.J., Miller, T.A. (2011): Targeting PI3K/Akt/HSP90 signaling sensitizes gastric cancer cells to deoxycholate-induced apoptosis. In: *Digestive diseases and sciences* 56 (2), 323–329.
- Reed, J.C. (2002): Apoptosis-based therapies. In: *Nature reviews. Drug discovery* 1 (2), 111–121.
- Repnik, U., Hafner Cesen, M., Turk, B. (2014): Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Concepts and challenges. In: *Mitochondrion* 19 Pt A, 49–57.
- Rodina, A., Vilenchik, M., Moulick, K., Aguirre, J., Kim, J., Chiang, A., Litz, J., Clement, C.C., Kang, Y., She, Y., Wu, N., Felts, S., Wipf, P., Massague, J., Jiang, X., Brodsky, J.L., Krystal, G.W., Chiosis, G. (2007): Selective compounds define

- Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. In: *Nature chemical biology* 3 (8), 498–507.
- Saif, M.W., Erlichman, C., Dragovich, T., Mendelson, D., Toft, D., Burrows, F., Storgard, C., Hoff, D. von (2013): Open-label, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered CNF1010 (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin 17-AAG) in patients with solid tumors. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 71 (5), 1345–1355.
- Schenk, E., Hendrickson, A.E.W., Northfelt, D., Toft, D.O., Ames, M.M., Menefee, M., Satele, D., Qin, R., Erlichman, C. (2013): Phase I study of tanespimycin in combination with bortezomib in patients with advanced solid malignancies. In: *Investigational new drugs* 31 (5), 1251–1256.
- Schneider, P., Bodmer, J.L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., Tschopp, J. (1997): Characterization of two receptors for TRAIL. In: *FEBS Letters* 416 (3), 329–334.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., Bornkamm, G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 19 (5), 621–626.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., Schütze, S. (2004): Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. In: *Immunity* 21 (3), 415–428.
- Schütze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W. (2008): Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (8), 655–662.
- Sundström, C., Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 17 (5), 565–577.
- Taipale, M., Jarosz, D.F., Lindquist, S. (2010): HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (7), 515–528.
- Takakuwa, T., Dong, Z., Nakatsuka, S., Kojya, S., Harabuchi, Y., Yang, W.I., Nagata, S., Aozasa, K. (2002): Frequent mutations of Fas gene in nasal NK/T cell lymphoma. In: *Oncogene* 21 (30), 4702–4705.

- Takayama, H., Takakuwa, T., Tsujimoto, Y., Nonomura, N., Okuyama, A., Aozasa, K. (2002a): Analysis of Fas gene mutations on laser capture microdissected specimens from renal cell carcinoma. In: *Japanese journal of cancer research : Gann* 93 (11), 1201–1206.
- Takayama, H., Takakuwa, T., Tsujimoto, Y., Tani, Y., Nonomura, N., Okuyama, A., Nagata, S., Aozasa, K. (2002b): Frequent Fas gene mutations in testicular germ cell tumors. In: *The American journal of pathology* 161 (2), 635–641.
- Tchikov, V., Bertsch, U., Fritsch, J., Edelmann, B., Schütze, S. (2011): Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. In: *European journal of cell biology* 90 (6-7), 467–475.
- van Herreweghe, F., Festjens, N., Declercq, W., Vandenabeele, P. (2010): Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (10), 1567–1579.
- Vanden Berghe, T., Kalai, M., van Loo, G., Declercq, W., Vandenabeele, P. (2003): Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (8), 5622–5629.
- Vogt, C. (1842): Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*): Solothurn, Jent und Gassman.
- Wagner, A.J., Chugh, R., Rosen, L.S., Morgan, J.A., George, S., Gordon, M., Dunbar, J., Normant, E., Grayzel, D., Demetri, G.D. (2013): A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (21), 6020–6029.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T. (1997): TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. In: *The EMBO journal* 16 (17), 5386–5397.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le T, Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H. (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. In: *Nature medicine* 5 (2), 157–163.

- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., et al. (1995): Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. In: *Immunity* 3 (6), 673–682.
- Zhang, H., Burrows, F. (2004): Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 82 (8), 488–499.
- Zhang, M.H., Lee, J.S., Kim, H.J., Di Jin, Kim, J.I., Lee, K.J., Seo, J.S. (2006): HSP90 protects apoptotic cleavage of vimentin in geldanamycin-induced apoptosis. In: *Molecular and cellular biochemistry* 281 (1-2), 111–121.
- Zhang, T., Hamza, A., Cao, X., Wang, B., Yu, S., Zhan, C.-G., Sun, D. (2008): A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. In: *Molecular cancer therapeutics* 7 (1), 162–170.
- Zhang, Y., Yoshida, T., Zhang, B. (2009): TRAIL induces endocytosis of its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. In: *Cancer biology & therapy* 8 (10), 917–922.
- Zhao, C., Wang, E. (2004): Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. In: *Cellular signalling* 16 (3), 313–321.
- Zhao, X.M., Chen, Z., Zhao, J.B., Zhang, P.P., Pu, Y.F., Jiang, S.H., Hou, J.J., Cui, Y.M., Jia, X.L., Zhang, S.Q. (2016): Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis. In: *Cell death & disease* 7, e2089.
- Zong, H., Gozman, A., Caldas-Lopes, E., Taldone, T., Sturgill, E., Brennan, S., Ochiana, S.O., Gomes-DaGama, E.M., Sen, S., Rodina, A., Koren, J.3., Becker, M.W., Rudin, C.M., Melnick, A., Levine, R.L., Roboz, G.J., Nimer, S.D., Chiosis, G., Guzman, M.L. (2015): A Hyperactive Signalosome in Acute Myeloid Leukemia Drives Addiction to a Tumor-Specific Hsp90 Species. In: *Cell reports* 13 (10), 2159–2173.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt habe. Fremde Gedanken sind als solche direkt bei Übernahme kenntlich gemacht worden. Die Arbeit habe ich in gleicher oder vergleichbarer Form noch keinem Prüfungsamt vorgelegt. Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden in:

Fritsch J., Fickers R., Koudelka T., Klawitter, J., Adam, D., Krause E., Tholey A., Schütze S. (2016, Mai): Identification of Heat Shock Protein 90 (HSP90) as a novel substrate for Cathepsin D in TNF Receptor-1 signaling. Poster präsentiert bei Cell Death, Inflammation and Immunity International Meeting, Kreta.

Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Särchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., Schütze, S. (2016): TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death. In: *Oncotarget* 7 (46), 75774–75789.

Danksagung

An erster Stelle danke ich dem Institut für Immunologie am UKSH Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. D. Kabelitz und der gesamten Arbeitsgruppe Schütze für die Möglichkeit, diese Dissertation anzufertigen, für die freundliche Aufnahme und für eine durchweg angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinem Doktorvater Herr Prof. rer. nat. S. Schütze für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die großartige wissenschaftliche und methodische Unterstützung während meiner gesamten Dissertation.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. J. Fritsch für die hervorragende Betreuung und Begleitung und seine zuverlässige Hilfe.

Zuletzt möchte ich meinem Vater für die Hilfe beim Korrektur lesen danken; sowie meiner gesamten Familie, meinen Freunden und Tarek für stete Ermutigung, Motivation und Rückhalt.

Lebenslauf

	Ricarda Fickers
Geburtsdaten:	06.06.1992 in Osnabrück
09/1998 – 07/2010	Erreichen des Abiturs am Gymnasium Marianum Meppen
10/2010	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel voraussichtlicher Abschluss 06/2018
02/2014 – 06/2014	Auslandsstudium der Humanmedizin an der Warszawski Uniwersytet Medyczny in Warschau/Polen über das Erasmus-Programm
04/2015	Doktorandin des Instituts für Immunologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
05/2016	Fritsch J., Fickers R., Koudelka T., Klawitter, J., Adam, D., Krause E., Tholey A., Schütze S. (2016, Mai): Identification of Heat Shock Protein 90 (HSP90) as a novel substrate for Cathepsin D in TNF Receptor-1 signaling. Poster präsentiert bei Cell Death, Inflammation and Immunity International Meeting, Kreta.
10/2017	Fritsch, J., Fickers, R., Klawitter, J., Särchen, V., Zingler, P., Adam, D., Janssen, O., Krause, E., Schütze, S. (2016): TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death. In: <i>Oncotarget</i> 7 (46), 75774–75789.