

Name:

Dipl.-Biol. Bajbouj, Khuloud

Das Thema der Dissertation ist:

Function and regulation of Death-associated protein kinase1 (DAPK) in  
colon cancer cells and macrophage-like cell line

Identification of p38 as a novel DAPK interacting partner during TNF $\alpha$ -mediated apoptosis in  
colon cancer

## Abstract

Death-associated protein kinase (DAPK) is a serine/threonine kinase that contributes to pro-apoptotic signalling upon cytokine exposure. Recently, it has been found that a high DAPK expression in colorectal tumor cells and tumor-associated macrophages (TAMs) was correlated with a high apoptotic rate in tumor cells but not in TAMs suggesting a new function of DAPK in apoptosis induction during the interaction between colorectal tumor cells and TAMs. However, the role of DAPK regulation in macrophage-associated tumor cell death is still elusive. We used a cell-culture model with conditioned supernatants of differentiated/activated macrophages (U937) and HCT116 colorectal tumor cells to recapitulate DAPK-associated tumor cell death that might reflect the *in vivo* tumor setting. We measured Cytokines in differentiated/activated macrophage supernatants ELISA. DAPK expression and DAPK activity were determined by *real-time* RT-PCR, Western Blotting, and DAPK *in vitro* kinase assay. Co-immunoprecipitation and triple immunofluorescence labelling were used to show protein interactions. For detection of protein-dependent apoptosis induction, we used the Annexin V-binding assay, caspase 3/7 activity ELISA, Western Blotting and siRNA-transfection. Here, we show that *in vitro* DAPK induction and apoptosis in tumor cells was due to TNF- $\alpha$  release from the activated macrophages. p53 was found to act down-stream of DAPK in this scenario. Simultaneously, an early phosphorylation of p38 MAPK was observed. We identified for the first time that p-p38 MAPK co-localizes and interacts with DAPK and triggers DAPK-mediated apoptosis in the HCT116 cells. We addressed the physiological relevance of our findings and showed that supernatants of freshly isolated human macrophages were also able to induce DAPK, p-p38, and caspase 3 cleavage in HCT116 cells. We further verified the co-localization of DAPK and p-p38 proteins by immunohistochemistry analysis of human colon cancer slices. Moreover, the observed apoptosis resistance in the macrophages was mediated by DAPK. Finally, we suggest that, the cytoprotective effect of DAPK impacts the mitochondrial signalling pathway by inhibiting the caspase 3 cleavage.

Altogether, we are the first to show p-p38 triggering of DAPK-activation in TNF $\alpha$ -induced apoptosis. Our findings highlight the mechanisms underlying DAPK regulation in tumor cell death evoked by immune cells.

## Zusammenfassung

Die death-associated protein kinase (DAPK) ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin regulierte Serin-Threonin-Kinase, die nach Zytokinstimulation eine proapoptotische Funktion hat. Neuesten Berichten zufolge exprimieren nicht nur kolorektale Tumorzellen sondern auch die sie umgebenden tumor-assoziierten Makrophagen die DAPK. Dabei war eine erhöhte DAPK-Expression in den Tumorzellen mit einer verstärkten Apoptose assoziiert, während DAPK-positive Makrophagen keine TUNEL-Färbung zeigten. Über die Rolle der DAPK bei der immunzell-vermittelten Apoptose ist bisher jedoch nichts bekannt.

Um die *in vivo* Bedingungen zu simulieren und die DAPK-assoziierte Tumorzell-Apoptose näher zu untersuchen, wurde ein Zellkulturmodell mit konditionierten Überständen der ausdifferenzierten/aktivierten Makrophagen (U937) und der kolorektalen Tumor-Zelllinie HCT116 verwendet. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob die DAPK eine Rolle bei der Apoptoseresistenz der Makrophagen spielt.

Zunächst wurden die in den Überständen von ausdifferenzierten/aktivierten Makrophagen enthaltenen Zytokine mittels ELISAs gemessen. Die DAPK-Expression und die DAPK-Aktivität wurden über *real-time* RT-PCR, Western Blotting und DAPK in-vitro Kinase-Assay untersucht. Die Methoden der Co-Immunopräzipitation und der Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung wurden verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Der Annexin V-binding Assay, die Caspase 3 und 7 Aktivitäts-ELISAs, der Nachweis von aktiven Spaltprodukten im Western Blot sowie die siRNA-Transfektion wurden verwendet, um eine DAPK-abhängige Apoptoseinduktion zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass in-vitro die DAPK-Regulation und die Apoptoseinduktion in den Tumorzellen von der  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung der aktivierten Makrophagen abhängig sind. Weiterhin stellte sich heraus, dass p53 dabei downstream von DAPK agierte. Gleichzeitig wurde eine frühe Phosphorylierung von p38-MAPK beobachtet. Wir konnten erstmalig die Co-Lokalisation und Interaktion von p-p38-MAPK mit DAPK in den HCT116-Zellen nach  $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung beschreiben. Ferner induziert p-p38 die katalytische Aktivierung der DAPK und vermittelt somit die DAPK-abhängige Apoptose. Um die physiologische Relevanz unserer Daten zu zeigen, untersuchten wir das DAPK- und p-p38-Expressionsmuster in humanen Normal-Gewebe und Gewebe von Kolonkarzinomen. Die immunhistochemische Analyse zeigte nur in den Tumoren

eine DAPK-p-p38 Co-lokalisierung. Auch frisch isolierte humane Makrophagen vermögen nach Aktivierung den apoptotischen Zelltod in der HCT116 Zelllinie auszulösen. Ferner stellten wir fest, dass die beobachtete Apoptoseresistenz in den Makrophagen DAPK-abhängig war. Schließlich postulieren wir, dass die DAPK-vermittelten Resistenz in den Makrophagen über den Caspase 3 Weg realisiert ist. Zusammenfassend zeigte unsere Studie erstmalig, dass die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose über eine DAPK-Aktivierung durch p-p38 ausgelöst wird. Unsere Ergebnisse haben eine weitreichende Bedeutung für die Erklärung der durch Immunzellen ausgelösten Tumorzellapoptose sowie einer Termination der Makrophagenantwort.