

**Untersuchungen zur Signaltransduktion  
bei der durch Chemotherapeutika  
induzierten Apoptose**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

INGO ENGELS

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Juli 2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Bohley

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff

3. Berichterstatter:

PD Dr. M. Leist

## DANKSAGUNGEN

# Danksagungen

Danksagen möchte ich:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für mein Dissertationsthema und die ständige Unterstützung meiner Arbeit,

Prof. Dr. Peter Bohley für die Bereitschaft, die Arbeit vor der Fakultät zu vertreten,

PD Dr. Sebastian Wesselborg für die freundschaftliche und intensive Betreuung,

Dr. Heike Bantel für die Projektanregung, die Wirkung von Mistellektinen auf die Apoptose zu untersuchen, Dr. Christoph Berg für die intensive Zusammenarbeit am organellfreien Zellsystem der Erythrocyten, Kirsten Lauber und Dr. Andrea Renz für die Bereitstellung aktiver Caspase-3, Evi Rossmann für viele Titrations mit Chemotherapeutika, Ralph Schwenzer und PD Harald Wajant für die Sortierung und Anreicherung der eine Caspase-9-Mutante exprimierenden HeLa Zellen, Ania Stepczynska für die Experimente mit den Caspase-9 dominant-negativen Jurkat Zellen und die Westernblot-Analysen gegen Bid, Caspase-9 und -6 mit den Bcl-x<sub>L</sub> überexprimierenden Zellen,

und nicht zuletzt nochmal Sebastian, Christoph, Reiner, Kirsten, Marek, Dagmar, Andrea, Andreas, Stephan, Markus, Christopher und Andree, mit denen die Arbeit viel Spaß gemacht hat.

## Abkürzungsverzeichnis

AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
AMC	Aminomethylcumarin
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease-Activating Factor-1</i>
APO	<i>Apoptosis Antigen</i>
AU	<i>Arbitrary Unit</i>
Bad	<i>Bcl-2 Antagonist of Cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist / Killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B Cell Lymphoma/Leukemia- 2</i>
Bfl-1	<i>Bcl-2 Homologue Isolated from a Human Fetal Liver</i>
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 Interacting Killer</i>
Bim	<i>Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
BJAB-Zellen	humane B-Zelllinie aus einem Burkitt-Lymphom
Blk	<i>Bik-Like Killer Protein</i>
Bok	<i>Bcl-2-Related Ovarian Killer</i>
Boo	<i>Bcl-2 Homologue of Ovary</i>
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CASH	<i>Caspase Homologue (with Death Effector Domain)</i>
Casp	Caspase
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteinase
Casper	<i>Caspase-8-related Protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD95	APO-1, Fas
CD95L	CD95-Ligand
Ced	<i>Cell Death Protein</i>
CEM-Zellen	humane Zelllinie aus einer akuten lymphatischen Leukämie
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHX	Cycloheximid
CLARP	<i>Caspase-Like Apoptosis Regulatory Protein</i>
CMH1	<i>CPP32 MCH2 Homologue-1</i>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CPP32	<i>Cysteine Protease 32</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
Daxx	<i>Fas Death Domain-Associated Protein</i>
DcR	<i>Decoy Receptor</i>
DD	Todesdomäne ( <i>Death Domain</i> )
DED	Todeseffektordomäne ( <i>Death Effector Domain</i> )
DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcumarin
DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with Low pI</i>
DISC	Todessignal-Komplex ( <i>Death Inducing Signaling Complex</i> )
Diva	<i>Death Inducer Binding to vBcl-2 and Apaf-1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP5	<i>Neuronal Death Protein 5</i>
DR	Todesrezeptor ( <i>Death Receptor</i> )
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
ERICE	<i>Evolutionarily Related Interleukin-1<math>\beta</math> Converting Enzyme</i>
FADD	<i>Fas-Associating Protein with Death Domain (MORT1)</i>
Fas	<i>Fibroblast Associated Antigen</i>
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz-Kanal
FLAME-1	<i>FADD-Like Antiapoptotic Molecule 1</i>
FLICE	<i>FADD-like ICE</i>
FLIP	<i>FLICE Inhibitory Protein</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FU	<i>Fluorescence Unit</i>
G418	Gentamycin-verwandtes Aminoglykosid
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HeLa-Zellen	humane Zelllinie aus einem zervikalen Adenokarzinom

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-Ethansulfonsäure
Hrk	<i>Harakiri</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAD	<i>Inhibitor of CAD</i>
ICE	<i>Interleukin-1<math>\beta</math>-Converting Enzyme</i>
ICE-LAP	<i>ICE-Like Apoptotic Protease</i>
ICE <sub>rel</sub> -III	<i>IL1-<math>\beta</math> Convertase-Related-III</i>
ICH	<i>ICE and CED-3 Homologue</i>
I-FLICE	<i>Inhibitor of FLICE</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Jurkat T-Zellen	humane Zelllinie aus einem akuten T-Zell-Lymphom
Jurkat-R	CD95-resistente Jurkat T-Zellen
kD	Kilodalton
LARD	<i>Lymphocyte Associated Receptor of Death</i>
LIT	<i>Lymphocyte Inhibitor of TRAIL</i>
LT- $\alpha$	Lymphotoxin- $\alpha$
MACH	<i>MORT-Associated CED-3 Homologue</i>
MCF-7-Zellen	humane Zelllinie aus einem Mamma-Adenokarzinom
Mch	<i>Mammalian CED-3 Homologue</i>
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
ML	Mistellektin
MORT1	<i>Mediator of Receptor Induced Toxicity 1</i>
MRIT	<i>MACH-Related Inducer of Toxicity</i>
Mtd	<i>Matador</i>
Nbk	<i>Natural Born Killer</i>
NIAP	<i>Neuronal IAP</i>
NK-Zellen	<i>Natural Killer Cells</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
N-terminal	aminoterminal
OPG	Osteoprotegerin
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PMA	Phorbolmyristylacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAIDD	<i>RIP-Associated ICH-1/Ced-3 Homologous Death Domain Protein</i>
RICK	<i>RIP-like Interacting CLARP Kinase</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smac	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TNF	Tumornekrose-Faktor
TR6	<i>TNF Receptor-like Molecule 6</i>
TRADD	<i>TNF Receptor-Associated Death Domain Protein</i>
TRAF	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Factor</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TRAMP	<i>TNF Receptor-Related Apoptosis Mediating Protein</i>
TRID	<i>TRAIL Receptor without an Intracellular Domain</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol, Polyethylenglykol-p- isooctylphenoether
TWEAK	<i>Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family that Weakly Induces Apoptosis</i>
VEID-AMC	N-Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-Aminomethylcumarin
X-IAP	<i>X-linked IAP</i>
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

Für L-Aminosäuren wird der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet.

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Apoptose	1
1.2 Caspasen und ihre Substrate	2
1.3 Signaltransduktion über Todesrezeptoren	6
1.4 Der mitochondriale Signalweg	9
1.5 Regulationsmechanismen	10
1.6 Apoptose in Erkrankungen	14
1.7 Wirkmechanismen von Chemotherapeutika	15
1.8 Mistellektine in der Chemotherapie	16
1.9 Zielsetzung	17
<b>2. Material und Methoden</b>	18
2.1 Reagenzien	18
2.2 Zellen und Zellkultur	18
2.3 Cryokonservierung eukaryontischer Zellen	19
2.4 Expression rekombinanter Caspasen	20
2.5 Zelltransfektionen	20
2.6 Präparation von Mitochondrien und mitochondrienfreien Zellextrakten zur Bestimmung der Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol	21
2.7 Immunoblot-Analyse	21
2.8 Immunpräzipitation	22
2.9 Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität	22
2.10 <i>In vitro</i> -Prozessierung von Caspasen und Spectrin	23
2.11 Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials	23
2.12 Messung des Zelltodes	24
<b>3. Ergebnisse</b>	25
3.1 Chemotherapeutika induzieren Caspase-8-Aktivierung und Apoptose unabhängig von einer Signaltransduktion durch Todesrezeptoren	25
3.2 Caspase-8/FLICE dient als Effektorcaspase in Apoptose durch Chemotherapeutika	35

# INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Chemotherapeutika induzieren keine Apoptose im organellfreien Zellsystem der Erythrocyten	42
3.4	Mistellektin induziert Apoptose über den mitochondrialen Signalweg und verstärkt die Wirkung von Chemotherapeutika	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	Chemotherapeutika induzieren Caspase-8-Aktivierung und Apoptose unabhängig von einer Signaltransduktion durch Todesrezeptoren	58
4.2	Caspase-8/FLICE dient als Effektorcaspase in der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose	59
4.3	Chemotherapeutika induzieren keine Apoptose im organellfreien Zellsystem der Erythrocyten	63
4.4	Mistellektin induziert Apoptose über den mitochondrialen Signalweg und verstärkt die Wirkung von Chemotherapeutika	65
4.5	Mitochondrien dienen als intrazelluläre Sensoren für die Zellviabilität	67
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>73</b>

# 1. Einleitung

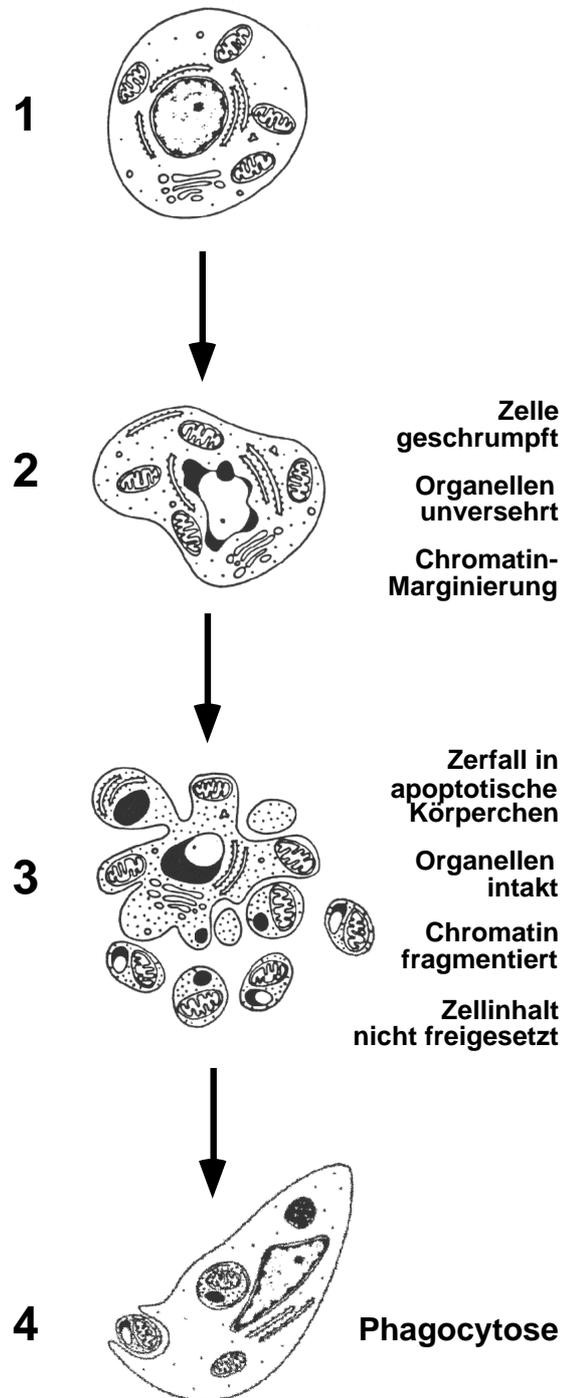
## 1.1 Apoptose

Apoptose (Kerr et al., 1972) beschreibt ein in eukaryontischen Zellen abgelegtes Selbstmordprogramm, durch das in Metazoen einzelne Zellen ohne Belastung des Gesamtorganismus eliminiert werden.

Die Apoptose spielt eine maßgebliche Rolle bei der embryonalen Morphogenese und während der Metamorphose von Amphibien bei der Rückbildung larvaler Organe. Als Gegenspieler der Proliferation ist die Apoptose auch bei Adulten an der Formgebung von Organen und Geweben durch die Aufrechterhaltung der Homöostase beim ständigen Zellumsatz beteiligt. Zum Erhalt des Gesamtorganismus trägt die Apoptose bei der klonalen Deletion autoreaktiver Thymocyten und beim Abbau von Tumorzellen bei (Duvall und Wyllie, 1986).

Apoptose ist durch stereotype morphologische und biochemische Kriterien

**Abb. 1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Prozessen.** Eine normale Zelle ist in (1) abgebildet. Bei der Apoptose erfolgt eine Kondensation von Cytoplasma und Zellkern (2) mit der anschließenden Fragmentation von Zellkern und Cytoplasma in apoptotische Körperchen (3), die von benachbarten Zellen oder Phagozyten internalisiert und abgebaut werden (4).

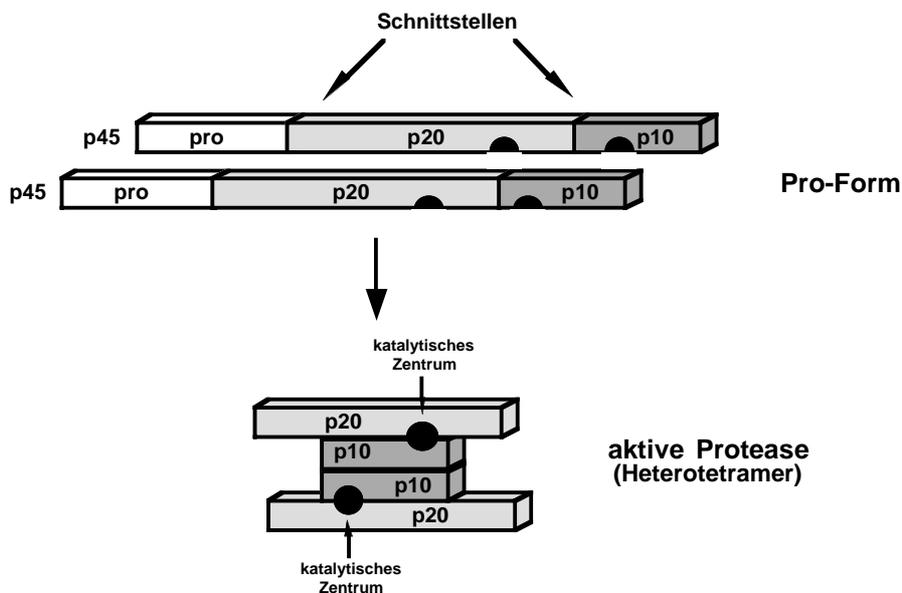


charakterisiert (Abb. 1) (Kerr et al., 1972; Arends und Wyllie, 1991). Die Zelle schrumpft und löst sich von benachbarten Zellen. An der Zellmembran finden sich Ausstülpungen (Zeiosis). Die Morphologie der Mitochondrien bleibt erhalten. Das Chromatin kondensiert und fragmentiert. Die genomische DNA wird zwischen den Nucleosomen geschnitten. Dadurch entstehen DNA-Bruchstücke mit Vielfachen von 185 Basenpaaren (Arends et al., 1990), die im Agarose-Gel als "DNA-Leiter" nachgewiesen werden können. Die Zelle zerfällt in kleine membranumschlossene Partikel, die die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten.

Diese sogenannten apoptotischen Körperchen werden von benachbarten Zellen oder Makrophagen mittels spezifischer Rezeptoren erkannt, phagozytiert und abgebaut (Duvall und Wyllie, 1986; Savill et al., 1990; Fadok et al., 1992). Da zelluläre Proteine bis zur Phagozytose membranumschlossen sind, bleibt eine entzündliche Reaktion aus.

### 1.2 Caspasen und ihre Substrate

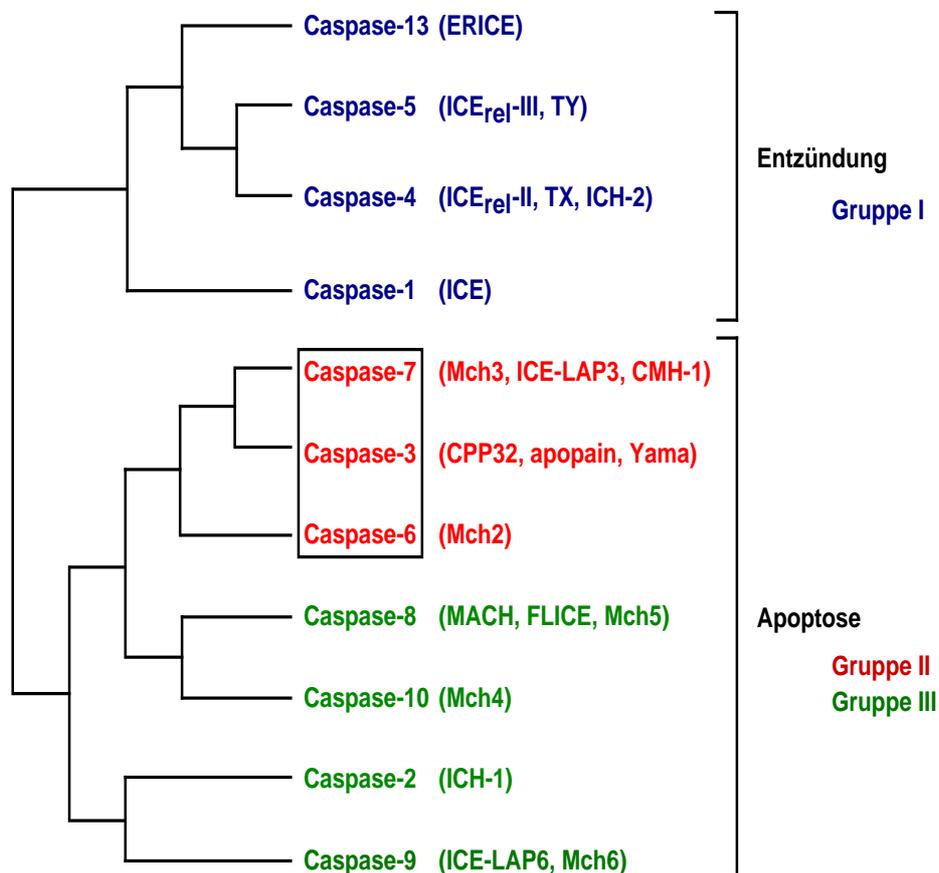
Die morphologischen Veränderungen der Zelle, die in ihrer Disintegration und Phagozytose münden, repräsentieren nur das finale Stadium des apoptotischen Zelltodes. Die Vollstreckung ist gekennzeichnet durch ein Szenarium aus irreversiblen post-translationalen Proteinmodifikationen. Die proteolytische Prozessierung und Aktivierung der Caspasen (Alnemri et al., 1996) sind ursächlich für die apoptotischen Veränderungen



**Abb. 2: Proteolytische Aktivierung der Caspasen am Beispiel der Caspase-1.** Die Spaltung der katalytisch inaktiven Procaspase-1 führt zum aktiven Heterotetramer der Caspase-1, das aus zwei p20- und zwei p10-Untereinheiten

einer Zelle. Caspasen sind eine hoch konservierte Familie aus Cystein-Proteasen mit einer Schnittspezifität auf der Carboxylseite von Aspartatresten. Aktive Caspasen bilden ein Heterotetramer aus zwei identischen großen Untereinheiten von etwa 20 kD und zwei identischen kleinen Untereinheiten von etwa 10 kD. Caspasen werden als Zymogene synthetisiert, die eine N-terminale Prodomäne, eine große und eine kleine Untereinheit enthalten. Die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen bedarf mindestens zwei aufeinanderfolgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander und von der Prodomäne zu trennen (Abb. 2).

Phylogenetisch lassen sich die bisher 11 Mitglieder der humanen Caspase-Familie (aus 14 bekannten Caspasen bei Säugern) in zwei Subfamilien einteilen (Abb. 3). Innerhalb dieser können Caspasen mit einer langen oder kurzen N-terminalen Prodomäne im



**Abb. 3: Die humane Caspase-Familie** (verändert nach Nicholson, 1999, und Strasser *et al.*, 2000). Caspasen werden in zwei große phylogenetische Subfamilien eingeteilt. Hinsichtlich ihrer Substratspezifität lassen sich Caspasen in drei weitere Gruppen einteilen: Caspasen der Gruppe I (*blau*) vermitteln die Prozessierung von Cytokinen, während die apoptotischen Caspasen entweder den Effektor- (Gruppe II, *rot*) oder den Initiatorcaspasen (Gruppe III, *grün*) zugeordnet werden. Die meisten Caspasen besitzen eine lange Prodomäne (>10 kD) außer den Caspasen-3, -6 und -7 (*rot*), die kurze peptidische Prodomänen (< 30 Aminosäuren) enthalten. Die humanen Homologen der murinen Caspasen-11, -12 und -14 sind noch nicht identifiziert worden.

Zymogen unterschieden werden. Alternativ können die Caspasen in drei Gruppen anhand ihrer Substratspezifität eingeordnet werden, die mittels kombinatorischer Substrat-Kollektionen im Positional Scan-Format bestimmt wurden (Thornberry et al., 1997; Rano et al., 1997). Neben der obligatorischen Spezifität für einen Aspartatrest in der P1-Position wird die Substratspezifität weiterhin vornehmlich durch den Aminosäurerest in der Position P4 bestimmt. Auffallend bei den für die Apoptose relevanten Caspasen (Gruppe II und III) ist, daß die Substratspezifität der Caspasen der Gruppe III mit den zur Aktivierung erforderlichen Schnittstellen in den Caspasen der Gruppen II und III übereinstimmt. Daraus läßt sich eine Reihenfolge in der Aktivierung von apikalen oder Initiatorcaspasen (Gruppe III) zu distalen Caspasen (Gruppe II) ableiten, die in Caspase-8- oder Caspase-9-knock out-Mäusen bestätigt wurde (Varfolomeev et al., 1998; Juo et al., 1998; Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998). Vergleichbar mit der Koagulation und dem Komplementsystem ist hier eine intrazelluläre Kaskade von proteolytischen Auto- und Transaktivierungen für die Schnelligkeit und Irreversibilität des apoptotischen Prozesses verantwortlich.

Die Mehrheit der während der Apoptose prozessierten Proteine stellen Substrate der Caspasen der Gruppe II dar. Die Caspasen der Gruppe II können daher auch als Effektorcaspasen klassifiziert werden. Durch die Vielzahl der Caspase-Substrate werden alle funktionellen Bereiche einer Zelle erfaßt (Tab. 1) (Stroh und Schulze-Osthoff, 1998). Die Spaltung von Strukturproteinen wie z. B. Fodrin ist möglicherweise für die Reorganisation der zellulären Morphologie während der Apoptose verantwortlich. Die typische internucleosomale DNA-Fragmentation ist eine Folge der Aktivierung der Endonuclease CAD (Caspase-activated DNase), die über die Degradation der inhibitorischen Untereinheit ICAD (Inhibitor of CAD) durch Caspase-3 eingeleitet wird (Enari et al., 1998). Während Nicht immer sind die funktionellen Effekte nach der Spaltung der Zielproteine durch Caspasen geklärt. In der Summe müssen sie aber (i) zum Arrest des Zellzyklus, (ii) zum Halt aller Reparaturmechanismen, (iii) zum Zusammenbruch aller molekularer Strukturen, (iv) zum Verlust der Zell/Zell-Kontakte und (v) zur Markierung der apoptotischen Zelle für die Phagozytose führen.

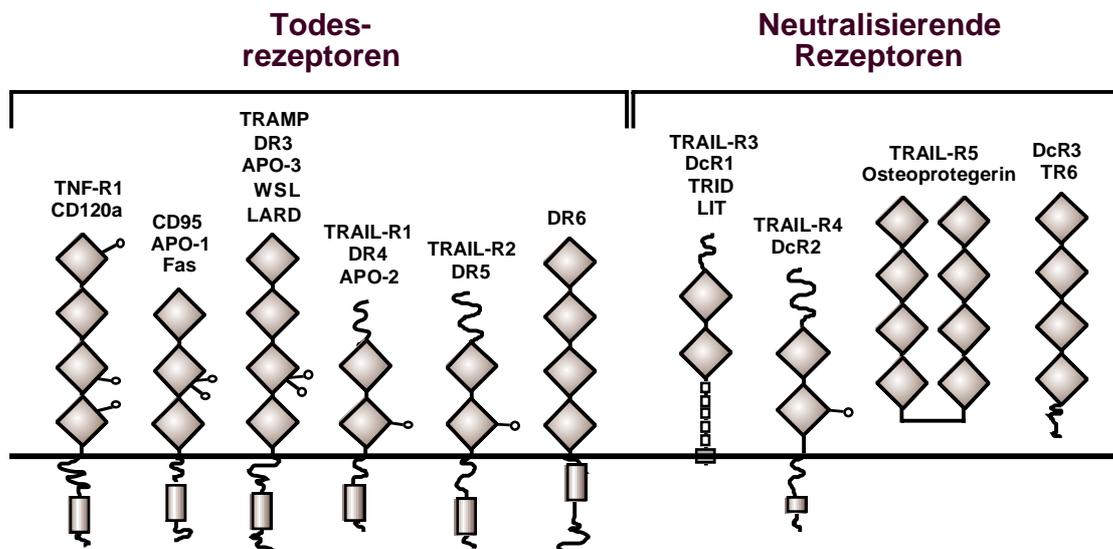
**Tab. 1: Bisher bekannte Caspase-Substrate.** (Verändert nach Stroh und Schulze-Osthoff, 1998)

<b>Zytoskelett- &amp; Strukturproteine</b>		<b>Proteinkinasen in der Signaltransduktion</b>	
Fodrin	Kortikales Zytoskelett	Proteinkinase C $\delta$	Signaltransduktion
$\beta$ -Catenin	Zelladhäsion	Proteinkinase C $\theta$	Signaltransduktion
Plakoglobin	Zelladhäsion	'PKC-related kinase-2' (PRK2)	Signaltransduktion
Aktin	Zytoskelett	MEKK1	MAP-Kinase-Weg
Gelsolin	Aktin-bindendes Protein	p21-aktivierte Kinase (PAK2, hPAK65)	MAP-Kinase-Weg
Keratin-18, -19	Intermediär-Filament	PITSLRE-Kinasen	Zellzyklus
Gas2	Organisation der Mikrofilamente	'Focal adhesion kinase'	Zelladhäsion
Lamine	Kernhülle	MST/Krs	STE20-verwandte Kinase
<b>Zellzyklus &amp; Replikation</b>		Calmodulin-Kinase IV	Signaltransduktion
Topoisomerase-I	DNA-Replikation	<b>Andere Signalvermittler</b>	
MCM3 nukleärer Replikationsfaktor	DNA-Replikation	Proteinphosphatase 2A (PP2A)	Signaltransduktion
DNA-Replikations-Komplex C (DSEB/RFC140)	DNA-Replikation	D4-GDP 'dissociation inhibitor' (D4-GDI)	Inhibitor von kleinen GTPasen, Rho-Weg
MDM2/ HDM2	p53-Inhibitor	Ras GAP	Ras-GTPase-aktivierendes Protein
NuMA	'Nuclear mitosis apparatus protein'	p28 Bap31	Bcl-2-Adaptor des endoplasmatischen Retikulums
Retinoblastoma-Protein (Rb)	Aufbau des Repressorkomplexes	zytosolische PLA2	Phospholipid-metabolismus
p21 (Cip1/Waf1)	Cdk2-Inhibitor	<b>Zytokinvorstufen</b>	
p27 (Kip1)	Cdk2-Inhibitor	Pro-Interleukin-1 $\beta$	Immunregulation
Wee1	Kinase, Cdc2-Inhibitor	Pro-Interleukin-16	Immunregulation
Cdc27	Zellzyklus	Pro-Interleukin-18	Immunregulation
Cyclin A	Mitose	<b>Weitere Substrate</b>	
<b>Transkription &amp; Translation</b>		Procaspasen	
'Sterol-regulatory element-binding proteins' (SREBPs)	Cholesterin-metabolismus	Rabaptin-5	Endosomenfusion
STAT1	Signaltransduktion von Zytokinen	Calpastatin	Calpaininhibitor
NF- $\kappa$ B (p50, p65)	Zytokine und anti-Apoptosegene	Nedd4	Ubiquitin-Proteinligase
I $\kappa$ B- $\alpha$	Inhibitor von NF- $\kappa$ B	Bcl-2	Apoptose-Inhibitor
Sp1	Transkriptionsfaktor	Bcl-xL	Apoptose-Inhibitor
U1-70 kD sRNP	Spleißen von prä-mRNA	Bid	Apoptose-Aktivator
'Heteronuclear, ribonuclear Proteins' (hnRNPs C1/2)	Spleißen von prä-mRNA	hsp90	Hitzeschockprotein
<b>Spaltung &amp; Reparatur von DNA</b>		APC-Protein	'adenomatous polyposis coli protein'
Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)	DNA-Reparatur	Huntingtin	beteiligt am Chorea Huntington
DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK)	DNA-Reparatur	Atrophia-1	beteiligt an der Neurodegeneration
'Inhibitor of caspase-activated' DNase (ICAD, DFF)	DNA-Spaltung	Ataxin-3	beteiligt an der Neurodegeneration
		DRPLA-Protein	beteiligt an der Neurodegeneration
		Preseniline	beteiligt am Morbus Alzheimer

### 1.3 Signaltransduktion über Todesrezeptoren

Zelltod durch Apoptose ist ebenso wie Zellproliferation, Differenzierung oder Kontrolle der Genexpression eine Konsequenz interzellulärer Kommunikation und wird durch Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen vermittelt. Die Induktion der Apoptose ist die Hauptaufgabe der sogenannten Todesrezeptoren, die eine Subfamilie der TNF-Rezeptor-Superfamilie darstellen (Abb. 4). Bislang sind sechs Mitglieder der Todesrezeptorfamilie identifiziert worden (Engels et al., 2001). Sie zeichnen sich durch eine intrazelluläre Domäne von 80 Aminosäuren aus, die als Todesdomäne bezeichnet wird, da sie für die Transduktion des cytotoxischen Signals benötigt wird.

Ähnlich wie ihre Rezeptoren besitzen die jeweiligen Liganden der Todesrezeptoren (CD95L, TNF, LT- $\alpha$ , TRAIL und TWEAK) untereinander eine strukturelle Homologie. Sie bestehen aus drei identischen Untereinheiten und aktivieren ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung (Beutler und van Huffel, 1994; Wiley et al., 1995; Eck et al., 1992; Jones et al., 1992; Banner et al., 1993; Dhein et al., 1992). Mit der Ausnahme von LT- $\alpha$

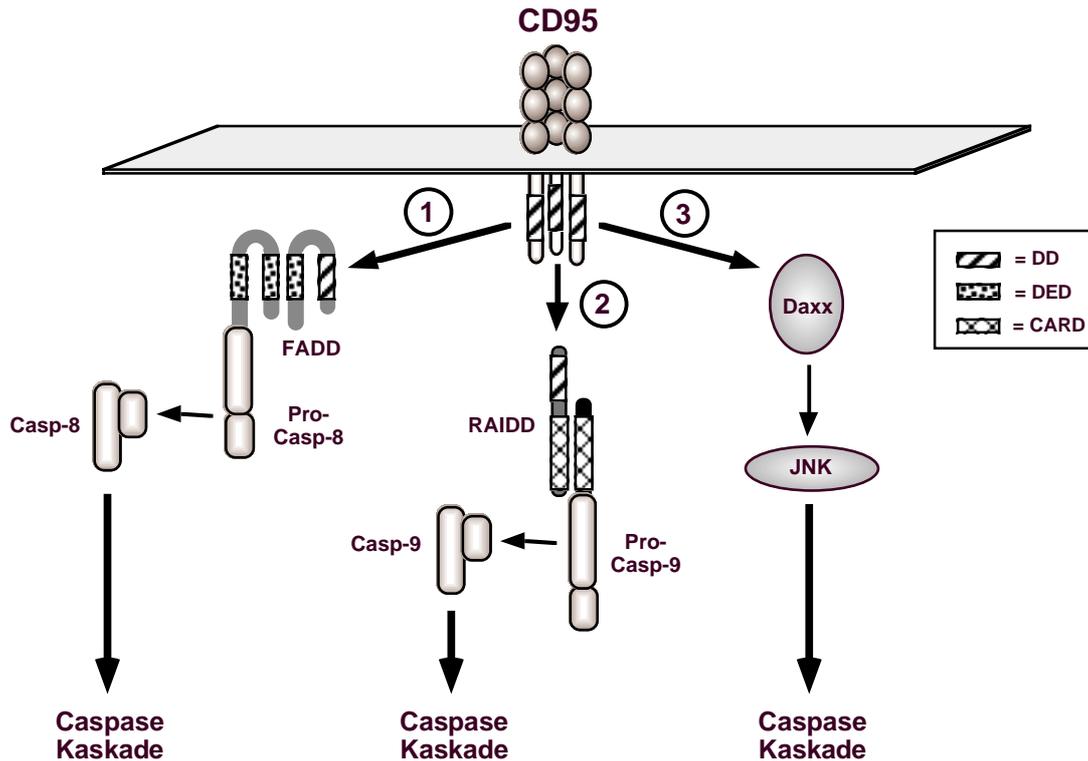


**Abb. 4: Schematische Darstellung der Todesrezeptoren und ihrer neutralisierenden Rezeptoren** (aus Engels *et al.*, 2001). Mitglieder dieser Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind durch ihre intrazelluläre Todesdomäne gekennzeichnet (graue Box). Die zwei bis vier Rauten im extrazellulären Teil repräsentieren homologe Domänen reich an Cysteinresten. Die TRAIL neutralisierenden Rezeptoren (DcR1, DcR2) besitzen keinen intrazellulären Teil oder enthalten eine verkürzte, nicht funktionelle Todesdomäne. Osteoprotegerin (OPG) und DcR3 werden sezerniert.

werden alle Liganden als Transmembranproteine synthetisiert, lösliche Formen können aber durch spezifische Metalloproteasen erzeugt werden.

Die Signaltransduktion der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose ist bislang am besten am CD95-System untersucht worden (Abb.5). Die Stimulation des CD95-Rezeptors durch löslichen oder membrangebundenen CD95-Liganden führt zur Trimerisierung des Rezeptors und leitet damit die Bildung des Todessignal-Komplexes (DISC, Death Inducing Signaling Complex) ein. Hierbei bindet das Adaptorprotein FADD (Fas-Associating Protein with Death Domain/MORT1) CD95. Ermöglicht wird diese Bindung durch die homophile Interaktion der Todesdomäne (DD, Death Domain) von FADD mit der intrazellulären Todesdomäne von CD95. FADD seinerseits verfügt über eine weitere Interaktionsdomäne, die sogenannte Todeseffektordomäne (DED, Death Effector Domain), die nun ihrerseits die Todeseffektordomäne der Caspase-8 bindet (Pan et al., 1997a; Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996). Die Bindung von Caspase-8 (MACH, Mch5) (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Srinivasula et al., 1996) an FADD führt vermutlich zu einer Konformationsänderung der Caspase-8, die ihre autoproteolytische Aktivierung zur Folge hat. Die Identifizierung von Caspase-8 als Bestandteil des Todessignal-Komplexes verbindet zwei unterschiedliche Elemente des apoptotischen Signalweges, den Rezeptor mit den Effektorcaspasen.

Die Weiterleitung des apoptotischen Signals am CD95-Rezeptor über ein System hierarchischer Module, das aus einem zum Rezeptor rekrutierten Adaptorprotein, einer apikalen Initiatorcaspase und einem Netzwerk aus Effektorcaspasen besteht, ist exemplarisch für alle bisher bekannten Todesrezeptoren. FADD und Caspase-8 erscheinen als essentielle Komponenten des Todessignalkomplexes aller Todesrezeptoren (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995; Walczak et al., 1997; Schneider et al., 1997; Sprick et al., 2000; Kischkel et al., 2000). TNF-Rezeptor 1 und die mit ihm verwandten Rezeptoren TRAMP und DR6 benötigen als zusätzliches Bindeglied zwischen Rezeptor und FADD das zwei Todesdomänen enthaltende TRADD (Hsu et al., 1996; Bodmer et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1996; Pan et al., 1998a). Für die TRAIL-Rezeptoren kann neben Caspase-8 Caspase-10 als Initiatorcaspase nicht ausgeschlossen werden (Pan et al., 1997a). Todesrezeptoren können noch weitere Adaptorproteine wie RAIDD und RICK rekrutieren, die nach Überexpression Apoptose induzieren. RAIDD trägt eine Todesdomäne an seinem C-Terminus, der N-Terminus weist eine Homologie mit Caspase-2 auf. Die daher vermutete Rezeptor-abhängige Caspase-2-Aktivierung (Duan



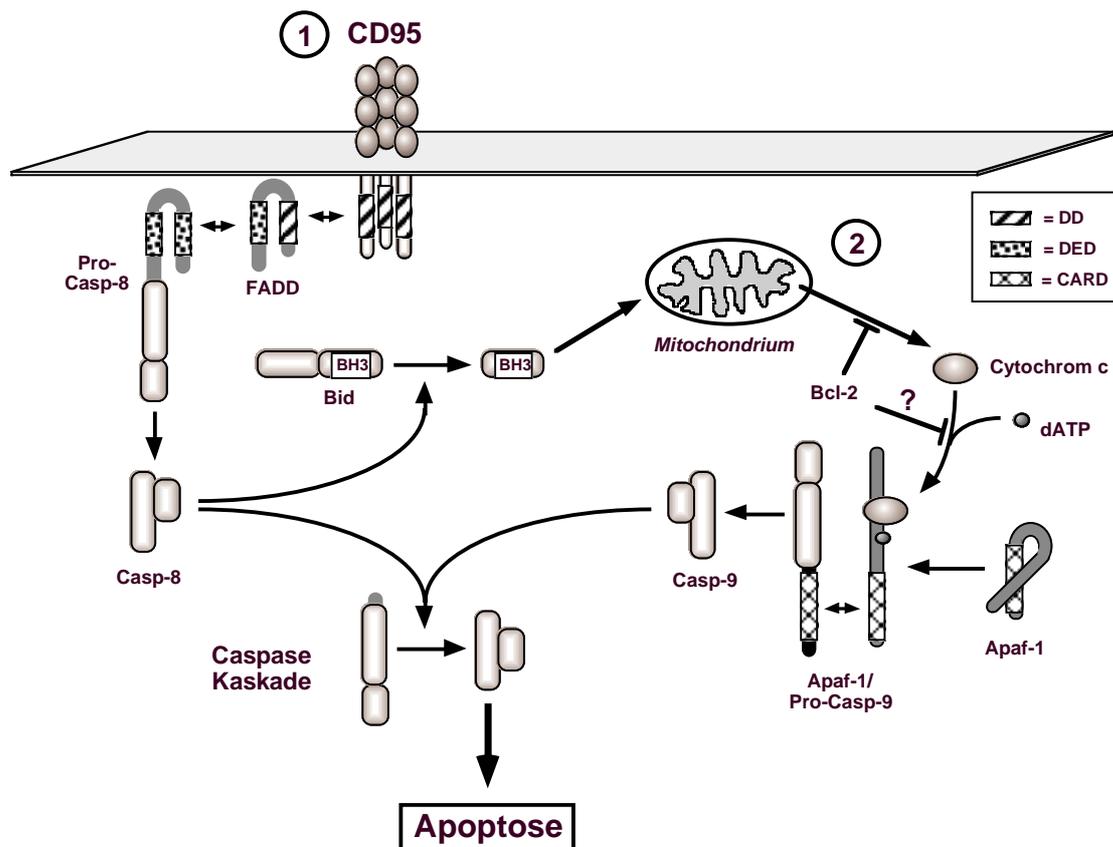
**Abb. 5: Die möglichen proximalen Signalwege von CD95.** (1) Den hauptsächlichsten Signalweg bildet die Rekrutierung des Adaptorproteins FADD durch die Interaktion der Todesdomäne (DD) von FADD mit der DD von CD95. Die Todeseffektordomäne (DED) von FADD rekrutiert anschließend Procaspase-8 an den DISC, was zur Spaltung und Aktivierung von Caspase-8 führt. (2) Ein alternativer Aktivierungsweg kann über das Adaptorprotein RAIDD verlaufen. Hierbei bindet die DD von RAIDD an die DD von CD95 und aktiviert nach homophiler CARD/CARD-Interaktion CARD-tragende Caspasen wie Procaspase-2. (3) Einen weiteren Signalweg stellt die Rekrutierung von Daxx an die cytoplasmatische Domäne von CD95 dar. Dieser Weg beinhaltet die Aktivierung von JNK und die distale Aktivierung von Caspasen. Es sei darauf hingewiesen, daß die physiologische Relevanz der letzten beiden Wege noch nicht geklärt ist.

und Dixit, 1997) ist aber fraglich, da Caspase-2-defiziente Mäuse keinen Defekt in der Signaltransduktion durch Todesrezeptoren aufweisen (Bergeron et al., 1998).

Todesrezeptoren lösen über die Aktivierung von Caspasen hinaus weitere Signalwege aus, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten, zur Bildung von Ceramiden und zur Aktivierung von Proteinkinase-Kaskaden führen. Im Falle von CD95 wurde Daxx identifiziert (Abb.5) (Yang et al., 1997a), das spezifisch mit der Todesdomäne von CD95 assoziiert, daraufhin Streß-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) aktiviert und so Apoptose verstärkt. Ein einzelner Todesrezeptor ist also in der Lage, mehrere Signalwege zu initiieren, die zusammen an der Induktion des apoptotischen Zelltodes beteiligt sind.

**1.4 Der mitochondriale Signalweg**

Neben der direkten Aktivierung der Caspase-Kaskade über Caspase-8 kann die Stimulation des CD95-Signalkomplexes auch über den mitochondrialen Cytochrom c/Apaf-1-Weg verlaufen und nach Aktivierung von Caspase-9 die proteolytische Kaskade einleiten (Abb. 6) (Scaffidi et al., 1998). Hierbei wird durch Caspase-8 das Protein Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie, gespalten. Das proteolytisch aktivierte Bid-Fragment wird N-myristoyliert und transloziert daraufhin zu den Mitochondrien und



**Abb. 6: Die zwei verschiedenen Signalwege der CD95-vermittelten Apoptose.** Der erste Signalweg erfolgt durch die FADD-vermittelte Rekrutierung von Procaspase-8 an den CD95-Rezeptorkomplex. Der zweite Signalweg wird durch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol initiiert. Dieser Apoptoseweg kann durch die durch Caspase-8 vermittelte Spaltung von Bid, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, ausgelöst werden. Die Bindung von Cytochrom c und dATP an Apaf-1 hat die Exponierung der Interaktionsdomäne CARD zur Folge, wodurch es Apaf-1 ermöglicht wird, an die CARD von Procaspase-9 zu binden. Caspase-9 wird daraufhin vermutlich in ähnlicher Weise wie Caspase-8 durch Autoproteolyse aktiviert. Beide Initiatorcaspasen sind in der Lage, eine proteolytische Caspase-Kaskade auszulösen, was zum programmierten Zelltod führt. Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie verhindern die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und/oder die Bindung von Cytochrom c an Apaf-1. Folglich inhibiert Bcl-2 nur den mitochondrialen Apoptoseweg, nicht aber den FADD/Caspase-8-vermittelten direkten Signalweg.

induziert die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c (Luo et al., 1998; Li et al., 1998; Zha et al., 2000). Cytoplasmatisches Cytochrom c bindet daraufhin an das Regulatorprotein Apaf-1 (Zou et al., 1997). Cytochrom c ist zwar in der Lage, allein an Apaf-1 zu binden, es wird aber die zusätzliche Bindung von dATP benötigt, um die Interaktionsdomäne CARD freizulegen (Liu et al., 1996). Nach Exposition dieser Domäne kann Apaf-1 nun seinerseits an die CARD von Procaspase-9 binden, woraufhin diese vermutlich durch autokatalytische Spaltung aktiviert wird und die proteolytische Caspase-Kaskade einleitet (Li et al., 1997a) (Abb. 6). Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie verhindern die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und/oder die Bindung von Cytochrom c an Apaf-1. Infolgedessen wird durch Bcl-2 nur der mitochondriale Apoptoseweg blockiert, der FADD/Caspase-8-vermittelte Signalweg wird hingegen nicht beeinträchtigt (Schulze-Osthoff et al., 1998; Scaffidi et al., 1998). Bislang ist jedoch noch unklar, ob der mitochondriale Cytochrom c/Apaf-1-Weg unabhängig funktioniert oder ein fester Bestandteil des Todesrezeptor-Signalweges ist.

### **1.5 Regulationsmechanismen**

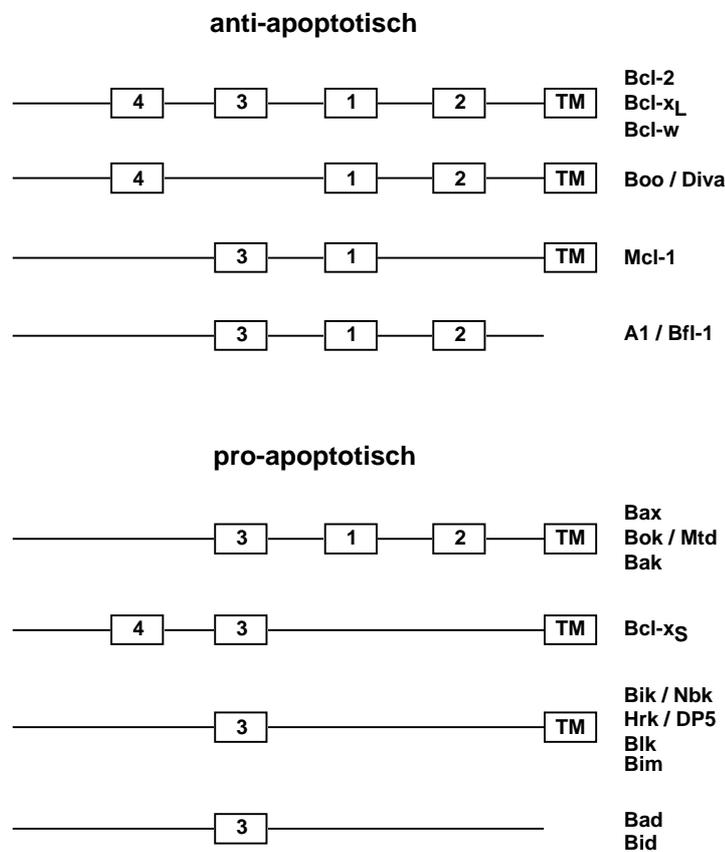
Das Auslösen des endogenen Selbstmordprogrammes hängt nicht nur von der Expression der Todeseffektorproteine ab, sondern auch von den Resistenzmechanismen, welche das Apoptosesignal kompensieren können. Die proximalste Interaktion zur Hemmung des Todesrezeptor-Signalweges besteht in der Inhibition der Ligandenbindung. Ein interessanter Mechanismus zur Neutralisierung der Rezeptorstimulation ist im TRAIL-System entdeckt worden. So vermögen die beiden TRAIL-Rezeptoren DcR1 und DcR2 zwar TRAIL zu binden, aber aufgrund des Fehlens einer funktionellen Todesdomäne können sie das Todessignal nicht weiterleiten. Die Expression dieser Rezeptoren wird für die Resistenz normaler Zellen gegenüber der TRAIL-vermittelten Cytotoxizität verantwortlich gemacht (Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997a; Degli-Esposti et al., 1997b; Marsters et al., 1997).

Auf der Ebene der Initiatorcaspasen fungiert cFLIP (Casper, I-FLICE, FLAME-1, CASH, CLARP, MRIT) in Säugerzellen als wichtiger Apoptoseregulator (Shu et al., 1997; Hu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Han et al., 1997; Irmeler et al., 1997). c-FLIP wird in verschiedenen Geweben exprimiert und kommt in zwei verschiedenen Spleißvarianten vor. Ähnlich wie Caspase-8 besitzt die kurze Form (c-FLIP<sub>s</sub>) zwei N-terminale DED-Motive. Die lange Form c-FLIP<sub>L</sub> besitzt hingegen zusätzlich eine C-terminale Domäne, welche der proteolytischen Domäne von Caspase-8

und -10 ähnelt. Jedoch ist bei c-FLIP das im aktiven Zentrum katalytisch wirksame Cystein durch ein Tyrosin ersetzt. Folglich ist c-FLIP<sub>L</sub> katalytisch inaktiv. c-FLIP kann mit verschiedenen Proteinen wie FADD, Caspase-8, Caspase-3, TRAF2 und Bcl-x<sub>L</sub> assoziieren (Shu et al., 1997; Han et al., 1997). In ruhenden T-Lymphozyten und in der frühen Aktivierungsphase wird c-FLIP sehr stark exprimiert und schützt die T-Zellen vor dem Aktivierungs-induzierten Zelltod. In der späteren Aktivierungsphase nimmt jedoch die c-FLIP-Expression ab, wodurch die T-Zellen suszeptibel für den Aktivierungs-induzierten Zelltod werden (Peter et al., 1997).

Proteine der Familie der IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) können den apoptotischen Prozeß auf der Ebene der Caspase-9 und vor allen Dingen der Effektorcaspasen regulieren (Deveraux und Reed, 1999). Die Familie der IAPs besteht aus den Säugerproteinen c-IAP1, c-IAP2, X-IAP, NIAP und Survivin, welche alle den programmierten Zelltod supprimieren (Rothe et al., 1995; Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996; Ambrosini et al., 1997). Allen gemeinsam ist das Cystein/Histidin-reiche Motiv BIR (Baculovirus IAP Repeat), welches in 1-3 Kopien vorliegt. Mit Ausnahme von NIAP besitzen alle anderen IAP-Mitglieder eine Zinkfinger-ähnliche RING-Domäne im C-Terminus. Für X-IAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 konnte gezeigt werden, daß sie an Caspase-3 und -7 binden und deren Aktivität inhibieren, wohingegen die proximalen Caspasen-1, -6, -8 und -10 nicht in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden (Deveraux et al., 1997; Roy et al., 1997). Die IAP werden hierbei von Caspasen gebunden, aber nicht proteolytisch gespalten (Roy et al., 1997). Im Falle der Caspase-9 erscheint die BIR3-Domäne von X-IAP essentiell für die Interaktion zwischen X-IAP und Caspase-9 (Srinivasula et al., 2001). Für die Bindung von X-IAP an Caspase-7 oder Caspase-3 ist dahingegen keine BIR-Domäne entscheidend. Hier werden regulatorische Funktionen der BIR2-Domäne für die Inhibition der Caspasen-7 und -3 diskutiert (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). Im Zuge der apoptotischen Cytochrom c-Freisetzung transloziert ebenfalls das kürzlich identifizierte Protein Smac/DIABLO (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) aus den Mitochondrien ins Cytosol. Dort entfaltet Smac/DIABLO seine proapoptotische Wirkung, indem es die Inhibition der Caspasen-9, -3 und -7 durch die Proteine der IAP-Familie neutralisiert (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Chai et al., 2000; Srinivasula et al., 2000; Srinivasula et al., 2001). Ursächlich hierfür ist die direkte Interaktion zwischen Smac/DIABLO und der BIR3-Domäne der IAPs (Srinivasula et al., 2000; Liu et al., 2000; Wu et al., 2000; Srinivasula et al., 2001).

Die Bcl-2-Familie besteht aus den anti-apoptotischen Mitgliedern Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, A1 und aus den pro-apoptotischen Proteinen Bax, Bad, Bak, Bid, Bim, und Hrk (Reed, 1997; Kroemer, 1997; Adams und Cory, 1998). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind durch den Besitz von bis zu 4 verschiedenen Bcl-2-Homologie(BH)-Domänen gekennzeichnet (Abb. 7) und können durch ein komplexes Netzwerk von Homo- und Heterodimeren miteinander interagieren. Ursprünglich wurde angenommen, daß das Verhältnis von pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie letztendlich dafür verantwortlich ist, ob die Zelle für einen proximalen apoptotischen Stimulus suszeptibel ist oder nicht. So blockiert die Überexpression von Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> die Induktion von Apoptose, wohingegen die Überexpression von Bax



**Abb. 7: Schematische Darstellung der pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie** (nach Strasser *et al.*, 2000). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie unterscheiden sich durch verschiedene Bcl-2-Homologie(BH)-Domänen (*numeriert mit 1 bis 4*), mittels derer sie untereinander und mit anderen Proteinen interagieren können. Ausgenommen A1, Bid und Bad besitzen die meisten Mitglieder der Bcl-2-Familie eine C-terminale Transmembran-Region (*TM*).

Apoptose induziert (Oltvai et al., 1993; Boise et al., 1993). Neuere Daten hingegen stellen dieses Modell in Frage, da Bcl-x<sub>L</sub>-Mutanten, welche nicht mehr mit Bax Heterodimere bilden können, trotzdem Apoptose inhibieren (Cheng et al., 1996; St. Clair et al., 1997). In umgekehrter Weise entfalten Mutanten von Bax und Bak, welche nicht mehr mit Bcl-x<sub>L</sub> interagieren, dennoch ihr apoptotisches Potential (Simonian et al., 1996; Simonian et al., 1997). Es wird daher angenommen, daß diese Mitglieder der Bcl-2-Familie anstelle der Heterodimerisierung um die Bindung an gemeinsame Interaktionspartner kompetitieren.

Der Hauptwirkungsort von Bcl-2 ist vermutlich das Mitochondrium, da Bcl-2 alle apoptotischen Veränderungen in diesem Organell unterdrücken kann (Abb. 6). So schützen die Bcl-2-inhibitorischen Proteine vor der Apoptose-induzierten Bildung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vor Veränderungen in der Calcium-Homöostase und vor Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Bcl-2 konnte zudem die Freisetzung der apoptogenen Protease AIF (Apoptosis-inducing Factor) aus isolierten Mitochondrien inhibieren (Susin et al., 1996). *In vitro*-Experimente haben gezeigt, daß Bcl-2 mit Apaf-1 und Caspase-9 interagiert und dadurch diesen ternären Komplex an die äußere Mitochondrienmembran bindet (Pan et al., 1998b). Bcl-2 verhindert aber die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c, was ansonsten durch die Bindung an Apaf-1 die Caspase-Kaskade auslösen würde (Yang et al., 1997b; Kluck et al., 1997). So induziert Cytochrom c die Aktivierung von Caspasen *in vitro* und nach Mikroinjektion in Zellen (Zhivotovsky et al., 1998). Bcl-2 blockiert aber nur die Todesrezeptor-vermittelte Aktivierung des mitochondrialen Cytochrom c/Apaf-1-Weges, wohingegen der proximale FADD/Caspase-8-Weg nicht beeinflußt wird (Scaffidi et al., 1998).

Die Mechanismen der Cytochrom c-Freisetzung und der Inhibition durch Bcl-2 sind bislang unbekannt. Eine Möglichkeit ergibt sich durch die dreidimensionale Struktur von Bcl-x<sub>L</sub>, welches Ähnlichkeiten zu der porenbildenden Domäne von bakteriellen Toxinen aufweist (Muchmore et al., 1996). So können Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> in der Tat Ionenkanäle in künstlichen Lipidmembranen bilden (Schendel et al., 1997; Minn et al., 1997). Es ist durchaus denkbar, daß verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie Porenkanäle mit bestimmter Selektivität bilden und dadurch die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran regulieren. Neben der Inhibition der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c hemmt Bcl-2 möglicherweise ebenfalls die Cytochrom c-vermittelte Aktivierung des Apaf-1/Caspase-9-Weges. So konnte gezeigt werden, daß

Bcl-2 die Bax-induzierte Caspase-Aktivierung und Apoptose-Induktion supprimiert, aber nicht die Freisetzung von Cytochrom c (Rossé et al., 1998). Darüberhinaus inhibiert Bcl-2 die Induktion von Apoptose nach Mikroinjektion von Cytochrom c (Zhivotovsky et al., 1998). Diese Befunde bedeuten, daß die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 sich nicht allein durch die Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung erklären läßt, sondern daß Bcl-2 möglicherweise durch Bindung an Cytochrom c oder Apaf-1 die Aktivierung von Caspasen und die Apoptose-Induktion inhibiert.

**1.6 Apoptose in Erkrankungen**

**Tab. 2: Apoptose und Krankheiten**

<b>Erhöhte Apoptoserate</b>
Hepatobiliäre Erkrankungen
Primäre sklerosierende Cholangitis
Akutes Leberversagen
Primäre biliäre Zirrhose
Hepatitis
Morbus Wilson
Colitis ulcerosa
Neurodegenerative Erkrankungen
Morbus Alzheimer
Morbus Parkinson
Multiple Sklerose
Retinopathia pigmentosa
Amyotrophe Lateralsklerose
Hämatopoetische Erkrankungen
Myelodysplastisches Syndrom
Aplastische Anämie
Chronische Leukopenie
AIDS
<b>Reduzierte Apoptoserate</b>
Maligne Erkrankungen
Leukämien
Lymphome
Karzinome
Autoimmunerkrankungen
Lupus erythematodes
Rheumatoide Arthritis
Latente virale Infektionen
EBV-Infektion

Daß infolge einer gestörten Regulation der apoptotischen Mechanismen zu viele oder zu wenig Zellen sterben, wird für viele Krankheiten als Ursache angenommen (Tab. 2). Eine zu geringe Apoptoserate ist eine der Ursachen für die Entstehung von Tumoren. Die geringe Apoptoserate wird bei bestimmten Tumoren mit einem veränderten Expressionslevel von Proteinen aus der Bcl-2-Familie in Verbindung gebracht. In einigen Tumoren konnte eine reduzierte Expression des proapoptotischen Bax beobachtet werden. Die Überexpression von Bcl-2 wird als Ursache für die schlechte Prognose von Colon-, Prostata-Carcinomen und Neuroblastomen angesehen (McDonnell et al., 1992). Ebenfalls an der Resistenz von Tumorzellen gegenüber einigen Chemotherapeutika scheint die Überexpression von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> beteiligt zu sein.

Die Kenntnis der apoptotischen Signaltransduktion eröffnet neue therapeutische Strategien gegen Krankheiten, die einer

erhöhten oder verringerten Apoptoserate unterliegen. Intensive Forschungsanstrengungen werden auf der Suche nach Substanzen betrieben, die in das apoptotische Gleichgewicht eingreifen, das in malignen Erkrankungen gestört ist. Vor diesem Hintergrund werden Bcl-2-Antisense-Nucleotide in der Behandlung von B-Zell-Lymphomen untersucht (Cotter et al., 1994; Webb et al., 1997; Cotter et al., 1999). Durch die Blockade der Initiation der Translation und damit der Expression von Bcl-2 erhofft man, die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu unterlaufen. Alternativ dazu werden Substanzen gesucht und entwickelt, die spezifisch die Caspase-Kaskade auslösen.

### **1.7 Wirkmechanismen von Chemotherapeutika**

Chemotherapeutika bewirken die Elimination von Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen wie die Interkalation in die DNA, die Inhibition der DNA-Replikation, die Schädigung der Zellmembran oder die Produktion von freien Radikalen (Barry et al., 1990; Hannun, 1997). Obwohl die intrazellulären Zielstrukturen der jeweiligen Chemotherapeutika sehr verschieden sind, münden alle in einen gemeinsamen Signalweg, der das endogene Selbstmordprogramm der Apoptose auslöst. Chemotherapeutika induzieren in Zellen die für die Apoptose typischen Veränderungen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und internucleosomale DNA-Fragmentation (Fisher, 1994). Eine enge Verbindung von Apoptose und den Mechanismen der Chemotherapeutika konnte durch die Beteiligung der entsprechenden genetischen Komponenten demonstriert werden. Die Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Proteine kann transfizierten Tumorzellen Resistenz gegenüber Cytostatika verleihen (Miyashita und Reed, 1993; Lotem und Sachs, 1993; Yang und Korsmeyer, 1996). Eine Reihe von Untersuchungen konnte eine Beteiligung des Tumorsuppressors p53 bei der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose nachweisen (Lotem und Sachs, 1993; Lowe et al., 1993; Strasser et al., 1994). Zuletzt konnte gezeigt werden, daß die durch Chemotherapeutika vermittelte Induktion der Apoptose durch die Aktivierung der Caspasen erfolgt, da Inhibitoren der Caspasen die Induktion der Apoptose durch Chemotherapeutika verhinderten (Zhu et al., 1995; Chen et al., 1996; Datta et al., 1996; Los et al., 1997).

Obwohl bekannt ist, daß die verschiedenen Chemotherapeutika den Apoptoseweg durch Aktivierung von Caspasen auslösen, so ist doch wenig über den Signalweg bekannt, der nach DNA-Schädigung zur Caspaseaktivierung führt. Es wurde von einigen Arbeitsgruppen postuliert, daß Cytostatika Apoptose über den CD95-Signalweg

induzieren (Friesen et al., 1996; Müller et al., 1997; Fulda et al., 1997a). So wurde berichtet, daß verschiedene Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Methotrexat oder Bleomycin eine Hochregulation von CD95 und die Expression des CD95-Liganden (CD95L) induzieren und damit die auto- und parakrine CD95-vermittelte Apoptose auslösen. Zelllinien, welche resistent gegenüber der Stimulation durch CD95 waren, waren ebenfalls resistent gegenüber der Chemotherapeutika-vermittelten Apoptose. Demgegenüber gab es auch Berichte, daß Chemotherapeutika in der Abwesenheit von CD95-Signalen Apoptose induzieren können (Eischen et al., 1997; Gamen et al., 1997; Villunger et al., 1997; Fulda et al., 1997b).

### **1.8 Mistellektine in der Chemotherapie**

Mistelektine werden bereits seit längerem in der adjuvanten Chemotherapie eingesetzt. Ihre therapeutisch aktiven Moleküle sind Lektinkomponenten, welche aus dem Mistellektin I (ML-I), ML-II, ML-III und dem kürzlich isolierten Chitin-bindenden ViscalbcBA bestehen (Hajto et al., 1990; Beuth et al., 1992; Peumans et al., 1996). Die klassischen Mistellektine I, II, und III bestehen aus zwei Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sie unterscheiden sich jeweils in ihrer Bindungsspezifität für Zuckerseitenketten. So bindet ML-I spezifisch an D-Galaktose und ML-II und ML-III bevorzugt an N-Acetylgalaktosamin (Franz et al., 1981). Das Haupteffektormolekül in Mistelektinen ist das  $\beta$ -Galaktosid-spezifische Lektin ML-I (Hajto et al., 1989). Seine B-Kette ist ein 34 kD-Protein, welches an die Zellmembran bindet und daraufhin die 29 kD A-Kette ins Zytosol schleust. Mittlerweile ist die komplette Aminosäuresequenz sowohl von der A-Kette (Soler et al., 1996) als auch von der B-Kette (Soler et al., 1998) bekannt. Es zeigte sich, daß sie eng verwandt mit den Pflanzenlektinen Ricin und Abrin sind, von denen bekannt ist, daß sie als Typ-II-Ribosomen-Inaktivatoren fungieren. Nach Internalisation inaktiviert die A-Kette die ribosomale 60S-Untereinheit durch Depurinierung eines Adenosinrestes innerhalb der 28S ribosomalen RNA (Endo et al., 1988). Es wird angenommen, daß die cytotoxische Wirkung der A-Kette von Mistellektin ähnlich wie Ricin auf der Inhibition der Proteinbiosynthese beruhen (Franz, 1985).

Experimente in Zellkulturen und im Tiermodell haben gezeigt, daß ML-I verschiedene Prozesse auf zellulärer Ebene auslöst, welche möglicherweise die adjuvante Wirkung von Mistelektinen in der Krebstherapie bedingen (Beuth, 1997). So induziert die Inkubation von peripheren mononukleären Blutzellen oder monocytären Zelllinien mit ML-I eine

erhöhte Expression verschiedener Cytokine wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Hajto et al., 1990; Ribereau-Gayon et al., 1996; Stein und Berg, 1997). Darüberhinaus ist ein Anstieg an NK-Zellen (Natural Killer Cells) und der Phagozytoseaktivität beobachtet worden. Es konnte zudem gezeigt werden, daß die Applikation von ML-I die Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin ins Blut zur Folge hat (Heiny und Beuth, 1994).  $\beta$ -Endorphin ist ein Oligopeptid, welches die Schmerzantwort im zentralen Nervensystem erniedrigt (Falconer et al., 1988). Es ist denkbar, daß dadurch die Lebensqualität von Krebspatienten verbessert wird.

Eine wichtige Eigenschaft der Mistellektine besteht in ihrer cytostatischen und cytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen, im besonderen auf Krebszellen lymphoiden Ursprungs. Neuere Daten weisen daraufhin, daß die Cytotoxizität hierbei durch die Induktion von Apoptose vermittelt wird. Es konnte beobachtet werden, daß die Inkubation verschiedener Zelllinien mit Mistellektinen zu den typischen apoptotischen Veränderungen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und internucleosomale DNA-Fragmentation führt (Janssen et al., 1993; Büssing et al., 1996; Möckel et al., 1997). Bei diesen Untersuchungen ist bislang jedoch noch unklar, durch welche Mechanismen und welche Signaltransduktionswege Mistellektine den programmierten Zelltod aktivieren.

### **1.9 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Mechanismen der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose untersucht werden. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Frage, ob Apoptose induziert durch Chemotherapeutika von der Signaltransduktion des CD95-Systems abhängig ist und welche Rolle der mitochondriale Todesweg einnimmt. Darüberhinaus sollte den Ursachen der adjuvanten Wirkung von Mistelextrakten in der Chemotherapie nachgegangen werden. Zusammenfassend wurde von diesen Untersuchungen ein besseres Verständnis für die klinische Chemoresistenz vieler Tumore erhofft.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

Das CD95-neutralisierende chimäre Protein Glutathion-S-Transferase (GST)-CD95, bestehend aus dem extrazellulären Teil von CD95 und GST, wurde von Dr. E. Gulbins (Universität Tübingen, Tübingen) zur Verfügung gestellt und in *Escherichia coli* produziert.

Der Caspase-Inhibitor Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon (zVAD-fmk) wurde von Enzyme Systems (Dublin, California, USA) erhalten. Die Chemotherapeutika Daunorubicin, Etoposid und Mitomycin C wurden von der Universitätsapotheke Tübingen, Doxorubicin wurde von Sigma (Deisenhofen) erhalten. Daunorubicin und Mitomycin C wurden in Methanol, Doxorubicin und Etoposid in Ethanol gelöst und als Stocklösungen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Staurosporin wurde bei Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) erworben. Agonistischer anti-CD95-Antikörper wurde von BioCheck (Münster) erhalten. TNF $\alpha$  wurde von der Knoll AG (Ludwigshafen) erhalten, Cycloheximid (CHX) von Roth (Karlsruhe), Ionomycin und C<sub>2</sub>-Ceramid von Calbiochem (Bad Soden). Fludarabin, Phorbolmyristylacetat (PMA) und aufgereinigtes  $\alpha/\beta$ -Spectrin aus humanen Erythrocyten waren von Sigma (Deisenhofen). ML-I, präpariert und aufgereinigt durch Lactose-Affinitätschromatographie (Soler et al., 1996), wurde durch Prof. Dr. W. Voelter (Abteilung für Physikalische Biochemie am Institut für Physiologische Chemie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Brefeldin A wurde von Sigma (Deisenhofen) erhalten.

Alle übrigen Reagenzien wurden über Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.2 Zellen und Zellkultur

Alle Zelllinien wurden, wenn nicht anders verzeichnet, in RPMI-1640 supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10 mM HEPES (alles von GIBCO-BRL, Eggenstein) kultiviert. Die Zellen wuchsen bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und wurden in der log-Phase gehalten. Der CD95-resistente Jurkat Subklon Jurkat-R wurde durch kontinuierliche Kultivierung in der Anwesenheit von monoklonalem anti-CD95-

Antikörper (IgG<sub>3</sub>, 1 µg/ml, BioCheck, Münster) über sechs Monate erhalten. Der Caspase-8-defiziente Jurkat Subklon und die parentale Jurkat Zelllinie A3 (Juo et al., 1998) wurden freundlicherweise von J. Blenis (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) bereitgestellt. Stabile Transfektanten von Jurkat-Zellen, die Bcl-2 überexprimieren, wurden von H. Walczak (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

BJAB FADD-DN-Zellen, die stabil mit einer dominant-negativen FADD-Mutante transfiziert wurde, der die aminoterminalen DED-Region fehlt (Chinnaiyan et al., 1995), wurden ursprünglich von Dr. V. M. Dixit (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA) erhalten.

Zur Isolierung von humanen Erythrocyten wurden humane Blutproben von gesunden Spendern in EDTA präpariert. Nach Zentrifugation zur Entfernung von Plasma, Leukocyten und den oberen 10% der Erythrocyten wurden die verbleibenden Erythrocyten zweimal in RPMI-1640 mit 0,4 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend in Kulturmedium inkubiert.

Die humane Caspase-3-defiziente Brustkarzinom-Zelllinie MCF-7, die stabil mit Caspase-3 oder mit Kontrollvektor transfiziert worden sind (Jänicke et al., 1998a), wurden freundlicherweise von R. Jänicke und A. Porter (National University of Singapore, Singapore) zur Verfügung gestellt.

HeLa-Zellen, die stabil mit einem chimären Konstrukt aus einer dominant-negativen FADD-Mutante oder dem Kontrollvektor und dem Grün-Fluoreszierenden-Protein (GFP) transfiziert waren, wurden freundlicherweise von Dr. P. Scheurich und Dr. H. Wajant (Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt und in RPMI-1640 supplementiert mit 5% FCS, 10 mM HEPES und Antibiotika kultiviert.

### **2.3 Cryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Die Cryokonservierung erfolgte mittels DMSO, das in die Zellen diffundiert und die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zellstörung der Zellmembran verhindert. Dazu wurden sedimentierte Zellen in Einfriermedium (Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO) (maximal 20-30 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgenommen und jeweils 1 ml der Suspension in ein Cryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die

Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt, und die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Unter ständigem Schütteln wurde tropfenweise 10 ml kaltes Kulturmedium/10% FCS hinzugegeben. Nach weiterem zweimaligen Waschen wurden Zellzahl und Zellvitalität bestimmt, anschließend die Zellen in Kultur genommen.

## 2.4 Expression rekombinanter Caspasen

Caspase-3 und Caspase-6 wurden als Histidin-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 exprimiert. Nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG bei Raumtemperatur wurden die Caspasen nahezu bis zur Homogenität auf Nickel-Chelator-Affinitätssträgermaterial (His-Bind<sup>TM</sup>-resin, Calbiochem) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigten Fraktionen wurden gegen 40 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl dialysiert und auf ihre Homogenität mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Die Aktivität der Caspasen wurde fluorometrisch unter Verwendung der synthetischen Substrate N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Ac-DEVD-AMC) und N-Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-AMC (Ac-VEID-AMC, beide von BIOMOL, Plymouth, PA, USA) wie unten beschrieben bestimmt.

## 2.5 Zelltransfektionen

Ein Expressionsvektor, der eine dominant-negative Caspase-9-Mutante kodierte, in der der Cystein-Rest des aktiven Zentrums zu einem Alanin-Rest mutiert worden ist (C287A), wurde freundlicherweise von E. S. Alnemri (The Kimmel Cancer Institute, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt. Der Expressionsvektor für Bcl-x<sub>L</sub> wurde von C. B. Thompson (Chicago, USA) bereitgestellt. Die Elektroporation wurde mit einem Gene pulser II electroporator (BioRad, München) durchgeführt. 10<sup>8</sup> Jurkat-Zellen wurden zweimal mit TBS pH 7,4 vor der Transfektion gewaschen. 25 µg DNA wurden mit 135 µF and 500 V elektroporiert. Die Jurkat-Zellen wurden mit 800 µg/ml G418 (Clontech, Heidelberg) selektioniert. Das parentale Plasmid pcDNA-3 (Invitrogen, Leek, Niederlande) wurde als Vektorkontrolle eingesetzt. Die Proteinexpression wurde mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines anti-Bcl-x<sub>L</sub>- (Transduction Laboratories) oder anti-Caspase-9-Antikörpers überprüft. Ein Konstrukt, das ein Fusionsprotein aus der Caspase-9-Prodomäne (Aminosäuren 1-163) und GFP (pCasp9-GFP) kodierte, wurde durch Polymerase-Kettenreaktion in die Restriktionsstellen für EcoR1 und BamH1 des Vektors pEGFP-N1 (Clontech) kloniert. Die stabil pCasp9-GFP überexprimierenden HeLa-Zellen wurden durch Transfektion mit Superfect (Qiagen, Hilden) generiert und

anschließend mit 600 µg/ml G418 (Clontech) selektioniert. Nach zwei Wochen wurden 100-200 einzelne Kolonien vereinigt, expandiert und auf hohe Expression durch dreimalige Zellsortierung in einem FACStarplus (Becton Dickinson) angereichert. HeLa-Zellen, die stabil die GFP-Kontrolle exprimierten, wurden bereits beschrieben (Wajant et al., 1998).

## **2.6 Präparation von Mitochondrien und mitochondrienfreier Zellextrakte zur Bestimmung der Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol**

Zur Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung wurden  $5 \times 10^6$  Zellen geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und in fünf Volumina Puffer A aufgenommen, der 250 mM Sucrose, 20 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin und 10 µg/ml Leupeptin enthielt. Die Zellen wurden in einem 1 ml-Homogenisator (Douncer) mit 12 Stößen homogenisiert. Die Homogenisate wurden mit 1000 g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert, um Zellkerne zu entfernen. Die Überstände wurden zur Sedimentierung der Mitochondrien mit 10000 g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände, bezeichnet als cytosolische S10-Fraktion, wurden auf ein 15%-iges Polyacrylamidgel geladen. Die Freisetzung des Cytochrom c wurde mittels Immunoblot-Analyse mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 7H8.2C12 (PharMingen, Hamburg) bestimmt.

## **2.7 Immunoblot-Analyse**

Die Prozessierung der Caspasen und Caspase-Substrate Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) und Bid wurde durch Immunoblot-Analyse bestimmt. In Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen wurden  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung ausgesät und mit den apoptotischen Stimuli behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen und in 1% Triton X-100, 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 3 µg/ml Aprotinin, 3 µg/ml Leupeptin, 3 µg/ml Pepstatin A und 2 mM PMSF lysiert. Anschließend wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (8-15%-iges Gradientengel für Caspase-8 und PARP, 12%-iges oder 15%-iges Gel für Caspase-9 oder 15%-iges Gel für Caspase-3 und Bid) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Amersham, Braunschweig) elektrotransferiert (0,5 A, 90 min., 4°C). Die Beladung des Gels mit gleichen Proteinmengen wurde durch Proteinbestimmung nach Bradford (1976) gewährleistet und nach dem Transfer durch Färbung der Membran mit Ponceau S bestätigt. Die Membranen

wurden eine Stunde mit 5% fettarmem Trockenmilchpulver in TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl) mit Protein gesättigt und daraufhin 1 h mit polyklonalem Kaninchen-Antikörper gegen PARP (1:2000, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), Caspase-6 (P. Vandenabeele, Gent, Belgien), Caspase-9 (Y. A. Lazebnik, Cold Spring Harbor, NY, USA), monoklonalem Maus-Antikörper gegen Caspase-8 (1:10-Verdünnung eines Hybridom-Überstandes, BioCheck), Caspase-3 (Transduction Laboratory, Heidelberg), Spectrin (Sigma) oder polyklonalem Ratten-anti-Bid-Antikörper (J. Yuan, Boston, MA, USA) (Li et al., 1998) inkubiert. Die Membranen wurden viermal mit TBS/0,05% Tween-20 gewaschen und mit dem jeweiligen Peroxidase-gekoppelten affinitäts-gereinigten Zweitantikörper für eine Stunde inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde die Reaktion mit verstärkter Chemolumineszenz unter Verwendung von ECL-Reagenz (Amersham) entwickelt.

## **2.8 Immunpräzipitation**

Zur Immunpräzipitation von Caspase-8 wurden  $10^9$  frisch präparierte Erythrocyten oder  $10^7$  Jurkat-Zellen in 100  $\mu$ l Lysepuffer bestehend aus 1% NP-40, 20 mM HEPES pH 7,4, 84 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 2  $\mu$ g/ml Aprotinin, 2  $\mu$ g/ml Leupeptin und 2  $\mu$ g/ml Pepstatin A lysiert. Die Proben wurden wie angezeigt mit 100  $\mu$ M zVAD-fmk vorinkubiert, bevor 2  $\mu$ g aufgereinigter Caspase-6 zugegeben wurden. Die Lysate wurden bei 37°C für drei Stunden geschüttelt. Anschließend wurden 2  $\mu$ g anti-Caspase-8 und 20  $\mu$ l Protein-G-Sepharose (Amersham) zugegeben. Als Kontrolle wurden die Reaktionsmischungen in Abwesenheit zelluärer Lysate inkubiert. Die Immunpräzipitation wurde bei 4°C über Nacht unter Schütteln durchgeführt. Das Präzipitat wurde anschließend dreimal in einem Puffer, der 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% Glycerol und 0,01% Triton X-100 enthielt, gewaschen. 15  $\mu$ l des Präzipitats wurden in Laemmli-Puffer unter reduzierenden Bedingungen gekocht und nach Caspase-8-Prozessierung durch Immunoblot-Analyse untersucht. 5  $\mu$ l des Präzipitats wurden zur fluorometrischen Bestimmung der Caspase-Aktivität eingesetzt.

## **2.9 Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität**

Cytosolische Zellextrakte wurden durch Zelllyse mit einem Puffer gewonnen, der 0,5% NP-40, 20 mM HEPES pH 7,4, 84 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5  $\mu$ g/ml Aprotinin, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A und 1 mM PMSF enthielt. Die Caspase-Aktivität wurde bestimmt durch Inkubation der

Zellysate mit 50  $\mu\text{M}$  des fluorogenen Substrates DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin, Bachem, Heidelberg) in 200  $\mu\text{l}$  Puffer, der 10 mM HEPES pH 7,3, 100 mM NaCl, 10% Sucrose, 0,1% CHAPS und 10 mM DTT enthielt. Die Freisetzung von Aminomethylcoumarin wurde fluorometrisch mittels einer Anregungswellenlänge von 360 nm bei einer Emissionswellenlänge von 475 nm gemessen.

### **2.10 *In vitro*-Prozessierung von Caspasen und Spectrin**

Zur Bestimmung der *in vitro*-Spaltung von Caspasen und Spectrin wurden  $50 \times 10^6$  Erythrocyten oder  $2 \times 10^6$  Jurkat-Zellen in 60  $\mu\text{l}$  Lysepuffer in Abwesenheit oder unter Zugabe von zVAD-fmk lysiert. Anschließend wurden 2  $\mu\text{g}$  aktiver Caspase-3 oder Caspase-6 zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für drei Stunden bei 37°C geschüttelt. *In vitro*-Spaltung von aufgereinigtem Spectrin wurde auf ähnliche Weise durch Zugabe von 2  $\mu\text{g}$  aufgereinigter Caspase-3 oder Caspase-6 zu 6  $\mu\text{g}$  aufgereinigtem  $\alpha/\beta$ -Spectrin durchgeführt. Die Spectrin-Spaltung wurde durch Immunoblot-Analyse bestimmt.

Zur Bestimmung, ob Cytochrom c in der Lage ist, verschiedene Caspasen in cytosolischen Extrakten zu aktivieren, wurden Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, in Puffer A bestehend aus 20 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA und 1 mM PMSF resuspendiert und für 15 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Douncer mit 15 Stößen homogenisiert und bei 16000 g und 4°C für 15 min. zentrifugiert. Zur Aktivierung der Caspasen wurden 1 mM DTT, 1  $\mu\text{M}$  Cytochrom c aus Pferdeherz (Sigma) und 1 mM dATP zu den Überständen zugegeben und bei 37°C für die Dauer der angegebenen Zeiten inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und hinsichtlich ihrer Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8 untersucht.

### **2.11 Messung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials**

Zur Bestimmung der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials wurden Zellen bei 37°C für 15 min. mit 80 nM kationischem Fluorochrom 3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid (Sigma) (Zamzami et al., 1995) in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gehalten und im Durchflußcytometer (FACScalibur, Becton

Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung CellQuest-Analyse-Software bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen.

### **2.12 Messung des Zelltodes**

Zur Bestimmung des Zelltodes wurden  $3-4 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an anti-CD95 oder Chemotherapeutika behandelt. Fragmentierte DNA aus apoptotischen Zellkernen wurde nach der Methode von Nicoletti *et al.* (1991) gemessen. Apoptotische Zellkerne wurden durch Zelllyse in einem hypotonischen Lysepuffer bestehend aus 0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100 und 50 µg/ml Propidiumiodid präpariert und anschließend in einem Durchflußcytometer analysiert. Zellkerne links vom 2 N Gipfel, die damit hypodiploide DNA enthielten, wurden als apoptotisch gewertet.

Die Effekte der kombinierten Behandlung von Jurkat-Zellen mit Etoposid und ML-I wurden durch Isobologramm-Analyse nach der Methode von Berenbaum berechnet (Berenbaum, 1981).

Die Externalisation von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen wurde durch Färbung mit Annexin-V-FITC nach dem Protokoll des Herstellers (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) visualisiert und anschließend im Durchflußcytometer unter Verwendung eines FSC/FL1-Profiles analysiert.

Zelltod wurde durch die Aufnahme von 2 µg/ml Propidiumiodid (Sigma) in PBS in nicht fixierte Zellen und anschließender Messung im Durchflußcytometer unter Verwendung eines FSC/FL2-Profiles bestimmt. Alle durchflußcytometrischen Analysen wurden mit einem FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung CellQuest-Analyse-Software durchgeführt.

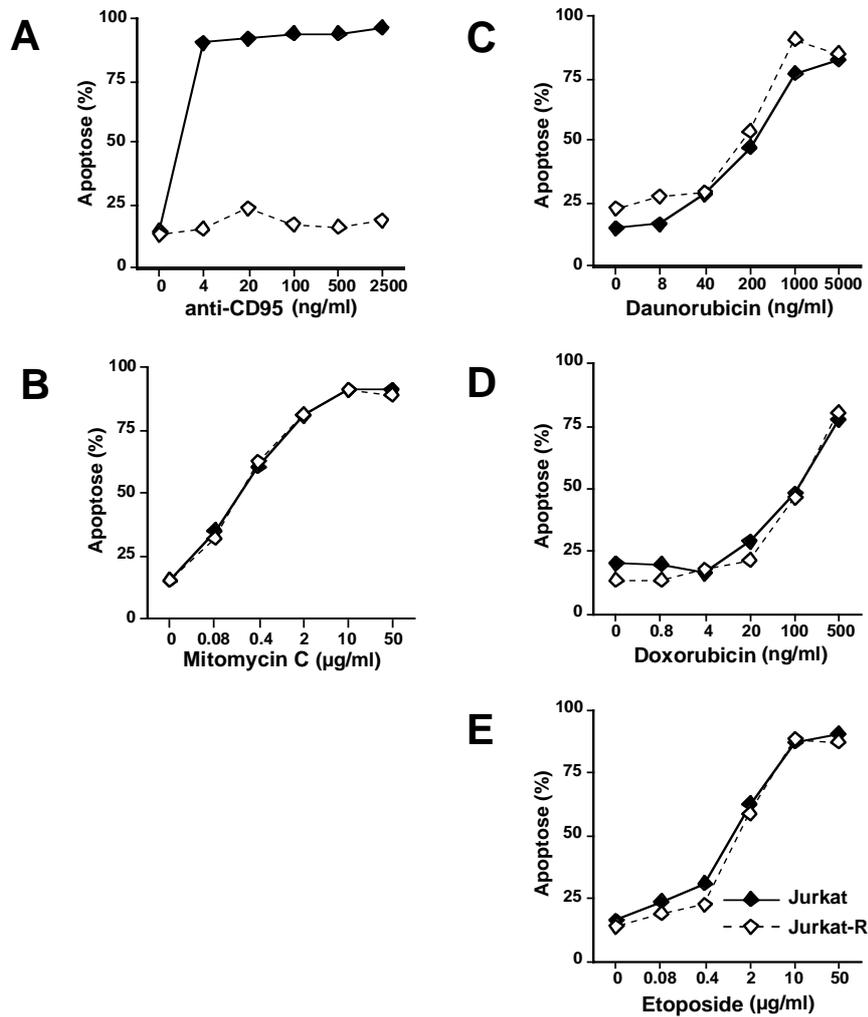
Die mikroskopische Analyse apoptotischer Veränderungen der Zellmorphologie wurde mit nicht fixierten GFP-FADD-DN exprimierenden HeLa-Zellen an einem inversen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Chemotherapeutika induzieren Caspase-8-Aktivierung und Apoptose unabhängig von einer Signaltransduktion durch Todesrezeptoren

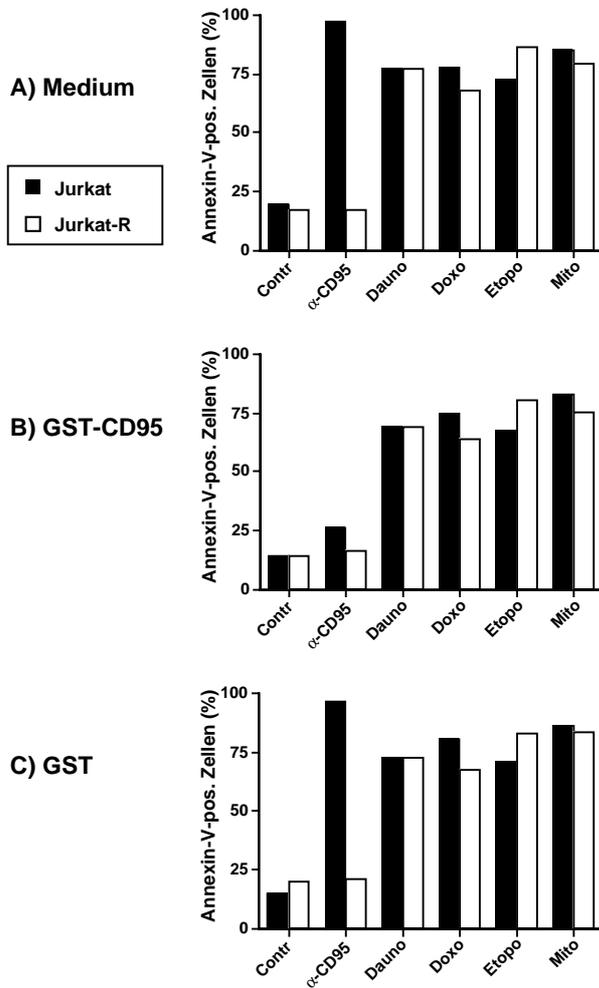
*Apoptose durch Chemotherapeutika erfolgt unabhängig von einer CD95/CD95L-Interaktion*

Der Mechanismus, durch den Chemotherapeutika Apoptose auslösen, wird kontrovers diskutiert. Es wurde gezeigt, daß antineoplastische Agentien wie Doxorubicin,



**Abb. 8: Effekte von Mitomycin C, Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposid und anti-CD95 auf CD95-sensitive und CD95-resistente Jurkat-Zellen.**  $3 \times 10^4$  CD95-sensitive oder -resistente Zellen wurden mit (A) Mitomycin C oder (B) anti-CD95-Antikörper in den angegebenen Konzentrationen für 24 h stimuliert. Bei Abwesenheit apoptotischer Stimuli wurden die Zellen mit der Solvenskontrolle der entsprechenden höchsten Stimulus-Konzentration behandelt. Die Induktion der Apoptose wurde im Durchflußzytometer durch Propidiumiodid-Färbung hypodiploider apoptotischer Zellkerne bestimmt.

Bleomycin und Methotrexat die Expression von CD95L induzieren, der über eine autokrine Wechselwirkung mit CD95 Zelltod bewirkte (Friesen et al., 1996; Müller et al., 1997; Fulda et al., 1997a). Zur Untersuchung, ob eine induzierbare Interaktion zwischen CD95L und seinem Rezeptor Voraussetzung für die durch Chemotherapeutika vermittelte Apoptose ist, wurde der Subklon Jurkat-R eingesetzt, der zur Resistenz gegenüber CD95-



**Abb. 9: Die Inhibition der Signaltransduktion über CD95 hat keinen Einfluß auf die durch Chemotherapeutika vermittelte Apoptose.**  $3 \times 10^4$  CD95-sensitive (Jurkat; schwarze Balken) oder -resistente (Jurkat-R, graue Balken) Zellen wurden für 1 h mit (A) Medium, (B) 100 µg/ml GST-CD95 oder (C) 100 µg/ml GST vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (Kontr) oder mit agonistischem Antikörper gegen CD95 (anti-CD95; 20 ng/ml), Daunorubicin (Daun; 5 µg/ml), Doxorubicin (Doxo; 1 µg/ml), Etoposid (Etop; 25 µg/ml) oder Mitomycin C (Mito; 25 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h wurde die Phosphatidylserin-Exponierung mittels Annexin-V-FITC-Färbung im Durchflußzytometer bestimmt.

Signaltransduktion selektiert worden ist. Die Konzentrationsabhängigkeit der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose wurde durch durchfluß-cytometrische Färbung hypodiploider DNA aus apoptotischen Zellkernen bestimmt. Bei einer Stimulation des CD95-Signalweges mit agonistischem anti-CD95-Antikörper wurde in Jurkat-Zellen bereits bei einer Konzentration von 4 ng/ml deutlich Apoptose induziert, wohingegen in Jurkat-R-Zellen über den gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich keine Apoptose verzeichnet werden konnte (Abb. 8A). CD95-sensitive Jurkat-Zellen und CD95-resistente Jurkat-R-Zellen zeigten in vergleichbarer Konzentrationsabhängigkeit Apoptose nach Behandlung mit Mitomycin C (Abb. 8B). Ebenfalls Daunorubicin, Doxorubicin und Etoposid induzierten Zelltod mit der gleichen Konzentrationsabhängigkeit in Jurkat- wie auch in Jurkat-R-Zellen (Abb. 8C-E).

Um eine mögliche Beteiligung von CD95 bei der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose weiter ausschließen zu können, wurden Zellen mit einem neutralisierenden löslichen GST-

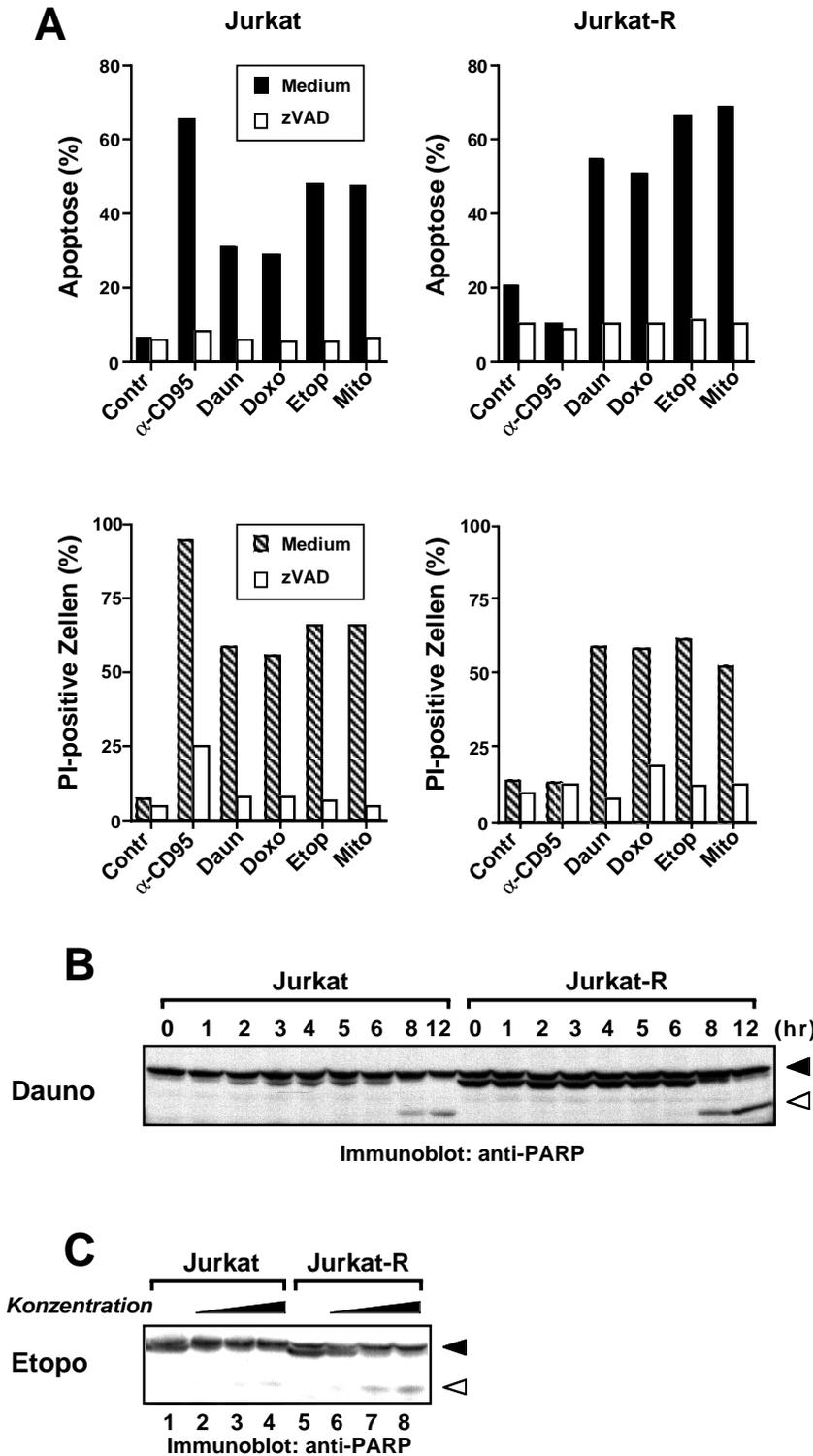
CD95-Rezeptor-Konstrukt vorinkubiert, das die Bindung von CD95L an seinen zellulären Rezeptor verhindert. Die Induktion des Zelltodes wurde durch Phosphatidylserin-Exposition am äußeren Blatt der Zellmembran mittels Annexin-V-FITC-Färbung im Durchflußcytometer ermittelt. Alle eingesetzten Chemotherapeutika lösten sowohl in Jurkat- als auch in Jurkat-R-Zellen Apoptose aus, während anti-CD95 ausschließlich in Jurkat-R-Zellen induzierte (Abb. 9A). GST-CD95 inhibierte Zelltod durch anti-CD95, wohingegen auf Zelltod durch Chemotherapeutika kein Effekt sichtbar wurde (Abb. 9B). GST als Negativkontrolle alleine hatte keinen Einfluß sowohl auf den durch anti-CD95 als auch durch Chemotherapeutika vermittelten Zelltod (Abb. 9C). Gleichartige Daten wurden auch im Durchflußcytometer durch Färbung apoptotischer Zellen und Zellkerne mit Propidiumiodid erhalten (Daten nicht gezeigt).

*Apoptose durch Mitomycin C, Etoposid, Daunorubicin und Doxorubicin wird durch Caspasen vermittelt*

Da Caspasen an der Induktion von Apoptose durch Chemotherapeutika beteiligt sind, wurde untersucht, ob ihre Aktivierung durch Chemotherapeutika auch unabhängig von einer CD95/CD95L-Wechselwirkung erfolgt. Dazu wurden CD95-sensitive und CD95-resistente Zellen unter analogen Bedingungen wie in Abb. 9 und zusätzlich in Anwesenheit von zVAD-fmk, einem Peptidinhibitor fast aller Caspasen, stimuliert. Wie im vorherigen Experiment induzierten alle Chemotherapeutika Zelltod sowohl in Jurkat als auch in Jurkat-R-Zellen aus. Nur die cytotoxische Wirkung von anti-CD95 war auf Jurkat-Zellen beschränkt. Durchflußcytometrische Färbung hypodiploider Zellkerne zeigte, daß zVAD-fmk die Apoptose durch anti-CD95 und Chemotherapeutika stark verminderte (Abb. 10A, obere Reihe). Die Inhibition der Caspasen verhinderte entsprechend der Aufnahme von Propidiumiodid in Zellen ebenfalls die Schädigung der Zellmembran und den damit verbundenen Zelltod (Abb. 10A, untere Reihe).

Die Beteiligung von Caspasen in der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose wurde weiterhin durch die proteolytische Prozessierung eines bekannten Caspase-Substrates durch Immunoblot-Analyse bestimmt. PARP, ein DNA-Reparatur-Enzym, wird während der Apoptose von Caspase-3 geschnitten (Kaufmann et al., 1993; Tewari et al., 1995). PARP, ein 116 kD-Protein, wurde nach achtstündiger Behandlung mit Daunorubicin sowohl in CD95-sensitiven als auch in CD95-resistenten Jurkat-Zellen zum charakteristischen 89 kD-Fragment geschnitten (Abb. 10B). Etoposid induzierte ebenfalls

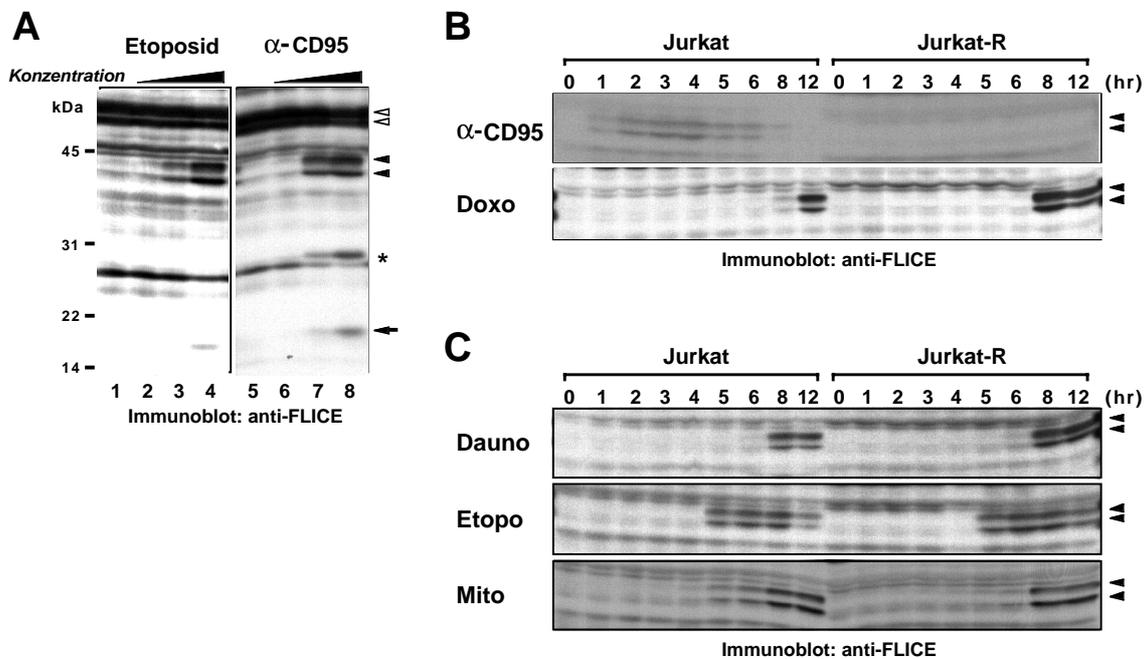
in konzentrationsabhängiger Weise die Prozessierung von PARP in beiden Zelllinien (Abb. 10C).



**Abb. 10: Apoptose durch Chemotherapeutika wird durch Caspasen vermittelt und erfolgt unabhängig von einer CD95-Signaltransduktion.** (A)  $3 \times 10^4$  CD95-sensitive Jurkat- oder CD95-resistente Jurkat-R-Zellen wurden mit Medium (*schwarze oder gestreifte Balken*) oder mit  $100 \mu\text{M}$  zVAD-fmk (*weiße Balken*) für 1 h vorinkubiert und anschließend mit  $20 \text{ ng/ml}$  anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95),  $5 \mu\text{g/ml}$  Daunorubicin (*Daun*),  $1 \mu\text{g/ml}$  Doxorubicin (*Doxo*),  $25 \mu\text{g/ml}$  Etoposid (*Etop*) oder  $25 \mu\text{g/ml}$  Mitomycin C (*Mito*) stimuliert. Die Induktion der Apoptose wurde nach 24 h mittels Propidiumiodid-Färbung hypodiploider Zellkern im Durchflußzytometer bestimmt. Zelltod wurde durch Aufnahme von Propidiumiodid in tote Zellen im Durchflußzytometer bestimmt. (B, C)  $1 \times 10^6$  Jurkat oder Jurkat-R-Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer stimuliert mit (B)  $5 \mu\text{g/ml}$  Daunorubicin oder (C) für 6 h mit verschiedenen Konzentrationen an Etoposid (*Spur 1, 5: Solvenskontrolle; Spur 2, 6: 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ; Spur 3, 7: 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Spur 4, 8: 25  $\mu\text{g/ml}$* ). Die zellulären Proteine wurden mittels 8-15%-iger SDS-PAGE aufgetrennt, und die durch Caspasen vermittelte Spaltung von PARP im Westernblot nachgewiesen. Die offenen Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene 116 kD-Form, die gefüllten Pfeilköpfe das gespaltene 89 kD-Fragment von PARP.

*Caspase-8/FLICE wird durch Chemotherapeutika unabhängig von einer CD95L/Rezeptor-Interaktion aktiviert*

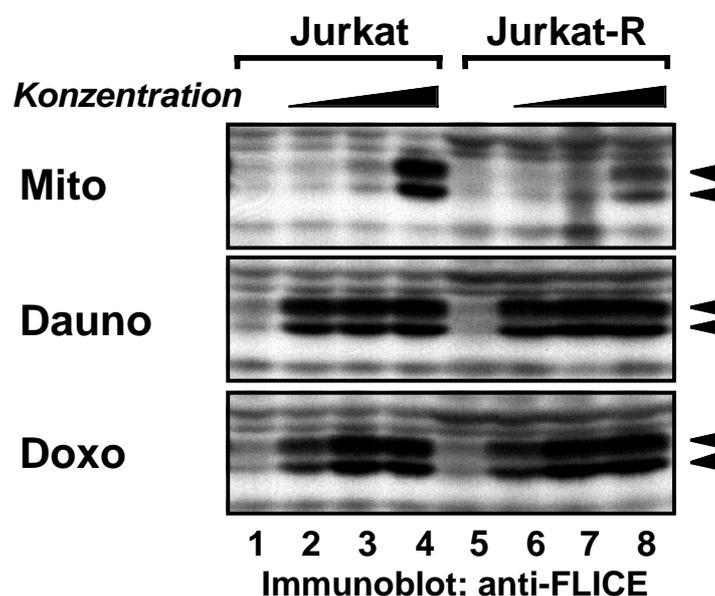
Bei der durch CD95 vermittelten Apoptose wird die Caspase-Kaskade durch die Bindung von Procaspase-8 an den DISC und die nachfolgende Prozessierung zur aktiven Caspase-8 eingeleitet. Da Chemotherapeutika die Aktivierung von Caspasen unabhängig von CD95 vermittelten, wurde eine mögliche Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika untersucht. Caspase-8 wird als zwei Isoformen von 53 und 55 kD (Caspase-8a und -8b) synthetisiert, die nach Bildung eines Intermediates von 41 kD und 43 kD zum Heterodimer aus einer p18- und einer p10-Untereinheit prozessiert werden (Medema et al., 1997; Scaffidi et al., 1997). Mit einem Antikörper gegen die p18-Untereinheit konnte festgestellt werden, daß die Aktivierung des CD95-Signalweges zur Prozessierung



**Abb. 11: Chemotherapeutika induzieren die Aktivierung von Caspase-8 unabhängig von einer Signaltransduktion durch CD95.** (A)  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Etoposid (*Spur 1*: Solvenskontrolle; *Spur 2*: 0,5 µg/ml; *Spur 3*: 5 µg/ml; *Spur 4*: 50 µg/ml) für 6 h oder mit anti-CD95 (*Spur 5*: Solvenskontrolle; *Spur 6*: 2,5 ng/ml; *Spur 7*: 50 ng/ml; *Spur 8*: 1000 ng/ml) für 3 h inkubiert. Die zellulären Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Spaltung von Caspase-8 wurde im Westernblot mittels Antikörper gegen die p18-Untereinheit nachgewiesen. Offene Pfeilköpfe zeigen die beiden Isoformen von Procaspase-8 (Procaspase-8a und -8b), die in die intermediären Formen p43 und p41 (*gefüllte Pfeilköpfe*) gespalten werden und letztlich weiter in die aktive p18-Untereinheit (*gefüllter Pfeil*) prozessiert werden. Die leichte IgG-Kette des stimulatorischen anti-CD95-Antikörpers ist mit einem Stern gekennzeichnet. (B)  $1 \times 10^6$  Jurkat- oder Jurkat-R-Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 1 µg/ml anti-CD95 (*α-CD95*), 1 µg/ml Doxorubicin (*Doxo*) oder (C) mit 5 µg/ml Daunorubicin (*Dauno*), 20 µg/ml Etoposid (*Etopo*) oder 25 µg/ml Mitomycin C (*Mito*) stimuliert. Die zellulären Lysate wurden mit anti-Caspase-8 wie in (A) beschrieben im Westernblot nachgewiesen. Es ist jeweils nur der Ausschnitt der gespaltenen Intermediate (p43 und p41; *Pfeilköpfe*) von Caspase-8a und Caspase-8b gezeigt.

von Procaspase-8 in seine charakteristischen Intermediate und zur aktiven p18-Untereinheit führte (Abb. 11A). Ein gleichartiges Prozessierungsmuster wurde nach Behandlung von Jurkat-Zellen mit Etoposid erhalten (Abb. 11A), so daß Caspase-8 auch durch einen apoptotischen Signalweg unabhängig vom Todesrezeptor CD95 aktiviert werden konnte.

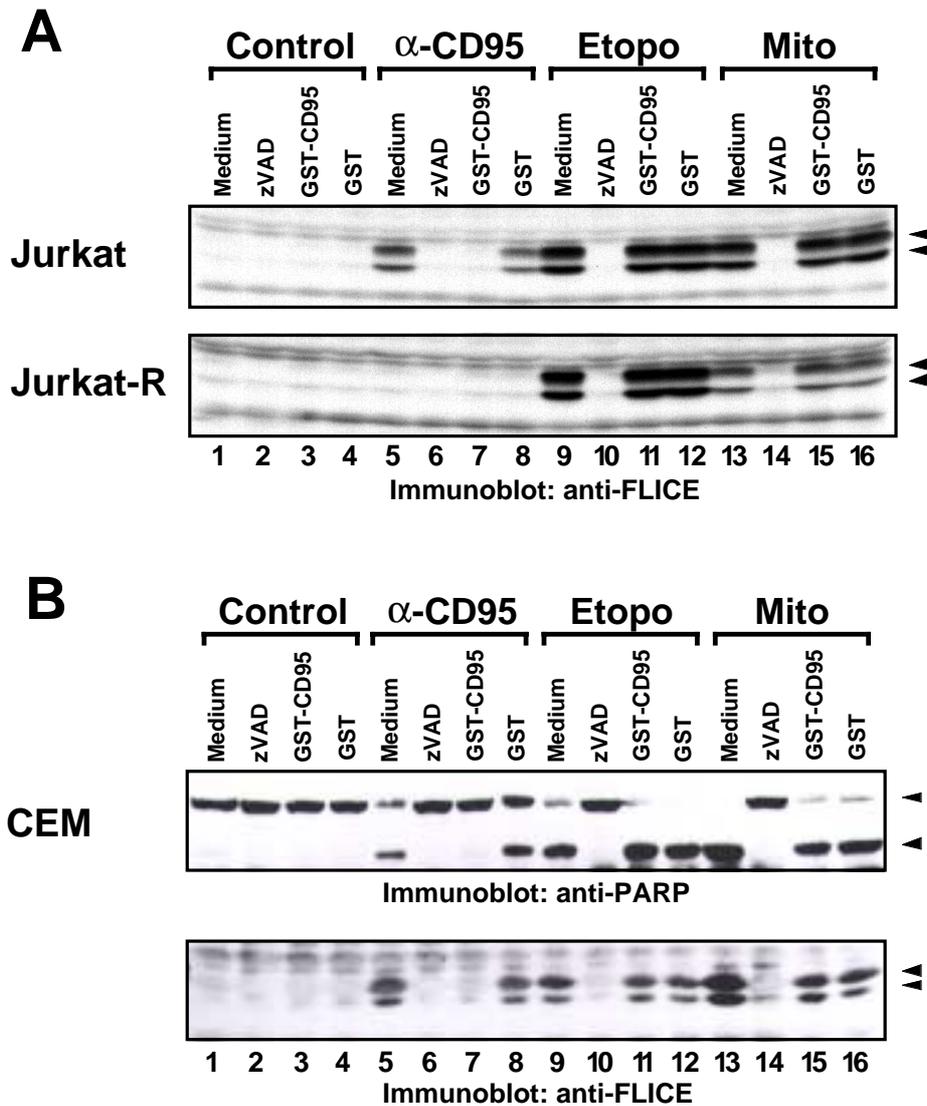
In einer Kinetik wurde Caspase-8 durch anti-CD95 in sensitiven Jurkat-Zellen bereits nach einer Stunde zu den p43/41-Intermediaten prozessiert, während in CD95-resistenten Jurkat-R-Zellen keine Prozessierung beobachtet werden konnte (Abb. 11B). Doxorubicin und Daunorubicin induzierten die Prozessierung sowohl in Jurkat als auch in Jurkat-R-Zellen in einer vergleichbaren Kinetik nach acht bis zwölf Stunden (Abb. 11B und C). Die Aktivierung von Caspase-8 nach Behandlung mit Etoposid und Mitomycin C erfolgte im Vergleich zu Doxorubicin und Daunorubicin etwas früher. Die Behandlung mit Etoposid führte bereits nach fünf Stunden zu einer signifikanten Aktivierung von Caspase-8. Mitomycin C induzierte die Prozessierung von Caspase-8 nach acht Stunden (Abb. 11C). Alle eingesetzten Chemotherapeutika induzierten die proteolytische Aktivierung von Caspase-8 in einem Konzentrationsbereich, der auch im Plasma von Patienten während der Chemotherapie erreicht werden kann (Abb. 12).



**Abb. 12: Dosisabhängige Spaltung von Caspase-8 durch Mitomycin C, Daunorubicin und Doxorubicin.**  $1 \times 10^6$  Jurkat- und Jurkat-R-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Mitomycin C (*Spur 1, 5*: Solvenskontrolle; *Spur 2, 6*: 6,25 µg/ml; *Spur 3, 7*: 12,5 µg/ml; *Spur 4, 8*: 25 µg/ml für 6 h), Daunorubicin (*Spur 1, 5*: Solvenskontrolle; *Spur 2, 6*: 1,25 µg/ml; *Spur 3, 7*: 2,5 µg/ml; *Spur 4, 8*: 5 µg/ml für 10 h) oder Doxorubicin (*Spur 1, 5*: Solvenskontrolle; *Spur 2, 6*: 0,5 µg/ml; *Spur 3, 7*: 1 µg/ml; *Spur 4, 8*: 2 µg/ml für 10 h) stimuliert. Anschließend wurden die Zellysate mit anti-Caspase-8 wie in Abb. 12A beschrieben im Westernblot nachgewiesen. Die Pfeilköpfe zeigen die gespaltenen Intermediate (p43 und p41) von Caspase-8a und Caspase-8b.

*Die Inhibition der CD95/Rezeptor-Interaktion hat keine Auswirkungen auf die Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika*

Darüberhinaus wurde der Effekt des neutralisierenden GST-CD95-Fusionsproteins auf die Aktivierung von Caspase-8 nach Behandlung mit Chemotherapeutika untersucht. Während GST-CD95 die Prozessierung von Caspase-8 durch anti-CD95 (Abb. 13A) oder



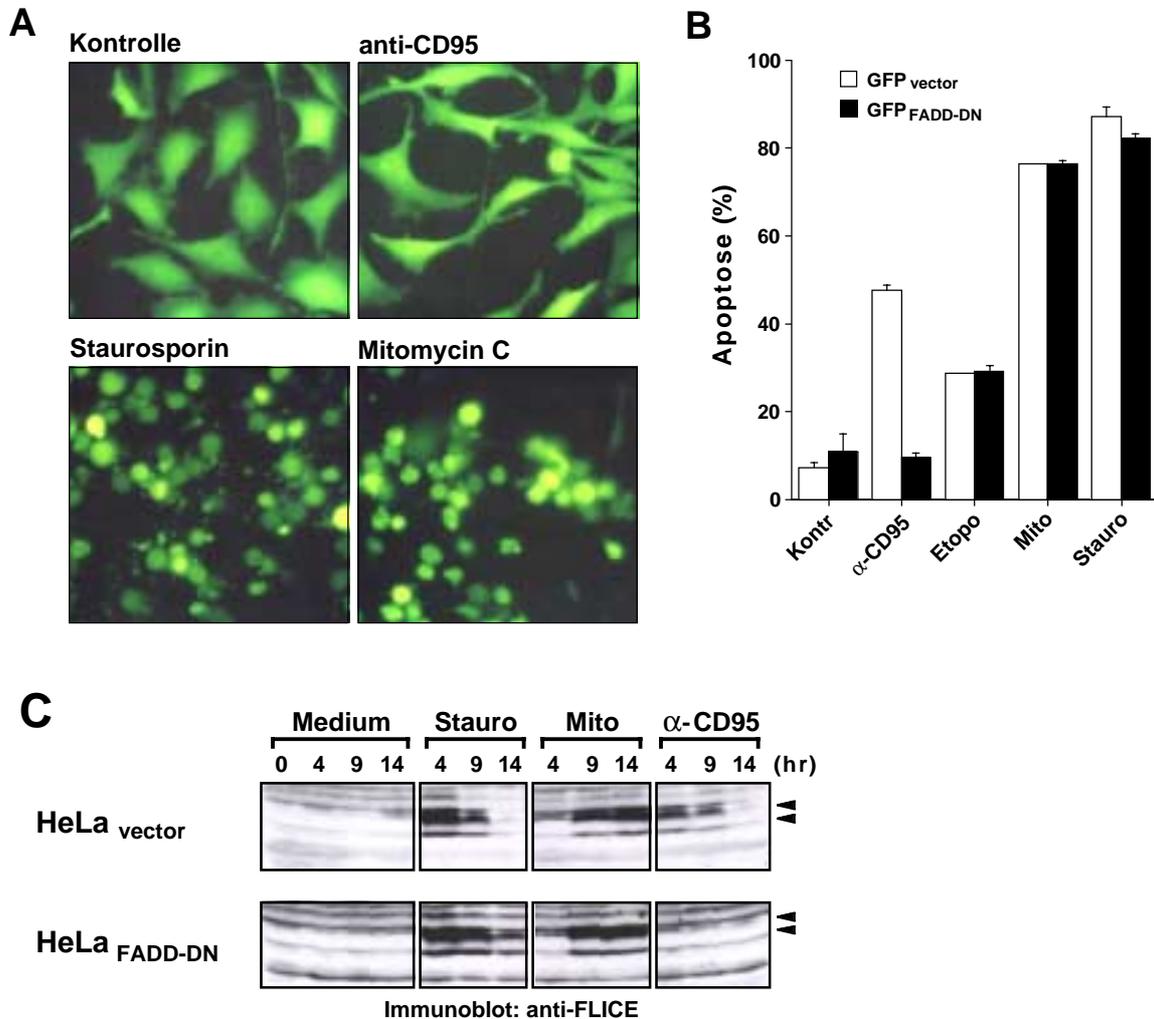
**Abb. 13: Die Inhibition des CD95-Signalweges durch GST-CD95 hat keinen Einfluß auf die Spaltung von Caspase-8 und PARP durch Chemotherapeutika.** (A) Jurkat, Jurkat-R-Zellen oder (B) CEM-Zellen (jeweils  $1 \times 10^6$ ) wurden für 1 h mit Medium, 100  $\mu$ M zVAD-fmk, 100  $\mu$ g/ml GST-CD95 oder 100  $\mu$ g/ml GST vorbehandelt und anschließend mit Medium (*Control*), 20 ng/ml anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95; für 3 h), 25  $\mu$ g/ml Etoposid (*Etopo*; für 6 h) oder Mitomycin C (*Mito*; für 6 h) stimuliert. Die zellulären Proteine wurden wie in Abb. 12A beschrieben mit anti-Caspase-8 (A und B) oder mit anti-PARP (B) im Westernblot nachgewiesen. Die Pfeilköpfe zeigen im anti-Caspase-8-Immunoblot die gespaltenen Intermediate (p43 und p41) von Caspase-8a und Caspase-8b. Im anti-PARP-Immunoblot zeigen die Pfeilköpfe die ungespaltenen p116- und die gespaltene p89-Form von PARP.

rekombinantem CD95L (Daten nicht gezeigt) unterband, hatte GST-CD95 keinen Einfluß auf die Prozessierung von Caspase-8 nach Behandlung mit Etoposid oder Mitomycin C sowohl in CD95-sensitiven als auch in CD95-resistente Jurkat-Zellen. GST als Kontrolle beeinflusste die Aktivierung von Caspase-8 in keinem Falle. Im Gegensatz zu GST-CD95 verhinderte der Caspaseninhibitor zVAD-fmk die Aktivierung von Caspase-8 nicht nur nach Behandlung mit anti-CD95, sondern auch mit Etoposid und Mitomycin C. Die entsprechenden Ergebnisse wurden in leukämischen CEM-Zellen erhalten, in denen sowohl anti-CD95 als auch Chemotherapeutika die Prozessierung von PARP als auch die Aktivierung von Caspase-8 induzierten (Abb. 13B). Vergleichbar mit Jurkat-Zellen wurde nur die Caspasenaktivierung infolge der Behandlung mit anti-CD95, aber nicht mit Chemotherapeutika durch das neutralisierende GST-CD95-Konstrukt inhibiert. Die Aktivierung von Caspasen durch Chemotherapeutika erfolgte also unabhängig von einer Bindung von CD95L an seinen Rezeptor.

*Die Aktivierung von Caspase-8 und Apoptose durch Chemotherapeutika ist unabhängig von einer Signaltransduktion durch Todesrezeptoren*

Da Caspase-8 die proximale Caspase bei der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose ist, implizierten bisherige Daten andere Mechanismen, die zur Aktivierung von Caspase-8 führten. Caspase-8 wird nicht nur an den DISC von CD95 rekrutiert, sondern ebenfalls an die Rezeptoren für TNF und TRAIL. Um eine mögliche Rolle der Todesrezeptoren bei der Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika vollständig ausschließen zu können, wurde die Wirkung von Chemotherapeutika auf HeLa-Zellen untersucht, die stabil eine GFP-fusionierte, dominant-negative Mutante des Adaptorproteins FADD exprimierten, der die zur Induktion von Apoptose essentielle Todeseffektordomäne fehlte (Wajant et al., 1998). FADD ist für die Transduktion apoptotischer Signale via CD95, TNF-Rezeptor 1 und den TRAIL-Rezeptoren verantwortlich (Boldin et al., 1996; Wajant et al., 1998; Chinnaiyan et al., 1996; Pan et al., 1997a; Walczak et al., 1997; Chaudhary et al., 1997; Schneider et al., 1997). HeLa-FADD-DN-Zellen sind daher resistent gegenüber anti-CD95 und TRAIL und besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber durch TNF vermittelter Apoptose (Wajant et al., 1998). Die mikroskopische Analyse zeigte, daß die Stimulation mit anti-CD95 keine apoptotischen Veränderungen der HeLa-Zellen nach sich zog, wodurch der protektive Effekt der dominant-negativen FADD-Mutante bestätigt wurde (Abb. 14A). Nach Behandlung der Zellen mit Staurosporin oder Mitomycin C traten hingegen typische apoptotische Erscheinungsbilder wie Zellkondensation und die Bildung apoptotischer

Körperchen auf (Abb. 14A). Bei der gleichzeitigen Messung der DNA-Fragmentation konnten alle cytotoxischen Agentien sowohl in HeLa-FADD-DN als auch in Vektorkontroll-Zellen Apoptose induzieren, wohingegen anti-CD95 Apoptose nur in HeLa-Zellen auslöste, die mit dem Kontrollvektor transfiziert waren (Abb. 14B). In



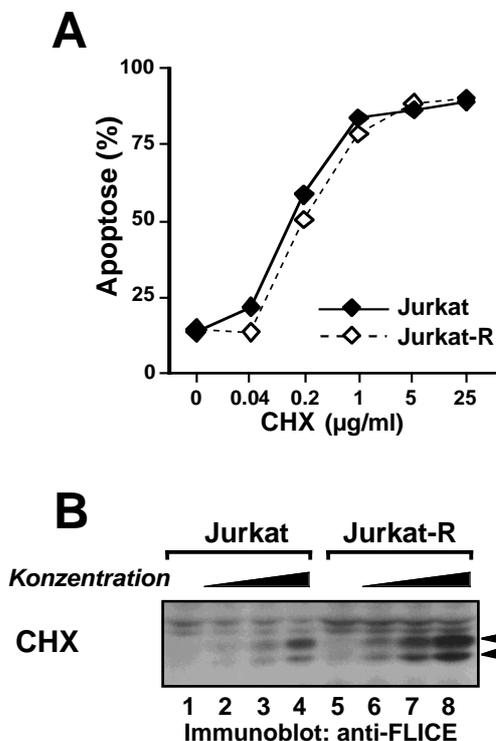
**Abb. 14: Die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose und Aktivierung von Caspase-8 sind unabhängig von einer Signaltransduktion via FADD.** (A und B) HeLa-Zellen ( $4 \times 10^4$ ), die entweder ein Fusionsprotein aus GFP und einer dominant-negativen Mutante von FADD ( $GFP_{FADD-DN}$ ) oder GFP alleine ( $GFP_{vector}$ ) exprimierten, wurden mit Medium (Kontrolle), anti-CD95 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Staurosporin (2,5  $\mu\text{M}$ ), Etoposid (25  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Mitomycin C (25  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt. (A) Nach 24 h wurden die HeLa-FADD-DN-Zellen auf Apoptose-Induktion im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. (B) Anschließend wurden die HeLa-FADD-DN- und HeLa-vector-Zellen lysiert, und die Zahl hypodiploider apoptotischer Zellkerne im Durchflußzytometer bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. (C) HeLa-FADD-DN- oder HeLa-vector-Zellen (jeweils  $1,5 \times 10^6$ ) wurden mit Medium, anti-CD95 (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Staurosporin (2,5  $\mu\text{M}$ ) oder Mitomycin C (25  $\mu\text{g/ml}$ ) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die zellulären Proteine wurden wie in Abb. 12A beschrieben mit anti-Caspase-8 im Westernblot nachgewiesen. Gezeigt werden die gespaltenen Intermediate (p43 und p41) von Caspase-8a und Caspase-8b.

Übereinstimmung damit aktivierten Staurosporin und Mitomycin C Caspase-8 sowohl in HeLa-FADD-DN als auch in HeLa-Vektorkontroll-Zellen, während anti-CD95 die Aktivierung von Caspase-8 nur in HeLa-Vektorkontroll-Zellen induzierte (Abb. 14C). Die Apoptose durch Chemotherapeutika benötigte also keine Signaltransduktion durch Todesrezeptoren. Caspase-8 konnte durch Chemotherapeutika auch unabhängig eines FADD enthaltenden DISC aktiviert werden.

*Die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid aktiviert Caspase-8*

Da die Familie der Todesrezeptoren ständig wächst, konnte eine Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika via eines bisher unbekanntes Todesrezeptors nicht ausgeschlossen werden, der apoptotische Signale unabhängig von FADD transduziert. Daher wurde untersucht, ob die *de novo*-Synthese anderer Todesliganden wie z. B. TNF oder TRAIL an der Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, behandelt. In einigen Zelltypen löst die alleinige Inhibition der Translation durch Cycloheximid Apoptose aus. Diese Apoptose ist unabhängig von einer Signaltransduktion durch CD95 und fand in gleichem Ausmaß in Jurkat- und Jurkat-R-Zellen statt (Abb. 15A). Die Behandlung mit Cycloheximid induzierte die Prozessierung von Caspase-8 ohne Beteiligung weiterer Stimuli in CD95-sensitiven und CD95-resistenten Zellen (Abb. 15B). Damit konnte eine induzierbare Expression von CD95L

oder anderer Todesliganden als unverzichtbare Voraussetzung für die Aktivierung von Caspase-8 und nachfolgender Apoptose ausgeschlossen werden.



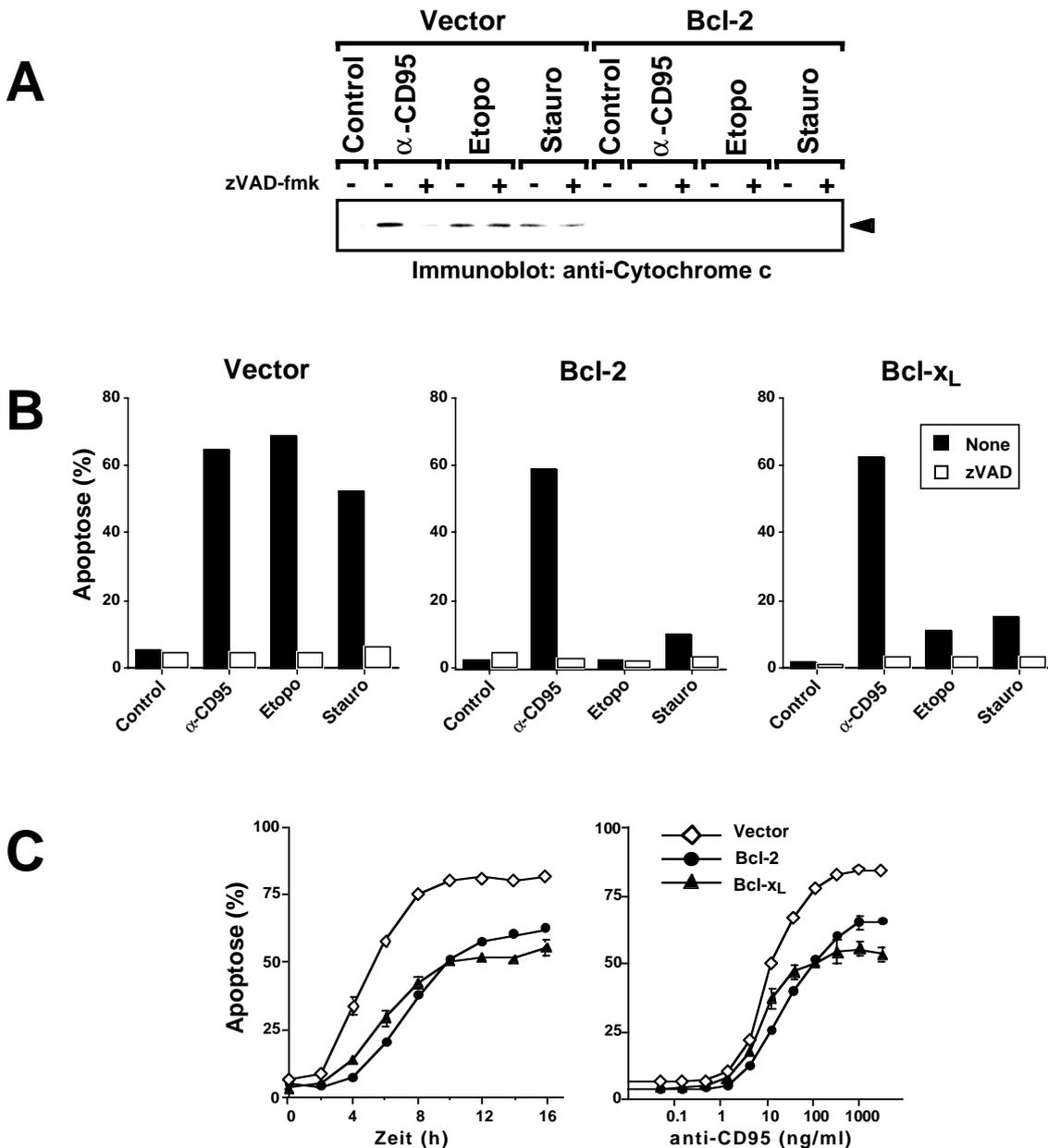
**Abb. 15: Die Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid induziert Apoptose und die Spaltung von Caspase-8.** (A)  $3 \times 10^4$  CD95-sensitiven Jurkat- (geschlossene Rauten) oder CD95-resistente Jurkat-R-Zellen (offene Rauten) wurden in den angegebenen Konzentrationen an Cycloheximid (CHX) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose-Induktion anhand der hypodiploiden Zellkerne im Durchflußzytometer quantifiziert. (B)  $1 \times 10^6$  Jurkat- oder Jurkat-R-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cycloheximid (Spur 1, 5: Solvenskontrolle; Spur 2, 6: 0,4 µg/ml; Spur 3, 7: 2 µg/ml; Spur 4, 8: 10 µg/ml) für 5 h inkubiert. Die Spaltung von Caspase-8 wurde in Zellysaten wie in Abb. 12A beschrieben nachgewiesen. Die Pfeilköpfe zeigen jeweils die gespaltenen Intermediate (p43 und p41) von Caspase-8a und Caspase-8b.

### **3.2 Caspase-8/FLICE dient als Effektorcaspase in Apoptose durch Chemotherapeutika**

*Die Cytochrom c-Freisetzung und die Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika wird durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine inhibiert*

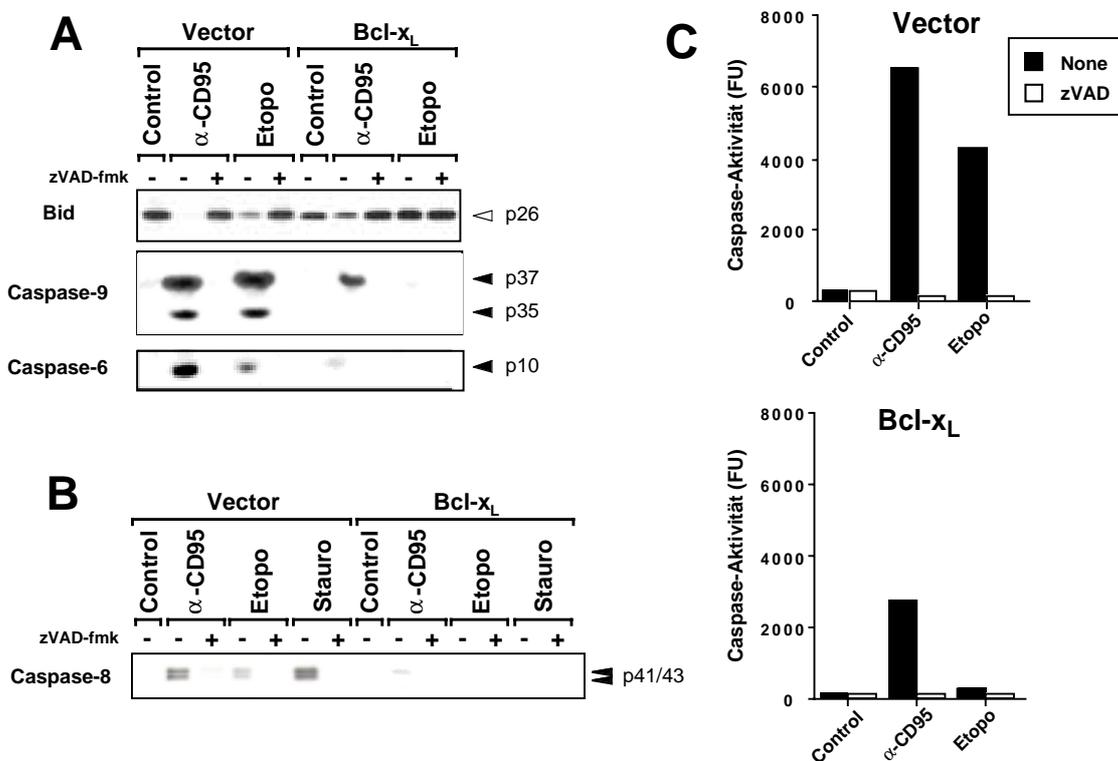
Caspase-8 verbindet die Signaltransduktion von Todesrezeptoren mit der Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges durch die Prozessierung von Bid, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Die vorherigen Experimente zeigten, daß zur Induktion von Apoptose und Aktivierung von Caspase-8 durch Chemotherapeutika Todesrezeptoren keine Voraussetzung sind. Ob Caspase-8 durch Chemotherapeutika oberhalb oder unterhalb der Mitochondrien aktiviert wird, wurde mittels Jurkat-Zellen untersucht, die stabil Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> überexprimierten, die beide die Translokation von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol inhibierten. Die Stimulation der Vektorkontrollzellen mit anti-CD95 induzierte die Freisetzung von Cytochrom c. Dies wurde durch den Caspaseninhibitor zVAD-fmk deutlich inhibiert (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu erfolgte die Freisetzung von Cytochrom c nach Stimulation mit Etoposid oder Staurosporin unabhängig von Caspasen, da die Inkubation mit zVAD-fmk keinen Effekt hatte. Die Expression von Bcl-2 (Abb. 16A) oder Bcl-x<sub>L</sub> (Daten nicht gezeigt) unterband die Translokation von Cytochrom c ins Cytosol nach Behandlung mit anti-CD95 und Chemotherapeutika. Trotz dieser Inhibition hatte die Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> keine größeren Auswirkungen auf die durch CD95 vermittelte Apoptose, wohingegen beide Proteine den durch Chemotherapeutika induzierten Zelltod signifikant inhibierten (Abb. 16B und C). Um den Einfluß der überexprimierten Bcl-2-Proteine auf postmitochondriale Ereignisse zu bestimmen, wurde die Prozessierung von Bid in sein proapoptotisches Fragment sowie die proteolytische Aktivierung sowohl der Initiatorcaspase-9 als auch der Effektorcaspase-6 untersucht. Die Stimulation der Vektorkontrollzellen sowohl mit anti-CD95 als auch mit Chemotherapeutika führte zur Prozessierung von Bid, Caspase-9 und Caspase-6 (Abb. 17A). Dies konnte durch den Caspaseninhibitor zVAD-fmk verhindert werden. In Bcl-x<sub>L</sub> exprimierenden Zellen wurde die Prozessierung von Bid und die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-6 nach Behandlung mit anti-CD95 teilweise unterdrückt, nach Stimulation mit Chemotherapeutika vollständig geblockt.

Die Aktivierung von Bid sowie von Caspase-9 und Caspase-6 korrelierte mit der Prozessierung von Caspase-8 (Abb. 17B). Die Stimulation der Vektorkontrollzellen mit



**Abb. 16: Chemotherapeutika induzieren unabhängig von Caspasen eine durch Bcl-2 inhibierbare Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien.** (A) Effekte von Bcl-2 und dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk auf die Cytochrom c-Freisetzung.  $5 \times 10^6$  Jurkat-Kontrollvektor-Zellen (*Vector*) oder stabil Bcl-2 überexprimierende Jurkat Zellen (*Bcl-2*) wurden mit Medium oder 100  $\mu$ M zVAD-fmk für 1 h vorbehandelt und anschließend mit Medium (*Control*; 6 h), anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95; 1  $\mu$ g/ml; 3 h), Etoposid (*Etopo*; 25  $\mu$ g/ml; 6 h) oder Staurosporin (*Stauro*; 2,5  $\mu$ M; 3 h) stimuliert. Die Zellen wurden homogenisiert, die cytosolischen S10-Fractionen anschließend mittels 15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol wurde durch Westernblot bestimmt und wird durch die Pfeilköpfe angezeigt. (B) Wirkung auf die Apoptose-Induktion.  $3 \times 10^4$  Jurkat-Zellen, entweder stabil mit dem Kontrollvektor alleine (*Vector*) oder mit Bcl-x<sub>L</sub> oder Bcl-2 transfiziert, wurden mit Medium (*schwarze Balken*) oder mit 100  $\mu$ M zVAD-fmk (*weiße Balken*) für 1 h vorbehandelt und anschließend mit Medium (*Control*), anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95; 1  $\mu$ g/ml), Etoposid (*Etopo*; 25  $\mu$ g/ml) oder Staurosporin (*Stauro*; 2,5  $\mu$ M) für 14 h stimuliert. Die Induktion von Apoptose wurde im Durchflußzytometer mittels Propidiumiodidfärbung hypodiploider Zellkerne bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. (C) Effekt von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> auf CD95-vermittelte Apoptose. Jurkat-Kontrollvektor-Zellen oder Bcl-2- oder Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierende Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD95 (*links*) oder mit verschiedenen Konzentrationen an anti-CD95 für 16 h (*rechts*) behandelt. Es werden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen gezeigt.

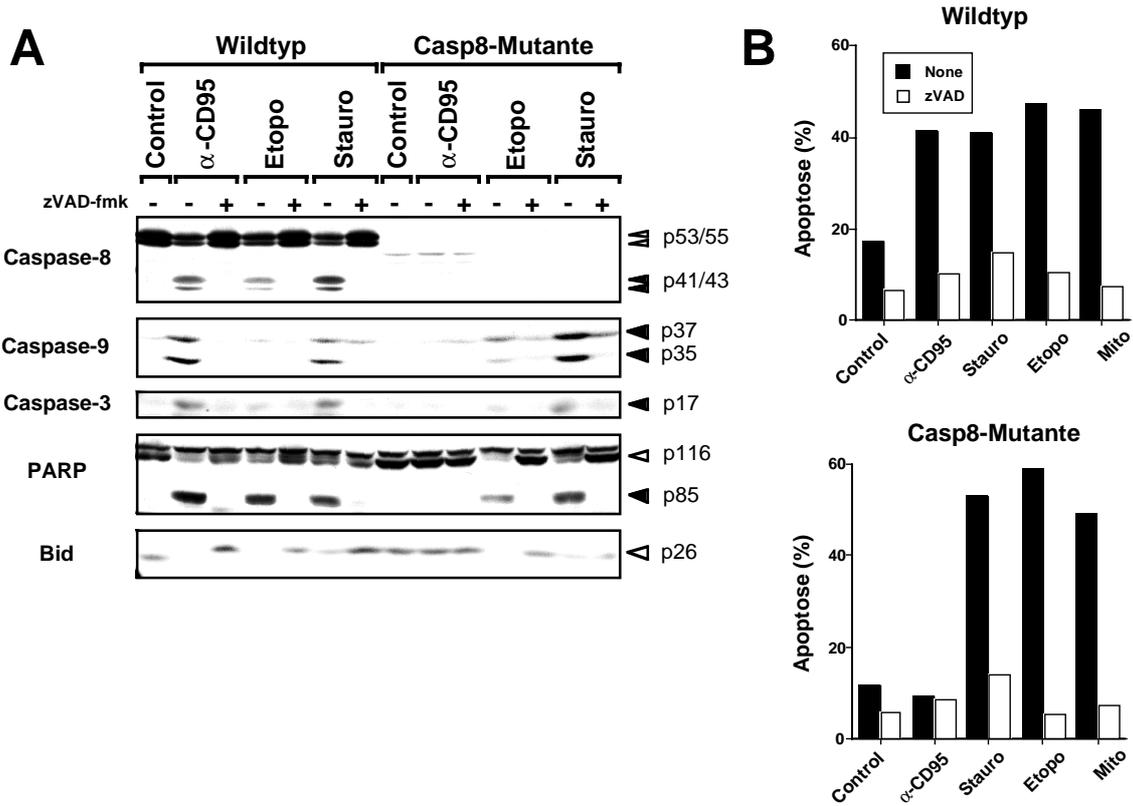
anti-CD95, Staurosporin oder Etoposid induzierte die Aktivierung von Caspase-8. Die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> verhinderte vollständig die Prozessierung von Caspase-8 durch die Stimuli, die unabhängig von Todesrezeptoren wirken. Nach Stimulation mit anti-CD95 wurde die Prozessierung von Caspase-8 nur attenuiert. Ein vergleichbarer Effekt von Bcl-x<sub>L</sub> wurde bei der Messung von Caspase-Aktivitäten mit fluorogenen Substraten beobachtet (Abb. 17C). Nach Stimulation mit Chemtherapeutika findet folglich die Prozessierung von Caspase-8 unterhalb der Mitochondrien statt, da zum einen Bcl-x<sub>L</sub> die Aktivierung vollständig verhinderte und zum anderen Caspasen für die Freisetzung von Cytochrom c nicht verantwortlich waren.



**Abb. 17: Todesrezeptor-unabhängige Stimuli aktivieren Caspase-8, Bid und andere Caspasen unterhalb der Mitochondrien.** (A, B) Effekt von Bcl-x<sub>L</sub> und zVAD-fmk auf Bid-Spaltung, Caspase-9- und Caspase-6-Aktivierung. 2 x 10<sup>6</sup> Jurkat-Zellen, stabil entweder mit dem Kontrollvektor allein (*Vector*) oder mit Bcl-x<sub>L</sub> transfiziert, wurden wie in Abb. 16A beschrieben vorbehandelt und stimuliert. Bid-, Caspase-9-, Caspase-6- und Caspase-8-Aktivierung wurden durch Westernblot bestimmt. Offene Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene, geschlossene Pfeilköpfe die gespaltene Form der angegebenen Proteine. (C) Effekt auf die Caspase-3-Aktivierung. Jurkat-Kontrollvektor-Zellen und Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierende Zellen wurden wie oben beschrieben vorbehandelt und stimuliert. Nach 4 h Stimulation wurden Zellysate präpariert, mit dem fluorogenen Caspase-Substrat DEVD-AMC inkubiert und in einem Spektrofluorometer vermessen. Die Caspase-Aktivität ist in relativen Einheiten angegeben.

*Caspase-8 ist für Apoptose durch Chemotherapeutika nicht erforderlich*

Die Aktivierung von Caspase-8 unterhalb der Mitochondrien eröffnete die Frage, ob Caspase-8 auch im mitochondrialen Apoptoseweg als Initiatorcaspase fungiert oder ob Caspase-8 unterhalb von Caspase-9 aktiviert wird. Da das Motiv der Todeseffektordomäne (DED) dem der Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) von Caspase-9 ähnelt, könnte Caspase-8 von Apaf-1 gebunden werden und damit als proximale Caspase distal von Mitochondrien die Caspase-Kaskade initiieren. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein Caspase-8 defizienter Jurkat-Klon (Juo et

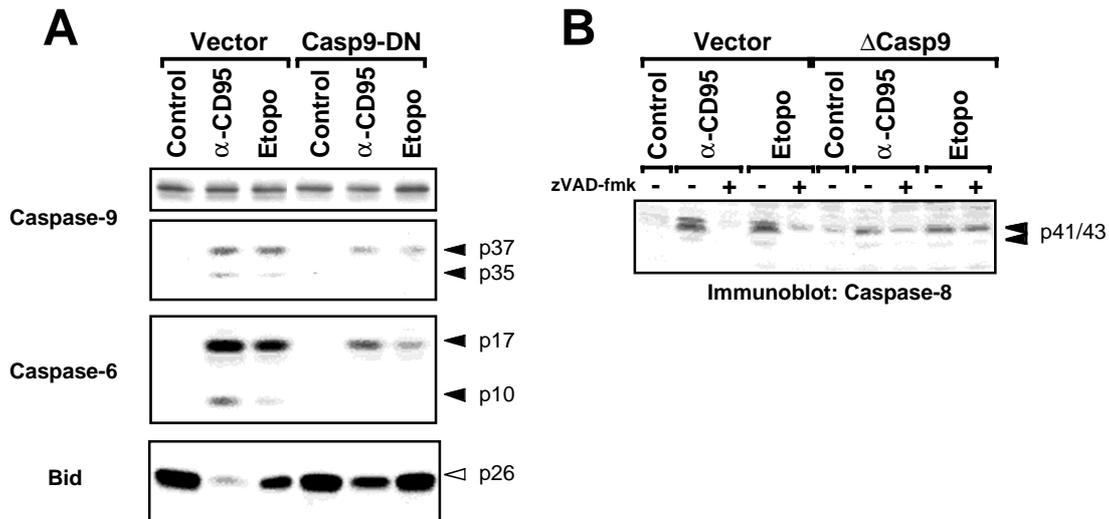


**Abb. 18: Caspase-8 ist nicht essentiell für Apoptose durch Chemotherapeutika.** (A)  $2 \times 10^6$  Caspase-8-defiziente Jurkat-Zellen (*Casp8-mutant*) oder die parentalen Jurkat-A3-Zellen (*wild type*) wurden mit oder ohne  $100 \mu\text{M}$  zVAD-fmk für 1 h vorinkubiert und anschließend mit Medium (*Control*; 6 h), anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95;  $1 \mu\text{g/ml}$ ; 3 h), Etoposid (*Etopo*;  $25 \mu\text{g/ml}$ ; 6 h) oder Staurosporin (*Stauro*;  $2,5 \mu\text{M}$ ; 3 h) stimuliert. Die zellulären Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die proteolytische Prozessierung von Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3, PARP und Bid wurde im Westernblot nachgewiesen. Offene Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene, geschlossene Pfeilköpfe die gepaltene Form des angegebenen Proteins. (B)  $3 \times 10^4$  Caspase-8-defiziente Jurkat-Zellen (*Casp8-mutant*) oder parentale Jurkat-Zellen (*wild type*) wurden mit Medium (*schwarze Balken*) oder mit  $100 \mu\text{M}$  zVAD-fmk (*weiße Balken*) für 1 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (*Control*), anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95;  $1 \mu\text{g/ml}$ ), Etoposid (*Etopo*;  $25 \mu\text{g/ml}$ ) oder Staurosporin (*Stauro*;  $2,5 \mu\text{M}$ ) für 24 h stimuliert. Die Induktion von Apoptose wurde im Durchflußzytometer durch Propidiumiodidfärbung hypodiploider Zellkerne bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

al., 1998) herangezogen. Nach Stimulation der parentalen Jurkat A3-Zellen mit anti-CD95, Staurosporin und Etoposid wurde Caspase-8 prozessiert, während in Caspase-8 defizienten Zellen keine Caspase-8 beobachtet werden konnte (Abb. 18A). Wie schon früher gezeigt (Juo et al., 1998), war dieser Zellklon durch die Defizienz an Caspase-8-Expression resistent gegenüber anti-CD95 (Abb. 18B), was die absolute Erfordernis von Caspase-8 für die CD95-Signaltransduktion unter Beweis stellte. Aufgrund der Caspase-8-Defizienz wurde ebenfalls keine Aktivierung von Caspase-3 und keine Prozessierung von PARP nach Stimulation mit anti-CD95 gefunden (Abb. 18A). Die Behandlung der Caspase-8 defizienten Zellen mit Staurosporin oder Etoposid führte hingegen zu einer Prozessierung von Caspase-3 in einem ähnlichen Ausmaß wie in den parentalen Zellen (Abb. 18A,B). Diese Aktivierung wurde sehr wahrscheinlich von Caspase-9 vermittelt, da die Aktivierung von Caspase-9 unabhängig von Caspase-8-Expression durch Chemotherapeutika induziert wurde. Auch Bid wurde nach Behandlung mit todesrezeptorunabhängigen Stimuli trotz Abwesenheit von Caspase-8 prozessiert (Abb. 18A). Caspase-8 kann also nicht allein für die proapoptotische Aktivierung von Bid verantwortlich sein. Zwar konnte nachgewiesen werden, daß Caspase-8 keine Voraussetzung für die Induktion von Apoptose unabhängig von Todesrezeptoren ist, aber die Möglichkeit, daß Caspase-8 parallel mit Caspase-9 die Rolle einer Initiatorcaspase im mitochondrialen Apoptoseweg erfüllt, konnte nicht ausgeschlossen werden.

#### *Caspase-9 ist ein unverzichtbares Element im mitochondrialen Apoptoseweg*

Um zu untersuchen, ob Caspase-8 Caspase-9 in der mitochondrialen Apoptose ersetzen kann, wurden Jurkat-Zellen generiert, die stabil eine dominant-negative Mutante von Caspase-9 überexprimierten, in der der Cysteinrest im aktiven Zentrum durch einen Alaninrest ersetzt worden ist. Die Überexpression der mit einem T7-Tag fusionierten Caspase-9-Mutante wurde mittels Immunoblot verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation der Vektorkontrollzellen mit anti-CD95 oder Chemotherapeutika wie Etoposid induzierte die Prozessierung von Caspase-9, Caspase-6 und Bid (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu war in Jurkat-Zellen, welche die katalytisch inaktive Caspase-9 überexprimierten, die Prozessierung von Caspase-9, Caspase-6 und Bid im Falle von anti-CD95 vermindert, im Falle von Etoposid deutlich inhibiert. Zur weiteren Bewertung dieser Ergebnisse wurden HeLa-Zellen eingesetzt, die stabil ein Fragment von Caspase-9 exprimierten, das die mit GFP fusionierte CARD-Domäne ( $\Delta$ Casp-9) enthielt. Die Stimulation der Vektorkontrollzellen mit anti-CD95 und Etoposid induzierte die Aktivierung von Caspase-8, während die Überexpression von  $\Delta$ Casp-9 die Prozessierung



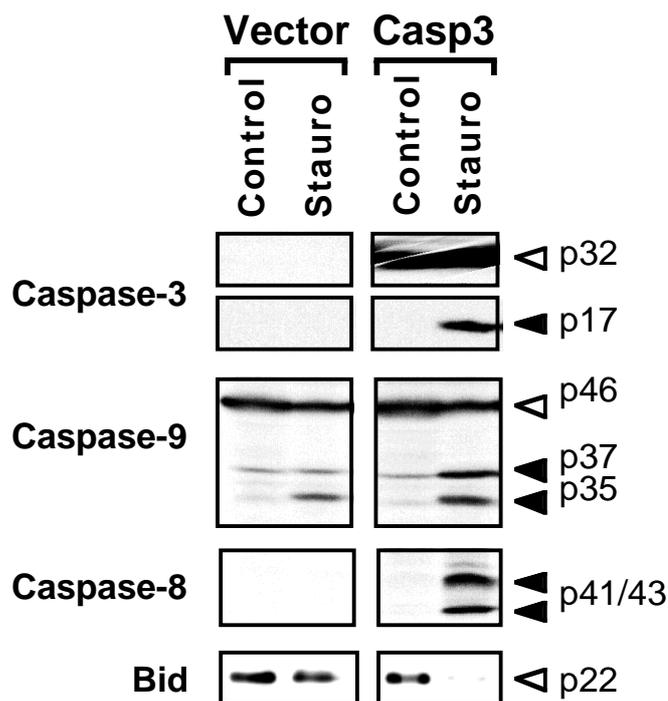
**Abb. 19: Caspase-9 ist essentiell für die Caspase-Aktivierung durch Chemotherapeutika.** (A)  $2 \times 10^6$  Jurkat-Zellen, die entweder den Kontrollvektor (*Vector*) oder eine dominant-negative Mutante von Caspase-9 (*Casp9-DN*) exprimierten, in der der Cystein-Rest des aktiven Zentrums in einen Alanin-Rest mutiert ist (C287A), wurden mit Medium (*Control*; 6 h), anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95; 1  $\mu$ g/ml; 3 h) oder Etoposid (*Etopo*; 25  $\mu$ g/ml; 6 h) stimuliert. Die zellulären Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die proteolytische Prozessierung von Caspase-9, Caspase-6 und Bid wurde im Westernblot nachgewiesen. Der obere Bereich des Caspase-9-Blots zeigt ein unspezifisch immunoreaktives Protein, das als Kontrolle für gleiche Proteinbeladung diente. (B) Stabile Transfektanten von HeLa-Zellen, die entweder GFP alleine (*Vector*) oder ein Fusionsprotein aus der CARD von Caspase-9 und GFP exprimieren ( $\Delta$ *Casp9*), wurden wie in (A) beschrieben behandelt und hinsichtlich der Caspase-8-Aktivierung im Westernblot untersucht. Offene Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene, geschlossene Pfeilköpfe die gespaltene Form des angegebenen Proteins.

von Caspase-8 nach Stimulation mit Etoposid unterband (Abb. 19B). Die Prozessierung von Caspase-8 durch anti-CD95 wurde auch deutlich vermindert. Dies bestätigte, daß es sich bei HeLa-Zellen um Typ-II-Zellen handelt, in denen die Induktion des apoptotischen Programms vom mitochondrialen Apoptoseweg abhängt (Scaffidi et al., 1998).

*Die Prozessierung von Caspase-8 und Bid ist im mitochondrialen Apoptoseweg von der Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 abhängig*

Caspase-8 ist die proximale Caspase in der Signaltransduktion durch Todesrezeptoren, da Caspase-8 zum einen für die Initiation der Caspase-Kaskade verantwortlich ist, zum anderen mittels Prozessierung von Bid die Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c ins Cytosol auslöst. Die durch Chemotherapeutika induzierte Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs hingegen hängt nicht von der Expression von Caspase-8 ab. Als zentraler Mediator erscheint hier Caspase-9. Um die exakte Position von Caspase-8 im mitochondrialen Apoptoseweg zu bestimmen, wurde die humane Brustkarzinom-

Zelllinie MCF-7 eingesetzt, die sich als defizient in der Expression von Caspase-3 erwies (Jänicke et al., 1998a). Dies könnte als Ursache dafür gelten, daß mikroinjiziertes Cytochrom c keine Apoptose in diesen Zellen auszulösen vermochte (Li et al., 1997b). Falls Caspase-8 durch Caspase-3 unterhalb von Caspase-9 aktiviert würde, dürften Chemotherapeutika keine Aktivierung von Caspase-8 in MCF-7-Zellen induzieren. Durch Immunoblot wurde verifiziert, daß MCF-7 keine Caspase-3 exprimieren (Abb. 20). Die Stimulation mit Staurosporin induzierte die Aktivierung von Caspase-9, hatte aber keinen Effekt auf die Prozessierung von Caspase-8 und Bid. Die gleichen Stimuli induzierten allerdings die Aktivierung von Caspase-9, -3 wie auch von Caspase-8 und Bid in MCF-7-Zellen, die mit Caspase-3 transfiziert waren. (Abb. 20). Im mitochondrialen Apoptoseweg nimmt Caspase-8 also eine Position unterhalb von Caspase-9 ein. Die Aktivierung von Caspase-8 ist abhängig von der Expression von Caspase-3. Während Caspase-8 in der Signaltransduktion via Todesrezeptoren als Initiatorcaspase fungiert, dient sie bei der todesrezeptorunabhängigen Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges als Effektorcaspase.



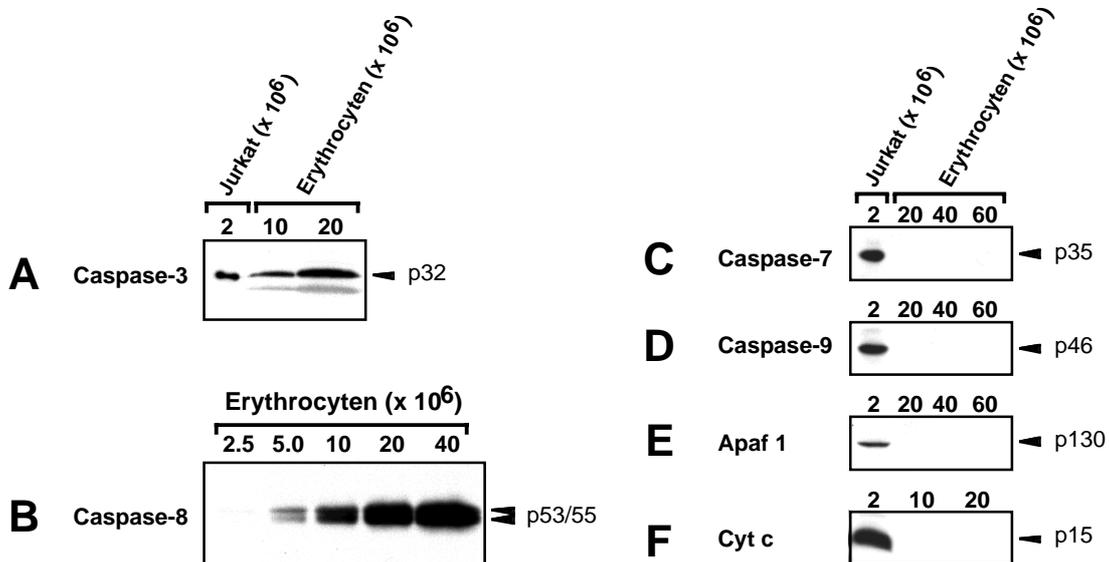
**Abb. 20: Die Spaltung von Caspase-8 und Bid erfolgen im mitochondrialen Todessignalweg nach der Aktivierung von Caspase-3.**  $2 \times 10^6$  Caspase-3-defiziente MCF7-Zellen, die entweder den Kontrollvektor alleine (*Vector*) oder stabil Caspase-3 exprimierten (*Casp3*), wurden mit Medium (*Control*; 5 h) oder Staurosporin (*Stauro*; 2,5  $\mu$ M; 5 h) stimuliert. Die zellulären Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die proteolytische Prozessierung von Caspase-3, Caspase-9, Caspase-8 und Bid wurde im Westernblot nachgewiesen. Offene Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene, geschlossene Pfeilköpfe die gespaltene Form des angegebenen Proteins.

### 3.3 Chemotherapeutika induzieren keine Apoptose im organellefreien Zellsystem der Erythrocyten

Es war bislang unbekannt, ob Apoptose in Erythrocyten funktionell eine Rolle spielt und ob Erythrocyten Bestandteile des apoptotischen Programms enthalten. Humane Erythrocyten stellen ein minimales zelluläres System dar, dem alle membrangebundenen Organellen wie Zellkern, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum fehlen. In kernhaltigen Zellen sind diese Organellen entscheidende Elemente für die Initiations- und Exekutionsphase der Apoptose. Daher war es von Interesse, ob reife Erythrocyten die Möglichkeit besitzen, das apoptotische Programm zu aktivieren.

#### *Erythrocyten enthalten Procaspase-8 und -3*

Zur Bestimmung, ob humane Erythrocyten Caspasen und andere apoptotische Komponenten enthalten, wurden Fraktionen hoch aufgereinigter Erythrocyten aus dem Blut gesunder Spender präpariert und per Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen verschiedene Apoptose-Regulatoren untersucht.  $10 \times 10^6$  Erythrocyten enthielten Caspase-3 in einer vergleichbaren Menge wie  $2 \times 10^6$  Jurkat-Zellen (Abb. 21A). Ebenso der hohe Expressionsgrad dieser Proteine zeigte an, daß die Detektion von Caspase-3 und

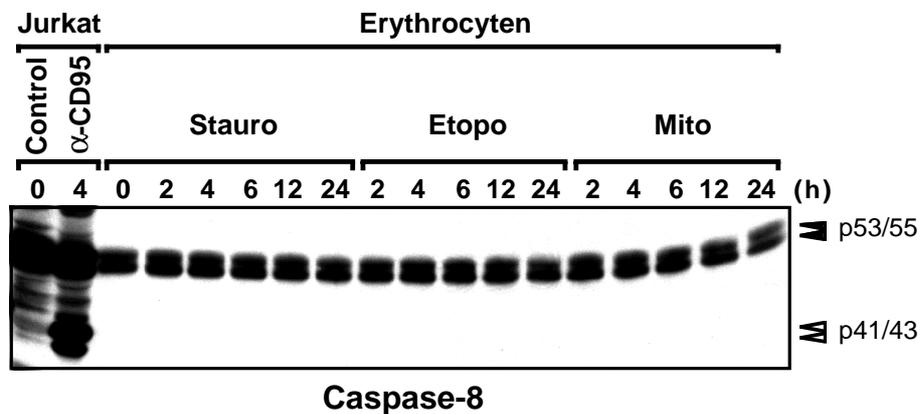


**Abb. 21: Humane Erythrocyten enthalten Procaspase-3 und Procaspase-8.** Lysate der angegebenen Zahl frisch präparierter Erythrocyten oder Jurkat-Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und hinsichtlich Caspase-3- (A) und Caspase-8-Expression (B) im Westernblot untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von Procaspase-7 (C), Procaspase-9 (D), Apaf-1 (E) und Cytochrom c (F) untersucht. Die schwache Proteinbande in (A) repräsentiert ein unspezifisches Protein, das auf der Höhe von Hämoglobin wandert. Die Pfeilköpfe zeigen die angegebenen Proteine in ihrer unprozessierten Form an.

Caspase-8 nicht auf Kontamination mit Leukocyten zurückgeführt werden konnte. Allerdings konnten weder Procaspase-2 und -6 (Daten nicht gezeigt) noch Procaspase-7 und -9 nachgewiesen werden (Abb. 21C,D). Erythrocyten enthielten weder Apaf-1 noch Cytochrom c (Abb. 21E,F). Weiterhin konnten die Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> oder Bad nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Erythrocyten enthielten also Procaspase-8 und -3, aber keinen Bestandteil des mitochondrialen Apoptosoms.

*Caspasen können in intakten Erythrocyten nicht aktiviert werden*

Da Erythrocyten Caspasen enthielten, wurde untersucht, ob deren Caspasen durch apoptogene Stimuli aktiviert werden können, von denen gezeigt worden ist, daß sie in verschiedenen Zelltypen Caspasen-abhängige Apoptose auslösen können (Herr et al., 1997; Goldkorn et al., 1998; Ojcius et al., 1991; Consoli et al., 1998; Bertrand et al., 1994; Wesselborg et al., 1998). Keines der getesteten Chemotherapeutika konnte Signale auslösen, die eine Aktivierung von Caspase-8 nach sich zog (Abb. 22). Auch agonistischer anti-CD95-Antikörper, entweder allein oder in Kombination mit dem Inhibitor der Proteinbiosynthese Cycloheximid (CHX), bewirkte keine Prozessierung von Caspase-8. Darüberhinaus konnten Caspase-3 und Caspase-8 in Erythrocyten weder durch ionisierende Bestrahlung, Ceramide, Oxidantien, TNF $\alpha$  noch durch Phorbol ester oder Calcium-Ionophore aktiviert werden (Tab. 3).



**Abb. 22: Caspasen in Erythrocyten werden nicht durch Todesrezeptor-unabhängige Stimulation mit Staurosporin, Etoposid oder Mitomycin C aktiviert.** Erythrocyten wurden für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin (*Stauro*; 2,5  $\mu$ M), Etoposid (*Etopo*; 25  $\mu$ g/ml) oder Mitomycin C (*Mito*; 25  $\mu$ g/ml) behandelt. Als Positivkontrolle wurden Lysate von  $2 \times 10^6$  unbehandelten Jurkat-Zellen (*Control*) und von Jurkat-Zellen untersucht, die 4 h mit anti-CD95 ( $\alpha$ -CD95; 1  $\mu$ g/ml) inkubiert worden waren. Nach Auftrennung der zellulären Proteine mittels SDS-PAGE wurde die Spaltung von Caspase-8 im Westernblot untersucht. Gefüllte Pfeilköpfe zeigen die ungespaltenen, offene Pfeilköpfe die gespaltenen Formen von Caspase-8.

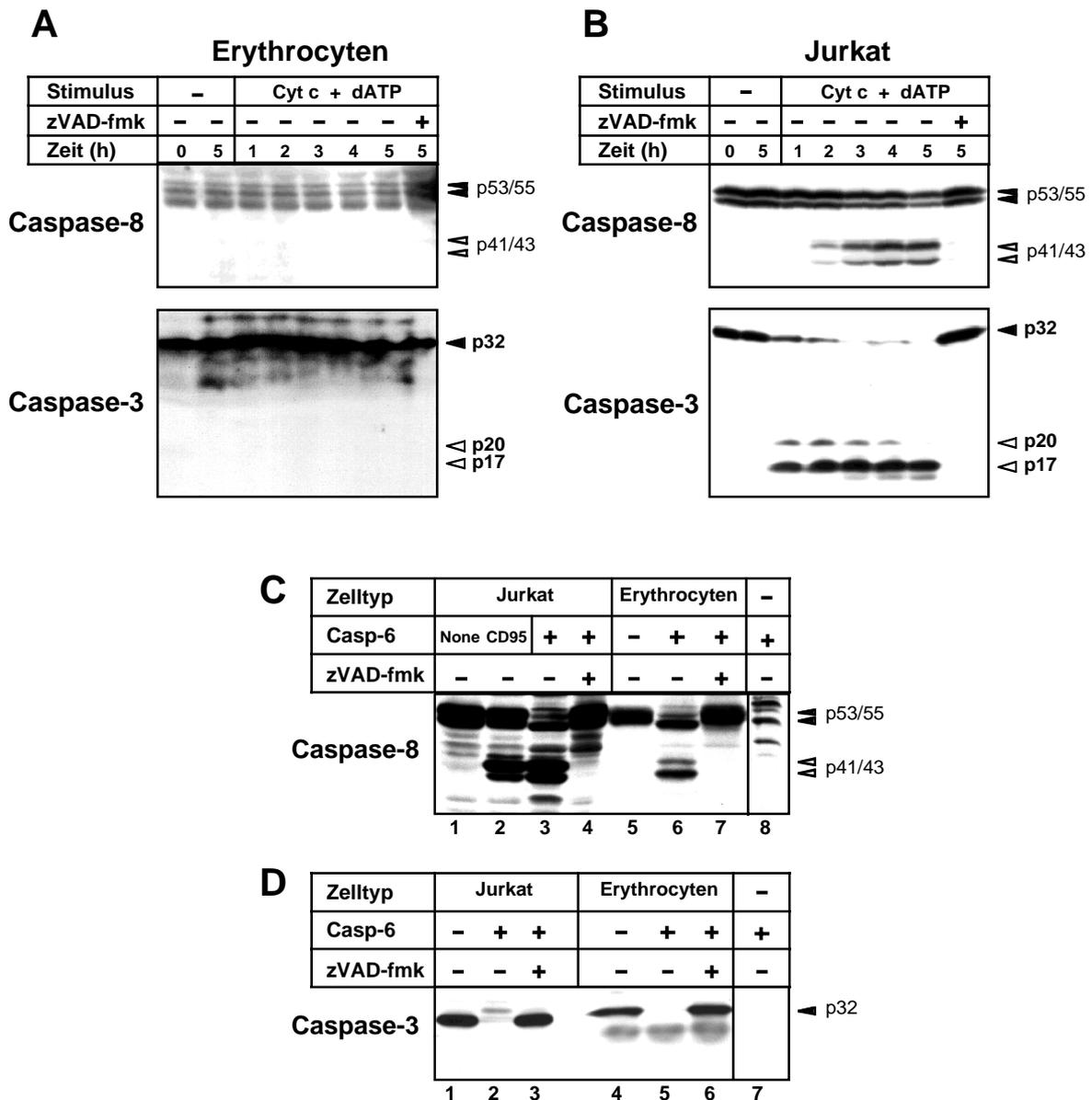
**Tab. 3: Effekt verschiedener apoptotischer Stimuli auf die Caspase-Aktivierung in Erythrocyten.** 50 x 10<sup>6</sup> Erythrocyten wurden mit unterschiedlichen Stimuli für die angegebene Zeit behandelt. Die Caspase-Aktivierung wurde mittels Westernblot bestimmt.

<b>Stimulus</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Zeit</b>	<b>Caspasen-aktivierung</b>
Anti-CD95	1 µg/ml	2 - 24 h	keine
Anti-CD95 + CHX	1 µg/ml 10 µg/ml	2 - 24 h	keine
TNFα	20 ng/ml	0.5 - 72 h	keine
PMA	1 - 8 µM	2 - 4 h	keine
Ionomycin	2 - 16 µM	2 - 4 h	keine
PMA + Ionomycin	1 - 8 µM 2 - 16 µM	2 - 4 h	keine
Etoposid	25 µg/ml	2 - 24 h	keine
Mitomycin C	25 µg/ml	2 - 24 h	keine
Fludarabin	1 - 1000 µM	2 - 24 h	keine
Staurosporin	2.5 µM	2 - 24 h	keine
γ-Bestrahlung	5 - 40 Gy	16 - 48 h	keine
Wasserstoffperoxid	0.5 -1 mM	1 - 5 h	keine
C <sub>2</sub> -Ceramid	50 µM	4 - 12 h	keine

*Caspasen aus Erythrocyten können in vitro aktiviert werden*

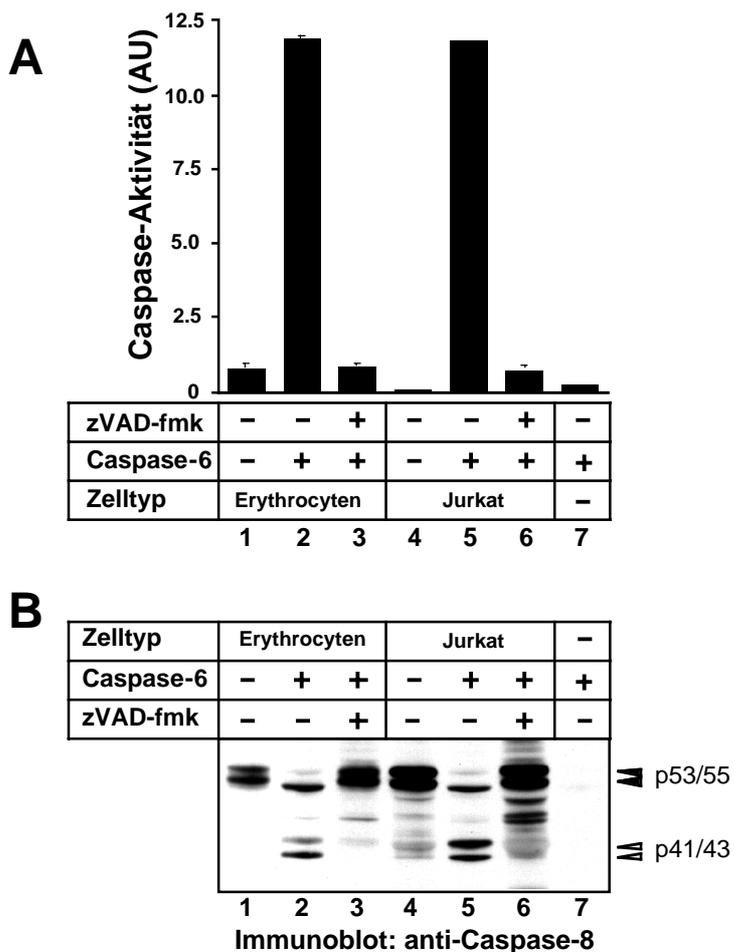
Da keiner der getesteten Stimuli eine Aktivierung der Caspasen in intakten Erythrocyten auslöste, wurde untersucht, ob erythrocytäre Caspasen *in vitro* aktiviert werden können. Dazu wurden cytosolische Extrakte von Erythrocyten und Jurkat-Zellen mit Cytochrom c und dATP inkubiert und dann hinsichtlich Prozessierung der Caspasen im Immunoblot analysiert. In cytosolischen Extrakten von Erythrocyten fand keine Prozessierung von Procaspase-3 und Procaspase-8 zu ihren katalytisch aktiven Fragmenten nach Behandlung mit Cytochrom c und dATP statt (Abb. 23A). Da die durch Cytochrom c vermittelte Caspasen-Aktivierung Apaf-1 und Caspase-9 bedarf (Slee et al., 1999), stimmen diese Ergebnisse mit der Beobachtung überein, daß weder Apaf-1 noch Caspase-9 in Erythrocyten enthalten sind. Im Unterschied zu Erythrocyten wurde durch Cytochrom c und dATP schnell die Prozessierung beider Caspasen in den cytosolischen Extrakten von Jurkat-Zellen initiiert (Abb. 23B). Da in der mitochondrialen Kaskade die Spaltung von Caspase-8 der Aktivierung von Caspase-3 nachfolgt, wurde Caspase-8 im Vergleich zu Caspase-3 etwas verzögert prozessiert.

Da Caspasen ein proteolytisches Netzwerk ausbilden, in dem zum Beispiel Caspase-6 Caspase-3 und -8 prozessieren und aktivieren kann (Slee et al., 1999; Van de Craen et al., 1999), wurde untersucht, ob Procaspasen aus erythrocytären Lysaten durch die Zugabe exogener Caspasen gespalten werden können. Zu diesem Zweck wurde rekombinante Caspase-6 zu Lysaten von Erythrocyten und Jurkat-Zellen zugegeben und hinsichtlich der Prozessierung endogener Caspasen mittels Immunoblot analysiert. Rekombinante Caspase-6 prozessierte Procaspase-8 in beiden Lysaten zu den charakteristischen intermediären Spaltungsprodukten von 41 kD und 43 kD (Abb. 23C, Spuren 3 und 6), welche identisch mit den beobachteten Fragmenten aus intakten Jurkat-Zellen nach Stimulation mit anti-CD95 waren (Spur 2). Sowohl Procaspase-3 aus Erythrocyten als auch aus Jurkat-Zellen wurde nach Inkubation mit exogener Caspase-6 prozessiert (Abb. 23D). In beiden Lysaten wurde die Spaltung der endogenen Procaspase-3 und Procaspase-8 durch Zugabe von zVAD-fmk inhibiert.



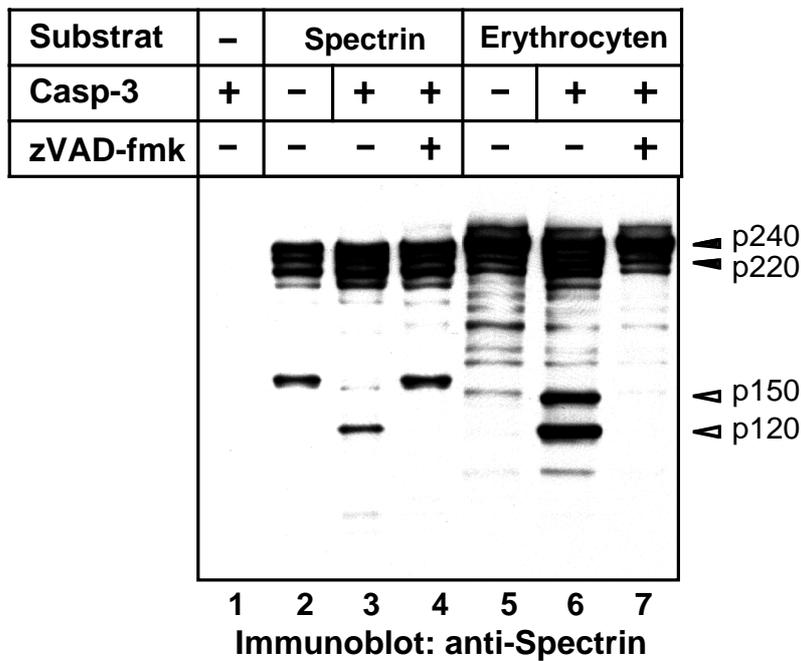
**Abb. 23: In vitro-Aktivierung von Caspasen aus Erythrocyten.** (A) Fehlende Caspase-Aktivierung in cytosolischen Extrakten von Erythrocyten durch exogenes Cytochrom c und dATP. Erythrocytenextrakte wurden entweder unbehandelt belassen oder für die angegebene Zeit mit Cytochrom c (*Cyt c*; 1  $\mu$ M) und dATP (1mM) in An- oder Abwesenheit von zVAD-fmk (100  $\mu$ M) inkubiert und anschließend auf Prozessierung von Caspase-3 und Caspase-8 im Westernblot untersucht. (B) Cytosolische Extrakte von Jurkat-Zellen wurden als Positivkontrolle in der gleichen Weise behandelt. (C, D) Exogene Caspase-6 prozessiert Procaspase-3 und -8 aus Erythrocyten *in vitro*. Rekombinante Caspase-6 wurde zu Lysaten von  $50 \times 10^6$  Erythrocyten oder  $2 \times 10^6$  gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Wie angegeben, wurden 100  $\mu$ M des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk vor der Inkubation mit Caspase-6 zugegeben. Die zellulären Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Prozessierung von Procaspase-8 (C) und Procaspase-3 (D) wurde im Westernblot untersucht. Als Kontrolle wird die Spaltung von Caspase-8 in intakten Zellen gezeigt (C). Dazu wurden Jurkat-Zellen mit Medium (C, *Spur 1*) oder mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD95 (C, *Spur 2*) behandelt. Nach 3 h wurden die zellulären Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle der Antikörper-Spezifitäten wurde exogene Caspase-6 alleine wie zelluläre Lysate behandelt (C, *Spur 8*; D, *Spur 7*). Gefüllte Pfeilköpfe zeigen die ungespaltenen, offene Pfeilköpfe die gespaltenen Formen der jeweiligen Caspasen an.

Zum weiteren Nachweis der *in vitro*-Aktivierung der Caspasen aus Erythrocyten wurde die katalytische Aktivität von Caspase-8 mit dem fluorogenen Substrat DEVD-AMC bestimmt. Dieses Substrat wird zwar bevorzugt von Caspase-3, aber auch von Caspase-8 gespalten. Da Hämoglobin das Fluoreszenzsignal in Proben mit Extrakten von Erythrocyten schwächte, wurde Caspase-8 nach der Zugabe von Caspase-6 immunpräzipitiert. Die aus der Inkubation der Lysate von Erythrocyten oder Jurkat-Zellen mit aktiver Caspase-6 erhaltenen Caspase-8-Präzipitate induzierten schnell eine DEVDase-Aktivität (Abb. 24A, Spuren 2 und 5). Es konnte keine Caspase-Aktivität beobachtet werden, wenn die Lysate entweder nicht mit Caspase-6 oder in Kombination mit zVAD-fmk behandelt worden sind (Spuren 1, 3, 4 und 6). Im Immunoblot korrespondierte die gemessene DEVDase-Aktivität mit dem Auftreten der charakteristischen Spaltungsprodukte von Caspase-8 (Abb. 24B). Caspase-6 wurde nicht durch den anti-Caspase-8-Antikörper präzipitiert (Abb. 24B, Spur 7) und trug daher nicht zur Spaltung von DEVD-AMC bei (Abb. 24A, Spur 7).



**Abb. 24: Proteolytisch prozessierte Procaspase-8 aus Erythrocyten ist *in vitro* aktiv.** Lysate von  $10^9$  Erythrocyten oder  $10^7$  Jurkat-Zellen wurden für 3 h mit  $2 \mu\text{g}$  rekombinanter Caspase-6 in der An- oder Abwesenheit von zVAD-fmk inkubiert, bevor Caspase-8 immunpräzipitiert wurde. Als Spezifitätskontrolle wurde das Reaktionsgemisch mit Caspase-6 in Abwesenheit zellulärer Lysate mit anti-Caspase-8 immunpräzipitiert (A, B; *Spuren 7*). (A) Die katalytische Aktivität der präzipitierten Caspase-8 wurde mittels der Spaltung des fluorogenen Substrates DEVD-AMC bestimmt und wird in relativen Einheiten angegeben. (B) Gleichzeitig wurde die Prozessierung präzipitierter Caspase-8 im Westernblot bestimmt. Gefüllte Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene, offene Pfeilköpfe die gespaltene Form von Caspase-8.

Es konnte gezeigt werden, daß Fodrin (nicht erythroides Spectrin) durch Caspase-3 in nucleierten Zellen gespalten werden kann (Jänicke et al., 1998b). Ob auch erythroides Spectrin, ein für die Erythrocytenintegrität wichtiges Strukturprotein, gespalten werden kann, wurde durch Inkubation exogener Caspase-3 sowohl mit Lysaten von Erythrocyten als auch mit aufgereinigtem Spectrin untersucht. Spectrin aus erythrocytären Lysaten wurde durch Caspase-3 zu den typischen p120/150-Fragmenten prozessiert (Abb. 25). Diese Degradation konnte durch die Zugabe von zVAD-fmk inhibiert werden (Abb. 25, Spur 7). Übereinstimmende Spaltungsprodukte wurden von aufgereinigtem Spectrin erhalten, obwohl ein immunreaktives Protein von 120 kD, welches wahrscheinlich ein Degradationsprodukt darstellt, bereits in unbehandelten Proben auftrat. Wenngleich Caspasen nicht durch apoptotische Stimulation intakter Erythrocyten aktiviert werden konnten, führte doch die Inkubation von Lysaten mit exogenen Caspasen *in vitro* zu der Aktivierung der erythrocytären Caspasen-3 und -8 wie auch zur Spaltung von Spectrin.



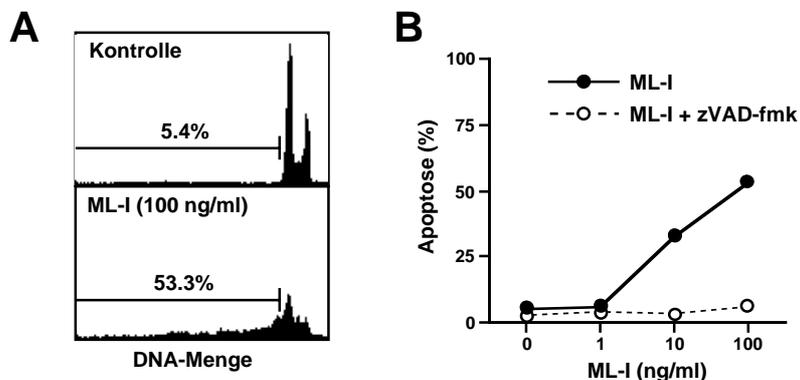
**Abb. 25: Caspase-3 spaltet gereinigtes Spectrin und Spectrin in Lysaten von Erythrocyten.** Gereinigtes Spectrin (6 µg) oder zelluläre Lysate von Erythrocyten (50 x 10<sup>6</sup>) wurden mit 2 µg rekombinanter Caspase-3 in der An- oder Abwesenheit von zVAD-fmk für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Spectrin-Spaltung wurde im Westernblot bestimmt. Gefüllte Pfeilköpfe zeigen die ungespaltene, offene Pfeilköpfe die gespaltene Form von Spectrin an.

### 3.4 Mistellektin induziert Apoptose über den mitochondrialen Signalweg und verstärkt die Wirkung von Chemotherapeutika

Mistelextrakte werden schon seit längerem in der adjuvanten Chemotherapie eingesetzt. Als die therapeutisch aktiven Komponenten wurden dabei die Mistellektine, darunter insbesondere Mistellektin I (ML-I) (Hajto et al., 1989) identifiziert. Eine wichtige Eigenschaft der Mistellektine besteht in ihrer cytostatischen und cytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen, im besonderen auf Krebszellen lymphoiden Ursprungs. Neuere Daten wiesen darauf hin, daß die Cytotoxizität durch die Induktion von Apoptose vermittelt wurde (Janssen et al., 1993; Büssing et al., 1996; Möckel et al., 1997). Bei diesen Untersuchungen blieb jedoch unklar, durch welche Mechanismen und Signaltransduktionswege Mistellektine den programmierten Zelltod aktivieren.

#### *ML-I induziert Apoptose mittels Aktivierung von Caspasen*

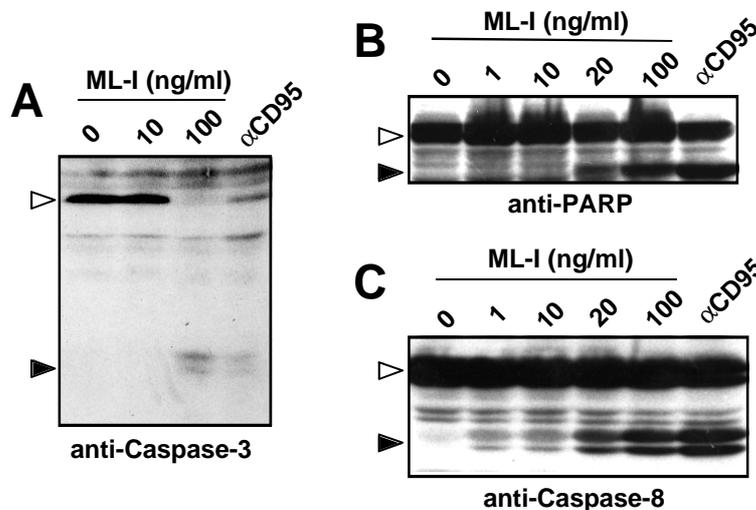
Die cytotoxische Aktivität von ML-I wurde an leukämischen Jurkat-T-Zellen untersucht. Anhand der Bildung hypodiploider DNA konnte nachgewiesen werden, daß ML-I konzentrationsabhängig Apoptose auslöst (Abb. 26). Die Induktion der Apoptose wurde auch durch typische morphologische Veränderungen der Zellen wie Zellschrumpfung und Bildung apoptotischer Körperchen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die



**Abb. 26: Apoptose-Induktion durch ML-I wird durch Caspasen vermittelt.** (A) ML-I induziert Apoptose. Es ist das typische DNA-Histogramm von Kontrollzellkernen (*oberes Histogramm*) und von Kernen aus Jurkat-Zellen, die für 18 h mit 100 ng/ml ML-I stimuliert worden waren (*unteres Histogramm*), gezeigt. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Der Anteil hypodiploider Zellkerne wurde im Durchflußzytometer bestimmt. Es lassen sich Kerne mit hypodiploider DNA und die Gipfel für die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und S/G<sub>2</sub>-Phase im Zellzyklus erkennen (*von links nach rechts*). (B) Inhibition der ML-I-induzierten Apoptose durch den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk. Jurkat-Zellen wurden entweder in Abwesenheit (*geschlossene Kreise*) oder Anwesenheit von zVAD-fmk (*offene Kreise*) für 1 h vorinkubiert und anschließend für 18 h mit ML-I in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Der Nachweis der Apoptose-Induktion erfolgte anhand der hypodiploiden Zellkerne im Durchflußzytometer.

Vorbehandlung der Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk verhinderte vollständig den durch ML-I ausgelösten Zelltod (Abb. 26B). Die durch ML-I induzierte cytotoxische Wirkung wurde also durch Caspasen vermittelt.

Caspasen bilden eine Familie verschiedener Cystein-Proteasen, die als inaktive Zymogene synthetisiert und zu einem aktiven Komplex aus zwei heterodimeren Untereinheiten prozessiert werden (Cohen, 1997; Nicholson und Thornberry, 1997). Welche Mitglieder der Caspasen-Familie während des durch ML-I induzierten Zelltodes aktiviert werden, wurde mittels spezifischer Antikörper im Western blot untersucht. Jurkat-Zellen wurden sechs Stunden mit ML-I behandelt, Proteinextrakte wurden hergestellt und durch SDS-PAGE fraktioniert. Die Behandlung der Zellen mit ML-I führte zur proteolytischen Prozessierung des inaktiven 32 kD Caspase-3-Proenzym zur aktiven p17-Untereinheit (Abb. 27A). In einer konzentrationsabhängigen Studie wurde weiterhin die Prozessierung von PARP untersucht, eines DNA-Reparaturenzyms, das während der Apoptose spezifisch durch Caspasen geschnitten wird. Abb. 27B zeigt, daß PARP, ein 116 kd-Protein, bereits bei einer Konzentration an ML-I von 20 ng/ml zum charakteristischen 89 kd-Fragment geschnitten wurde.



**Abb. 27: ML-I induziert die proteolytische Spaltung von Caspase-3, Caspase-8 und PARP.**  $2 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an ML-I für 6 h oder mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD95 ( $\alpha$ CD95) für 3 h stimuliert. Anschließend wurden die zellulären Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die proteolytische Prozessierung von Caspasen und PARP im Westernblot nachgewiesen. (A) Proteolytische Spaltung von Caspase-3. Der Westernblot zeigt die Spaltung des inaktiven 32 kd-Proenzym (*offener Pfeilkopf*) in die aktive p17-Untereinheit (*gefüllter Pfeilkopf*). (B) Prozessierung von PARP. Es ist die Spaltung des 116 kd-Proteins (*offener Pfeilkopf*) in das 89 kd-Fragment (*gefüllter Pfeilkopf*) gezeigt. (C) Proteolytische Aktivierung von Caspase-8. Der Westernblot zeigt die beiden Isoformen von Procaspase-8 (Procaspase-8a und -8b; *offener Pfeilkopf*) und die intermediären Spaltprodukte von 41 kD und 43 kD (*gefüllter Pfeilkopf*).

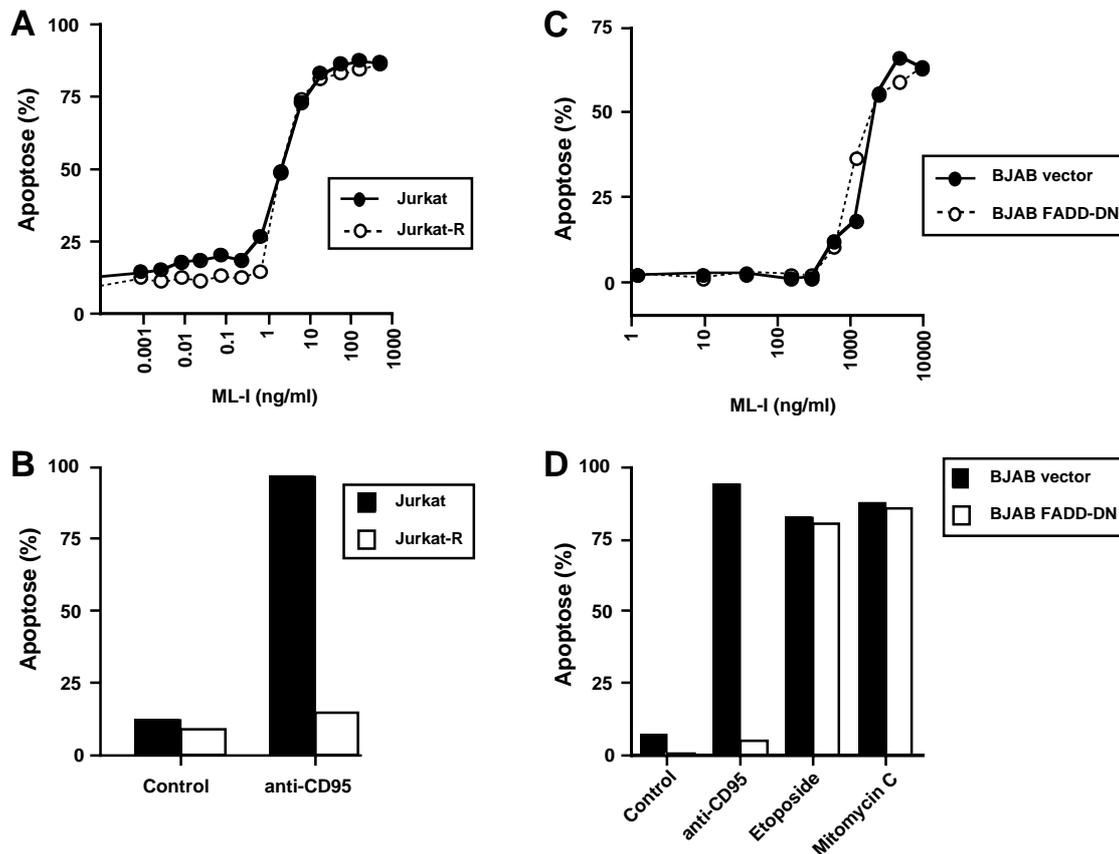
In unbehandelten Jurkat-Zellen erkannte ein Antikörper gegen die p18-Untereinheit von Caspase-8 eine Doppel-Bande von 53 und 55 kd, die die Isoformen Procaspase-8a und Procaspase-8b repräsentieren (Scaffidi et al., 1997). Die Behandlung von Jurkat-Zellen mit ML-I führte zur Prozessierung zu intermediären 43 und 41 kD-Fragmenten, die bereits bei einer Konzentration an ML-I von 1 ng/ml sichtbar wurden (Abb. 27C). Mit Caspase-3 und Caspase-8 wurden während der durch ML-I induzierten Apoptose wurden zwei zentrale Mitglieder der Caspasen-Familie aktiviert.

*Mistellektin induziert Apoptose und die Aktivierung von Caspase-8 unabhängig von CD95 und Todesrezeptoren*

Caspase-8 wurde ursprünglich als proximaler Regulator CD95-vermittelter Apoptose identifiziert (Muzio et al., 1996). In diesen Signalweg wird Caspase-8 mittels Bindung an das Adaptorprotein FADD über homophile Interaktion zweier Todeseffektordomänen an den DISC rekrutiert. Da für andere apoptotische Agentien wie Chemotherapeutika zur Induktion von Apoptose die Beteiligung von CD95 postuliert wurde, wurde die Notwendigkeit eines funktionellen CD95-Signalweges für Apoptose durch ML-I untersucht. Entweder müßte ML-I die Expression von CD95-Ligand induzieren oder über direkte Bindung an die glykosylierte Oberfläche des Rezeptors die Trimerisierung von CD95 bewirken, die Voraussetzung für die Signaltransduktion via CD95 ist. Ob eine CD95-Rezeptor/Ligand-Interaktion an der cytotoxischen Wirkung von ML-I beteiligt ist, wurde mittels des Subklons Jurkat-R untersucht, der resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose ist. Nach Behandlung sowohl CD95 sensibler Jurkat und CD95 resistenter Jurkat-R-Zellen wurde in beiden Zelllinien in einer sehr ähnlichen Konzentrationsabhängigkeit Apoptose ausgelöst (Abb. 28A). Ein agonistischer anti-CD95-Antikörper induzierte Apoptose ausschließlich in Jurkat-Zellen. Dies bestätigte die CD95-Resistenz des Subklons Jurkat-R (Abb. 28B).

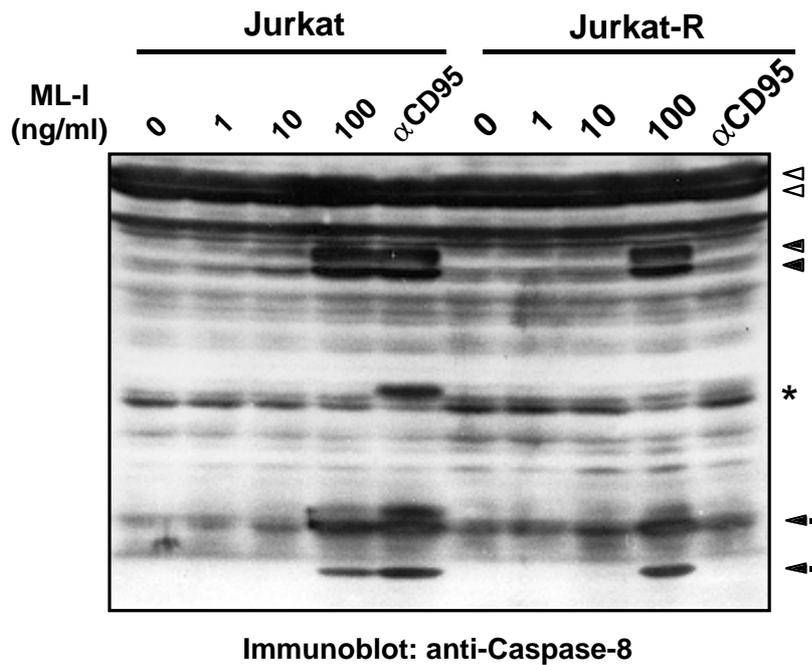
Um eine mögliche Beteiligung anderer Todesrezeptoren ausschließen zu können, wurde die Wirkung von ML-I auf BJAB B-Zellen untersucht, die mit einer dominant-negativen FADD-Mutante transfiziert worden sind, der die Todeseffektordomäne fehlt. FADD übermittelt apoptotische Signale neben CD95 auch von TNF-Rezeptor 1 und den TRAIL-Rezeptoren (Boldin et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996; Schneider et al., 1997; Pan et al., 1997a). BJAB FADD-DN-Zellen sind folglich resistent gegenüber anti-CD95 und TRAIL und besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber durch TNF induzierter Apoptose. Im Vergleich zu Jurkat-Zellen war eine höhere Konzentration an ML-I

erforderlich, um sowohl in BJAB FADD-DN- als auch in BJAB-Zellen auszulösen, die stabil mit dem Kontrollvektor transfiziert waren (Abb. 28C). In beiden Zelllinien wurde aber mit einer vergleichbaren Konzentrationsabhängigkeit Apoptose induziert. Während die Chemotherapeutika Etoposid und Mitomycin C in beiden Zelllinien Apoptose auslösten, wurde nach Stimulation des CD95-Signalweges nur in BJAB-Vektorkontrollzellen, nicht aber in BJAB FADD-DN-Zellen Zelltod induziert (Abb. 28D).



**Abb. 28: Die ML-I-induzierte Apoptose erfolgt unabhängig von CD95 und anderen Todesrezeptoren.**

(A) Der Effekt von ML-I auf die Induktion von Apoptose in CD95-sensitiven und -resistenten Jurkat-Zellen.  $4 \times 10^4$  CD95-sensitive (*geschlossene Kreise*) und -resistente Jurkat-Zellen (*offene Kreise*) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an ML-I stimuliert. Nach 18 h wurde die Induktion von Apoptose anhand der hypodiploiden Zellkerne im Durchflußzytometer ermittelt. (B) Der Einfluß von anti-CD95 auf die Apoptose-Induktion in Jurkat- (*schwarze Balken*) und Jurkat-R-Zellen (*weiße Balken*). Beide Zelllinien wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD95 stimuliert oder unbehandelt belassen (*Kontrolle*) und die Apoptose-Induktion wie in (A) nach 18 h gemessen. (C) Die Wirkung von ML-I auf BJAB-FADD-DN- und BJAB-vector-Zellen.  $4 \times 10^4$  BJAB-Zellen, die stabil mit einer dominant-negativen FADD-Mutante (*offene Kreise*) oder der Vektorkontrolle (*geschlossene Kreise*) transfiziert worden waren, wurden mit den angegebenen Konzentrationen an ML-I stimuliert. Nach 36 h wurde die Apoptose-Induktion im Durchflußzytometer anhand der hypodiploiden Zellkerne gemessen. (D) Die Induktion von Apoptose in BJAB-FADD-DN und BJAB-vector durch anti-CD95 und Chemotherapeutika. Beide Zelllinien wurden für 36 h mit  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD95,  $25 \mu\text{g/ml}$  Etoposid oder  $25 \mu\text{g/ml}$  Mitomycin C stimuliert. Die Induktion von Apoptose wurde wie oben beschrieben ermittelt.

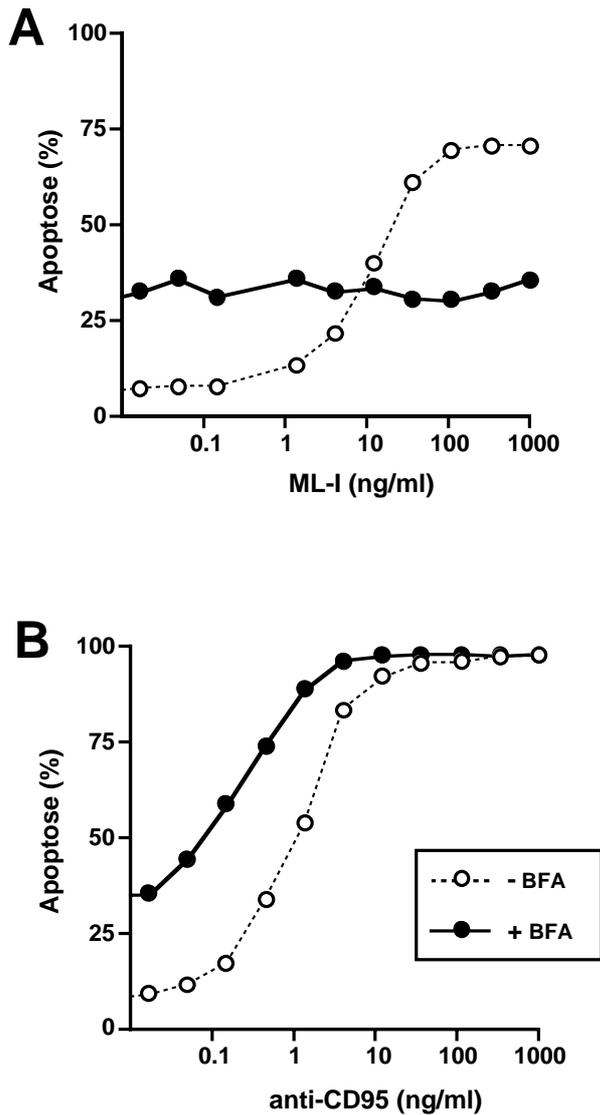


**Abb. 29: Caspase-8 wird durch ML-I ohne Beteiligung von CD95 aktiviert.**  $2 \times 10^6$  Jurkat- und Jurkat-R-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an ML-I für 6 h oder mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD95 für 3 h stimuliert. Die zellulären Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE separiert. Die proteolytische Aktivierung von Caspase-8 wurde im Westernblot nachgewiesen. Die offenen Pfeilspitzen weisen auf die beiden Isoformen von Procaspase-8a und -8b hin, die nach Aktivierung in die intermediären Spaltprodukte p41 und p43 (*gefüllte Pfeilspitzen*) prozessiert werden und letztlich in die aktive p18-Untereinheit gespalten werden (*Pfeile*). Die leichte IgG-Kette des stimulatorischen anti-CD95-Antikörpers ist mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Sowohl in CD95-sensitiven als auch in CD95-resistenten Jurkat-Zellen konnte eine proteolytische Prozessierung von Caspase-8 nach Inkubation mit denselben Konzentrationen an ML-I beobachtet werden (Abb. 29). Anti-CD95 aktivierte Caspase-8 nur in CD95-sensitiven, nicht in CD95-resistenten Jurkat-Zellen. Weder zur Aktivierung von Caspase-8 noch zur darauf initiierten Apoptose durch ML-I war CD95 oder ein anderer Todesrezeptor, der Apoptose mittels eines FADD enthaltenden Signalkomplexes vermittelt, erforderlich.

#### *Mistellektin wird internalisiert und löst den mitochondrialen Apoptoseweg aus*

Mistellektine binden mittels ihrer B-Kette an die Zelloberfläche und setzen daraufhin die A-Kette in das Cytosol frei. Im Falle von Ricin, einem verwandten Lektin, ist bekannt, daß die A-Kette in die Zelle via Endocytose eintritt und von einem intrazellulären Kompartiment in das Cytosol transloziert wird (Sandvig et al., 1991). Ob auch ML-I über einen solchen Weg Apoptose induziert, wurde mittels Brefeldin A untersucht, einem Inhibitor aus Pilzen, der den vesikulären Transport unterbricht. Die Zugabe von Brefeldin



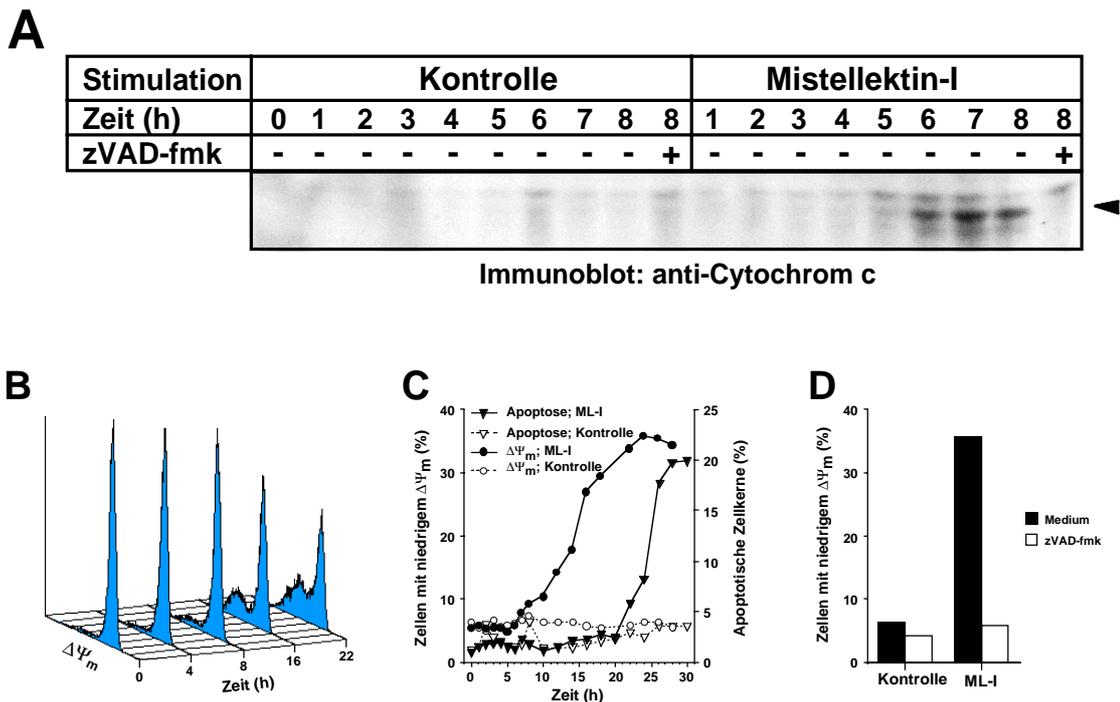
**Abb. 30: Brefeldin A inhibiert die Induktion von Apoptose durch ML-I, aber nicht durch CD95.**  $4 \times 10^4$  Jurkat-Zellen wurden für 30 min. in Ab- (*offene Kreise*) oder Anwesenheit (*geschlossene Kreise*) von Brefeldin A (1  $\mu\text{g/ml}$ ; *BFA*) vorinkubiert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen an (A) ML-I oder (B) anti-CD95 stimuliert. Nach 18 h wurde der Zelltod anhand der Aufnahme von Propidiumiodid in Zellen im Durchflußzytometer gemessen.

A schützte Jurkat-Zellen vor durch ML-I induziertem Zelltod (Abb. 30A). Dieser inhibitorische Effekt war vor allen Dingen bei hohen Lektin-Konzentrationen sichtbar, da Brefeldin A selbst bereits cytotoxisch wirkte. Im Gegensatz zu ML-I wurde Zelltod durch CD95 nicht durch die Inkubation der Zellen mit Brefeldin A beeinflusst (Abb. 30B). Dies unterstreicht den grundsätzlichen Unterschied in der Übermittlung des Stimuli. ML-I benötigt einen retrograden endosomalen Transport zur Induktion der Apoptose.

Neben Todesrezeptoren spielen Mitochondrien eine Schlüsselrolle bei der initialen Aktivierung der Caspasen. Die Induktion des Zelltodes ist hierbei mit der Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c ins Cytosol assoziiert (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997b). Im Cytosol bildet Cytochrom c zusammen mit dATP einen Komplex mit dem Ced-4-Homolog Apaf-1 aus, der in der Prozessierung von Caspase-9 und der nachfolgenden Aktivierung weiterer Caspase resultiert. Obwohl der Mechanismus der Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien bisher unbekannt ist, wird angenommen, daß

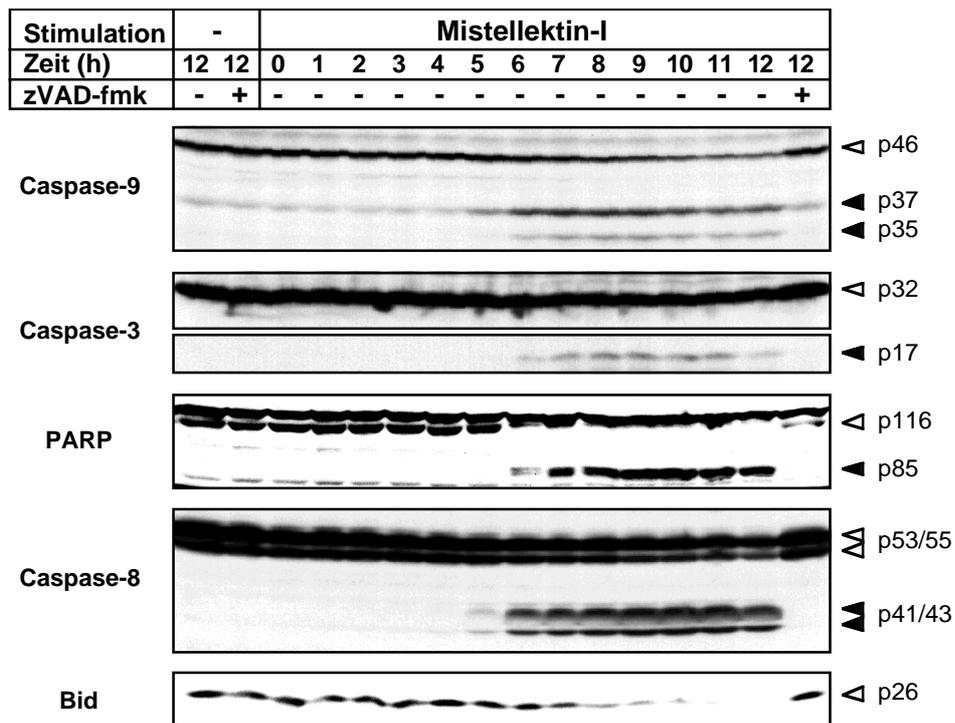
Cytochrom c infolge der Öffnung von Membranpermeabilitätsporen und des Verlusts des Mitochondrienmembranpotentials aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt wird (Susin et al., 1998). Zur Untersuchung der Beteiligung und zeitlichen

Reihenfolge dieser mitochondrialen Ereignisse in der durch ML-I induzierten Apoptose wurde die Translokation von Cytochrom c ins Cytosol und die Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials in einer Kinetik bestimmt. Fünf Stunden nach Stimulation von Jurkat-Zellen mit ML-I wurde Cytochrom c ins Cytosol freigesetzt (Abb. 31A). Dies geht der Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials und dem Beginn der Apoptose deutlich voran (Abb. 31B und C). Interessanterweise wurde sowohl die Cytochrom c-Freisetzung als auch der Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials durch den Caspaseninhibitor zVAD-fmk unterbunden (Abb. 31A und D).



**Abb. 31: ML-I induziert die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c ins Cytosol, die dem Verlust des Mitochondrienmembranpotentials und der Apoptose vorangeht.** (A) Kinetik der Cytochrom c-Freisetzung ins Cytosol. Jurkat-Zellen wurden entweder mit Medium oder mit 100  $\mu$ M zVAD-fmk für 1 h vorbehandelt und anschließend entweder unbehandelt belassen oder mit 10 ng/ml ML-I inkubiert. Nach der angegebenen Zeit wurden die Zellen homogenisiert. Die Proteine der cytosolischen S10-Fraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Freisetzung von Cytochrom c wurde mittels Westernblot nachgewiesen. (B) Histogramm-Analyse der Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials durch ML-I. Jurkat-Zellen wurden mit 10 ng/ml ML-I behandelt. Nach den angegebenen Zeiten wurde der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) durch Färbung der Zellen mit dem Potential-sensitiven Fluorochrom 3,3'-Dihexylcarbocyaniniodid bestimmt. (C) Kinetik des Verlustes des  $\Delta\Psi_m$  (Kreise) und der Apoptose (Dreiecke) durch ML-I. Der Anteil der Zellen mit einem niedrigem  $\Delta\Psi_m$  und mit hypodiploiden Zellkernen wurde im Durchflußzytometer bestimmt. Die offenen Symbole zeigen die Werte unbehandelter Zelle, die geschlossenen Symbole die Werte der Zellen, die mit ML-I für die angegebene Zeit behandelt wurden. (D) Effekt von zVAD-fmk auf den durch ML-I induzierten Verlust des  $\Delta\Psi_m$ . Der Graph zeigt Werte für das  $\Delta\Psi_m$ , die 24 h nach Stimulation der Zellen in der An- (weiße Balken) oder Abwesenheit (schwarze Balken) von zVAD-fmk ermittelt wurden.

Da der mitochondriale Cytochrom c/Apaf-1-Signalweg durch die Aktivierung von Procaspase-9 charakterisiert ist, wurde die Reihenfolge der proteolytischen Aktivierungen nach Stimulation mit ML-I untersucht. Jurkat-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit ML-I inkubiert, und die Aktivierung von Procaspase-9, Procaspase-3 und Procaspase-8 mittels Immunoblotanalyse bestimmt. Zusätzlich wurde die proteolytische Prozessierung von PARP und Bid, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, das durch Caspase-8 geschnitten wird (Li et al., 1998; Luo et al., 1998), untersucht. Die proteolytische Prozessierung aller Procaspasen und Caspasesubstrate erfolgte mit einer ungefähr gleichen Zeitabhängigkeit (Abb. 32). Die proteolytische Aktivierung von Procaspase-9, Procaspase-3 und Procaspase-9 erfolgte nach einer Behandlung mit ML-I von fünf bis sechs Stunden. Das Caspase-3-Substrat PARP wurde nur leicht verzögert nach der Aktivierung von Caspase-3 geschnitten. Bid, ein Caspase-8-Substrat, wurde ebenfalls zeitabhängig nach der Aktivierung von Caspase-8 prozessiert (Abb. 32). Die Inhibition der Caspasen-Aktivität durch zVAD-fmk

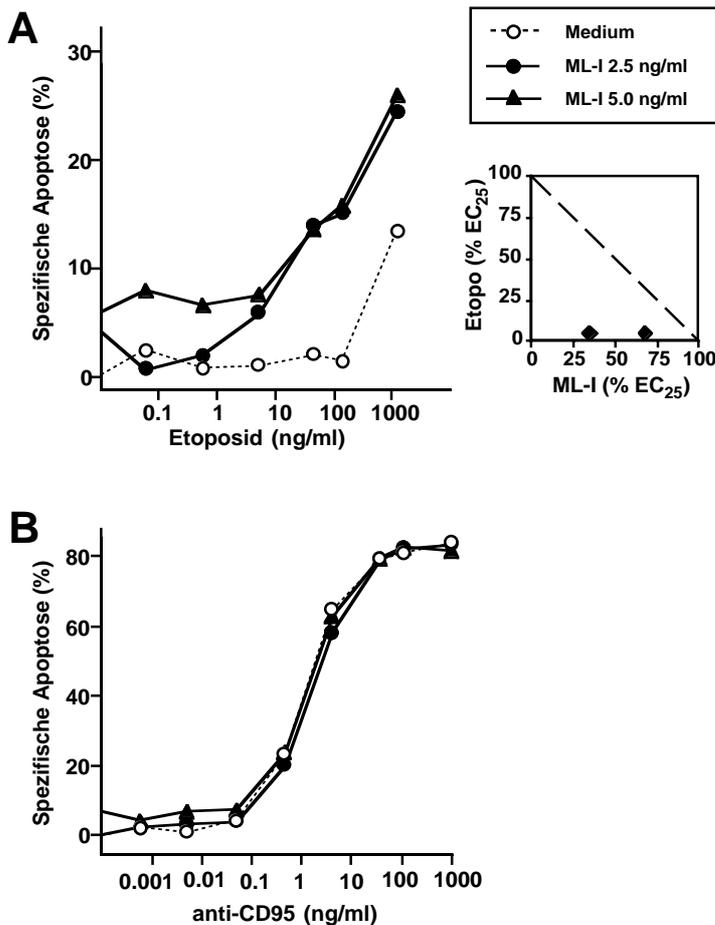


**Abb. 32: Kinetik der durch ML-I induzierten Spaltung von Caspase-9, Caspase-8, Caspase-3, PARP und Bid.** Jurkat-Zellen wurden mit Medium oder 100  $\mu$ M zVAD-fmk für 1 h vorbehandelt und anschließend für die angegebene Zeit mit Medium (-) oder 10 ng/ml ML-I inkubiert. Die zellulären Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die proteolytische Prozessierung von Caspase-9, -3, -8, PARP und Bid wurde im Westernblot nachgewiesen. Offene Pfeilspitzen zeigen die ungespaltene Form der angegebenen Proteine, geschlossene Pfeilspitzen die gespaltene Form.

verhinderte die proteolytische Degradation aller beobachteten Proteine. Apoptose durch ML-I wird folglich durch den mitochondrialen Cytochrom c/Apaf-1-Signalweg vermittelt, der deutlich dem Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials vorangeht.

*ML-I verstärkt Apoptose durch Chemotherapeutika*

Da Mistellektine in der Chemotherapie als Adjuvans eingesetzt wird, wurde untersucht, ob durch Chemotherapeutika induzierter Zelltod durch ML-I verstärkt wird. Dazu wurden Jurkat-Zellen konzentrationsabhängig mit einer Reihe verschiedener apoptotischer Agentien, darunter dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid und anti-CD95, zusammen mit ML-I behandelt. Geringe Konzentrationen an ML-I von 2,5 bis 5 ng/ml, die selbst nur geringe cytotoxische Wirkung erzielten, verstärkten maßgeblich die cytotoxische Wirkung von Etoposid, während sie auf die durch CD95 vermittelte Apoptose keinen Einfluß hatten (Abb. 33). Eine Isobologramm-Analyse stuft die Kombinationsbehandlung mit Etoposid und ML-I als supra-additiv ein (Abb. 33A).



**Abb. 33: ML-I verstärkt den cytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika.** Jurkat-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen (*offene Kreise*) oder mit 2,5 ng/ml (*geschlossene Kreise*) oder 5 ng/ml (*Dreiecke*) ML-I inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen entweder an Etoposid (A) oder anti-CD95 (B) koinkubiert. Der Zelltod wurde nach 24 h anhand der Aufnahme von Propidiumiodid in die Zellen bestimmt. Das Isobologramm der kombinierten Effekte von ML-I und Etoposid wurde aus den EC<sub>25</sub>-Werten beider Stimuli errechnet, die die Konzentrationen darstellen, die 25% Apoptose nach Einzelbehandlung mit dem jeweiligen Stimulus induzieren. Experimente ergaben EC<sub>25</sub>-Werte von 7,5 ng/ml für ML-I und 1,2 µg/ml für Etoposid. Die unterbrochene Linie verbindet die EC<sub>25</sub>-Werte und repräsentiert einen additiven Effekt. Werte, die links der unterbrochenen Linie liegen, stehen für einen supra-additiven oder Synergie-Effekt der Kombinationsbehandlung.

## 4. Diskussion

Das gegenwärtige Modell der Apoptose geht davon aus, daß nach apoptotischer Stimulation zunächst Initiator-Caspasen wie Caspase-8 und -9, die sich durch eine lange Prodomäne auszeichnen, aktiviert werden. Dies zieht in einer Kaskade die proteolytische Spaltung und Aktivierung von Effektor-Caspasen nach sich, die letztlich die apoptotischen Veränderungen in der Physiologie und Morphologie der Zelle vermitteln. Im Signalweg der Todesrezeptoren bewirkt die Rekrutierung von FADD die Bindung von Procaspase-8, die durch Oligomerisierung autoproteolytisch aktiviert wird (Muzio et al., 1996). Abhängig vom Zelltyp aktiviert Caspase-8 direkt Effektorcaspasen, darunter Caspase-3 und Caspase-6. In sogenannten Typ II-Zellen ist allerdings die Aktivierung einer verstärkenden Signalschleife erforderlich, um in der Zelle Apoptose zu induzieren (Scaffidi et al., 1998). Im Falle einer geringen initialen Caspase-8-Aktivierung wird der direkte Effekt von Caspase-8 auf Caspase-3 durch einen mitochondrialen Schaden verstärkt. Hierbei aktiviert Caspase-8 das proapoptotische Molekül Bid durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen Domäne, was Bid die Bindung an die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> ermöglicht und letztendlich zur Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol führt (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Im Cytosol bildet Cytochrom c einen Komplex mit Apaf-1 aus, der die proteolytische Aktivierung von Caspase-9 und in der Folge weiterer Effektorcaspasen bewirkt (Li et al., 1997a). In beiden Fällen dient Caspase-8 apikal als Initiator-Caspase, die entscheidend ist für die Induktion von Apoptose durch Todesrezeptoren. Darüberhinaus haben *in vitro*-Studien zur Prozessierung von Caspasen gezeigt, daß Caspase-8 viele andere Caspasen prozessieren kann (Srinivasula et al., 1996), so daß Caspase-8 als Schlüsselement zur Initiation der verschiedensten apoptotischen Signalwege erschien.

### 4.1 Chemotherapeutika induzieren Caspase-8-Aktivierung und Apoptose unabhängig von einer Signaltransduktion durch Todesrezeptoren

In verschiedenen Arbeiten wurde eine durch Chemotherapeutika induzierte Steigerung an CD95L-Expression über Ceramid-abhängige Mechanismen postuliert. Dies sollte eine CD95-abhängige Apoptoseinduktion mittels einer autokrinen Rückkopplung in drogensensitiven Zellen auslösen (Friesen et al., 1996; Müller et al., 1997; Fulda et al., 1997a; Herr et al., 1997). Den hier aufgeführten Daten konnte man zum ersten Mal entnehmen, daß nicht nur die Effektor-Caspasen Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 an

der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose beteiligt sind (Zhu et al., 1995; Chen et al., 1996; Datta et al., 1996; Los et al., 1997), sondern auch Caspase-8 durch antineoplastische Agentien, wie sie in der konventionellen Chemotherapie eingesetzt werden, aktiviert wird. Auch diese Beobachtung könnte nahelegen, daß die Cytotoxizität durch Chemotherapeutika durch einen Mechanismus via Todesrezeptoren vermittelt würde. Doch daß es sich hierbei nicht um einen grundsätzlichen und notwendigen Mechanismus der Wirkung von Chemotherapeutika handelt, wird durch eine Zahl unabhängiger Nachweise unterstützt.

Erstens wurde gezeigt, daß Chemotherapeutika sowohl in CD95-sensitiven als auch in CD95-resistenten Jurkat-Zellen Apoptose in gleicher Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration induzieren. Zweitens konnte nur der durch anti-CD95 vermittelte Zelltod durch ein neutralisierendes GST-CD95-Konstrukt in Jurkat- und CEM-Zellen inhibiert werden, während der Breitband-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk sowohl die durch anti-CD95 als auch durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose verhinderte. Drittens konnte durch den durch Chemotherapeutika induzierten Zelltod in HeLa-Zellen, die mit einer dominant-negativen FADD-Mutante transfiziert waren, ausgeschlossen werden, daß andere FADD-abhängige Todesrezeptoren an Apoptose durch Chemotherapeutika beteiligt sind. Abschließend konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von Caspase-8 und anschließende Apoptose durch Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, induziert werden kann. Obwohl dies nicht die Beteiligung bereits an der Zelloberfläche exponierter CD95L ausschließt, wird doch der Schluß nahegelegt, daß die induzierbare Synthese von CD95L oder anderer Todesliganden keine Voraussetzung für die Aktivierung von Caspase-8 und für Apoptose durch Chemotherapeutika ist.

#### **4.2 Caspase-8/FLICE dient als Effektorcaspase in der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose**

Obwohl Todesrezeptoren nicht erforderlich sind für Apoptose durch Chemotherapeutika, mußte in Betracht gezogen werden, daß die Aktivierung von Caspase-8 vor einem mitochondrialen Schaden eintritt. Allerdings würde eine Inhibition durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine dieser Vorstellung widersprechen und eher für eine Aktivierung von Caspase-8 nach der Freisetzung von Cytochrom c sprechen. Die Inhibition der Cytochrom c-Freisetzung durch Bcl-2 korrelierte mit der Inhibition der Aktivierung von Caspase-8 und der proteolytischen Prozessierung anderer Caspasen wie Caspase-9 und -6. Die Induktion des Zelltodes nach Stimulation mit Chemotherapeutika

wurde ebenfalls vollständig durch Bcl-2 verhindert, während die durch CD95 vermittelte Apoptose nur gering beeinträchtigt wurde. Die Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk inhibierte vollständig die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol nach Behandlung der Zellen mit anti-CD95, wohingegen die Cytochrom c-Freisetzung nach Stimulation mit Chemotherapeutika nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz zur Signaltransduktion über CD95 wird die Freisetzung von Cytochrom c in der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose nicht durch Caspase-8 oder anderen proximalen Caspasen kontrolliert.

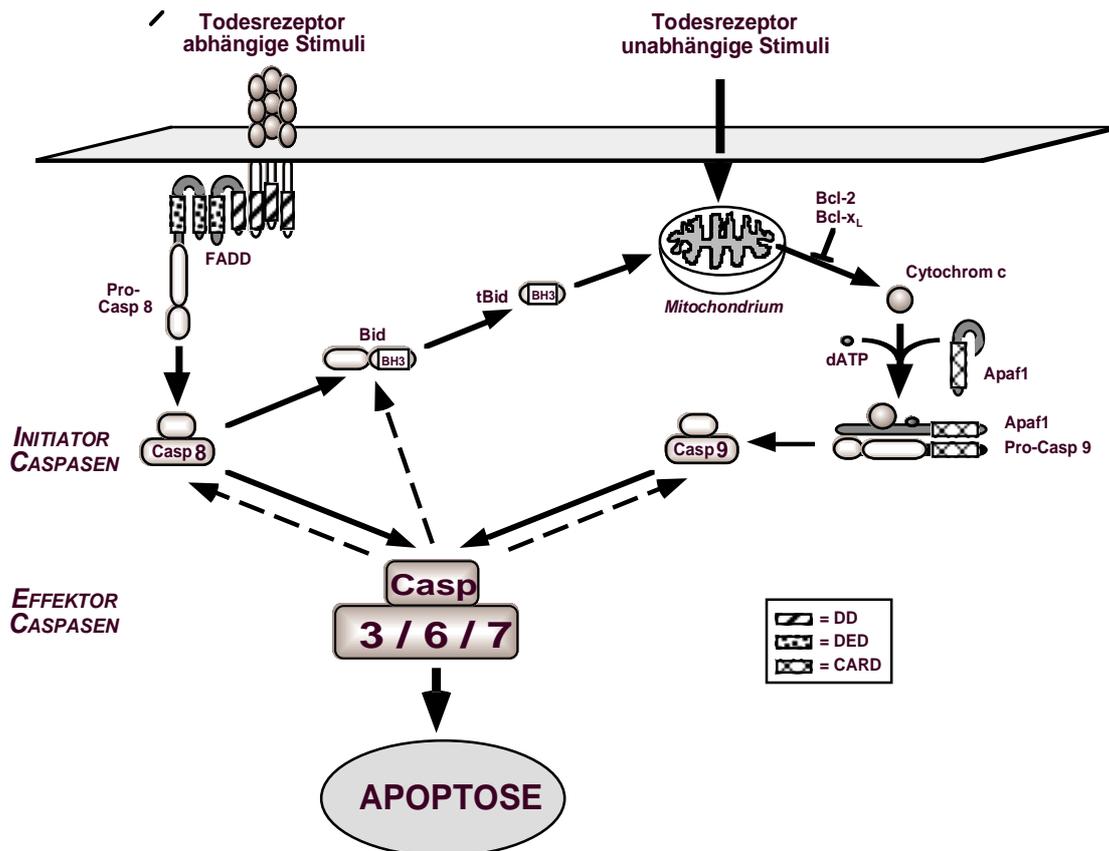
Über die Inhibition der Freisetzung mitochondrialen Cytochrom c in das Cytosol hinaus werden noch weitere Mechanismen diskutiert, mittels derer Bcl-2 seine antiapoptotische Wirkung entfaltet. Es wurde berichtet, daß Bcl-2 zum einen mit dem Apoptosom unter Ausbildung eines ternären Komplexes mit Apaf-1 und Caspase-9 interagieren (Hu et al., 1998) oder zum anderen die Bildung des DISC inhibieren könne (Kawahara et al., 1998), wobei diese Befunde noch kontrovers sind (Moriishi et al., 1999). In einem ähnlichen Kontext wurde gezeigt, daß Caspase-8 einen Komplex mit Apaf-1 bilden kann (Hu et al., 1998), was die Möglichkeit impliziert, daß Chemotherapeutika Caspase-8 nach einer Schädigung der Mitochondrien aktivieren. Unterstützend für eine Interaktion zwischen Apaf-1 und Caspase-8 war die durch NMR bestimmte Struktur der CARD von Apaf-1, die große strukturelle Ähnlichkeiten mit der Todeseffektordomäne von FADD aufwies (Qin et al., 1999; Day et al., 1999). Ob Caspase-8 als Initiatorcaspase im mitochondrialen Apoptoseweg dienen kann, wurde mit Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen untersucht. Bedingt durch die Defizienz von Caspase-8 wurde die durch CD95 vermittelte Apoptose, die Spaltung von PARP und die Aktivierung von Caspasen vollständig inhibiert, wohingegen die An- oder Abwesenheit von Caspase-8 nach Stimulation mit Chemotherapeutika ohne Einfluß blieb. Übereinstimmende Daten wurden mit Jurkat-Zellen erhalten, die stabil mit einer dominant-negativen Mutante von Caspase-8 transfiziert waren (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden diese Daten durch Experimente mit Caspase-8-*knock out*-Mäusen untermauert (Varfolomeev et al., 1998). Dies weist darauf hin, daß auch andere Rezeptor-assoziierte Signalwege wie die Aktivierung von Daxx, RAIDD/Caspase-2 oder Caspase-10 zumindest in Jurkat-Zellen kaum eine Bedeutung für den CD95-Signalweg besitzen.

Bemerkenswert war, daß auch nach Behandlung Caspase-8-defizienter Zellen mit Chemotherapeutika eine proapoptotische Spaltung von Bid auftrat, während die durch CD95 vermittelte Prozessierung von Bid unterbunden wurde. Dies impliziert, daß neben

Caspase-8 weitere Caspasen Bid spalten können. Die hier aufgeführten Experimente mit Caspase-3-transfizierten Zellen wie auch weitere inzwischen publizierte Daten (Slee et al., 2000; Tang et al., 2000) legen nahe, daß Bid durch Caspase-3 gespalten werden kann. Da die von Caspase-8 unabhängige Aktivierung von Bid nach der Freisetzung mitochondrialen Cytochrom c ins Cytosol erfolgt, scheint diese eine verstärkende Signalschleife zu initiieren, die eine gesteigerte Translokation von Cytochrom c ins Cytosol nach Stimulation mit Chemotherapeutika zur Folge hat.

Da Caspase-8 nicht als Initiatorcaspase in der durch Chemotherapeutika vermittelten Induktion des mitochondrialen Apoptoseweges diente, wurde die Rolle von Caspase-9 untersucht. Caspase-9 ist die essentielle Caspase in vielen Formen der Apoptose (Li et al., 1997a; Kuida et al., 1998; Hakem et al., 1998; Sun et al., 1999). Auch wenn Berichte ursprünglich darauf hinwiesen, daß Caspase-8 mit Apaf-1 interagieren kann, zeigten detailliertere Untersuchungen, daß Caspase-9 die einzige Protease ist, die mit Apaf-1 in lebenden Zellen wechselwirkt (Slee et al., 1999). Die hier aufgeführten Daten zeigen, daß Überexpression einer dominant-negativen Mutante sowohl die Spaltung endogener Caspase-9 und Caspase-6 als auch die Prozessierung von Bid und Caspase-8 nach Behandlung mit Chemotherapeutika stark inhibierte. Übereinstimmende Daten wurden mit HeLa-Zellen erhalten, die die CARD-Region von Caspase-9 überexprimierten. In beiden Fällen wurde auch CD95-vermittelte Apoptose vermindert, was darauf zurückgeführt werden kann, daß Jurkat- und HeLa-Zellen Typ II-Zellen darstellen, in denen für den Apoptose-Prozeß auf Caspasen des mitochondrialen Apoptoseweges zurückgegriffen werden muß.

Daß die Aktivierung von Caspase-8 in Bcl-x<sub>L</sub> und eine dominant-negative Caspase-9 Mutante überexprimierende Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika inhibiert ist, zeigt, daß die Aktivierung von Caspase-8 ein postmitochondriales Ereignis darstellt. Um die Reihenfolge der Prozessierung der verschiedenen Caspasen zu bestimmen, wurden Caspase-3-defiziente MCF-7-Zellen herangezogen. In diesen Zellen wurde Caspase-8 nur dann aktiviert, wenn sie mit Caspase-3 transfiziert waren. Hingegen wurde Caspase-9 auch in Caspase-3 defizienten MCF-7-Zellen aktiviert, wenn auch in einem geringeren Ausmaß im Vergleich zu Caspase-3-exprimierenden MCF-7-Zellen. Diese Beobachtungen werden auch durch *in vitro*-Studien gestützt, in denen gezeigt wurde, daß Caspase-9 direkt Caspase-3 und -7, aber nicht Caspase-6 spalten kann (Srinivasula et al., 1998). Die Depletion von Caspase-3 aus Zellextrakten hatte zur Folge, daß trotz Zugabe von Cytochrom c keine Prozessierung von Caspase-8 beobachtet werden konnte (Slee et



**Abb. 34: Schematische Darstellung des Todesrezeptor- und mitochondrialen Signalweges und der jeweiligen Position der Caspase-8.** Der Todesrezeptor-Signalweg (*links*) wird nach Ligation des Rezeptors initiiert, die in der Rekrutierung des Adaptorproteins FADD über die homophile Wechselwirkung der Todesdomänen (DD) resultiert. Die Todeseffektordomäne (DED) von FADD bindet darauf Procaspase-8, was ihre autoproteolytische Aktivierung nach sich zieht. Der mitochondriale Todessignalweg (*rechts*), der durch viele apoptotische Stimuli ausgelöst wird, wird durch die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol markiert. Cytochrom c bindet zusammen mit dATP an Apaf-1, was die Bindung von Caspase-9 über eine homophile CARD/CARD-Interaktion ermöglicht. Der mitochondriale, nicht aber der Todesrezeptor-Signalweg kann durch anti-apoptotische Bcl-2-Proteine inhibiert werden. Nach der Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 oder -9 laufen die beiden Signalwege in der Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 zusammen, was letztendlich im Tod der Zelle mündet. Da Caspase-8 Bid spaltet unter Erzeugung eines pro-apoptotischen Fragmentes mit einer BH3-Domäne, das die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt, besteht eine Verbindung zwischen beiden Todessignalwegen. Da Caspase-8 in Caspase-3-defizienten Zellen nach Behandlung mit Todesrezeptor-unabhängigen Stimuli nicht prozessiert wird, erfolgt ihre Aktivierung unterhalb von Caspase-3, sehr wahrscheinlich vermittelt durch Caspase-3-induzierte Aktivierung von Caspase-6. Im mitochondrialen Signalweg verstärkt Caspase-8 Apoptose durch die Aktivierung anderer Caspasen und durch die Spaltung von Bid, die zu einer gesteigerten Cytochrom c-Freisetzung führt. Die Spaltung von Bid kann auch durch andere Caspasen als Caspase-8 erfolgen.

al., 1999). Zusammen mit diesen *in vitro*-Studien wird durch die hier gezeigten Ergebnisse nahegelegt, daß in intakten Zellen Caspase-8 im mitochondrialen

Apoptoseweg distal von Caspase-9 aktiviert wird, wahrscheinlich nach einer durch Caspase-3 vermittelten Aktivierung von Caspase-6 (Abb. 34). Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen können sich gegenseitig aktivieren, was zu einem Netzwerk positiver Rückkopplungen führt. Die Aktivierung von Caspase-8 ist nicht nur ein Ergebnis einer von einer Oligomerisierung am Rezeptor abhängigen Autokatalyse, sondern ebenfalls einer direkten Spaltung durch Effektorcaspasen, womit Caspase-8 nicht nur für die Initiation, sondern auch in der Endphase der Apoptose Bedeutung erhält. Die im Rahmen des mitochondrialen Apoptoseweges prozessierte Caspase-8 aktiviert dann entweder andere Caspasen oder Bid. Dadurch wird die Cytochrom c-Freisetzung verstärkt und der apoptotische Prozeß beschleunigt. Neuerdings konnte auch das Paradigma der ausschließlichen Initiatorfunktion der Caspase-8 in der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose widerlegt werden. Waren bisher nur Caspase-3, Bid und RIP als Substrate der Caspase-8 bekannt, konnte mit Plectin erstmals ein Strukturprotein als Substrat der Caspase-8 und damit eine Rolle für Caspase-8 in der apoptotischen Reorganisation des Mikrofilamentsystems nachgewiesen werden (Stegh et al., 2000).

#### **4.3 Chemotherapeutika induzieren keine Apoptose im organellfreien Zellsystem der Erythrocyten**

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß Apoptose einen Kontrollmechanismus in der Regulation der Erythropoiese darstellt. Dies beinhaltete die Aktivierung von Todesrezeptoren, die die anschließende Prozessierung von Caspasen und den Zelltod erythroider Vorläuferzellen nach sich zog (Gregoli und Bondurant, 1997; De Maria et al., 1999; Zamai et al., 2000). Im Falle reifer Erythrocyten war es bislang unbekannt, ob Apoptose eine funktionelle Rolle spielt und ob Erythrocyten Bestandteile des apoptotischen Programms enthalten. Erythrocyten stellen in Säugern ein minimales zelluläres System dar, dem alle membrangebundenen Organellen wie Zellkern, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum fehlen. Daher wurde untersucht, ob Erythrocyten noch die Möglichkeit besitzen, das apoptotische Programm auszulösen.

Es konnte gezeigt werden, daß humane Erythrocyten sowohl Caspase-8, die entscheidende Initiatorcaspase in der über Todesrezeptoren vermittelten Apoptose, als auch Caspase-3, die zentrale Effektorcaspase, enthalten. Die Expression beider Caspasen war vergleichbar mit der in kernhaltigen Zellen. Allerdings wiesen Erythrocyten keine der essentiellen Komponenten der mitochondrialen Caspase-Kaskade, darunter Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9, auf. Da Erythrocyten im Laufe ihrer Differenzierung

Mitochondrien und andere Organellen verlieren, ist es möglich, daß damit der Verlust der an Mitochondrien assoziierten apoptotischen Komponenten einhergeht.

Keiner der eingesetzten apoptotischen Stimuli konnte eine Aktivierung der Caspasen in Erythrocyten induzieren. In erythroiden Vorläuferzellen werden sowohl CD95-Rezeptor als auch CD95-Ligand exprimiert (De Maria et al., 1999). Da die Ligation von CD95 keine Caspase-Aktivierung in Erythrocyten bewirkte, mußte ebenfalls ein Verlust des Rezeptors vermutet werden. Entsprechend wurde keine Expression von CD95 an der Zelloberfläche beobachtet (Daten nicht gezeigt). Da auch Chemotherapeutika und andere apoptogene Stimuli keine Aktivierung der Caspasen induzierten, wurde untersucht, ob antiapoptotische Komponenten dafür verantwortlich sein könnten. Allerdings konnten weder eine Expression der Caspase-Inhibitoren XIAP, IAP1 und IAP2 noch der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> gefunden werden. Es wurde berichtet, daß weder humane noch murine Erythroblasten Bcl-2 exprimieren (Motoyama et al., 1999). Die Expression anderer Mitglieder der Bcl-2-Familie verbleibt während der Differenzierung relativ konstant, bis sie sich gegen Ende der Differenzierung etwa zum Zeitpunkt der Enucleation verringert.

Da keiner der apoptotischen Stimuli eine Aktivierung der Caspasen in intakten Erythrocyten induzierte, wurde untersucht, ob Caspasen aus Erythrocyten *in vitro* aktiviert werden könnten. Die Zugabe von Cytochrom c und dATP reichte in kernhaltigen Zellen aus, Caspasen zu aktivieren; in Erythrocyten konnte aufgrund des Fehlens von Apaf-1 und Caspase-9 keine Caspase-Aktivierung verzeichnet werden. Durch die Caspase-Aktivierung mittels exogener Caspase-6 konnte aber nachgewiesen werden, daß humane Erythrocyten grundsätzlich ein funktionelles Caspase-Netzwerk besitzen. In Erythrocyten von Hühnern, die im Gegensatz zu Erythrocyten von Säugern Zellkerne enthalten, konnte die Behandlung mit Staurosporin Apoptose auslösen (Weil et al., 1998). Allerdings zeigte kein Caspase-Inhibitor einen Effekt auf den Zelltod, so daß von einer Caspasen-unabhängigen Apoptose ausgegangen werden muß.

Obwohl humane Erythrocyten funktionelle Caspasen enthalten, konnten Chemotherapeutika keine Apoptose auslösen, da essentielle Komponenten des mitochondrialen apoptotischen Apparates wahrscheinlich bei der Entfernung der membrangebundenen Organellen verloren gegangen sind.

#### **4.4 Mistellektin induziert Apoptose über den mitochondrialen Signalweg und verstärkt die Wirkung von Chemotherapeutika**

Aufgrund ihrer breiten immunstimulatorischen und Antitumor-Wirkung werden Mistellektine immer mehr in der adjuvanten Tumorthherapie eingesetzt. Eine direkte cytotoxische Wirkung von Mistellektinen konnte in Zellkulturen und im Tiermodell gezeigt werden. So konnte ein Verlust an Zellvitalität und Proliferationsvermögen in verschiedenen Tumorzell-Linien wie T- und B-Zell-Lymphomen, Mastocytomen und Histiocytomen nach Behandlung mit Mistellektinen nachgewiesen werden (Janssen et al., 1993; Doser et al., 1989; Ribereau-Gayon et al., 1986; Dietrich et al., 1992). In einigen Fällen wurde zudem beschrieben, daß die Stimulation mit Mistellektinen Apoptose induziert (Janssen et al., 1993; Büssing et al., 1996; Möckel et al., 1997). Die subkutane Injektion von geringen Dosen an Mistellektin-I (ML-I; 1 ng/kg) in Mäusen induzierte einen anti-tumoralen Effekt in Lymphosarkomen, Fibrosarkomen und in einem xenotransplantierten Leiomyosarkom-Modell (Hajto et al., 1990; Beuth et al., 1991). Kürzlich konnte demonstriert werden, daß Mistelextrakte nach Transplantation von B16-Melanomzellen in Mäusen die Lungenmetastasierung inhibierten und die Überlebensrate erhöhten (Antony et al., 1997). Eine Pilotstudie mit Tumorpatienten im fortgeschrittenen Stadium zeigte, daß die Behandlung mit Mistelextrakten eine Verbesserung des Allgemeinzustandes und sogar die partielle Tumorremission bewirken konnte (Hajto et al., 1991). Der genaue Wirkungsmechanismus der Mistellektin-induzierten Zytotoxizität war bislang jedoch unklar.

Daher wurde der Mechanismus der ML-I-induzierten Cytotoxizität in leukämischen Jurkat-T- und B-Zelllinien eingehend untersucht. In beiden Zelllinien konnte festgestellt werden, daß der ML-I-induzierte Zelltod durch die Induktion von Apoptose bewirkt wurde, wie sich anhand klassischer morphologischer Kriterien wie Zellschrumpfung, Membranausstülpungen (Zeiosis) und biochemischer Veränderungen wie der Bildung hypodiploider DNA feststellen ließ. Die Induktion von Apoptose durch ML-I war abhängig von der intrazellulären Caspasen-Aktivierung, da die Induktion von Zelltod praktisch vollständig durch den Breitband-Caspaseinhibitor zVAD-fmk blockiert werden konnte. ML-I induzierte die proteolytische Aktivierung von Caspasen und rief die Spaltung des Caspase-Substrates PARP hervor.

Interessanterweise wurde durch ML-I ebenfalls die proteolytische Spaltung von Caspase-8 induziert. Da Caspase-8 normalerweise auf die Apoptose-Induktion durch Todes-

rezeptoren beschränkt ist, war nicht auszuschließen, daß ML-I die *de novo*-Expression des CD95-Liganden induziert und dadurch in auto- oder parakriner Weise über eine CD95-Ligand/Rezeptor-Interaktion das Apoptose-Programm auslöst. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, daß ML-I durch Quervernetzung das glykosylierte CD95-Molekül (oder anderer Todesrezeptoren) in ähnlicher Weise aktiviert wie Concanavalin A und Phytohämagglutinin den T-Zellrezeptor. Infolgedessen wurde die Beteiligung von Todesrezeptoren bei der ML-I-vermittelten Apoptose untersucht. Durch Verwendung von CD95-resistenten Zellen ließ sich nachweisen, daß ML-I in gleicher Dosisabhängigkeit und Kinetik Apoptose in den CD95-resistenten Jurkat-R-Zellen und den CD95-sensitiven Jurkat-Zellen induziert und damit belegt, daß ML-I in ähnlicher Weise wie Chemotherapeutika in Abwesenheit vom CD95-Signalweg die Caspase-8-Aktivierung und Apoptose auslöst. Um die mögliche Beteiligung weiterer Todesrezeptoren auszuschließen, wurden stabile BJAB-Transfektanten verwendet, welche eine dominant-negative FADD-Mutante exprimieren (BJAB-FADD-DN) und dadurch resistent gegenüber Todesrezeptor-vermittelten Signalen sind (Zou et al., 1997; Hofmann et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1997; Moreno et al., 1996). Es zeigte sich wiederum, daß sowohl in den BJAB-FADD-DN als auch in den Vektor-transfizierten BJAB-Zellen ML-I in gleicher Konzentrationsabhängigkeit Apoptose induzierte und somit die Beteiligung von Todesrezeptoren bei der ML-I-induzierten Apoptose ausschließt.

Es wurde veröffentlicht, daß das Galaktose-bindende Protein Galectin-1, welches in Stromazellen des Thymus exprimiert wird, in T-Zellen Apoptose induzieren kann (Perillo et al., 1995). Um zu untersuchen, ob ML-I in ähnlicher Weise Apoptose induziert, wurde die CD45-defiziente Jurkat-Zelllinie JCAM herangezogen. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase und wird für die Galectin-induzierte Apoptose benötigt. Es zeigte sich, daß in CD45-exprimierenden und -defizienten Jurkat-Zellen in gleicher Dosisabhängigkeit durch ML-I Apoptose induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies schließt aus, daß ML-I über einen ähnlichen Mechanismus wie Galectin Apoptose induziert. Durch die Inhibition des vesikulären Transports mittels Brefeldin A ließ sich die ML-I-induzierte Apoptose blockieren. Die ML-I-stimulierte Apoptose hat also die Internalisation des Lektins zur Voraussetzung, Todesrezeptoren spielen folglich hierbei keine Rolle.

Die Feststellung, daß Mistellektine in gleicher Weise wie Chemotherapeutika die Aktivierung der Caspase-8 unabhängig vom CD95-Weg induzieren können, legte den Verdacht nahe, daß ML-I ebenfalls den mitochondrialen Cytochrom c/Apaf-1-Weg zur

Apoptose-Induktion verwendet. Um eine Beteiligung des mitochondrialen Apoptoseweges bei der ML-I-vermittelten Caspase-8-Aktivierung nachzuweisen, wurde die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in cytosolischen Zellfraktionen gemessen. Es zeigte sich, daß ML-I in konzentrationsabhängiger Weise die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol induziert. Damit wurde belegt, daß Mistellektine in ähnlicher Weise wie Chemotherapeutika unabhängig vom Todesrezeptor-Signalweg über den mitochondrialen Cytochrom c/Apaf-1-Weg das endogene Apoptose-Programm auslösen. Im Vergleich zur Cytochrom c-Freisetzung war die Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials deutlich verzögert. Eine zur Aufrechterhaltung der Atmungskette kritische Mindestmenge an Cytochrom c verbleibt also zunächst im Intermembranraum der Mitochondrien. Dazu konnte kürzlich gezeigt werden, daß als Reaktion auf verschiedene Chemotherapeutika der Cytochrom c-Freisetzung eine erhöhte Expression von Cytochrom c und weiterer Bestandteile der Atmungskette vorangeht (Sanchez-Alcazar et al., 2001).

Bereits in geringer Konzentration war ML-I in der Lage, die cytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika zu erhöhen, wohingegen die CD95-induzierte Apoptose nicht beeinflusst wurde. Dieser Befund könnte die Rolle von Mistellektinen in der adjuvanten Chemotherapie dahingehend erklären, daß Mistellektine die cytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika in Bezug auf die Tumorregression verstärken. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant zu untersuchen, ob ML-I die Resistenz von Chemotherapeutika-refraktären Tumorzellen überwinden kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der molekulare Wirkungsmechanismus von Mistellektinen in der Todesrezeptor-unabhängigen Aktivierung des mitochondrialen Cytochrom c/Apaf-1-Apoptoseweges besteht. Von klinischer Relevanz ist hierbei, daß Mistellektine die cytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika verstärken. Die genaue Kenntnis der molekularen Wirkungsweise der Mistellektine bildet nun die theoretische Grundlage für künftige klinische Studien mit Mistellektinen in der adjuvanten Tumortherapie.

#### **4.5 Mitochondrien dienen als intrazelluläre Sensoren für die Zellviabilität**

Es war bekannt, daß die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c durch verschiedene apoptotische Stimuli wie anti-CD95, Staurosporin und Chemotherapeutika induziert werden kann (Yang et al., 1997b; Kluck et al., 1997; Krippner et al., 1996; Adachi et al.,

1997; Kharbanda et al., 1997). Es war bislang jedoch unklar, ob der Mitochondrien-kontrollierte Apoptoseweg unabhängig funktioniert oder ein Bestandteil des CD95-Signalweges ist.

Da die Aktivierung der Caspase-8 in der Literatur bisher nur nach Ausbildung eines FADD-enhaltenden Todesrezeptor-Komplexes beobachtet wurde, war es zunächst überraschend, eine CD95-unabhängige Caspase-8-Aktivierung festzustellen. Die proteolytische Spaltung von Procaspase-8 ließ sich hierbei durch unterschiedliche Stimuli wie Chemotherapeutika, Staurosporin, Mistellektine und Cycloheximid unabhängig vom CD95-Signalweg beobachten. Durch die Verwendung von BJAB-FADD-DN-Zellen konnte darüberhinaus auch die Beteiligung anderer Todesrezeptoren ausgeschlossen werden. Damit wurde erstmals ein vollkommen neuer Aktivierungsmodus für Caspase-8 belegt (Wesselborg et al., 1999; Ferrari et al., 1998; Bantel et al., 1999).

Daß die Freisetzung von Cytochrom c, die die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges charakterisiert (Yang et al., 1997b; Kluck et al., 1997; Krippner et al., 1996; Adachi et al., 1997; Kharbanda et al., 1997), durch die CD95-unabhängigen Stimuli Etoposid, Staurosporin und Mistellektin ausgelöst wurde, deutete die eigenständige Rolle des mitochondrialen Signalweges zur Initiation der Apoptose an. Die Eigenständigkeit der mitochondrialen Apoptose-Induktion wurde durch die Caspasenunabhängigkeit der Cytochrom c-Freisetzung nach Stimulation mit Etoposid und Staurosporin manifestiert. Daß Apoptose durch Chemotherapeutika ausschließlich über den mitochondrialen Cytochromc/Apaf-1-Signalweg initiiert wird, wurde durch die Inhibition der Apoptose durch Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 nachgewiesen, während die Induktion der Apoptose nach CD95-Stimulation nicht beeinflusst wurde, da CD95 die Caspase-Kaskade auch ohne Beteiligung des Mitochondriums einleiten kann.

Die gezeigten Daten verdeutlichen also, daß Chemotherapeutika zur Entfaltung ihrer molekularen Wirkungsweise nicht die Beteiligung von Todesrezeptoren benötigen. Obwohl Chemotherapeutika und die Stimulation von CD95 im distalen mitochondrialen Apoptose-Signalweg konvergieren, können beide unabhängig voneinander Apoptose in sensitiven Zellen induzieren. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Freisetzung lysosomaler Proteasen in das cytosolische Kompartiment über eine Cathepsin-abhängige Spaltung von Bid den Cytochrom c/Apaf-1-Signalweg initiiert (Stoka et al., 2001). Dies unterstreicht die Bedeutung der Mitochondrien bei der Induktion der Apoptose unabhängig von Todesrezeptoren, liefert allerdings keinen weiteren Anhaltspunkt für den

Wirkungsmechanismus der Chemotherapeutika. Die Spaltung von Bid konnte aufgrund der Inhibition durch Bcl-x<sub>L</sub> nach Stimulation mit Chemotherapeutika als post-mitochondriales Ereignis festgemacht werden.

Zum vollständigen Verständnis der molekularen Wirkungsweise von Chemotherapeutika bleibt allerdings noch zu klären, in welcher Weise die Schädigung der DNA und/oder die Arretierung des Zellzyklus den mitochondrialen Apoptoseweg aktiviert. Es müssen Signalfaktoren postuliert werden, die vom Zellkern ins Cytosol gelangen und anschließend die mitochondriale Cytochrom c-Freisetzung und dadurch die Aktivierung des Cytochrom c/Apaf-1-Signalweges bewirken.

## 5. Zusammenfassung

Chemotherapeutika bewirken die Elimination von Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen wie die Interkalation in die DNA, die Inhibition der DNA-Replikation, die Schädigung des Cytoskeletts oder die Produktion von freien Radikalen. Obwohl die intrazellulären Zielstrukturen einzelner Chemotherapeutika sehr verschieden sind, münden doch alle in einen gemeinsamen Signalweg, welcher Apoptose auslöst. Die Induktion der Apoptose wird durch Caspasen vermittelt. Caspasen sind Cystein-Proteasen, welche nach proteolytischer Spaltung ihrer inaktiven Proenzyme aktiviert werden. Ähnlich dem Gerinnungssystem bilden sie eine intrazelluläre proteolytische Kaskade, die durch die Spaltung vitaler Proteinsubstrate den Zelltod bewirkt. Bislang sind zwei verschiedene Mechanismen der Caspase-Aktivierung beschrieben. Bei der Apoptose durch Todesrezeptoren wie CD95 oder den TNF-Rezeptor wird die Initiator-Caspase-8 über das Adaptorprotein FADD an den Rezeptor gebunden, woraufhin diese weitere Effektor-Caspasen aktiviert. Die Caspase-8-abhängige Spaltung von Bid, einem proapoptischen Protein der Bcl-2-Familie, bewirkt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol, wodurch ein weiterer Signalweg initiiert wird. Cytochrom c im Cytosol assoziiert in Anwesenheit von dATP mit dem Regulatorprotein Apaf-1, welches anschließend die Initiator-Caspase-9 bindet und aktiviert.

Es war bislang unklar, auf welche Weise Chemotherapeutika Apoptose auslösen. Postuliert wurde ein Mechanismus para- oder autokriner CD95/CD95-Ligand-Interaktion. Durch Verwendung von CD95-resistenten und FADD dominant-negativen Zelllinien konnte aber ausgeschlossen werden, daß bei der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose Todesrezeptoren beteiligt sind. Zudem wurde Caspase-8 sowohl in den CD95-sensitiven als auch CD95-resistenten Zellen durch alle eingesetzten Cytostatika wie auch durch den Inhibitor der Proteinbiosynthese Cycloheximid aktiviert. Die durch Chemotherapeutika ausgelöste Apoptose erforderte also weder eine *de novo*-Synthese des CD95-Liganden noch eine CD95/CD95-Ligand-Interaktion. Zum ersten Mal konnte

gezeigt werden, daß die Initiator-Caspase-8 unabhängig von der Signaltransduktion durch Todesrezeptoren aktiviert wird.

Um die Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Cytostatika zu untersuchen, wurde eine Vielzahl an Zellklonen eingesetzt, denen entweder einzelne Caspasen fehlten oder die Proteine wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> oder dominant-negative Caspase-Mutanten exprimierten, die mit der apoptotischen Kaskade an unterschiedlichen Stellen interferierten. Im Gegensatz zum CD95-Signalweg erfolgte die Cytochrom c-Freisetzung ins Cytosol in der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose unabhängig von einer Caspasen-Aktivierung. Caspase-8 wurde post-mitochondrial aktiviert. Bid konnte distal von Mitochondrien und unabhängig von Caspase-8 gespalten werden. Damit wurde erstmals belegt, daß die Stimulation von Todesrezeptoren keine Voraussetzung für die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges ist. In diesem mitochondrialen Apoptose-Signalweg fungiert Caspase-8 im Gegensatz zum Todesrezeptor-Signalweg nicht als Initiator-Caspase, sondern als Effektor-Caspase distal zur Initiator-Caspase-9.

Da Erythrocyten keine membrangebundenen Zellorganellen enthalten, stellten diese ein geeignetes System dar, die Rolle der Mitochondrien in der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose zu untersuchen. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, daß caspasenabhängige Apoptose einen Kontrollmechanismus in der Regulation der Erythropoese darstellt. Ob reife Erythrocyten Bestandteile des apoptotischen Programms enthalten, war bislang unbekannt. Es konnte gezeigt werden, daß humane Erythrocyten sowohl Caspase-8, die entscheidende Initiatorcaspase in der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose, als auch Caspase-3, die zentrale Effektorcaspase, enthalten. Allerdings wiesen Erythrocyten keine der essentiellen Komponenten der mitochondrialen Caspase-Kaskade, darunter Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9, auf. Obwohl Caspase-3 und -8 *in vitro* funktionell aktiv waren, konnte keine der eingesetzten apoptotischen Stimuli inclusive der Chemotherapeutika eine Aktivierung der Caspasen in intakten Erythrocyten induzieren.

Mistlektin I (ML-I) stellt die aktive Hauptkomponente in Mistelextrakten dar, die bereits seit längerem in der adjuvanten Chemotherapie eingesetzt werden. ML-I übt dabei starke immunmodulierende und cytotoxische Effekte aus, deren Mechanismen allerdings weitgehend unbekannt waren. Die Behandlung leukämischer T- und B-Zellen mit ML-I induzierte Apoptose, die die Aktivierung von Caspasen erforderte. ML-I löste Apoptose unabhängig von Todesrezeptoren über den mitochondrialen Signalweg aus. Eine Kombinationsbehandlung von ML-I mit Chemotherapeutika zeigte eine supra-additive Erhöhung der cytotoxischen Wirkung.

Das Verständnis der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose ist von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika und den effektiveren Einsatz bestehender Chemotherapeutika in der Tumorthherapie. Die Induktion der Apoptose durch Chemotherapeutika über einen als eigenständig zu wertenden mitochondrialen Signalweg ist richtungsweisend für die Suche nach der Ursache der Chemoresistenz einiger Tumore. Der Einsatz von Mistlektin als Adjuvans in der Chemotherapie bestätigt dabei das Mitochondrium als notwendige Zielstruktur zur Erhöhung der tumoralen Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika.

## 6. Literatur

Adachi, S., Cross, A. R., Babior, B. M., Gottlieb, R. A. (1997). Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 21878-21882.

Adams, J. M., Croy, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Allison, J., Georgiou, H. M., Strasser, A., Vaux, D. L. (1997). Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3943-3947.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917-921.

Antony, S., Kuttan, R., Kuttan, G. (1997). Effect of viscum album in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 16, 159-162.

Aragane, Y., Kulms, D., Metzke, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A., Schwarz, T. (1998). Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* 140, 171-182.

Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608.

Arends, M. J., Wyllie, A. H. (1991). Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Intern. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254.

Baichwal, V. R., Bäuerle, P. A. (1997). Activate NF-kappa B or die? *Curr. Biol.* 7, R94-R96.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.

Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999). Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 2083-2090.

Barry, M. A., Behnke, C. A., Eastman, A. (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* 40, 2353-2362.

Belka, C., Marini, P., Lepple-Wienhues, A., Budach, W., Jekle, A., Los, M., Lang, F., Schulze-Osthoff, K., Gulbins, E., Bamberg, M. (1999). The tyrosine kinase lck is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation. *Oncogene* 18, 4983-4992.

Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., Duke, R. C. (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630-632.

Berenbaum, M. C. (1981). Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv. Cancer Res.* 35, 269-335.

Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L., Yuan, J. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.* 12, 1304-1314.

Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.* 211, 314-321.

Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H. J., Pulverer, G. (1991). Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In Vivo* 5, 29-32.

Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H. J., Burrichter, H., Oette, K., Pulverer, G. (1992). Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin. Investig.* 70, 658-661.

Beuth, J. (1997). Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs* 8, S53-S55.

Beutler, B., van Huffel, C. (1994). Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 264, 667-668.

Bodmer, J. L., Bums, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L. E., Browning, J. L., MacDonald, H. R., Tschopp, J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.

Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C. B. (1993). Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270, 7795-7798.

Boldin, M. P., Goncharov, T., Goltsev, Y. V., Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17, 37-49.

Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Büssing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfüller, U., Schietzel, M., Schweizer, K. (1996). Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.* 99, 59-72.

Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.

Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Dataa, P., Alnemri, E. S., Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104, 769-780.

Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Immunity* 7, 821-830.

Chen, Z., Naito, M., Mashima, T., Tsuruo, T. (1996). Activation of actin-cleavable interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 56, 5224-5229.

Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., Hardwick, J. M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379, 554-556.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., Dixit, V. M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., Dixit, V. M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-1126.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.

Consoli, U., El-Tounsi, I., Sandoval, A., Snell, V., Kleine, H. D., Brown, W., Robinson, J. R., DiRaimondo, F., Plunkett, W., Andreeff, M. (1998). Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 91, 1742-1748.

Cotter, F. E., Johnson, P., Hall, P., Pocock, C., al Mahdi, N., Cowell, J. K., Morgan, G. (1994). Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* 9, 3049-3055.

Cotter, F. E., Waters, J., Cunningham, D. (1999). Human Bcl-2 antisense therapy for lymphomas. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 97-106.

Cryns, V., Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.* 12, 1551-1570.

Datta, R., Banach, D., Kojima, H., Talanian, R. V., Alnemri, E. S., Wong, W. W., Kufe, D. W. (1996). Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* 88, 1936-1943.

Day, C. L., Dupont, C., Lackmann, M., Vaux, D. L., Hinds, M. G. (1999). Solution structure and mutagenesis of the caspase recruitment domain (CARD) from Apaf-1. *Cell Death Differ.* 6, 1125-1132.

De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P., Peschle, C. (1999). Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 93, 796-803.

Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., Smith, C. A. (1997a). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186, 1165-1170.

Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., Goodwin, R. G. (1997b). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.

Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215-2223.

Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239-252.

Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P., Krammer, P. H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* 149, 3166-3173.

Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/. *Nature* 373, 438-441.

Dietrich, J. B., Ribereau-Gayon, G., Jung, M. L., Franz, H., Beck, J. P., Anton, R. (1992). Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anticancer Drugs* 3, 507-511.

Doser, C., Doser, M., Hulsén, H., Mechelke, F. (1989). Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneimittelforschung* 39, 647-651.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Duan, H., Dixit, V. M. (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385, 86-89.

Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* *15*, 2685-2694.

Duvall, E., Wyllie, A. H. (1986). Death and the cell. *Immunol. Today* *7*, 115-119.

Eck, M. J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos, A. M., Sprang, S. R. (1992). The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor- $\beta$ ). at 1.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.* *267*, 2119-2122.

Eischen, C. M., Kottke, T. J., Martins, L. M., Basi, G. S., Tung, J. S., Earnshaw, W. C., Leibson, P. J., Kaufmann, S. H. (1997). Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* *90*, 935-943.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43-50.

Endo, Y., Tsurugi, K., Franz, H. (1988). The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.* *231*, 378-380.

Engels, I. H., Mozoluk, M., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (2001). Apoptosis triggered by death receptors. In: Ebadi, M., Marwah, J., Chopra, R. K. (Ed.) *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical, and Therapeutical Aspects in Human Health and Diseases*. Scottsdale: Prominent Press. Im Druck.

Erhardt, P., Cooper, G. M. (1996). Activation of the CPP32 apoptotic protease by distinct signaling pathways with differential sensitivity to Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* *271*, 17601-17604.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* *148*, 2207-2216.

Falconer, J., Chan, E. C., Madsen, G., Thomson, M., Davies, J., Smith, R. (1988). Secretion of beta-endorphin into the maternal circulation by uteroplacental tissues in response to hypoglycaemic stress. *J. Endocrinol.* 118, R5-R8.

Fearnhead, H. O., Rodriguez, J., Govek, E. E., Guo, W., Kobayashi, R., Hannon, G., Lazebnik, Y. A. (1998). Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13664-13669.

Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188, 979-984.

Fisher, D. E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78, 539-542.

Franz, H., Ziska, P., Kindt, A. (1981). Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem. J.* 195, 481-484.

Franz, H. (1985). Ingredients of mistletoe (*Viscum album* L.) as potential drugs. *Pharmazie* 40, 97-104.

Franz, H. (1986). Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 43, 23-34.

Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* 2, 574-577.

Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., Debatin, K. M. (1997a). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 57, 3823-3829.

Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nunez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E., Debatin, K. M. (1997b). Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 57, 4956-4964.

Fulda, S., Susin, S. A., Kroemer, G., Debatin, K. M. (1998). Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 58, 4453-4460.

Gamen, S., Anel, A., Lasierra, P., Alava, M. A., Martinez-Lorenzo, M. J., Pineiro, A., Naval, J. (1997). Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett.* 417, 360-364.

Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., Chan, C. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell Sci.* 111, 3209-3220.

Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., Brodianskii, V. M., Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J. Biol. Chem.* 272, 19641-19644.

Gregoli, P. A., Bondurant, M. C. (1997). The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* 90, 630-640.

Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R., Ferguson, T. A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192.

Hajto, T., Hostanska, K., Gabius, H. J. (1989). Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res.* 49, 4803-4808.

Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H. J. (1990). Increased secretion of tumor necrosis factors  $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50, 3322-3326.

Hajto, T., Hostanska, K., Fornalski, M., Kirsch, A. (1991). Antitumor activity of  $\beta$ -galactoside specific mistletoe lectin as immunomodulator applied by mistletoe extracts (Iscador). *Dtsch. Zschr. Onkol.* 23, 1-6.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-352.

Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M., Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11333-11338.

Han, J., Wallen, H. D., Nunez, G., White, E. (1998). E1B 19,000-molecular-weight protein interacts with and inhibits CED-4-dependent, FLICE-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 18, 6052-6062.

Hannun, Y. A. (1997). Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 89, 1845-1853.

Heiny, B. M., Beuth, J. (1994). Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces  $\beta$ -endorphin release and immunopotentiality in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 14, 1339-1342.

Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., Debatin, K. M. (1997). Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J.* 16, 6200-6208.

Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* 22, 155-156.

Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.

Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., Dixit, V. M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17255-17257.

Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N., Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4386-4391.

Huang, Y., Chul Park, Y., Rich, R. L., Segal, D., Myska, D. G., Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* *104*, 781-790.

Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., Nunez, G. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10717-10722.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.

Jänicke, R. U., Spengart, M. L., Wati, M. R., Porter, A. G. (1998a). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 9357-9360.

Jänicke, R. U., Ng, P., Spengart, M. L., Porter, A. G. (1998b). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 15540-15545.

Janssen, O., Scheffler, A., Kabelitz, D. (1993). In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung* *43*, 1221-1227.

Jones, E. Y., Stuart, D. I., Walker, N. P. (1992). Crystal structure of TNF. *Immunol. Ser.* *56*, 93-127.

Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* *8*, 1001-1008.

Kang, S. M., Schneider, D. B., Lin, Z., Hanahan, D., Dichek, D. A., Stock, P. G., Baekkeskov, S. (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat. Med.* 3, 738-743.

Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J., Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 161, 3936-3942.

Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985.

Kawahara, A., Kobayashi, T., Nagata, S. (1998). Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene* 17, 2549-2554.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z. M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., Kufe, D. (1997). Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6939-6942.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzler, E., Green, D. R., Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.

Krammer, P. H., Dhein, J., Walczak, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P. T., Knipping, E., Westendorp, M. O., Stricker, K., Baumler, C., Hellbrandt, S., Germer, M., Peter, M. E., Debatin, K. M. (1994). The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol. Rev.* 142, 175-191.

Krippner, A., Matsuno-Yagi, A., Gottlieb, R. A., Babior, B. M. (1996). Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 21629-21636.

Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 3, 614-620.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.

Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.

Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J., Fritz, L. C. (1997b). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 272, 30299-30305.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997a). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-353.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.

Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408, 1004-1008.

Los, M., Herr, I., Friesen, C., Fulda, S., Schulze-Osthoff, K., Debatin, K. M. (1997). Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* 90, 3118-3129.

Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10, 629-639.

Lotem, J., Sachs, L. (1993). Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Differ.* 4, 41-47.

Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., Housman, D. E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272, 25417-25420.

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. *Curr. Biol.* 7, 1003-1006.

Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L., Lenardo, M. J. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* 273, 4345-4349.

McDonnell, T. J., Troncoso, P., Brisbay, S. M., Logothetis, C., Chung, L. W., Hsieh, J. T., Tu, S. M., Campbell, M. L. (1992). Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52, 6940-6944.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794-2804.

Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357.

Miyashita, T., Reed, J. C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81, 151-157.

Möckel, B., Schwarz, T., Zinke, H., Eck, J., Langer, M., Lentzen, H. (1997). Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittelforschung* 47, 1145-1151.

Moreno, M. B., Memon, S. A., Zacharchuk, C. M. (1996). Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and IL-1 $\beta$ -converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 157, 3845-3849.

Moriishi, K., Huang, D. C., Cory, S., Adams, J. M. (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9683-9688.

Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T., Nakano, T. (1999). Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* 189, 1691-1698.

Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L., Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H., Galle, P. R. (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* 99, 403-413.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G. C., Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 17, 706-718.

Nicholson, D. W., Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22, 299-306.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139, 271-279.

Ojcius, D. M., Zychlinski, A., Zheng, L. M., Young, J. D. (1991). Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp. Cell Res.* 197, 43-49.

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V. M. (1997a). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V. M. (1997b). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.

Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., Dixit, V. M. (1998a). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431, 351-356.

Pan, G., O'Rourke, K., Dixit, V. M. (1998b). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* 273, 5841-5845.

Perillo, N. L., Pace, K. E., Seilhamer, J. J., Baum, L. G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378, 736-739.

Peter, M. E., Kischkel, F. C., Scheuerpflug, C. G., Medema, J. P., Debatin, K. M., Krammer, P. H. (1997). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* 27, 1207-1212.

Peumans, W. J., Verhaert, P., Pfuller, U., Van Damme, E. J. (1996). Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Lett.* 396, 261-265.

Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., Shi, Y. (1999). Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399, 549-557.

Rano, T. A., Timkey, T., Peterson, E. P., Rotonda, J., Nicholson, D. W., Becker, J. W., Chapman, K. T., Thornberry, N. A. (1997). A combinatorial approach for determining

protease specificities: application to interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE). *Chem. Biol.* 4, 149-155.

Reed, J. C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.

Ribereau-Gayon, G., Jung, M. L., Baudino, S., Salle, G., Beck, J. P. (1986). Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. *Experientia* 42, 594-599.

Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M. L., Poindron, P., Anton, R. (1996). Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* 109, 33-38.

Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104, 791-800.

Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499.

Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.

Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-6925.

Sanchez-Alcazar, J. A., Khodjakov, A., Schneider, E. (2001). Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res.* 61, 1038-1044.

Sandvig, K., Prydz, K., Hansen, S. H., van Deurs, B. (1991). Ricin transport in brefeldin A-treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. *J. Cell Biol.* 115, 971-981.

Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., Haslett, C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343, 170-173.

Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J. Biol. Chem.* 272, 26953-26958.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.

Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., Reed, J. C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5113-5118.

Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- $\kappa$ B. *Immunity* 7, 831-836.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254, 439-459.

Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K., Yagita, H. (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat. Med.* 3, 165-170.

Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowski, P., Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.

Shu, H. B., Halpin, D. R., Goeddel, D. V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.

Simonian, P. L., Grillot, D. A., Andrews, D. W., Leber, B., Nunez, G. (1996). Bax homodimerization is not required for Bax to accelerate chemotherapy-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 271, 32073-32077.

Simonian, P. L., Grillot, D. A., Nunez, G. (1997). Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2. *Oncogene 15*, 1871-1875.

Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol. 144*, 281-292.

Slee, E. A., Keogh, S. A., Martin, S. J. (2000). Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ. 7*, 556-565.

Smith, K. G., Strasser, A., Vaux, D. L. (1996). CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J. 15*, 5167-5176.

Soler, M. H., Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T., Voelter, W. (1996). Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I. *FEBS Lett. 399*, 153-157.

Soler, M. H., Stoeva, S., Voelter, W. (1998). Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 246*, 596-601.

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity 12*, 599-609.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93*, 14486-14491.

Srinivasula, S. M., Ahamad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J., Armstrong, R. C., Alnemri, E. S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 18542-18545.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949-957.

Srinivasula, S. M., Datta, P., Fan, X. J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., Alnemri, E. S. (2000). Molecular Determinants of the Caspase-promoting Activity of Smac/DIABLO and Its Role in the Death Receptor Pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 36152-36157.

Srinivasula, S. M., Hedge, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.-A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.

St. Clair, E. G., Anderson, S. J., Oltvai, Z. N. (1997). Bcl-2 counters apoptosis by Bax heterodimerization-dependent and -independent mechanisms in the T-cell lineage. *J. Biol. Chem.* 272, 29347-29355.

Stegh, A. H., Herrmann, H., Lampel, S., Weisenberger, D., Andra, K., Seper, M., Wiche, G., Krammer, P. H., Peter, M. E. (2000). Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20, 5665-5679.

Stein, G. M., Berg, P. A. (1997). Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: in vitro studies. *Anticancer Drugs* 8, S39-S42.

Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T.-H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Brömme, D., Krajewski, S., Reed, J. C., Yin, X.-M., Turk, V., Salvesen, G. S. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 3149-3157.

Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79, 329-339.

Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H., Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 14, 6136-6147.

Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 5, 997-1000.

Sun, X. M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B. B., Green, D. R., Cohen, G. M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 5053-5060.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184, 1331-1341.

Susin, S. A., Zamzami, N., Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 151-165.

Tang, D., Lahti, J. M., Kidd, V. J. (2000). Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 9303-9307.

Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1995). Yama/CPP32  $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907-17911.

Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Tolomeo, M., Dusonchet, L., Meli, M., Grimaudo, S., D'Alessandro, N., Papoff, G., Ruberti, G., Rausa, L. (1998). The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anticancer drug-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 5, 735-742.

Van de Craen M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., Vandenabeele, P. (1999). The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* 6, 1117-1124.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

Villunger, A., Egle, A., Kos, M., Hartmann, B. L., Geley, S., Kofler, R., Greil, R. (1997). Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res.* 57, 3331-3334.

Wajant, H., Johannes, F. J., Haas, E., Siemienski, K., Schwenzler, R., Schubert, G., Weiss, T., Grell, M., Scheurich, P. (1998). Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction. *Curr. Biol.* 8, 113-116.

Walczak, H., Degli-Eposti, 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. *EMBO J.* *16*, 5386-5397.

Webb, A., Cunningham, D., Cotter, F., Clarke, P. A., di Stefano, F., Ross, P., Corbo, M., Dziewanowska, Z. (1997). BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* *349*, 1137-1141.

Weil, M., Jacobson, M. D., Raff, M. C. (1998). Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J. Cell Sci.* *111*, 2707-2715.

Wesselborg, S., Engels, I. H., Rossmann, E., Los, M., Schulze-Osthoff, K. (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* *93*, 3053-3063.

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. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* *3*, 673-682.

Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* *408*, 1008-1012.

Yang, E., Korsmeyer, S. J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* *88*, 386-401.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., Wang, X. (1997b). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* *275*, 1129-1132.

Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., Baltimore, D. (1997a). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* *89*, 1067-1076.

Yeh, W. C., Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V., Mak, T. W. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.

Zamai, L., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Bassini, A., Papa, S., Alnemri, E. S., Guidotti, L., Vitale, M., Zauli, G. (2000). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* 95, 3716-3724.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182, 367-377.

Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., Korsmeyer, S. J. (2000). Posttranslational N-Myristoylation of BID as a Molecular Switch for Targeting Mitochondria and Apoptosis. *Science* 290, 1761-1765.

Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O. T., Doskeland, S. O. (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391, 449-450.

Zhu, H., Fearnhead, H. O., Cohen, G. M. (1995). An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells. *FEBS Lett.* 374, 303-308.

Zhuang, J., Dinsdale, D., Cohen, G. M. (1998). Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell Death Differ.* 5, 953-962.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in den folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Wesselborg, S., Engels, I. H., Rossmann, E., Los, M., Schulze-Osthoff, K. (1999). Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* 93, 3053-3063.

Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999). Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 2083-2090.

Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Lauber, K., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Jänicke, R. U., Porter, A. G., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (2000) Caspase-8 functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 19, 4563-4573.

Berg, C. P., Engels, I. H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S. F., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (2001) Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Diff.*, im Druck.

Weitere Publikationen:

Los, M., Stroh, C., Jänicke, R. U., Engels, I. H., Schulze-Osthoff, K. (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* 22, 31-34.

Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I. H., Belka, C., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (2001) Staurosporine activates the mitochondrial death pathway upstream and downstream of the mitochondrial cytochrome c release. *Oncogene* 20, 1193-1202.

Engels, I. H., Mozoluk, M., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (2001). Apoptosis triggered by death receptors. In: Ebadi, M., Marwah, J., Chopra, R. K. (Eds.) *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical, and Therapeutical Aspects in Human Health and Diseases*. Prominent Press.

Jänicke, R. U., Engels, I. H., Dunkern, T., Kaina, B., Schulze-Osthoff, K., Porter, A. G. (2001). Ionizing radiation but not cancer drugs causes cell cycle arrest and failure to activate the mitochondrial death pathway in MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene*, im Druck.

Müller, F. U., Loser, K., Kleideiter, U., Neumann, J., Engels, I. H., Los, M., Schulze-Osthoff, K., Scheld, H.-H., Schmitz, W. (2001) Adenovirus-mediated gene transfer of the transcription factor AP-2 $\alpha$  triggers apoptosis in cardiac myocytes. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Veröffentlichte Vorträge:

Engels, I. H., Stepczynska, A., Stroh, C., Berg, C., Schwenzer, R., Wajant, H., Los, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999) Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Immunobiology* 200, 372.

Nicht veröffentlichte Vorträge:

Engels, I. H., Bantel, H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1998) Mistletoe lectins activate caspase-8/FLICE in the absence of death receptor signaling and potentiate anticancer drug-induced apoptosis. 1<sup>st</sup> European Workshop on Cell Death, L'Aquila, Italien.

Engels, I. H., Stepczynska, A., Rossmann, E., Los, M., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999) Chemotherapeutica induce the activation of caspase-8 independent of death receptor signaling. Spring Meeting of the German Society of Immunology, Stuttgart.

Engels, I. H., Berg, C. P., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (2000) Calpains but not caspases are involved in senescence of human mature red blood cells. 2<sup>nd</sup> Symposium on Vascular Biology, Münster.

# **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Albert, Bayer, Bisswanger, Bock, Bohley, Breyer-Pfaff, Eisele, Fröhlich, Gauglitz, Gebhardt, Götz, Günzl, Häfelinger, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Hoffmann, Jung, Kaiser, Krug, Lindner, Mayer, Mecke, Nagel, Nakel, Oberhammer, Oelkrug, Pfaff, Pfeiffer, Pommer, Probst, Rammensee, Reutter, Schurig, Schulze-Osthoff, Schwarz, Strähle, Stegmann, Voelter, Voigt, Walden, Wegmann, Werringloer, Weser, Wiesmüller.

## Lebenslauf    Ingo Engels

02. Mai 1972            geboren in Aachen, Nordrhein-Westfalen  
Vater: Kurt Engels, Oberstudiendirektor i.R.  
Mutter: Elisabeth Engels, geb. Geulen
- 1978-1982            Besuch der Grundschule Birkstr. in Aachen-Eilendorf  
1982-1991            Besuch des Geschwister-Scholl-Gymnasiums, Aachen  
mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife
- 1991-1992            Zivildienst als Rettungssanitäter  
beim Malteser Hilfsdienst e.V. Aachen
- 1992-1998            Studium der Biochemie  
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 10/1993              1. Teil der Vorprüfung zur Diplomprüfung  
in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 04/1995              2. Teil der Vorprüfung zur Diplomprüfung  
in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 08/1997-01/1998    Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Peter Bohley  
*Tridecapeptidamidkolektionen zur Charakterisierung von  
Epitopen für MHC Klasse II-restringierte T-Zellen*  
am Physiologisch Chemischen Institut der Universität Tübingen,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Bohley,  
am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der  
Universität Tübingen in Reutlingen, Abteilung Biochemie,  
Arbeitskreis Dr. Karl-Heinz Wiesmüller  
am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Günther Jung und  
an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Charité an der  
Humboldt-Universität zu Berlin
- 01/1998              Diplom in Physiologischer Chemie und Biochemie
- 1998-2001            Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff  
*Untersuchungen zur Signaltransduktion bei der durch  
Chemotherapeutika induzierten Apoptose*
- 04/1998-07/1999    an der Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin I  
08/1999-07/2001    am Institut für Experimentelle Dermatologie,  
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster