

1. Einleitung

1.1. Apoptose: ein Programm zur geregelten Selbstzerstörung

Um die Homöostase in Geweben metazoischer Organismen aufrechtzuerhalten, verfügt jede Zelle über ein genetisch festgelegtes Programm der Selbstzerstörung, das auf äußere oder innere Signale hin eingeschaltet wird und zum „Suizid“ der Zelle führt. Dieser Vorgang wird als Apoptose oder Programmierter Zelltod bezeichnet. Apoptose regelt das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod und stellt einen wichtigen, physiologischen Mechanismus bei der Embryonalentwicklung, der Differenzierung und Erneuerung von Geweben sowie der Regulation des Immunsystems dar (1, 2). Apoptose-induzierende Signale können u.a. Hormone, Zytokine und chemische Substanzen sein, oder alternativ wird Apoptose durch Entzug von Wachstumsfaktoren, sowie durch eine irreparable Schädigung der Zelle, insbesondere der DNA, ausgelöst.

Zellen sterben entweder durch Apoptose oder durch Nekrose, beiden Abläufen können charakteristische morphologische Veränderungen der Zellen zugeordnet werden, wie sie in Tab. 1 gegenübergestellt sind.

Tab. 1 : Charakteristika von Apoptose und Nekrose

Apoptose	Nekrose
<ul style="list-style-type: none"> • organisierter Suizid der Zelle • genetische Regulation • Schrumpfen der Zelle • Zytoplasmamembran bildet Ausstülpungen aus (Membran-„Blebbing“) • Bildung und Freisetzung von „apoptotischen Partikeln“ • Aktivierung von spezifischen Proteinen der Apoptose-Maschinerie • Fragmentierung des Nukleus • Kondensation des Chromatins • Fragmentierung der DNA • keine Inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> • unorganisierter Zelltod • metabolische Regulation • Schwellen der Zelle • Ruptur der Zytoplasmamembran Platzen der Zelle • Freisetzung des Zytoplasmas • Aktivierung unspezifischer, lysosomaler Proteine • Zerstörung der Zellkomponenten ohne Fragmentierung des Nukleus • Abwesenheit von DNA-Fragmentierung • lokale Inflammationsreaktion

Diese zellulären Phänomene wurden zum ersten Mal 1972 durch Kerr et al. (3) als eigenständiger, aktiver Prozeß beschrieben. Dysfunktionen der Apoptose scheinen an einer Reihe von Erkrankungen des Menschen beteiligt zu sein, hierzu zählen neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder die spinale Muskelatrophie, die beide mit einem vermehrten Zelltod einhergehen. Andererseits führt eine verminderte Apoptoseaktivität auch dazu, daß DNA-geschädigte und mutierte Zellen nicht eliminiert werden und unkontrolliert proliferieren. Diese Zellen bilden dann aufgrund ihrer genetischen Instabilität den Ausgangspunkt für Neoplasien. Neben Tumorentstehung kann eine fehlende Apoptose auch die klonale Selektion autoreaktiver T- und B-Lymphozyten beeinträchtigen und dadurch Autoimmunerkrankungen mitbeeinflussen (4, 5). Für die gezielte Therapie von Erkrankungen, deren Pathogenese in Verbindung mit gestörter Apoptose steht, ist das Verstehen der molekularen Abläufe und der Regulationsmechanismen der Apoptose notwendig.

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des evolutionär konservierten Ablaufes der Apoptose konnten Untersuchungen am Nematoden, *Caenorhabditis elegans*, liefern. Die Entwicklung dieses Organismus setzt die Apoptose einzelner Zellen voraus. Die Regulation der Apoptose ist an die Funktionalität mehrerer Genen gekoppelt, zu denen *CED-3*, *CED-4* und *CED-9* (2) gehören. Davon ausgehend wurden viele humane, homologe Gene entdeckt.

1.2. Caspasen: ausführende Proteine der Apoptose-Maschinerie

Mit der Klonierung des *ced-3*-Gens aus *Caenorhabditis elegans* wurde das erste Mitglied der Familie der Caspasen charakterisiert, die als Effektoren bei dem Prozeß der Apoptose wirken (6). Das humane ICE (*interleukin 1 converting enzyme*), bereits als Protease bekannt, die Interleukin-1 (IL-1) durch Spaltung aktiviert, zeigte nicht nur Sequenz-Homologien zu CED-3, sondern erwies sich auch vergleichbar hinsichtlich der Apoptose-induzierenden Funktion von CED-3 (7). Seither sind insgesamt 14 humane Caspasen beschrieben worden, die sich als Cysteinproteasen durch konservierte, aktive Zentren der Primärstruktur

-QACXG- auszeichnen (8). Die Bezeichnung ‚Caspasen‘ bezieht sich außerdem auf die Fähigkeit der Proteasen, nach einem Aspartat zu spalten. Caspasen sind folglich Cystein-abhängige-Aspartat-spezifische Proteasen (9). Sie werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, die durch Spaltung nach einem Aspartat entweder durch andere Caspasen oder durch autokatalytische Prozesse aktiviert werden (10). Die Reifung zur aktiven Caspase beginnt mit der Spaltung des Zymogens in große (p20) und kleine (p10) Untereinheit und setzt sich mit der Abtrennung der N-terminalen Prodomäne fort. Das aktive Enzym besteht als Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (11-13).

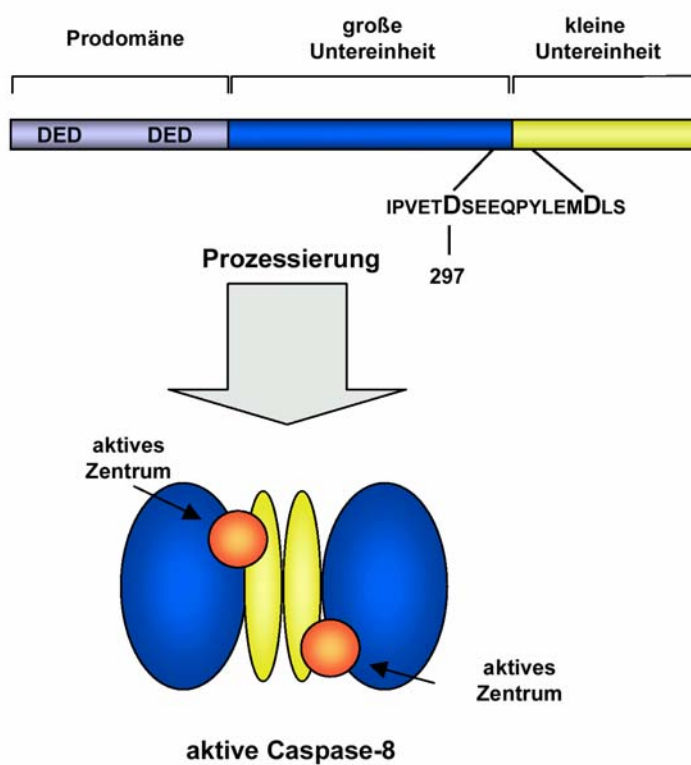


Abb.1: Struktur und Prozessierung der Caspasen am Beispiel der Caspase-8. Die Prozessierung der Caspasen erfolgt durch Spaltung nach einem Asparat zwischen großer und kleiner Untereinheit und anschließender Abspaltung der N-terminalen Prodomäne. Das aktive Enzym setzt sich als Heterotetramer aus 2 kleinen und 2 großen Untereinheiten mit katalytischen Zentren zusammen, die jeweils beide Untereinheiten einbeziehen.

Die Aktivierung von Caspasen stellt für das Überleben der Zelle ein kritisches Ereignis dar, das deshalb einer strikten Kontrolle durch verschiedene Signalwege unterliegt. Die Einbindung in diese Signalkaskaden wird durch die Struktur der Prodomäne ermöglicht. Nach der Position der Caspasen innerhalb ihrer stufenweisen Aktivierung durch unterschiedliche Signale spricht man von Initiator-Caspasen oder von Effektor-Caspasen. Die Aufgabe der Initiator-Caspasen liegt in der Aktivierung der Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen sind durch eine lange Prodomäne von ca. 200 Aminosäuren charakterisiert, die zwei verschiedene konservierte Bereiche mit der Bezeichnung DED (*death effector domain*) oder CARD (*caspase recruitment domain*) tragen kann. Zu den Effektor-Caspasen zählt man Caspase-3, -6, -7 und -14, die sich durch kurze Prodomänen (23-28 Aminosäuren) auszeichnen. DEDs, wie sie innerhalb der Prodomäne der Initiator-Caspasen 8 und 10 zu finden sind, schaffen Kontaktpunkte zur DED des Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated death domain-containing protein*), das innerhalb eines Rezeptor-vermittelten Apoptoseweges eine wichtige Rolle spielt (14, 15). In ähnlicher Weise vermittelt die CARD, die in Caspase-1, -2, -4 und -9 zu finden ist, die Interaktion untereinander bzw. zu anderen Adaptermolekülen wie Apaf-1 (*apoptosis activating factor*).

Anhand der Sequenzhomologien lassen sich Caspasen in verschiedene Unterfamilien unterteilen, wie das Dendrogramm in Abb. 2 zeigt.

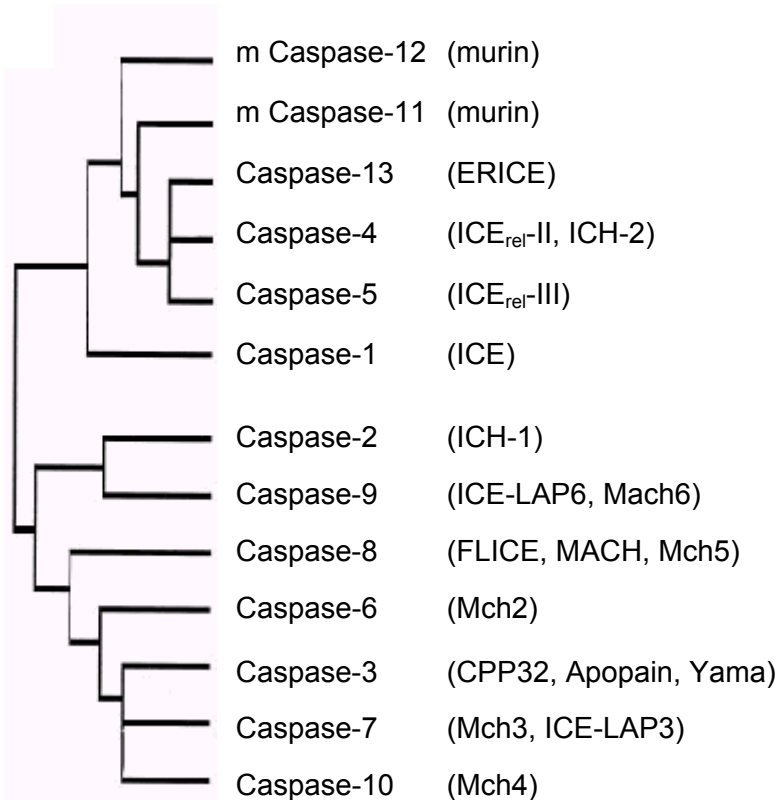


Abb. 2: Phylogenetische Unterteilung der Caspase-Familie. Die phylogenetische Analyse der Caspase-Familie ordnet die Caspasen anhand von Sequenzdaten nach Verwandtschaftsgrad ein. Alte Bezeichnungen sind in Klammern genannt. Caspase-14 fand bisher noch keine Einordnung.

Dabei scheinen die Caspasen-1 und -11 bei der Apoptose in Zellen eine geringe Rolle zu spielen (16, 17). Insbesondere Caspase-1 ist durch die Aktivierung von IL-1 β (Interleukin-1 β) und IL-18 als eine Protease charakterisiert, die an der Inflammation beteiligt ist (10). Sie wird durch die Initiator-Caspase-11 aktiviert (18). Für Caspase-14 ist die Beteiligung an der Apoptose noch Gegenstand der Diskussion, allerdings zeigte sich eine Aktivierung der murinen Caspase-14 nach Apoptoseinduktion durch TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) (19, 20). Über Caspase-4 und -13 gibt es ebenfalls Befunde für eine Beteiligung an der CD95/Fas-induzierten Apoptose (21, 22). Mittlerweile gilt die Beteiligung von Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 und -12 am Ablauf der Apoptose als unumstritten, wie insbesondere Deletionen der Gene im Maus-Modell nachgewiesen haben. Mäuse, die defizient für Caspase-3, -8 oder -9 sind, sterben während der Embryonalentwicklung und weisen Deformationen im Nervensystem bzw. am Herzen aufgrund von verminderter Apoptose auf (23-26). Außerdem zeigen sich Zellen, die eine geringe oder fehlende Expression von Caspasen aufweisen, als weniger sensibel gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen (27, 28).

Die Induktion von Apoptose in der Zelle, die in der ersten Phase mit der Aktivierung von Caspasen einhergeht, führt in einer nachfolgenden Phase (Exekutionsphase) zur Ausprägung der charakteristischen Apoptosemerkmale wie z.B. die Fragmentierung von DNA und Nukleus. Hierbei sind verschiedene Caspase-Substrate beteiligt, bei denen es sich einerseits um Strukturproteine wie β Aktin, Lamine oder Gas2 und andererseits um Enzyme handelt, die an der DNA-Reparatur (Poly-[ADP-Ribose]-Polymerase, PARP), die direkt an der inter-nukleosomalen Spaltung der DNA (*Caspase-activated Desoxyribonuclease*, CAD) oder am RNA-Splicing (70 kDa U1-Ribonukleoprotein) beteiligt sind (13, 29, 30). Die DNA-Nuklease CAD wird durch die Caspase-3-vermittelte Spaltung des CAD-Inhibitors (ICAD/DFP 45) aktiviert (31, 32). D4-GDI/Rho-GDI 2 (*GDP dissociation inhibitor*) nimmt möglicherweise über die Modulation der Rho-GTPasen Einfluß auf die Organisation des β Aktin-Zytoskelettes (33). Darüberhinaus werden Signalproteine, die Überleben oder Proliferation vermitteln, durch die Spaltung durch Caspasen inaktiviert (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt) oder es werden pro-apoptische Proteine durch Spaltung aktiviert (MEK-1) (34).

1.3. Signalwege der Apoptose

Immer deutlicher kristallisieren sich zwei zentrale Signalwege heraus, die in der Zelle nach Erhalt Apoptose-induzierender Stimuli beschriftet werden, um über die Aktivierung von Caspasen oder auch Caspase-unabhängig den programmierten Zelltod auszulösen. Dies sind einerseits Rezeptor-vermittelte Signalwege, die durch Bindung zwischen Ligand und Rezeptor initiiert sind und andererseits Signalwege, deren aktivierendes Ereignis in der Schädigung der Mitochondrien besteht (35). Welcher Signalweg rekrutiert wird, steht in Abhängigkeit zum Apoptose-induzierenden Stimulus und zum Zelltyp. Beide Wege sind nicht strikt voneinander getrennt, sondern weisen Verzweigungen auf. Darüberhinaus spielen auch von diesen Signalwegen unabhängige Mechanismen bei der Induktion von Apoptose eine wichtige Rolle. Hierzu zählt insbesondere die Regulation des Zellzyklus unter Einbeziehung von p53 (36). Auch andere Zellorganellen wie das Endoplasmatische Retikulum sind in der Lage, nach Schädigung Apoptose-induzierende Signale in der Zelle auszulösen und die Aktivierung von Caspase-12 zu induzieren (37).

1.3.1. Mitochondriale Induktion von Apoptose

Mitochondrien sind ins Zentrum der Apoptose-Forschung gerückt, seit in einem zellfreien System gezeigt wurde, daß die Induktion und Exekution von Apoptose von der Anwesenheit von Mitochondrien abhängig ist (38). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei der Apoptose

Cytochrom C aus der Region zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran freigesetzt wird und zur Bildung des sogenannten Apoptosoms führt (39). Dieser Komplex, der neben Cytochrom C aus dATP und Apaf-1, einem zu CED-4 aus *C. elegans* homologen Protein, besteht, induziert die Rekrutierung und autokatalytische Aktivierung von Caspase-9 (39, 40). Aktivierte Caspase-9 schaltet dann über eine Aktivierung von Caspase-3 die nachfolgende Caspase-Kaskade ein (41). Die Interaktion zwischen Caspase-9 und Apaf-1 erfolgt über die N-terminale CARD beider Proteine. Darüberhinaus verfügt das 130 kDa Apaf-1-Protein über eine zentrale Region mit Homologie zu CED-4 und eine Carboxy-terminale WD-40-Region. Obwohl der Ablauf der Ereignisse und die Stöchiometrie der Komponenten, die zur Aktivierung von Caspase-9 führen, noch Gegenstand der Diskussionen sind, deuten neuere Arbeiten auf einen Mechanismus hin, bei dem Cytochrom C zunächst an die WD-40-Region bindet, um eine Konformationsänderung zu induzieren. Anschließend formiert sich in Anwesenheit von dATP ein Komplex aus mehreren Apaf-1-Molekülen, das Caspase-9-Zymogene über deren CARDS in eine sterische Nähe zueinander bringt, um deren autokatalytische Aktivierung zu ermöglichen (42-44).

Dieser zentrale Prozeß der mitochondrialen Apoptose-Induktion wird flankiert durch Caspase-unabhängige Mechanismen, die ebenfalls die Freisetzung eines Proteins aus der mitochondrialen Intermembranregion beinhalten. Dieses Protein wird als AIF (*apoptosis inducing factor*) bezeichnet und stellt eine FAD-abhängige Oxidoreduktase dar, die im Zuge ihrer Freisetzung ins Zytoplasma über noch unbekannte Mediatoren die Kondensation von Chromatin und die Fragmentierung von DNA in ca. 50 kb große Fragmente induziert (45, 46).

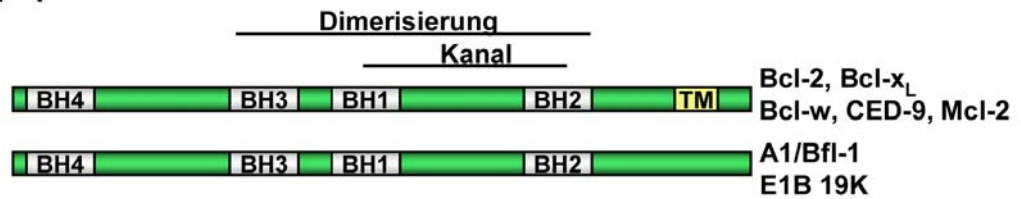
Neben der Freisetzung von Cytochrom C und AIF nach Schädigung der Mitochondrien scheint auch die Freisetzung von Pro-Caspase-2, -3 und -9 aus Mitochondrien für die Induktion von Zelltod von Bedeutung zu sein (46-48). Als weiterer Faktor wurde kürzlich SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) charakterisiert, der ebenfalls im Zuge der Apoptose-Induktion aus den Mitochondrien freigesetzt wird und eine Funktion bei der Caspase-Aktivierung hat (49, 50).

Substanzen, die Apoptose induzieren durch eine Beeinträchtigung der Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom C, greifen zwangsläufig auch auf lebenswichtige Abläufe der Zelle wie den Elektronentransport der Atmungskette ein (51). Störungen dieser Abläufe führen zum Zusammenbruch des Membranpotentials und lassen ATP-Mangel und ROI (*radical oxygen intermediates*) wie Superoxidanionen (O_2^-) entstehen. Inwieweit die Bildung von ROIs für Apoptose-induzierende Stimuli eine notwendige Voraussetzung darstellt, wird kontrovers diskutiert (52-54).

1.3.1.1. Regulatoren der mitochondrial-induzierten Apoptose: Die Bcl-2-Familie

Durch die Steuerung der mitochondrialen Aktivierung können die Mitglieder der Bcl-2-Familie großen Einfluß auf das Überleben oder Sterben einer Zelle nehmen. Es handelt sich um eine Proteinfamilie, auf die man 1985 mit der Charakterisierung des Proto-Onkogens, Bcl-2, als Genprodukt einer Translokation t(14;18) humaner B-Zell-Lymphome aufmerksam wurde (55). Es konnte im Folgenden gezeigt werden, daß Bcl-2 eine Vielzahl von Zelltod-induzierenden Stimuli, insbesondere durch Zytostatika, hemmt (56, 57). Die seither beschriebenen Mitglieder der Bcl-2-Familie umfassen sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, Homo- oder Heterodimere zu bilden (58). Sie besitzen mindestens eine von 4 konservierten, homologen Domänen, die als BH1, BH2, BH3 und BH4 (*bcl-2* *homology* 1-4) bezeichnet werden. Einige weisen außerdem eine Transmembrandomäne auf, die die Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, die Kernmembran oder in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums ermöglicht (Abb. 3). Bcl-2, Bak und Bax stellen Proteine dar, die ihre apoptotische oder anti-apoptotische Funktion jeweils unabhängig von anderen Bcl-2-Familien-Mitgliedern ausüben können. Dagegen sind die meisten pro-apoptotischen BH-3-*only*-Domänen-Proteine wie Bik, Hrk, Bid oder Bad auf die Interaktion und Inaktivierung von anti-apoptotischen Mitgliedern angewiesen (59). Für diese Heterodimerisierung, die auch Bcl-2, Bak und Bax zur Inaktivierung ihrer Gegenspieler zur Verfügung steht, ist die BH-3-Domäne notwendig (60). Die BH-3-Domäne der pro-apoptotischen Proteine inseriert dabei in eine hydrophobe, aus den BH1-, BH2- und BH3-Domänen gebildete Tasche der anti-apoptotischen Proteine (61-63). Analog zu den pro-apoptotischen Proteinen, die nur eine BH3-Domäne besitzen, zeigten Überexpressionen von Fragmenten aus Bax und Bak, die wenig mehr als die BH3-Domäne umfassten, die Fähigkeit, an Bcl-2 und Bcl-x_L zu binden und dadurch Apoptose in humanen Zellen auszulösen (64, 65).

anti-apoptotische Proteine



pro-apoptotische Proteine



pro-apoptotische „BH3“-Proteine

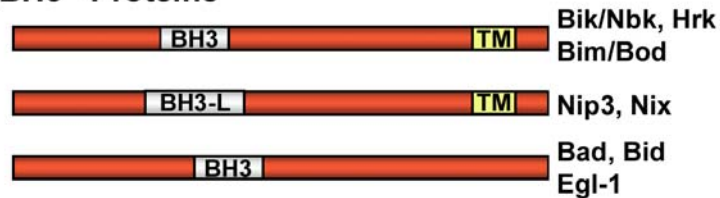


Abb. 3: Proteine der Bcl-2-Familie. Anti- und pro-apoptotische Mitglieder sind beispielhaft dargestellt. Die homologen Domänen und die Transmembranregionen (TM) sind gekennzeichnet.

1.3.1.2. Mechanismus der Cytochrom C-Freisetzung

Zusätzlich zur Regulation der Apoptose durch Heterodimerisierung sind Bax, Bak und Bcl-2 unabhängig von anderen Mitgliedern in der Lage, in synthetische Membranen zu inserieren und dort Ionen-Kanäle zu formieren (66-69). Inwieweit die Bildung von Kanälen *in vivo* für die Regulation der Apoptose eine Rolle spielt, ist noch nicht geklärt. Es gibt experimentelle Hinweise, daß die Bildung von Ionenkanälen insbesondere durch Bax einen wichtigen Mechanismus für die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien darstellt (70, 71). Dabei scheint eine Konformationsänderung von Bax wichtig zu sein, um die BH3-Domäne zu exponieren. Bax oligomerisiert daraufhin und kann in die Mitochondrienmembran inserieren (72).

Als alternativer Mechanismus der Freisetzung von Cytochrom C gewinnt die Vorstellung an Bedeutung, daß Mitglieder der Bcl-2-Familie auf bereits bestehende Kanäle einwirken. Hierzu zählt die Permeabilitäts-Transitions-pore der Mitochondrien (MPT). Diese Pore setzt sich aus mehreren Bestandteilen an Kontaktpunkten zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran zusammen. Hierzu gehört ein Porin der äußeren Membran, VDAC

(*voltage-dependent anion channel*), ein Transporter der inneren Membran, der als ANT (*adenine nucleotide translocator*) bezeichnet wird und das Matrixprotein Cyclophilin D. Durch eine Vielzahl von Signalen kann die Öffnung des Kanals erfolgen und den Durchtritt von Molekülen einer Größe von 1.5 kDa ermöglichen. Der Ausgleich des Ionengradienten führt dann zum Verlust der Energiekopplung und zur Hyperosmolarität der Matrix. Eine Reihe von Arbeiten zeigen, daß der Einstrom von Wasser die äußere Mitochondrienmembran zum Platzen bringt und damit die weitere Freisetzung von Cytochrom C und AIF induziert (73). Neben der Freisetzung von Cytochrom C und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) stellen sich als sekundäre Konsequenzen der Öffnung der PT-Pore die Bildung von ROIs und der Mangel an ATP dar (59). Arbeiten von Jürgensmeier et al. (74), Narita et al. (75) und Shimizu et al. (76) konnten zeigen, daß die durch Bax und Bak vermittelte Freisetzung von Cytochrom C und Abfall des $\Delta\Psi_m$ durch die PT-Pore reguliert wird und durch PT hemmende Substanzen wie Cyclosporin A oder Bongkrekssäure verhindert wird. Bax und Bak können dabei vermutlich direkt mit VDAC oder ANT interagieren (75-77), wohingegen BH3-Domänen Mitglieder vermutlich keinen direkten Effekt auf die Pore haben (78). Demgegenüber führt möglicherweise die Bindung zwischen der anti-apoptotischen BH4-Domäne von Bcl-x_L und VDAC zur Schließung der Pore und vermittelt so die Hemmung der Apoptose (78).

Der Mechanismus der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien wird folglich kontrovers diskutiert. Es erscheint dabei möglich, daß abhängig vom Zelltyp und vom Apoptose-induzierenden Stimulus verschiedene Wege eine Rolle spielen. Dabei spielt die Frage nach der Reihenfolge der Ereignisse eine Rolle. Fraglich ist, ob die mitochondriale Permeabilitäts-Transition (MPT) als Folge der Cytochrom C-Freisetzung auftritt, oder ob sie vielmehr eine Voraussetzung für die Cytochrom C-Freisetzung darstellt (79, 80).

1.3.1.3. Interaktion der Mitglieder der Bcl-2-Familie mit anderen Proteinen

In nicht-apoptotischen Zellen findet man das pro-apoptotische Bim in Assoziation mit LC8 am Dynein-Motor-Komplex der Mikrotubuli. Induktion von Apoptose führt zur Dissoziation von LC8 und Bim, worauf Bim zum Mitochondrium transloziert und durch Interaktion mit Bcl-2 dessen Apoptose-Hemmung antagonisiert (81). Auch die Interaktion mit Kinasen scheint für Mitglieder der Bcl-2-Familie eine Rolle zu spielen. Das ebenfalls pro-apoptotische Mitglied, Bad, wird durch Phosphorylierung (und Bindung an 14-3-3) inaktiviert. Das erfolgt einerseits über die Aktivierung von Akt/PKB, einer Serin-Threonin-Kinase (82) und andererseits nach Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor und nachfolgender Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) (83). Auch den Mitochondrien nachgeordnete Ereignisse können durch die Bcl-2-Familien beeinflusst werden. Hier spielt besonders die Interaktion von Bcl-x_L mit

dem Protein des Apoptosoms, Apaf-1, eine wichtige Rolle (84). Allerdings wird die Bindung an Apaf-1 und der Einfluß auf die Caspase-9-Aktivierung durch Bcl-2 noch kontrovers diskutiert und in Frage gestellt (85, 86). Das Mitglied der Bcl-2-Familie, Diva/Boo, wurde als pro-apoptotisches Protein charakterisiert, das möglicherweise Bcl-x_L aus seiner Bindung mit Apaf-1 verdrängt (87).

1.3.2. Rezeptor-vermittelte Induktion von Apoptose

Zur Regulation und Signaltransduktion extrazellulärer, apoptotischer Signale stehen der Zelle eine Reihe von Oberflächen-Rezeptoren zur Verfügung, die der TNF-Rezeptor-Superfamilie angehören (88, 89). Diese Familie umfasst Membranproteine, die sich in ihrer extrazellulären Region durch 2 bis 6 charakteristische, Cystein-haltige Domänen (CRD, *cysteine rich domain*) auszeichnen. Die Bindung eines spezifischen Liganden führt zur Trimerisierung des Rezeptors unter Ausbildung von Disulfid-Bindungen zwischen den CRDs (90). Die zytoplasmatischen Regionen der Rezeptoren, die weniger stark konserviert sind als die extrazellulären, induzieren über die Rekrutierung von Adaptermolekülen die Signaltransduktion und die Aktivierung von Caspasen. Die Anwesenheit einer aus mehreren α -Helices bestehenden Todesdomäne (DD, *death domain*) in der zytoplasmatischen Region grenzt sogenannte Todes-Rezeptoren der TNF-Familien von Rezeptoren ab, denen diese DD fehlt. Zu den Rezeptoren mit einer DD werden CD95/Fas (auch Apo-1 genannt), TNFR1 (auch p55), DR3 (*death receptor 3*, auch Apo3, WSL-1, Tramp), DR4, DR5 (auch Apo-2, Trail-R2, Killer) und DR6 gezählt. (91). TNFR2, CD40 und CD30 gehören zu den Rezeptoren der TNF-Familie, denen eine DD fehlt (92). Neben Apoptose-induzierenden Signalen können TNF-Rezeptoren aber auch Überlebenssignale vermitteln.

1.3.2.1. Apoptose-Induktion durch Rekrutierung von CD95/Fas

Apoptose-Induktion durch den CD95/Fas-Liganden (auch Apo-1L) übernimmt eine wichtige Funktion in der Regulation des Immunsystems durch Deletion von aktivierten T-Zellen am Ende einer Immunantwort und vermittelt die Zytotoxizität von T-Zellen gegenüber Virus-infizierten Zellen und malignen Zellen (93). Diese biologische Funktion wurde weiterhin deutlich an Patienten, die durch Mutationen von *fas* oder *fasL* schwere Autoimmunerkrankungen aufweisen (94, 95). Die Bindung des homotrimeren CD95/Fas-Liganden an CD95/Fas führt zu Trimerisierung der intrazellulären DD des Rezeptors, was zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated death domain-containing protein*) führt. Neben einer C-terminalen DD, welche die Interaktion zur DD des Rezeptors vermittelt, verfügt FADD über eine N-terminale DED, mit der die Bindung an die DEDs der Prodomänen von Caspase-8 und -10 ermöglicht wird. Die Rekrutierung mehrerer Caspase-

8-Moleküle durch FADD führt zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8 (96). Prozessierte Caspase-8 oder -10 induzieren dann die Aktivierung von Effektor-Caspasen, wie z.B. Caspase-3 (97). Unklar ist noch die Funktion von DAXX (*death domain associated protein*), das ebenfalls an die intrazelluläre Region von CD95/Fas bindet, aber über keine DD verfügt (98). Möglicherweise aktiviert DAXX über Phosphorylierung von ASK-1 (*apoptosis activating kinase*) den JNK/SAPK-Weg (*c-Jun-N-terminal kinase/stress-activated kinase*), dessen Beteiligung an der CD95/Fas-induzierten Apoptose allerdings noch umstritten ist (89, 98, 99). Neuere Arbeiten bringen DAXX in Zusammenhang mit einem Zellkern-vermittelten Apoptose-Signalweg. In akuten promyeloischen Leukämie-Zellen ist für die Induktion von Apoptose die Interaktion von DAXX mit dem interchromosomalen Protein PML (*promyelocytic leukemia protein*) im Zellkern notwendig (100). Strukturelle Ähnlichkeit zu FADD und Caspase-8 zeigt FLIP (*FLICE-inhibitory protein*, auch Casper), das 2 DEDs enthält, über die es an FADD binden kann und damit die Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-8 verhindert (101). Regulatorischer Einfluß auf die CD95/Fas-induzierte Apoptose wird auch einem Mitglied der sog. Attrappen-Rezeptoren, DcRs (*decoy receptors*), zugesprochen. DcR3 hemmt als löslicher Rezeptor durch Bindung von CD95/FasL dessen apoptotische Wirkung (102).

1.3.2.2. Apoptose-Induktion durch Rekrutierung von TNFR1 und TNFR2

TNFR1 und TNFR2 sind beide auf den meisten Körperzellen exprimiert (103). Obwohl nicht vollständig geklärt ist, unter welchen physiologischen Bedingungen $\text{TNF}\alpha$ Apoptose induziert, zeigen Untersuchungen, daß zytotoxische T-Zellen und Makrophagen zur Abwehr von Listerien $\text{TNF}\alpha$ benötigen (104). Die Bedeutung der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose für das Immunsystem wird auch durch die Tatsache unterstrichen, daß $\text{TNF}\alpha$ in erster Linie von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten sezerniert wird (105).

Die Assemblierung der Signalkaskade zur Induktion von Apoptose durch $\text{TNF}\alpha$ verläuft in ähnlicher Weise wie durch CD95L/FasL (Abb. 7). Die Bindung des Liganden $\text{TNF}\alpha$ induziert auch hier die Trimerisierung von TNFR1 über eine Interaktion der DDs. Diese Ligation führt zur Rekrutierung von TRADD (*TNFR associated death domain*) über deren DDs, was wiederum FADD rekrutiert und die Aktivierung von Caspase-8 und anschließend weiterer Effektor-Caspasen bewirkt (106, 107). TNFR2, obwohl nicht im Besitz einer DD, ist ebenfalls in der Lage, TRADD nach Rekrutierung des Liganden $\text{TNF}\alpha$ zu binden und über FADD die Aktivierung der Caspase-Kaskade zu erreichen (108).

Ein weiteres, an der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose beteiligtes Protein ist RAIDD (*RIP-associated ICH-1 homologous protein with a death domain*), das zusätzlich zur DD eine CARD besitzt, die die Bindung und Aktivierung von Caspase-2 vermittelt. Die Einbindung in

den TNFR1-TRADD-Komplex kann über eine Serin-Threonin-Kinase, RIP, erfolgen (109). Ob dieser Weg für die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose eine Relevanz besitzt, ist unklar, insbesondere weil Mäuse, die defizient für FADD sind, weder gegenüber CD95/Fas noch $\text{TNF}\alpha$ empfindlich sind, der RIP/RAIDD-Weg diese Mutation also nicht kompensieren kann (110). Dagegen zeigen diese Untersuchungen in Mäusen, die entweder kein FADD bzw. ein deletiertes FADD exprimieren, daß FADD ein essentieller Bestandteil der $\text{TNF}\alpha$ - und CD95/FasL-induzierten Apoptose-Signalgebung ist. Überraschenderweise wiesen diese Mäuse zusätzlich eine reduzierte Proliferation von reifen T-Zellen auf bzw. sind embryonal letal, was auf weitere Funktionen von FADD bei der Proliferation und Differenzierung von lymphatischen Zellen hinweist (111, 112).

1.3.2.3. Apoptose-Induktion durch Rekrutierung von DR3, DR4, DR5 und DR6

In sehr ähnlicher Weise wie durch Rekrutierung von TNFR1 und 2 kann Apoptose in der Zelle auch durch Aktivierung der Todesrezeptoren wie DR3, DR4, DR5 und DR6 induziert werden. Der Rezeptor DR3 bindet als Liganden Apo3L und kann Caspase-8 Aktivierung über die Assemblierung der Adaptermoleküle TRADD und FADD erzielen. Ein weiterer Ligand, der als Apo2L oder TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) bezeichnet wird, kann an DR4 oder DR5 binden und Apoptose induzieren, wobei die Beteiligung der Adaptermoleküle TRADD, FADD und RIP an der Signalkaskade noch diskutiert wird (111, 113, 114). Der Ligand von DR6 ist bisher nicht bekannt. Für die Regulation der TRAIL-induzierten Apoptose scheinen sog. Attrappen-Rezeptoren wie DcR1 und DcR2 eine Rolle zu spielen. Es gibt Hinweise, daß DcR1 und DcR2 mit DR4 und DR5 um die Bindung von TRAIL konkurrieren und dadurch Apoptoseinduktion in Abhängigkeit vom Zelltyp verhindern (115).

1.3.2.4. Bid: Verbindungspunkt zwischen Rezeptor- und mitochondrial-vermittelter Apoptose

Die beiden oben beschriebenen, wichtigen Signalwege der Zelle zur Auslösung von Apoptose laufen nicht völlig getrennt voneinander, sondern sind miteinander verknüpft, wie die Charakterisierung des pro-apoptotischen Mitgliedes der Bcl-2-Familie, Bid, gezeigt hat (116). Bid ist ein zytoplasmatisches Protein mit einer BH3-Domäne, das durch Caspase-8 N-terminal gespalten werden kann (117). Martinou und Mitarbeiter haben gezeigt, daß das trunkeerte, C-terminale Fragment von Bid, tBid, zum Mitochondrium transloziert, um hier über eine Konformationsänderung von Bax dessen Oligomerisierung und Insertion in die mitochondriale Membran zu induzieren. Diese Insertion führt zur Freisetzung von Cytochrom C (70, 72). Damit sind die Rezeptor-vermittelten Signalwege, die nach Bindung von $\text{TNF}\alpha$

oder CD95/Fas L die Aktivierung von Caspase-8 einleiten über Bid mit der mitochondrialen Apoptose-Induktion verbunden und können ebenfalls zur Freisetzung von Cytochrom C führen (118). Darüberhinaus induzieren Bid und tBid, möglicherweise durch Interaktion mit ANT, die mitochondriale Permeabilitätstransition (MPT) (119).

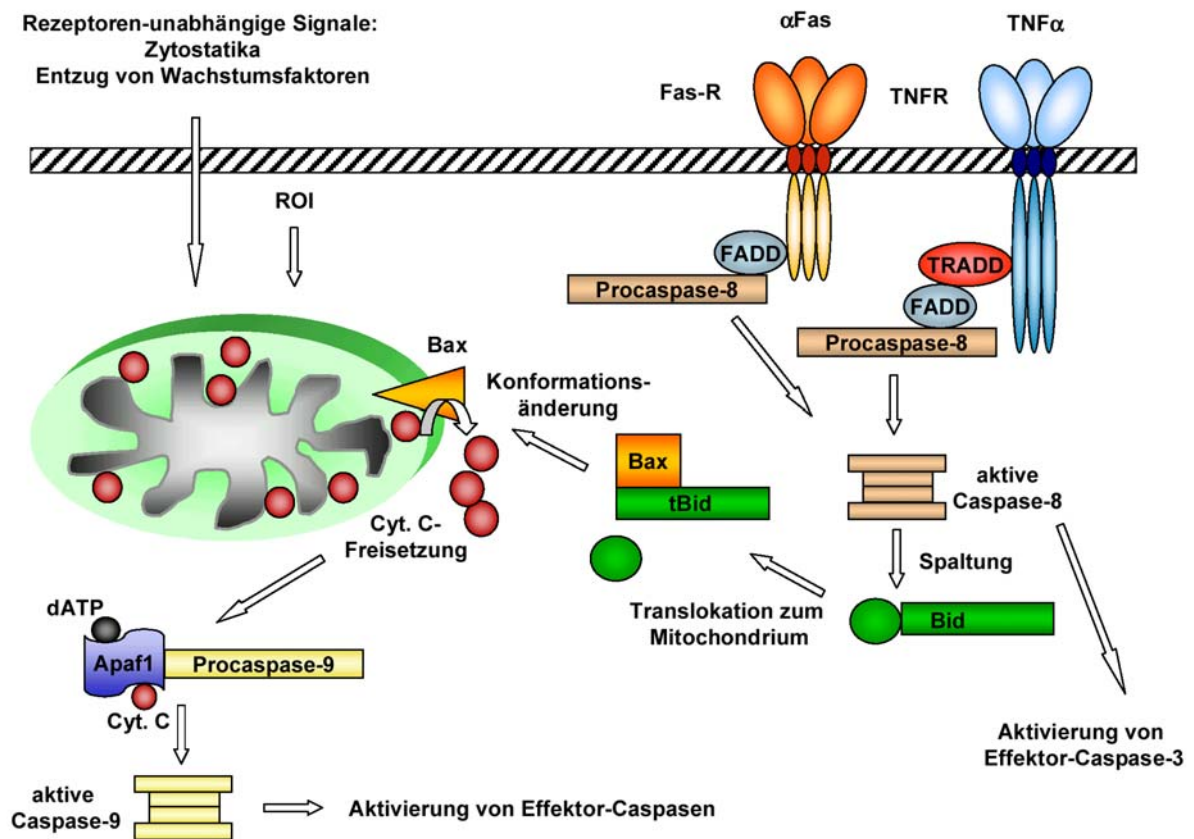


Abb. 4: Bid verknüpft mitochondriale und Rezeptor-vermittelte Signalwege. Aktive Caspase-8 spaltet Bid N-terminal, woraufhin Bid zum Mitochondrium transloziert und eine Konformationsänderung von Bax induziert.

1.4. Apoptose-Induktion durch die Zytostatika Etoposid und Epirubicin

Zytostatika, die innerhalb diverser Kombinationsprotokolle bei der Therapie von Neoplasien Verwendung finden, wirken über unterschiedliche Mechanismen. Ungeachtet der Reaktionsmechanismen werden durch Zytostatika Apoptose-Signalwege zumeist durch DNA-Schädigung induziert. Die zelluläre Antwort, die im Anschluß an diesen DNA-Schaden erfolgt, schließt neben der Induktion von Apoptose auch die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und die Arretierung des Zellzykluses ein (120).

1.4.1. Etoposid

Etoposid wird der Gruppe der Epipodophyllotoxine zugeschrieben und wirkt über eine Interaktion mit der Topoisomerase II (120). Topoisomerase I und II sind Enzyme, die die Topologie der DNA verändern. Durch das Einfügen von Strangbrüchen in einem DNA-Doppelstrang können andere DNA-Stränge durch die geschaffene Öffnung hindurchtreten, was zur Entspannung der Superspiralisierung der DNA führt (121, 122). Topoisomerase II benötigt im Gegensatz zur Topoisomerase I Mg^{2+} und ATP; ihre höchste Aktivität ist in der späten S-Phase und der frühen G_2 -Phase des Zellzyklus zu detektieren. Topoisomerasen sind beteiligt an der Trennung der Schwesterchromatiden bei der Mitose, außerdem an der Replikation und der Transkription (120). Topoisomerase II-Hemmer wie Etoposid interagieren direkt mit der Topoisomerase II. Aus dem reversibel auftretenden Spaltkomplex zwischen DNA und Enzym wird dadurch ein sogenannter ternärer, kovalent verbundener Komplex, der aus DNA, Enzym und Etoposid besteht (123). Dieser Komplex kollidiert mit und blockiert DNA-bindende Enzyme wie RNA- und DNA-Polymerasen (124). Er führt zur vermehrten Bildung von Strangbrüchen in erster Linie durch Verhinderung der Religation der DNA-Stränge durch die Topoisomerase (123, 125). Etoposid wirkt Zellzyklusphasenspezifisch in der späten S- und der frühen G_2 -Phase.

1.4.2. Epirubicin

Epirubicin gehört zur Substanzgruppe der Anthrazykline. Dieses Zytostatikum interkaliert in die DNA und führt zur Hemmung DNA-bindender Enzyme wie Helikasen und Polymerasen. Epirubicin ist, wie auch Etoposid, in der Lage, die Topoisomerase II zu hemmen, und durch Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Komplexes DNA-Strangbrüche zu induzieren (126). Die Wirkung ist nicht ausschließlich auf S- und G_2 -Phase beschränkt, aber hier am stärksten. Aus Epirubicin können Semichinonradikale entstehen, die wiederum mit Sauerstoff unter Bildung von Superoxiden, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen reagieren (127).

1.5. Apoptose-Induktion durch Ceramide

Verschiedene extrazelluläre Substanzen und Stresssignale induzieren die intrazelluläre Akkumulation des Sphingolipides Ceramid. Zu diesen Signalen zählen u.a. $TNF\alpha$, CD95L/FasL, Zytostatika, Radiatio und Hitzeschock (128-132). Die Erhöhung der Ceramidkonzentration in der Zelle kann die zu Apoptose und Zellzyklusarrest führende Antwort der Zelle auf diese Stimuli vermitteln (133). Viele dieser zellulären Antworten kann auch durch synthetisches Ceramid mit einer meist verkürzten Lipidkette (C_2 , C_6 oder C_8 statt C_{16} oder C_{18}) erzielt werden. Kurzkettige Ceramide führen zur Aktivierung von Caspasen, zur

DNA-Fragmentierung, zur Freisetzung von Cytochrom C, zur Aktivierung von Kinase-Signalwegen oder zur Dephosphorylierung und Aktivierung von Rb (Retinoblastom-Genprodukt) (134-137). Hinweise für eine Beteiligung von intrazellulärem Ceramid an der Apoptose stammen von Untersuchungen von Patienten, die an der Niemann-Pick-Erkrankung leiden und eine angeborene Defizienz der sauren Sphingomyelinase (ASMase), eines wichtigen Enzyms des Ceramid-Stoffwechsels aufweisen. Die Lymphozyten dieser Patienten sind unempfindlich gegenüber Bestrahlungs-induzierter Apoptose (138). Sie verhalten sich damit ähnlich wie Zellen aus ASMase-defizienten Mäuse, die kein intrazelluläres Ceramid bilden können und resistent gegenüber γ -Bestrahlung, $\text{TNF}\alpha$ oder Serumentzug sind (139). Neben der sogenannten „sauren“ SMase, deren pH-Optimum bei 4.5 – 5 liegt, existiert auch eine neutrale SMase (NSMase, pH-Optimum im neutralen Bereich); beide Enzyme stellen Sphingomyelin-spezifische Formen der Phospholipase C dar. Sie hydrolysieren Sphingomyelin (N-acetyl-Sphingosin-1-phosphorylcholin), ein Phospholipid der Zytoplasmamembran, zu Ceramid (N-acetyl-Sphingosin) und Phosphorylcholin (140). Die neutrale SMase kann durch Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an TNFR1 unter Beteiligung des intrazellulären Adaptermoleküls, FAN, aktiviert werden (141, 142). Demgegenüber sind an der Aktivierung von ASMase die DD des TNFR1 sowie die Adaptermoleküle TRADD und FADD beteiligt (143). Neben der Bildung von Ceramid durch Hydrolyse von Sphingomyelin existieren weitere metabolische Wege zur Regulation der intrazellulären Ceramid-Konzentration (Abb. 5).

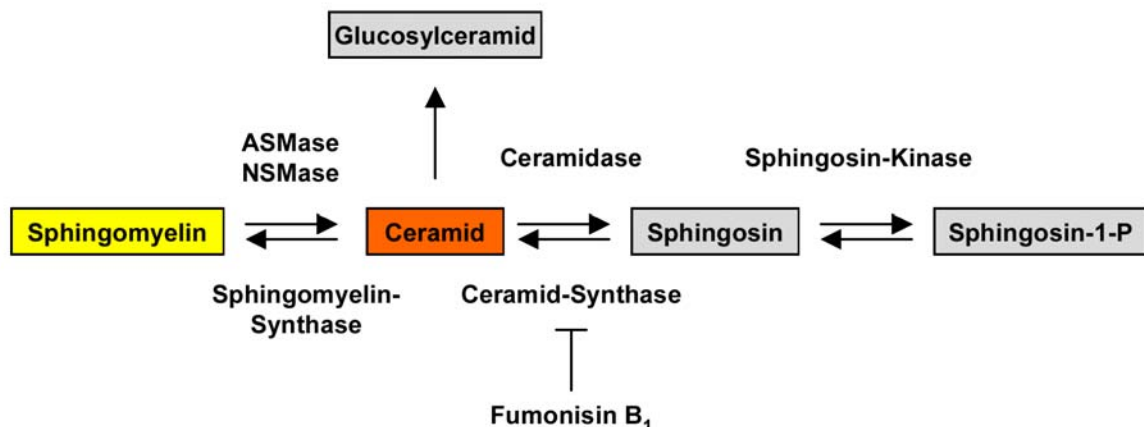


Abb. 5: Intrazellulärer Metabolismus von Ceramid. Durch Behandlung mit Fumonisin B₁, einem Mycotoxin, kann die Ceramid-Bildung in der Zelle durch Hemmung der Ceramid-Synthase blockiert werden.

Als direkte Angriffspunkte in der Zelle, welche die Induktion von Apoptose und den Zellzyklusarrest vermitteln, sind zwei Enzymklassen beschrieben worden: CAPPs (Ceramid-aktivierte Protein-Phosphatase) und eine CAPK (Ceramid-aktivierte Protein-Kinase) (144-146). Ceramid aktiviert eine Protein-Phosphatase des Typs PP1. Dies führt zur

Dephosphorylierung des Zellzyklusregulators pRB. Ceramid kann hierüber Zellzyklusarrest induzieren (144, 147). Zu den CAPP wird auch PP2A gezählt, der eine Funktion in der Dephosphorylierung und Inaktivierung von Bcl-2 zugesprochen wird (148). Darüberhinaus induziert Ceramid auch direkt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Für Neuroblastomzellen konnte die Beteiligung der Aktivierung von Caspase-2, Caspase-9 und Caspase-3 an der Induktion von DNA-Fragmentierung und Apoptose als Folge der mitochondrialen Aktivierung durch kurzkettiges C₂-Ceramid demonstriert werden (149).

Als weiterer Angriffspunkt von Ceramid kann die CAPK angesehen werden. Diese Kinase wurde als Kinasesuppressor von Ras (KSR) charakterisiert, die Raf-1 phosphoryliert und aktiviert (150). Durch die Phosphorylierung von Raf-1 als mögliches Substrat von CAPK könnte eine Verbindung zum MAP-Kinase-Weg hergestellt werden und ein weiterer Mechanismus der Apoptose-Induktion gefunden sein (133).

Eine verminderte, intrazelluläre Ceramid-Konzentration wird durch verschiedene Untersuchungen in Zusammenhang mit der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli gebracht (139, 151, 152).

1.6. $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$: Vermittlung von Überlebenssignalen

$\text{TNF}\alpha$ kann neben der Induktion von Apoptose auch Überlebenssignale in der Zelle induzieren (105). Beide, eigentlich gegensätzlichen Funktionen, werden durch Bindung an die beiden TNF -Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2 , initiiert. Darüber, wie derselbe Stimulus einerseits apoptotische und andererseits anti-apoptotische Mechanismen auslöst und wann das Gleichgewicht zu einer der beiden Seiten verschoben wird, ist bisher wenig bekannt. Die Tatsache, daß sich viele Zelltypen resistent gegenüber $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Apoptose verhalten, deutet auf eine zellspezifische Ausprägung der Balance zwischen Todes- und Überlebenssignalen hin.

Für die Vermittlung der Überlebenssignale ist in erster Linie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF-}\kappa\text{B}$ verantwortlich (153). Dieser induziert die Expression einer ganzen Reihe von Genen, deren Genprodukte fast ausschließlich eine proliferative und anti-apoptotische Funktion übernehmen. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ tritt als Dimer auf und gehört zur Familie der Rel-Proteine. Diese Familie umfasst 5 Mitglieder, darunter p50/p105 , p52/p100 , c-Rel , RelA (p65) und RelB , die sich durch ihre für DNA-Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit inhibitorischen Proteinen notwendige Rel-Domäne auszeichnen. In unterschiedlicher Formation, als Hetero- oder Homodimere, binden Rel/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Proteine an eine aus 10 Basen bestehende DNA-Erkennungssequenz, die als κB -Sequenz bezeichnet wird. Diese Bindung induziert direkt die Transkription der Zielgene (154). Eine Klasse der Rel-Proteine besitzt lange C-Termini mit mehreren Ankyrin-Domänen, die als inhibitorische Sequenzen agieren. Erst die Abspaltung dieser Ankyrin-Domänen läßt aus p105 das verkürzte und aktive p50 , bzw. aus p100 das aktive p52 entstehen. Die zweite Klasse umfasst RelA , RelB und c-Rel , die eine C-terminale Transaktivierungsdomäne aufweisen (155).

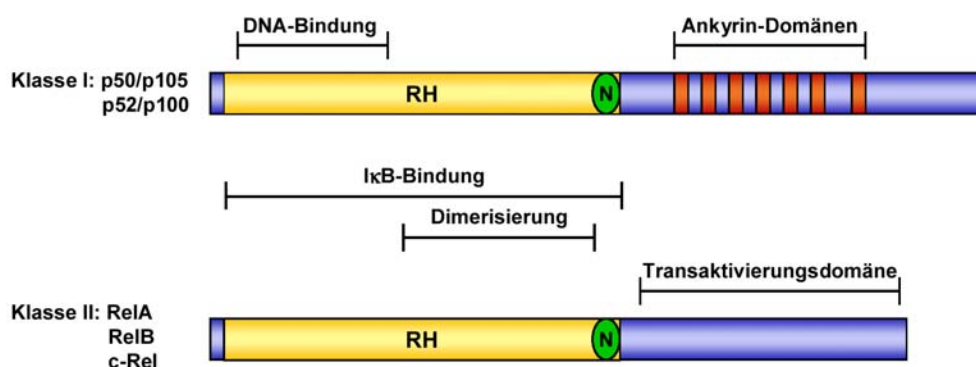


Abb. 6: Die beiden Klassen von Rel-Proteinen und ihre generelle Struktur. RH = Rel-Homologie-Region, N = nukleäre Lokalisationssequenzen.

Am häufigsten finden sich p50/RelA-Heterodimere in der Zelle. Die Aktivität der Rel/NF- κ B-Proteine ist in den meisten Zellen strikt durch die inhibitorischen I κ B-Proteine reguliert (156). Diese Proteine weisen ebenfalls mehrere C-terminale Ankyrin-Domänen auf, über die die Interaktion mit den Rel-Proteinen stattfindet. Bisher sind 5 I κ B-Proteine bekannt: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ und Bcl-3. Letzteres bindet an RelA und wirkt nicht inhibierend sondern aktivierend. Am meisten ist bisher über die Interaktion von I κ B α mit NF- κ B-Proteinen bekannt. Diese Interaktion verdeckt die Kern-Lokalisationssequenz und interferiert mit der DNA-Bindungssequenz von NF- κ B, wodurch NF- κ B in inaktiver Form im Zytoplasma gehalten wird. Erst die Phosphorylierung von I κ B α am N-Terminus an Serin-32 und Serin-36 führt zur Ubiquitinierung an Lysin-21 und -22 und anschließender Proteolyse durch das 26S Proteasom. Das vom Inhibitor befreite NF- κ B transloziert zum Nukleus und induziert die Transkription der Zielgene (157-160). Die Serin-spezifische Phosphorylierung erfolgt durch den IKK (I κ B Kinase)-Komplex, der aus 3 Untereinheiten besteht. Die Kinase-Aktivität wird durch die N-terminalen Domänen von IKK α und IKK β vermittelt, für die Funktionalität ist außerdem die Bindung von IKK α und IKK β an IKK γ (NEMO, *NF- κ B essential modulator*) notwendig. IKK γ ist möglicherweise für die strukturelle Einbindung des Komplexes in den NF- κ B-induzierenden Signalweg verantwortlich (161, 162).

TNF α ist ein potenter Aktivator des in Abb. 7 dargestellten Signalweges, der zur Aktivierung der IKK und letztlich zur Aktivierung von NF- κ B führt (158). Die Bindung von TNF α an TNFR1 rekrutiert TRADD, welches wiederum TRAF2 (*TNF receptor-associated factor-2*) bindet (163). Die Bindung von TNF α an TNFR2 hingegen kann direkt in der Rekrutierung von TRAF2 an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors resultieren (164). Es sind mittlerweile 6 TRAF Proteine bekannt (105). Die Überexpression von TRAF2, -5 und -6 führt zur Aktivierung von NF- κ B. Andererseits verhindert die Deletion von TRAF2 in Mäusen die Aktivierung des Signalweges nicht, was darauf hindeutet, daß TRAF2 nicht essentiell ist für die Aktivierung von NF- κ B (165). Dagegen erwies sich RIP1 (*receptor interacting protein*) als essentieller Bestandteil des Signalweges zur Aktivierung von NF- κ B, wobei RIP1 durch TRADD oder auch durch TRAF2 rekrutiert wird (153, 166). Neuere Untersuchungen konnten CLAP (*CARD-like apoptotic protein*, auch BCL-10, CIPER, CARMEN) als Protein identifizieren, daß über eine CARD an den TNFR1-TRADD-RIP1-Komplex bindet und die Aktivierung von NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) induziert (167, 168). NIK phosphoryliert daraufhin den IKK-Komplex, was zur Phosphorylierung von I κ B α und zur Freisetzung eines aktiven NF- κ B-Dimers führt. Für einige Zelllinien konnte gezeigt werden, daß TNF α neben der Rekrutierung von TRADD, RIP1 und TRAF über eine Aktivierung der PI-3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) einen weiteren Weg induziert. Dieser führt über die Aktivierung von Akt zur Phosphorylierung des IKK-Komplexes (169).

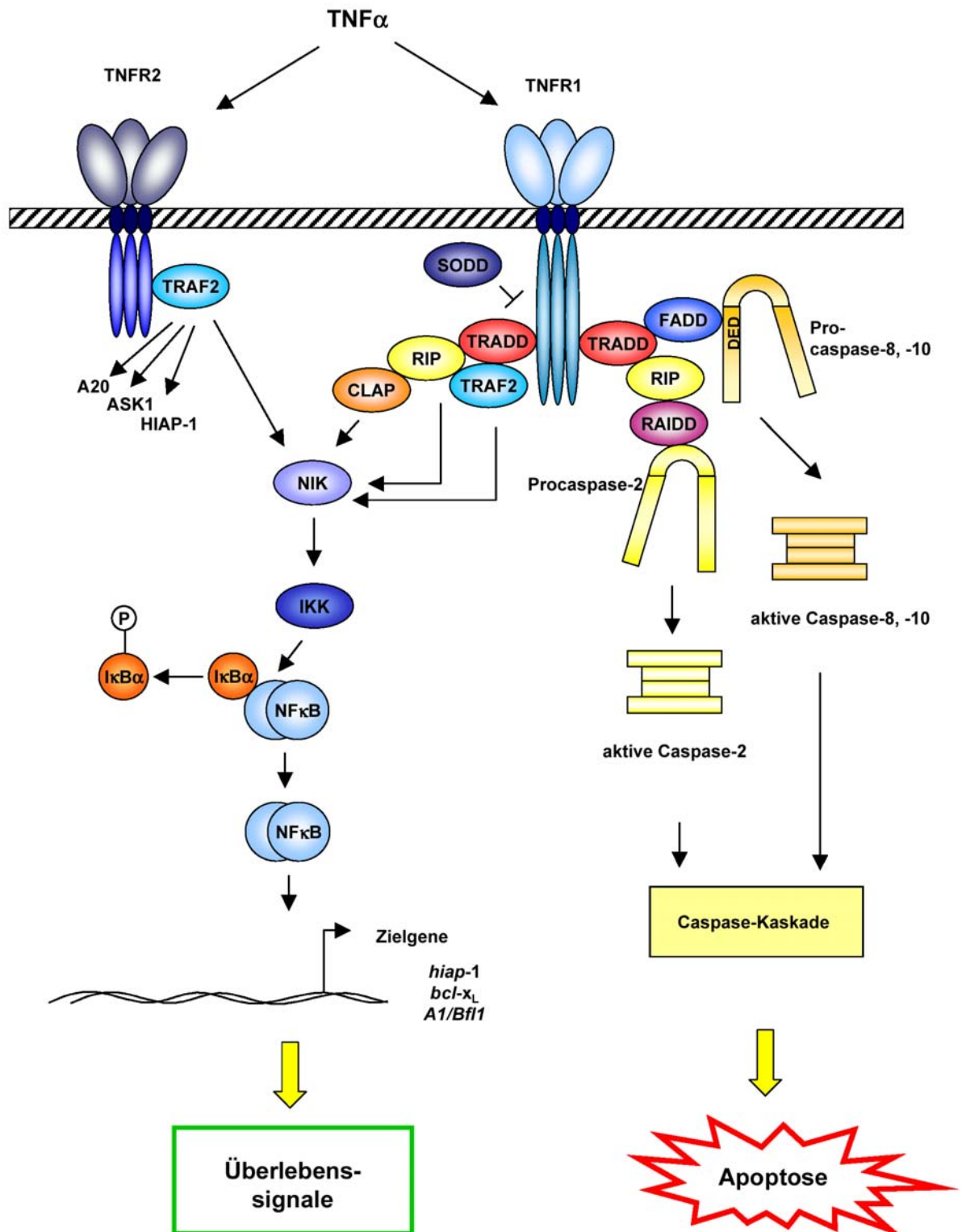


Abb. 7: TNF α -induzierte Signalwege: Vermittlung von Überlebenssignalen und Apoptose

Obwohl $\text{TNF}\alpha$ einer der wichtigsten Induktoren des NF- κ B-Signalweges ist, sind noch unzählige andere beschrieben. Hierzu gehören z.B. weitere Liganden der $\text{TNF}\alpha$ -Familie wie CD40 und TRAIL, Zytokine wie IL-1 und IL-2, verschiedene Zytostatika und C_2 -Ceramid. Auch die Infektion mit Bakterien oder Viren kann zur Aktivierung von NF- κ B führen (170). Eine Reihe von Proteinen übernimmt eine regulatorische Funktion für den $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B. SODD (*silencer of death domain*) blockiert durch Bindung an die DD von TNFR1 die $\text{TNF}\alpha$ -Signalkette (171). DAP-1 (death domain associated protein) verhindert als Ubiquitin-homologes Protein die NF- κ B-Aktivierung, möglicherweise indem es die Ubiquitinierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ blockiert (172). Das Zink-Finger-Protein A20 stellt einen negativen Regulator der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Signalwege dar und hemmt NF- κ B-Aktivierung und Apoptose (173). A20-defiziente Mäuse verhalten sich durch fehlende Blockierung der NF- κ B-Antwort sensitiver gegenüber $\text{TNF}\alpha$ und Lipopolysacchariden und versterben in Folge schwerer Multiorgan-Entzündungsreaktionen (174).

NF- κ B wurde zum ersten Mal 1986 als notwendiger Faktor für die Transkription von Genen der leichten κ -Ketten von Immunglobulinen beschrieben (175). Die Gene einiger Zytokine und der Proteine der MHC-Komplexe (*major histocompatibility antigens*) stehen ebenfalls unter Kontrolle von NF- κ B. Insgesamt sind ca. 150 Zielgene von NF- κ B charakterisiert worden, von denen viele für Proteine mit einer wichtigen Funktion im Immunsystem codieren (170). Daraus wird ersichtlich, daß die physiologische Relevanz von $\text{TNF}\alpha$ bei der Ausbildung der Immunantwort in entscheidendem Maße durch die Aktivierung von NF- κ B erzielt wird. In diesem Zusammenhang ist die über TNF-Rezeptoren vermittelte Aktivierung von NF- κ B als Voraussetzung für die Ausbildung von peripheren lymphatischen Organen wie die primären B-Zell Follikel der Lymphknoten (176) und für die Differenzierung von Dendritischen Zellen (177) zu nennen. Bei den putativen Zielgenen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, überwiegen die anti-apoptotischen Gene. In Tab. 1 sind Kandidatengene von NF- κ B mit Funktion in der Regulation der Apoptose dargestellt (153).

Tab. 2: Mögliche Zielgene von NF- κ B

anti-apoptotische Gene:	Adaptermoleküle	<i>TRAF1, TRAF2</i>
	IAPs	<i>hiap-1, hiap-2, xiap</i>
	Bcl-2-Familie	<i>A1/Bfl1, bclXL, bcl-2</i>
	Transkriptionsfaktoren	<i>c-myc, p53</i>
	andere	<i>A20, IEX-IL</i>
pro-apoptotische Gene:		<i>CD95/FasL, CD95/Fas, c-myc, p53, IκBα</i>

1.6.1. IAPs: Anti-apoptotische Proteine, deren Expression unter Kontrolle von NF- κ B steht

Unter den möglichen Zielgenen von NF- κ B befinden sich einige Mitglieder der IAP-Protein-Familie (*inhibitor of apoptosis proteins*). Im Hinblick auf die anti-apoptotische Wirkung der NF- κ B-Aktivierung stellen IAPs ernst zu nehmende Kandidaten für die Vermittlung dieses Effektes dar. IAPs sind hochkonservierte Proteine, die zunächst als baculo-virale Proteine beschrieben wurden (178). Man findet IAPs in Drosophila und vielen Säugetieren, humane IAPs sind bisher 8 bekannt: XIAP, HIAP-1, HIAP-2, NAIP, Survivin, Apollon, Livin, ML-IAP (179, 180), (181-184).

Tab. 3: Struktur der humanen IAP-Proteine. Details im Text.

XIAP	3 BIRs		1 RING-Finger
HIAP-1	3 BIRs	1 CARD	1 RING-Finger
HIAP-2	3 BIRs	1 CARD	1 RING-Finger
NAIP	3 BIRs		
Apollon	1 BIR		1 UBC-Domäne
Survivin	1 BIR		
Livin	1 BIR		1 RING-Finger
ML-IAP	1 BIR		1 RING-Finger

IAPs zeichnen sich durch 1-3 Cystein-reiche BIR- (*baculoviral inhibitory repeats*)-Domänen aus. Im Gegensatz zur C-terminalen Ring-Finger-Domäne, über deren Funktion wenig bekannt ist und die nicht in allen IAPs zu finden ist, erweisen sich die BIRs, insbesondere BIR2, als essentiell für die anti-apoptotische Funktion der IAPs (185-188). HIAP-1 und HIAP-2 besitzen zusätzlich eine CARD, die für die anti-apoptotische Funktion ebenfalls nicht notwendig zu sein scheint (186). Apollon zeichnet sich durch eine UBC-Domäne (*ubiquitin conjugated domain*) aus, die möglicherweise eine Bedeutung für den Ubiquitin-Proteasom-Weg haben könnte. Ob Apollon im physiologischen Zusammenhang Apoptose hemmen kann, ist nicht klar (184). Demgegenüber konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von XIAP, HIAP-1, HIAP-2, NAIP oder Survivin die Apoptose, die durch eine Reihe von Stimuli wie z.B. TNF α , CD95L/FasL, Staurosporin, Etoposid, Taxol und Bestrahlung induziert wird, hemmen kann (179, 189). Wichtigen Aufschluß über den Mechanismus der anti-apoptotischen Funktion der IAPs konnten durch *in vitro*-Versuche mit XIAP, HIAP-1, HIAP-2 und Survivin gewonnen werden. IAPs hemmen die Prozessierung und damit die Aktivität von Caspase-3, -7 und -9. XIAP, HIAP-1, HIAP-2 und Survivin binden direkt an Caspase-3, -7

und -9, aber nicht an Caspase-1, -6, -8 oder -10 (185, 186, 188). Die Bindung zwischen IAPs und Caspase-3 und -7 setzt die Prozessierung der Caspasen in große und kleine Untereinheit voraus. Hierdurch wird die Abspaltung der Prodomäne verhindert. Die Expression von Survivin erfolgt in Abhängigkeit der mitotischen Zellzyklusphase. Für die Hemmung der Taxol-induzierten Apoptose durch Survivin scheint die Interaktion mit Proteinen des Mitoseapparates kritisch zu sein (190). Auch exogen exprimiertes Survivin, das nicht in Abhängigkeit zur G2/M-Phase steht, bindet nur in der G2/M-Phase an die Kinetochore des Zellteilungsapparates (191). Die Arbeiten von O' Connor et al. zeigten, daß für die Interaktion von Survivin und Caspase-9 die Phosphorylierung von Survivin durch den Zellzyklusregulator p34-Cyclin B₁ notwendig ist. Auch diese Interaktion ist nur in der Mitose-Phase der Zelle zu detektieren und weist daraufhin, daß die Funktion Survivins möglicherweise im Schutz mitotischer Zellen vor Apoptose besteht (192).

IAPs stellen damit eine Protein-Familie dar, die über die Hemmung von Caspasen einen anti-apoptotischen Einfluß auf späte Ereignisse der Apoptose haben und für viele Apoptose-induzierende Stimuli, ähnlich wie die Mitglieder der Bcl-2-Familie, hemmend wirken könnten. Die Funktion der IAPs scheint aber nicht auf die Hemmung der Caspase-Aktivität beschränkt zu sein, vielmehr wurde für HIAP-1 und HIAP-2, sowie für XIAP gezeigt, daß sie als Zielgene von NF- κ B über einen *feed-back*-Mechanismus die Aktivierung von NF- κ B induzieren können, möglicherweise über einen TRAF-abhängigen Signalweg (193, 194). Die Interaktion zwischen BIR von HIAP-1 und TRAF aktiviert NF- κ B über eine verstärkte Degradation von I κ B α , ein Mechanismus, der durch Deletion der C-terminalen Ring-Finger-Domäne gehemmt wird (193). Andererseits wird der Ring-Finger-Domäne eine Funktion in der Auto-Ubiquitinierung zugesprochen, die bei Thymozyten dafür verantwortlich ist, daß HIAP-2 und XIAP nach Apoptose-Induktion mit Glucocorticoiden und Etoposid degradiert werden (195).

Neuere Untersuchungen haben DIABOLO/SMAC als Protein charakterisiert, das XIAP, HIAP-1, HIAP-2, und Survivin durch Bindung hemmt. Diabolo/Smac, das nach Apoptose-induzierendem Stimulus aus den Mitochondrien freigesetzt wird, vermittelt damit in indirekter Weise, durch die Bindung der Caspase-Hemmer, IAPs, die Aktivierung des Caspase-9/Apaf-Weges (49, 50). Die Auflösung der Kristallstruktur des Komplexes zwischen Smac und XIAP zeigte, daß an der Interaktion 4 N-terminale Aminosäuren von Smac und BIR3 von XIAP beteiligt sind (196, 197). Die mögliche Bedeutung der IAPs im Zusammenhang mit der Tumorbiologie und Prognose von Tumorpatienten unterstreichen eine Reihe von Arbeiten (182, 198, 199).

1.6.2 Die NF- κ B-Aktivierung als onkogenes Potential und Angriffspunkt für die Tumortherapie

Eine gestörte Regulation der NF- κ B-Aktivität ist an der Tumorgenese beteiligt und prägt auch die Tumorbiologie, z.B. bei der Entstehung von Therapieresistenzen. Eine konstitutive, also von einem aktivierenden Signal unabhängige, NF- κ B-Aktivität wurde bei einer Reihe von Tumoren beschrieben, wie z.B. T-Zell-Lymphom (200), für verschiedene Myelome (201), Mammakarzinom (202), Blasenkarzinom (203), Bronchial- (204) und Pankreaskarzinom (205).

In einer Reihe von Tumormodellen wurde gezeigt, daß NF- κ B-vermittelte Überlebenssignale Zytostatika-induzierte Apoptose hemmen (206). Die Blockierung der NF- κ B-Aktivität kann daher Tumorzellen für die durch Zytostatika-, Bestrahlungs- oder auch TNF α -induzierte Apoptose sensibilisieren (207-209).

Für verschiedene Zelllinienmodelle des Hodgkin Lymphoms konnten solche NF- κ B-vermittelten Effekte in Zusammenhang mit der Etiologie der Erkrankung gebracht werden (210). In einem Teil der Zellen liegt der NF- κ B-Dysregulation eine Mutation im Gen des NF- κ B-Inhibitors, *I κ B α* , zugrunde, die zu einer konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors führt (211). Für einen Großteil der Hodgkin-Lymphome und Zelllinienmodelle ist der Mechanismus aber noch ungeklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die deregulierte NF- κ B-Aktivität durch Expression eines exogenen *I κ B α* aufgehoben werden kann und zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli führt. HD-MyZ, eine Hodgkin-Zelllinie mit myelomonozytären Phänotyp, wurde hierzu mit einem dominant-negativen *I κ B α* , *I κ B α dn*, stabil transfiziert. Dem dominant negativen *I κ B α* , *I κ B α dn*, fehlen die N-terminalen Phosphorylierungsstellen an Ser-32 und Ser-36. *I κ B α dn* kann daher nicht phosphoryliert werden, wodurch die Konjugation mit Ubiquitin und der anschließende Abbau des Proteins unterbleiben. *I κ B α dn* bleibt deshalb auch in Anwesenheit NF- κ B-induzierender Signale an die NF- κ B-Untereinheiten gebunden. NF- κ B wird durch diesen dominant-negativen Effekt im Hinblick auf die DNA-Bindung blockiert (212).

1.7. Ziele der vorliegenden Arbeit

Für die vorliegende Arbeit wurde als zelluläres Modellsystem die Hodgkin-Zelllinie HD-MyZ verwandt. Durch die Transfektion des dominant-negativen $I\kappa B\alpha$ ($I\kappa B\alpha_{dn}$) bzw. eines Kontrollkonstruktes lag ein Modellsystem vor, das den Vergleich zwischen Zellen mit vorhandener NF- κ B-Aktivität und Zellen mit blockiertem NF- κ B-Signalweg ermöglichte. An diesem System sollte die Bedeutung NF- κ B-vermittelter Überlebenssignale für verschiedene Apoptose-Stimuli untersucht werden. Es sollte insbesondere die Frage geklärt werden, inwieweit die Blockierung der NF- κ B-vermittelten Überlebenssignale die Empfindlichkeit der HD-MyZ-Zellen gegenüber Zytostatika und Ceramid erhöhen kann.

Ziel der Arbeit war es außerdem, in diesem Zellsystem die bekannten $TNF\alpha$ -vermittelten Signalwege zu untersuchen, die einerseits zur Apoptose führen und andererseits der Apoptose durch NF- κ B-Aktivierung entgegenwirken. Für die Diskriminierung von pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Wirkung von $TNF\alpha$ wurde ebenfalls auf das HD-MyZ-Zellsystem zurückgegriffen, das die Betrachtung der $TNF\alpha$ -Wirkung auch unter NF- κ B-blockierten Bedingungen ermöglichte.

Von zentralem Interesse dieser Arbeit war der Einfluß von $TNF\alpha$ auf den Zytostatika-induzierten Zelltod von HD-MyZ und weiterer hämatologischer Tumorentitäten. Es sollte geklärt werden, ob $TNF\alpha$ zu einer Verstärkung oder zu einer Verminderung der Zytostatika-induzierten Apoptose führt.

Da sich $TNF\alpha$ als chemosensitivierende Substanz erwies, stellte sich die Frage nach dem Mechanismus der Sensitivierung. Durch verschiedene zellbiologische Untersuchungen sollten die Signalwege unterschieden werden, über die die Sensitivierung von Zytostatika-induzierter Apoptose erfolgte.