

## 1. Einleitung

# 1. Einleitung

### 1.1. Regulation der Apoptose

#### 1.1.1. Definition von Apoptose und Nekrose

Es existieren verschiedene Termini zur Beschreibung von Abläufen oder morphologischen Veränderungen der Zelle, die zu ihrem Tod führen. Die beiden Begriffe Nekrose und Apoptose sind die gebräuchlichsten. Nekrose ist die zufällige, passive und ungeordnete Form des Zelltodes, die relativ langsam abläuft, ohne charakteristische aktive Merkmalsveränderungen, und zur Schwellung und Disintegration der Zelle mit nachfolgender Inflammation führt. Auslöser sind unspezifische Stimuli wie stumpfes Trauma, Toxine, Hypoxämie und Detergenzien (Blatt und Glick 2001).

Ursprünglich bezeichnete der Begriff Apoptose (gr. *apoptosis*, herabfallen) bestimmte morphologische Veränderungen einer sterbenden Zelle während der Embryonalentwicklung. Hierzu zählen *membrane blebbing*, Chromatinkondensierung, Kernfragmentierung, Abrundung und Ablösung von adhärennten Zellen sowie Zellschrumpfung. Diese Definition von Kerr et al. aus dem Jahre 1972 hat bis heute weitgehend Bestand. Schon Mitte des 19. Jhd. beobachtete C. Vogt erstmals die Morphologie einer sterbenden Zelle während der Metamorphose einer Amphibie (Vogt, 1842). Als Synonym kann die Formulierung „Programmierter Zelltod“ (*programmed cell death*, PCD) verstanden werden, die darauf hinweist, dass den aktiven und stereotypen Abläufen ein genetisch fixiertes Programm zu Grunde liegt. Spezifische Stimuli wie UV-Strahlung, osmotischer Stress, TNF- $\alpha$ , Ceramid, Glukocorticoide, Chemotherapeutika u.v.m. führen zur Zellschrumpfung ohne Destruktion der Membranintegrität und zur Formierung von kleinen membranumgebenen Vesikeln mit Kernfragmenten als Inhalt (*apoptotic bodies*). Diese ermöglichen eine effiziente Phagozytose; eine Entzündungsreaktion bleibt aus. Da *in vitro* keine Phagozytose der *apoptotic bodies* möglich ist, kommt es zur Lyse, d.h. zur sekundären Permeabilisierung der Membranvesikel. Ein Prozess, der als „sekundäre“ Nekrose bezeichnet wird und *in vivo* nicht beobachtet werden kann. Tabelle 1.1. faßt die wichtigsten Merkmale zusammen (Zimmermann et al., 2001).

Es besteht aber auch Uneinigkeit über die genaue Differenzierung der beiden Begriffe, was z.T. dadurch erklärt werden kann, dass es Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose gibt, oder dass abgeschwächte Formen der Apoptose existieren, die nicht alle morphologischen

## 1. Einleitung

bzw. biochemischen Kriterien erfüllen (Denecker et al., 2001; Häcker, 2000; Jäätelä, 2002; Blagosklonny, 2000).

**Tabelle 1.1.:** Kennzeichen der Nekrose und der Apoptose.

| <b>Nekrose</b>                          | <b>Apoptose</b>   |
|---|---|
| Zellschwellung                          | Zellschrumpfung   |
| Verlust der Membranintegrität           | Intakte Membran   |
| -                                       | <i>membrane blebbing, Zeiose</i>  |
| Zerstörung der Zellstruktur             | Erhalt der Organellen   |
| Zellkernschwellung                      | Chromatinkondensation, Pyknose  |
| DNA-Fragmentierung an zufälliger Stelle | Oligonukleosomale DNA-Fragmentierung,<br>ca. 200 Basenpaare; DNA-Leiter |
| -                                       | <i>apoptotic bodies</i>   |
| Freisetzung lysosomaler Enzyme          | -   |
| Perifokale Inflammation                 | Phagozytose durch Makrophagen ohne<br>Entzündung                        |
| -                                       | Phosphatidylserin Externalisierung<br>( <i>Eat-me</i> -Marker)          |
| ATP-Verlust                             | ATP-abhängig  |
| Proteolyse durch Calpain, Cathepsin     | Caspasenaktivierung   |

Eine weitere Ursache für Mißverständnisse bietet die Tatsache, dass die Termini in unterschiedlichen Bereichen benutzt werden. Der Pathologe bzw. Kliniker verwendet Nekrose zur Beschreibung eines histologischen Endzustandes nach einer ausgedehnten Gewebeschädigung, z.B. einer alkoholinduzierten, zentrolobulären hepatischen Nekrose. Also ein post-mortem-Zustand, der nicht auf Bedingungen der Zellkultur übertragen werden kann (Blagosklonny, 2000). Der hier vorherrschende Zelltod wird als Onkosis (gr. *onkos*, Schwellung) bezeichnet. Die typische morphologische Veränderung ist die Zellschwellung und nachfolgende Lyse der Zelle, entsprechend der allgemeinen Definition für Nekrose. Apoptose und Onkose ergeben einzeln oder gemeinsam das Bild der Nekrose (Kanduc et al., 2002; Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002; Trump et al., 1997; Shirai 1999).

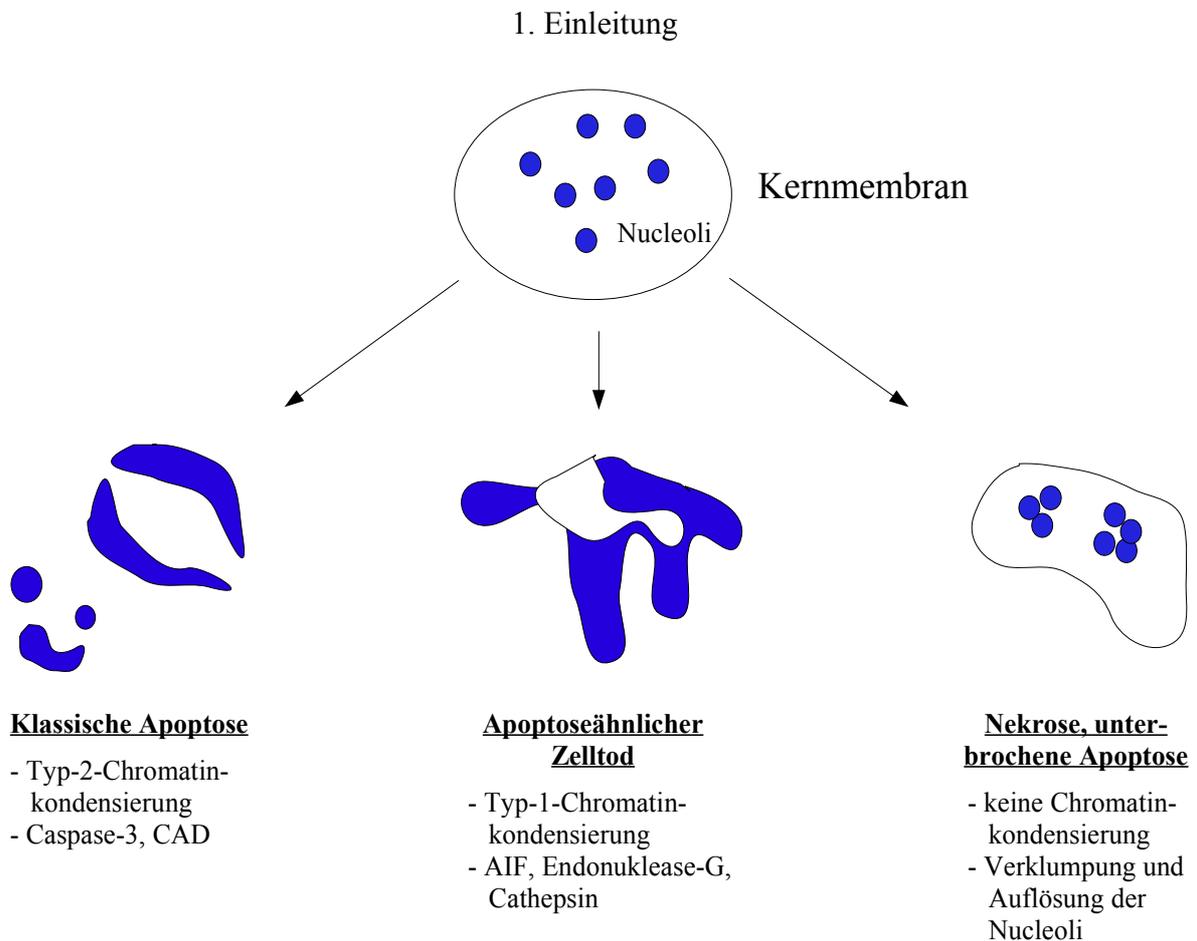
Die synonyme Verwendung von Apoptose und Programmierter Zelltod unterliegt derzeit ebenfalls einem Wandel. Zunächst bezeichnete „programmierter“ Zelltod, die gezielte, inhärente Eliminierung von Zellen während der Embryogenese und wurde dann gleichbedeutend mit den programmierten, determinierten Abläufen während der Apoptose (Häcker, 2000). Heute wird immer mehr deutlich, dass auch nicht-apoptotische Formen des

## 1. Einleitung

Zelltodes nach einem bestimmten Muster ablaufen. Deshalb wird z.B. die Nekrose bzw. Onkose als eine physiologische Form des „programmierten“ Zelltodes bezeichnet, der dem Gesamtorganismus unter pathologischen und physiologischen Konditionen nützlich sein kann (Proskuryakov et al., 2003). Mäuse verlieren z.B. während der Embryogenese ihre interdigitalen Zellen z.T. durch eine nekrotische Form des Zelltodes. Die pharmakologische Inhibition der Apoptosekaskade führte bei Mausembryonen trotzdem zum Verlust der Interdigitalzellen durch die Auslösung eines verzögerten, nekrotischen Zelltodes (Chautan et al., 1999). Im humanen Immunsystem werden primäre T-Lymphozyten durch einen Zelltod mit nekrotischer Morphologie eliminiert (Holler et al., 2000). Die Triggerung der Apoptose über Todesrezeptoren, die als typische Apoptosestimuli gelten, aktiviert zugleich einen Signalweg, der je nach Zustand der Zelle, entweder zu einer nekrotischen Form des Zelltodes oder zur Apoptose führt. Zu analogen Beobachtungen gelangte man in vielen anderen Apoptosemodellen (Jäätelä, 2002).

Die „klassische“ Apoptose bedarf der Aktivierung von spezifischen Proteasen, den Caspasen (*Cytosolic Aspartat-Specific Cysteine Protease*), die zelluläre Todessubstrate spalten. Der nachfolgende Zelltod zeigt die charakteristische Morphologie (Samali et al., 1999). Ausgehend von dieser Definition können alternative Formen des Zelltodes abgegrenzt werden, die Caspasen-unabhängig sind, aber nicht unregelmäßig verlaufen und deshalb auch als programmiert bezeichnet werden können. Jäätelä (2002) unterscheidet demnach einen nekroseähnlichen programmierten Zelltod, einen apoptoseähnlichen und einen apoptotischen programmierten Zelltod. Die Aktivierung von Proteasen wie Cathepsin, Calpain und Granzym A bzw. B (Johnson, 2000), die auch bei caspasenabhängiger Apoptose von Bedeutung sind, werden mit der nekroseähnlichen Variante in Bezug gebracht. Die apoptoseähnliche Form wird vorrangig durch mitochondriale Faktoren, insbesondere *apoptosis inducing factor* (AIF) und Endonuklease-G, bestimmt. Cytochrom C ist der wichtigste Mediator des apoptotischen Zelltodes.

Einen ungefähren Zeitrahmen der verschiedenen Zelltodformen gibt Blagosklonny (2000). Zelltod ohne Caspasenaktivierung wird hierbei als verzögerter Zelltod bezeichnet, der erst nach 36 h Stunden erkennbar wird. Ein sehr schneller Zelltod (2-16 h) liegt vor, wenn die Zelle stirbt, bevor eine Caspasenaktivierung möglich war und der Stimulus entsprechend stark war. Das Zeitfenster der klassischen Apoptose befindet sich dazwischen.



**Abbildung 1.1.:** Veränderung der Kernmorphologie. CAD = *caspase activated Dnase*; AIF = *apoptosis inducing factor*.

### 1.1.2. Molekulare Mechanismen der Apoptose

Die Apoptose wird hauptsächlich über zwei Wege eingeleitet, die beide zur Aktivierung von spezifischen Proteasen, den Caspasen, führen, die die morphologischen Veränderungen der Zelle herbeiführen. Einerseits gibt es den Weg über Rezeptoren, den sog. Todesrezeptoren wie Fas oder TNF- $\alpha$ , der als extrinsischer Weg bezeichnet wird. In der anderen Kaskade steht das Mitochondrium im Mittelpunkt, das verschiedenste apoptotische Signale mit Hilfe der Bcl-2- Proteinfamilie integriert und als intrinsisch bezeichnet wird (Zimmermann und Green, 2001). In einem dritten Weg, der noch weniger erforscht ist, hat das Endoplasmatische Retikulum eine wichtige Rolle bei der Initiation der Kaskade (van Cruchten, 2002; Ferri und Kroemer, 2001; Martin und Green, 1995).

## 1. Einleitung

Man kann den Ablauf der Apoptose in drei Stadien einteilen. Im ersten Schritt erhält die Zelle ein apoptotisches Signal. Dies kann die Bindung eines Todesrezeptorligandens oder der Entzug von Wachstumsfaktoren, die Behandlung mit UV-Strahlung, die Veränderung der Osmolarität und die Behandlung mit Chemotherapeutika sein. Im Stadium zwei verarbeitet die Zelle verschiedene Signale, die darüber entscheiden, ob die Zelle stirbt. Hierzu zählen die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Elementen unterschiedlicher Signaltransduktionswege wie der *mitogen-activated protein kinases* (MAP-Kinasen), der Proteinkinase C (PKC), der Phosphatasen, die Synthese von Lipid-*second-messenger* wie Ceramid und die Veränderung der Genexpression. Auch der metabolische bzw. energetische Zustand der Zelle und das Zellzyklusstadium beeinflussen das Schicksal der Zelle. Neben den genannten Faktoren hat der Level und der Funktionszustand von pro- bzw. antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteine und ihre Wirkung auf das Mitochondrium eine herausragende Bedeutung für die finale Entscheidung, ob eine Caspasenaktivierung herbeigeführt wird oder nicht. Das dritte Stadium mit den typischen morphologischen Veränderungen wird durch die Spaltung der sog. Todessubstrate definiert (Blatt und Glick, 2001).

# 1. Einleitung

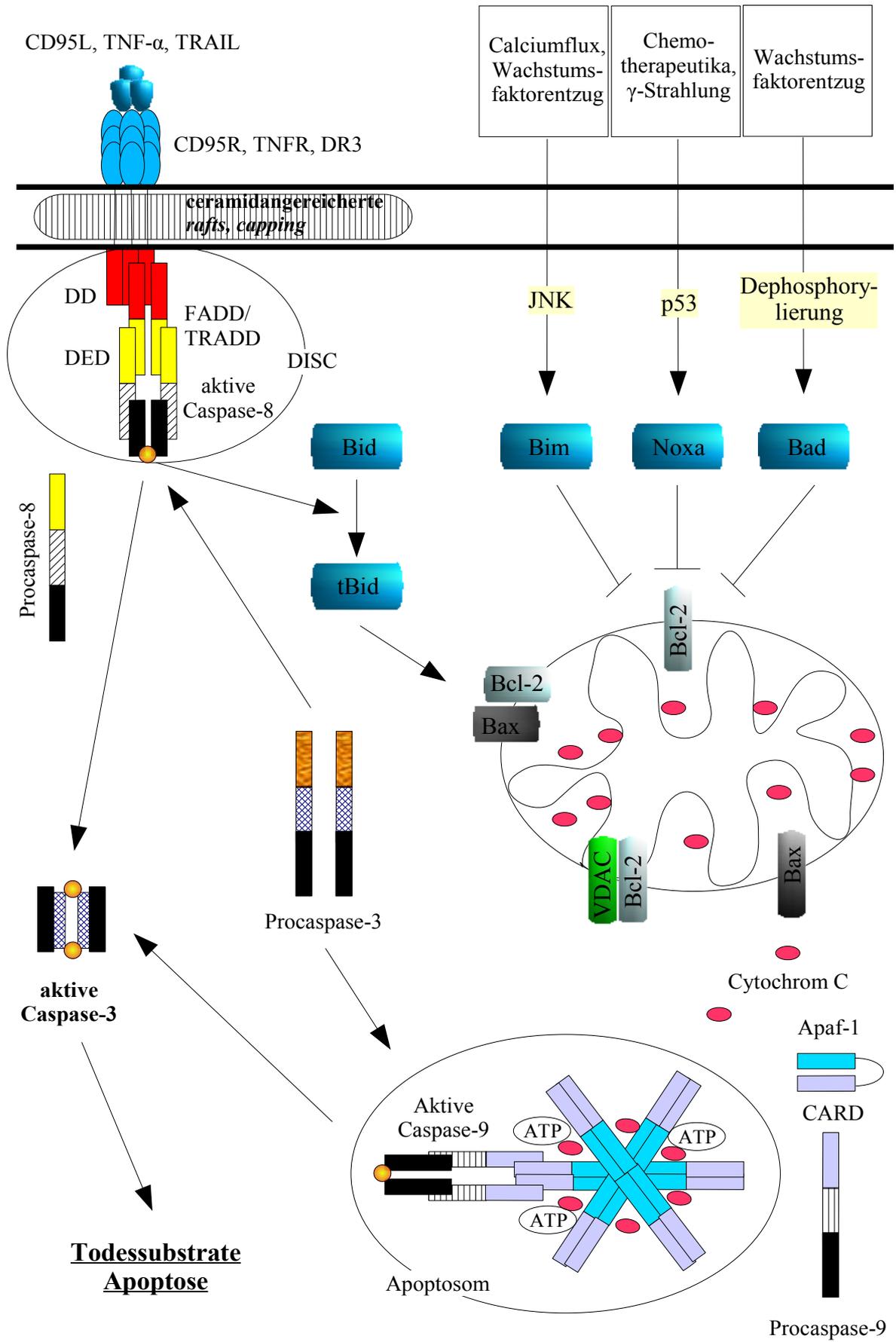


Abbildung 1.2.: Apoptosekaskade. Abkürzungen siehe Text oder Abkürzungsverzeichnis.

## 1. Einleitung

### 1.1.2.1. Caspasen: Exekution der Apoptose

Caspasen sind eine spezialisierte Gruppe von Proteasen, die essentiell für die Apoptose sind (Martin und Green, 1995; Blatt und Glick, 2001). Es sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate nach einem Aspartatrest spalten (Earnshaw et al., 1999). Diese Substratspezifität unterscheidet sie somit von anderen Proteasen; nur noch Granzyme B besitzt die gleiche Spezifität (Cerretti et al., 1992; Sarin et al., 1996). Das *interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme* (ICE, Caspase-1) war das erste Mitglied dieser Proteasenfamilie. Es ist für die Spaltung von Pro-Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zur biologisch aktiven Form Interleukin-1 $\beta$  verantwortlich (Cerretti et al., 1992). In der Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnte ein genetisch fixierter Weg der Apoptose beschrieben werden. Während der Entwicklung dieses Fadenwurmes werden 131 der 1090 somatischen Zellen durch ein einziges Genprodukt, *ced-3* (*cell death abnormal mutations in C. elegans*), eliminiert (Ellis et al., 1991). *Ced-3* konnte 1993 als homologes Protein zum ICE identifiziert werden (Yuan et al., 1993) und es ist die einzige funktionelle Caspase in *C. elegans*. Derzeit zählt man 14 Säugetiercaspasen, darunter sind 11 humane Enzyme. Nach phylogenetischen Analysen können zwei Subfamilien differenziert werden: ICE und verwandte Caspasen gehören zu den Inflammationscaspasen; *ced-3* bzw. dessen mammale Homologe zählt man zu den Apoptosecaspasen. Die Apoptosegruppe wird weiterhin in Initiatorcaspasen (*Upstream-Caspasen*) und Effektorcaspasen (*Downstream-Caspasen*) unterteilt (Zimmermann und Green, 2001).

**Tabelle 1.2.:** Einteilung der Caspasen modifiziert nach Zimmermann und Green, 2001.

| <b>ICE Subfamilie /<br/>Inflammation</b> | <b>CED-3 Subfamilie /<br/>Apoptose</b> |                         |
|--|--|-------------------------|
|  | <b>Initiatorcaspasen</b>               | <b>Effektorcaspasen</b> |
| Caspase-13                               | Caspase-8                              | Caspase-7               |
| Caspase-5                                | Caspase-10                             | Caspase-3               |
| Caspase-4                                | Caspase-2                              | Caspase-6               |
| Caspase-1                                | Caspase-9                              | -                       |

Caspasen werden als Zymogene synthetisiert, die aus drei Domänen zusammengesetzt sind: eine N-terminale Prodomäne (32-55 kD), eine große Domäne von ca. 20 kD, die das katalytische Zentrum mit dem konservierten Motiv QACXG enthält und eine kleine C-terminale Untereinheit von ca. 10 kD. Zwischen den Domänen befinden sich aspartatspezifische Spaltstellen. Die Länge der Prodomäne und die Substratspezifität unterscheiden die Caspasenfamilien. Initiatorcaspasen und Inflammationscaspasen besitzen

## 1. Einleitung

lange Prodomänen, die Sequenzmotive enthalten (*death effector domain*, DED bei Caspase-8, -10; bzw. *caspase-recruitment domain*, CARD bei Caspase-2, -9 und Caspase-1, -4 -5), die eine homophile Interaktion mit den Adaptorproteinen *Fas-associated death domain* (FADD und DED) und *apoptosis activating factor 1* (Apaf-1 und CARD) ermöglichen (Ashkenazi und Dixit, 1998; Earnshaw, 1999).

Neben der absoluten Substratspezifität an Position 1 der Bindungsstelle für Aspartat variiert sie an P2-P4 entsprechend der Funktion der Caspasen als Apoptoseinitiatoren, Apoptoseexekutoren und Zytokinprozessoren (Zimmermann und Green, 2001).

Hinsichtlich ihrer Aktivierung muß wiederum zwischen Initiatorcaspasen und Exekutionscaspasen differenziert werden. Caspase-3 präexistiert als inaktives Homodimer. Die Abspaltung der kleinen Untereinheiten und deren Translokation stabilisiert die aktive Konformation. Als Tetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten erlangt das Enzym die volle katalytische Aktivität mit zwei aktiven Zentren durch autokatalytische Abtrennung der kurzen Prodomäne (Riedl et al., 2001). Der erste Schritt der Aktivierung besteht daher in der Proteolyse des inaktiven Zymogens. Bei der Aktivierung von apikalen Caspasen kommt es zunächst zur Hetero- oder Homodimerisierung der inaktiven Monomere durch die Assoziierung an oligomeren Aktivatorkomplexen wie dem *death inducing signaling complex* (DISC) oder dem Apoptosom. Die dimere Konformation ist proteolytisch aktiv und initiiert die Apoptosekaskade ohne primäre Abspaltung der kleinen Untereinheit. Die nachfolgende Prozessierung der Initiatorcaspasen ist möglich aber nicht nötig für die Weiterleitung des Signales (Boatright et al., 2003).

Derzeit sind mehr als 280 Substrate von Caspasen bekannt. In den meisten Fällen ist die Signifikanz der Substratspaltung für die Apoptose noch unklar. Ziele sind z.B. Strukturproteine, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, DNA-Reparationsenzyme und Signaltransduktoren. In einigen Fällen ist eine genaue Einordnung bereits möglich. Die Spaltung von ICAD (*inhibitor of caspase activated dnase*) durch Caspase-3 aktiviert die Nuclease CAD (*caspase activated dnase*), die die typische apoptotische DNA-Fragmentierung herbeiführt. Gelsolin, das F-Actin depolymerisiert, wird ebenfalls durch Caspase-3 gespalten und aktiviert. Es ermöglicht die Reorganisation des Zytoskelettes und somit das *membrane blebbing*. Die Unterbrechung von antiapoptotischen Signalwegen durch Caspasen verstärkt den apoptotischen Prozess im Sinne eines positiven Feedbacks. Die Proteinkinasen Akt und Raf-1, die proapoptotische Moleküle wie Bad inaktivieren, werden durch Caspase-3 gespalten. Bei dem antiapoptotischen Bcl-2-Protein bewirkt die Spaltung eine Funktionsänderung bis hin zu einem proapoptotischen Molekül mit einer Struktur analog zu Bax, das die Apoptose verstärkt (Fischer et al., 2003).

## 1. Einleitung

Die Caspasenaktivität kann transkriptionell und posttranskriptionell modifiziert werden. In verschiedenen humanen Geweben variieren die mRNA-Level der Procaspasen. So ist die Expression der Procaspase-3 in Neuronen auf einem niedrigen Niveau, in Lymphgewebe hingegen erhöht (Krajewska et al., 1997). Obwohl die Apoptose in vielen Zelltypen ohne *De-novo*-Proteinsynthese ausgeführt wird, erhöhte sich das mRNA-Level der Procaspase-3 in Leukämiezellen nach der Behandlung mit Etoposid (Droin et al., 1998). Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) verstärkte die Genexpression von Caspase-3 in U937-Zellen und dadurch ihre Apoptoseempfindlichkeit (Tamura et al., 1996). Eine Proteinfamilie mit dem Namen *inhibitors of apoptosis proteins* (IAP), die durch Bindung an aktivierte Caspase-3, -7, oder -9 die Caspasenaktivität hemmt, reguliert die Apoptose auf Exekutionsebene. Sie umfaßt fünf Mitglieder. *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) ist der bekannteste Repräsentant mit der stärksten antiapoptotischen Aktivität.

### 1.1.2.2. Fas-Rezeptor und der extrinsische Apoptoseweg

Die Tumor-Nekrosefaktor-(TNF)-Rezeptorsuperfamilie mit derzeit ca. 26 verschiedenen Proteinen reguliert Zellprozesse, die Inflammation, Autoimmunität, Organogenese, Differenzierung und Apoptose beeinflussen. Diese Rezeptorsuperfamilie wird charakterisiert durch zwei bis fünf zysteinreiche Extrazellulärdomänen und durch die Anordnung der individuellen transmembranären Ketten in Trimeren. Die Subfamilie der Todesrezeptoren ist gekennzeichnet durch eine intrazelluläre *death domain* (DD) und beinhaltet sechs Mitglieder, deren Hauptfunktion die Induktion der Apoptose ist (Schulze-Osthoff et al., 1998). Hierzu zählen TNF-Rezeptor-1 (TNF-R-1), CD95 (Apo-1, Fas), *death receptor 3* (DR3, Apo-3), DR4 (Apo-2, TRAIL-1), *death receptor 5* (DR5, TRAIL-2) und *death receptor 6* (DR6). Sehr nahe Verwandte sind die *Decoy*-Rezeptoren ohne DD, deren funktionelle Bedeutung noch unklar ist (Ashkenazi, 2002; Locksley et al., 2001; Sartorius et al., 2001). CD95 zählt hierunter zu den am besten erforschten Rezeptoren, der deshalb hier exemplarisch dargestellt wird. Er wird als glykosyliertes Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 45 und 52 kDa in vielen Geweben exprimiert. Durch alternatives Splicen kann er als lösliche Form vorkommen, dessen transmembranärer Teil fehlt und zur Regulation der Apoptose beiträgt (Papoff et al., 1999). Der kognate Ligand (CD95L) wird ebenfalls in löslicher und membrangebundener Form exprimiert. Ob beide Formen Apoptose induzieren können, wird

## 1. Einleitung

diskutiert. In einer aktuellen Studie zeigte man, dass nur die membrangebundene Form Apoptose induziert, der lösliche CD95L sie hingegen supprimiert (Hohlbaum et al., 2000).

Die Weiterleitung des Apoptosesignals basiert auf einer Dreifachsymmetrie. Der trimere CD95L oder ein agonistischer Antikörper führt zur nichtkovalenten Trimerisierung des CD95-Rezeptors. An der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors formieren sich dann 3:3 Komplexe mit dem Adaptorprotein FADD. Eine ca. 80 Aminosäuren umfassende Sequenz des intrazellulären Rezeptoranteils und des Adaptorproteins vermittelt die homophile Interaktion und wird als *death domain* (DD) bezeichnet. FADD enthält neben der DD eine weitere Domäne, die *death effector domain* (DED), die mit der DED der Prodomäne von Caspase-8 oder -10 interagiert. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch die induzierte Annäherung (*induced proximity model*) der inaktiven Proformen zu Homodimeren und deren autokatalytische Aktivierung. In seiner Gesamtheit wird dieser oligomere Aktivator Komplex auch *death inducing signaling complex* (DISC) genannt, bestehend aus Fas-Rezeptor, FADD und Proform der Caspase-8 oder -10 (Locksley et al., 2001).

Abhängig von der weiteren Signaltransduktion nach CD95-Stimulierung unterscheidet man zwei Zelltypen. In Typ-I-Zellen folgt der Rezeptortrimerisierung eine ausgeprägte Aktivierung von Caspase-8 mit direkter Spaltung der inaktiven Caspase-3. Die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials ist Folge der Caspase-3-Aktivierung. Murine Thymozyten und T-Zellen werden z.B. als Typ-I-Zellen eingestuft (Kuida et al., 1998). Dagegen waren Hepatozyten aus Bid-defizienten Mäusen resistent gegenüber CD95-Stimulation und werden somit als Typ-II-Zellen bezeichnet (Yin et al., 1999). In Typ-II-Zellen wird der mitochondriale Apoptoseweg aktiviert. Nach CD95-Aktivierung spaltet die nur schwach aktivierte Caspase-8 Bid, das ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie ist, und das als *truncated* Bid (tBid) zum Mitochondrium transloziert, wo es durch Aggregation von Bax oder Bak die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren bewirkt, die dann die Caspase-3 aktivieren. Der DISC formiert sich nur schwach, FADD wird kaum gebunden und Caspase-8 entsprechend schwach aktiviert. In beiden Zelltypen wird das Mitochondrium nach CD95-Triggerung gleich stark aktiviert. Bcl-2- oder Bcl-X<sub>L</sub>-Überexpression inhibiert in beiden Zelltypen zunächst die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, aber nur in Typ-II wird die Apoptose verhindert (Peter und Krammer, 2003).

Ein Reihe weiterer Proteine assoziieren an den DISC, welche die Apoptose modulieren können. v-FLIP (*viral-FLICE-like inhibitory protein*) ist ein viraler Apoptoseinhibitor des  $\gamma$ -Herpesvirus, der die CD95-medierte Apoptose supprimiert (Hu et al., 1997). Dessen zelluläre Homologe c-FLIP<sub>s</sub> (*short*) und c-FLIP<sub>l</sub> (*long*) enthalten wie das virale Protein eine Tandem-

## 1. Einleitung

DED, wobei c-FLIP<sub>s</sub> und v-FLIP sehr ähnlich sind und C-FLIP<sub>1</sub> zusätzlich eine Proteasendomäne trägt, die homolog mit Caspase-8 ist, aber keine Aktivität besitzt. Durch homophile Interaktion mit FADD verhindert c-FLIP<sub>s</sub> die Rekrutierung der Caspase-8 an den DISC und unterbricht die Signaltransduktion (Kirchhoff et al., 2000). Bei c-FLIP<sub>1</sub> wird abhängig vom Expressionslevel entweder eine Induktion oder eine Inhibition der Apoptose beschrieben (Chang et al., 2002). Eine hohe ektope Expression von c-FLIP<sub>1</sub> gilt als antiapoptotisch, dagegen kann bei niedrigen, physiologischen Konzentrationen die Heterodimerisierung von Procaspase-8 und c-FLIP<sub>1</sub> die Aktivierung der Caspase-8 verstärken. Die proteaseähnliche Domäne von c-FLIP<sub>1</sub> assoziiert mit der Procaspase-8-Proteasendomäne und führt zur Induktion der Enzymaktivität mit nur einem aktiven Zentrum, das die Caspasen-Kaskade initiiert (Chang et al., 2003). Weiterhin wird c-FLIP mit alternativen CD95-Signalwegen in Verbindung gebracht. Einige Studien zeigten, daß c-FLIP mit TRAF2 (*TNF receptor associated factor 2*) assoziiert und den antiapoptotischen NF-κB-Weg (*nuclear factor κB*) aktiviert (Hu et al., 2000). Auch Raf-1, das den Erk-Signalweg aktiviert und RIP, eine Proteinkinase, die einen nekrotischen, caspasenunabhängigen Zelltod initiiert, werden über c-FLIP an den CD95-Signalweg gekoppelt (Holler et al., 2000; Kataoka et al., 2000).

Der CD95-Signalweg kann ligandenunabhängig die Apoptose durch die Formierung des DISC einleiten. Dieses Phänomen der ligandenunabhängigen Aktivierung eines Rezeptor-Signalweges wurde auch für den TGF-β-Rezeptor beschrieben (Feng und Derynck, 1996). Die Thymidin- Kinase/Ganciclovir (TK / GCV) und UV-Licht führen zur Aggregation des CD95-Rezeptors und zur Caspase-8-Aktivierung. Die Expression einer dominant negativen Form von FADD inhibierte nach GCV-Applikation die Apoptose und verminderte sie nach UV-Exposition (Aragane et al., 1998; Beltinger et al., 1999). Die physiologische Relevanz dieser Wege bleibt jedoch unklar, da z.B. die CD95-Aggregation nach UV-Exposition auch ein sekundäres Ereignis darstellen könnte, ausgelöst durch eine DNA-Schädigung. Ein weiteres Beispiel für CD95-medierte Apoptose ohne Ligandenbindung beobachtete man in Keimzellen (Hennino et al., 2001).

## 1. Einleitung

### 1.1.2.3. Mitochondrialer Apoptoseweg und Bcl-2-Proteinfamilie

Verschiedene apoptotische Stimuli wie UV- und  $\gamma$ -Strahlung, Chemotherapie, Viren, Bakterien, Anoikosis, Zytokin- und Wachstumsfaktorentzug werden durch die Proteine der Bcl-2-Familie erfasst und die Signale auf das Mitochondrium, das eine wichtige Rolle bei der Regulierung des intrinsischen Apoptoseweges spielt, übertragen. Neben seiner Hauptfunktion der ATP-Produktion dient es als Speicher für proapoptotische Proteine wie Cytochrom C, Smac/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein*), AIF (*apoptosis inducing factor*), die Serinprotease Omi/Htr2A, Endonuklease-G und Procaspase-2, -3, -8, -9 (Parone et al., 2002). Insgesamt werden ca. 30 Proteine nach Perforation des Mitochondriums aus dem intermembranösen Raum ins Zytoplasma freigesetzt (van Loo et al., 2002). Die Proteine der Bcl-2-Familie kontrollieren dies durch Öffnung oder Schließung verschieden großer Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (Zamzami und Kroemer, 2001). Die Bax/Bcl-2-Ratio in verschiedenen Melanomzelllinien korrelierte mit ihrer Sensibilität gegenüber Fas-induzierter Cytochrom C-Freisetzung und Induktion der Apoptose (Raisova et al., 2001). In einem anderen Model erfolgt die Freisetzung unspezifisch durch Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran.

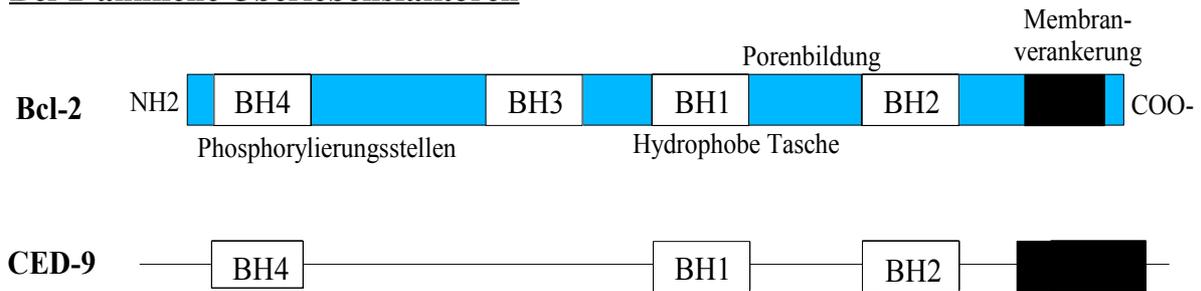
Zytosolisches Cytochrom C bildet mit Apaf-1, ATP und Procaspase-9 das Apoptosom, das die effektive Spaltung der Effektorcaspasen ermöglicht und so die Weiterleitung des apoptotischen Signals.

Derzeit besitzt die Familie der Bcl-2-Proteine ca. 30 Mitglieder in höheren Eukaryonten. Der Modellorganismus *C. elegans* kodiert nur für zwei Homologe aus dieser Familie: ced-9 und EGL-1 (*egg laying defective mutations in C. elegans*) (Adams und Cory, 2001; Puthalakath und Strasser, 2002). Namensgebend war die Translokation t(14/18) in humanen B-Zell-Lymphomen (*b cell lymphoma 2*), die durch Hochregulierung des Onkoproteins zur Apoptoseresistenz in Lymphomen beiträgt (Cleary, 1991). Man klassifiziert die Familie nach Funktion und Struktur in drei Kategorien:

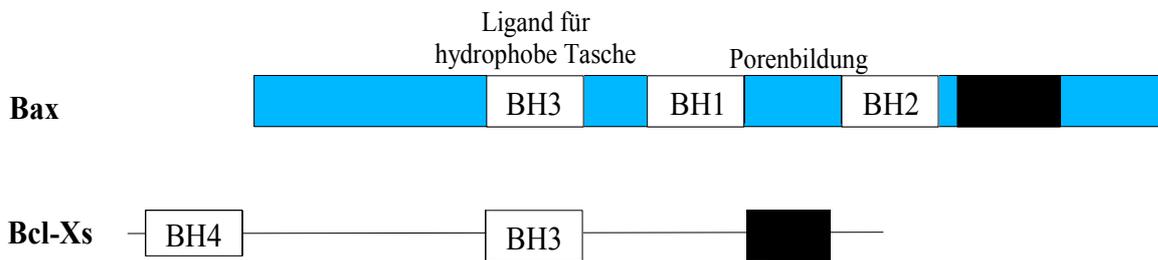
- a. Homolog zu EGL: proapoptotische Proteine wie Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, Bim<sub>L</sub>/Bod, Bid, Noxa, PUMA/Bbc3 und Bmf (*BH3-only death factors*);
- b. Homolog zu ced-9: antiapoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2L-10 und Bcl-B (*Bcl-2-like survival factors*);
- c. proapoptotische Proteine wie Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-xs und DEBCL aus *Drosophila*, die keine Homologie zu Proteinen in *C. elegans* aufweisen (*Bax-like death factors*) (Borner, 2003).

## 1. Einleitung

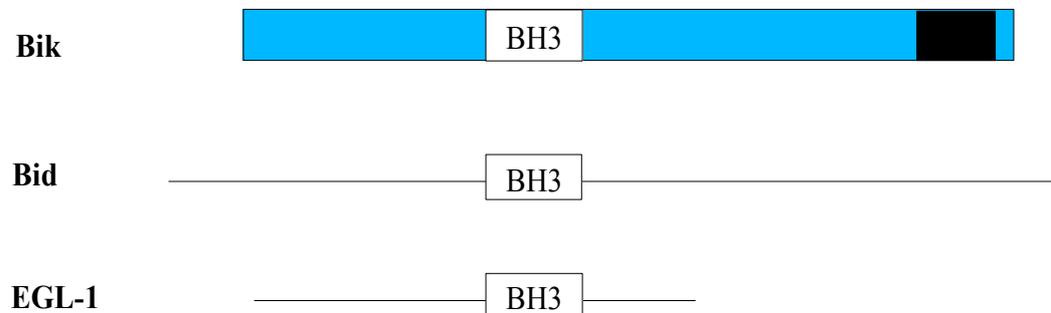
### Bcl-2-ähnliche Überlebensfaktoren



### Bax-ähnliche Todesfaktoren



### BH3-only Todesfaktoren



**Abbildung 1.3.:** Bcl-2-Proteinfamilie. BH bedeutet hierbei Bcl-2-homologe Domäne.

Generell bestehen die Mitglieder aus ein bis vier Bcl-2-homologen-Domänen (BH1-BH4) mit unterschiedlichen Funktionen und einer C-terminalen Membranverankerungsdomäne. Einigen *BH3-only death factors* wie z.B. Noxa und PUMA fehlt die zuletzt genannte Domäne. *BH3-only*-Proteine besitzen nur die kurze BH3-Domäne, der eine Art Ligandenfunktion zugeschrieben wird. In *C. elegans* hat EGL-1 eine wichtige Rolle bei der Auslösung des Zelltodes von somatischen Zellen. Abhängig vom Entwicklungsstadium des Wurmes variiert das Expressionslevel von EGL-1, das durch Transkriptionsfaktoren (TRA-1A, CES-1)

## 1. Einleitung

reguliert wird. Dessen BH3-Domäne bettet sich in die hydrophobe Tasche von ced-9 (homolog zu Bcl-2), das dann das gebundene proapoptotische ced-4 (homolog zu Caspase-9) freisetzt, um ced-3 (homolog zu Caspase-3) zu aktivieren (del Peso et al., 2000). In Analogie zu EGL-1, das die ontogenetische Apoptose in *C. elegans* reguliert, könnte jedes der 10 mammalen *BH3-only*-Proteine unterschiedliche apoptotische Stimuli erfassen. Daher werden sie auch als Sensoren der Apoptose bezeichnet, die in Antwort auf ein apoptotisches Signal aktiviert werden und es dann auf die Multidomänenmitglieder der Bcl-2-Familie weiterleiten. Verschiedene Mechanismen der Aktivierung auf allen Ebenen der Proteinregulierung sind bisher aufgeklärt worden.

Noxa und Puma werden transkriptionell durch p53 reguliert (Wu and Deng 2002). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach DNA-Schäden induziert wird, die bei UV-,  $\gamma$ -Strahlung oder Applikation von Chemotherapeutika entstehen (Vousden und Lu, 2002). Mehr als 50 % aller Tumoren tragen eine Mutation in p53, sodass sie apoptoseresistent gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika sind (Nigro et al., 1989). Die Induktion von Noxa könnte daher eine Sensibilisierung für Chemotherapeutika in diesen Tumorzellen hervorrufen.

Die Regulation von Bik und Bad erfolgt posttranskriptionell durch Phosphorylierung. Bad wird durch Phosphorylierung an Serinresten inaktiviert und bleibt an dem Protein 14-3-3 gebunden (Zha et al., 1996). Entsprechende wachstumsfaktorabhängige Kinasen wie AKT/PKB, PKA und Raf konnten identifiziert werden. Der PI-3-Kinase/PKC-Weg phosphoryliert z.B. AKT (Datta et al., 1997). Nach Wachstumsfaktorentzug wird Bad dephosphoryliert, wobei Calcineurin eine potentielle Phosphatase darstellt (Wang et al., 1999). Dephosphoryliertes Bad wird freigesetzt und interagiert mit Bcl-2-ähnlichen Überlebensfaktoren am Mitochondrium (Zha et al., 1996).

Ein weiterer Mechanismus der Aktivierung ist die Proteolyse wie er für Bid bereits im CD95-Signalweg beschrieben wurde. Caspase-8 prozessiert die inaktive zytosolische Form von Bid, das als *truncated* Bid (tBid) zum Mitochondrium transloziert (Luo et al., 1998). tBid weist eine erhöhte Affinität zu Bcl-2- und Bax-ähnlichen Faktoren auf. Bid könnte zusätzlich auch direkte porenbildende Eigenschaften besitzen, da bei Untersuchungen der Struktur Ähnlichkeiten mit porenbildenden, bakteriellen Toxinen festgestellt wurden (Chou et al., 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass es die Lipidzusammensetzung der äußeren Mitochondrienmembran moduliert und so ihre Permeabilität erhöht (Esposti, 2002).

Bim und Bmf werden durch Bindung an zytoskelettale Strukturen inaktiviert. Von Bim existieren drei alternative Splice-Produkte: Bim<sub>S</sub>, Bim<sub>L</sub> und Bim<sub>EL</sub>. Während Bim<sub>S</sub> konstitutiv proapoptotisch ist, werden Bim<sub>L</sub> und Bim<sub>EL</sub> durch Sequestration an *dynein light chain 1* der Microtubuli inaktiviert. Nach Wachstumsfaktorentzug oder UV-Bestrahlung werden sie

## 1. Einleitung

freigesetzt und binden an Bcl-2-ähnliche Proteine (Puthalakath et al., 1999; O`Conner et al., 1998). Bim scheint bei der Kontrolle der Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug ein wichtigerer Mediator zu sein als Bad. Bim<sup>-/-</sup>-Neurone und Lymphozyten zeigten sich *in vitro* komplett resistent gegenüber Wachstumsfaktorentzug (Putcha et al., 2001). Bim und Bad könnten bei der Apoptose von Erythrozyten in Bim<sup>-/-</sup>-Mäusen kooperieren, da sie im Gegensatz zu deren Lymphozyten nicht akkumulieren und auch durch ein anderes proliferationsförderndes Zytokinmuster stimuliert werden (Bouillet et al., 1999).

Der entsprechende Reiz für die Aktivierung von Bmf ist der Verlust von extrazellulärer Matrix mit Abrundung der Zellen oder die Behandlung mit Substanzen, die Aktin depolymerisieren. In der Folge wird Bmf zusammen mit der *dynein light chain 2* aus dem Myosin-V-Motorkomplex freigesetzt (Puthalakath et al., 2001).

Die Bcl-2 homologe Überlebensfaktoren tragen wie ced-9 drei bis vier Bcl-2-homologe Domänen, die sie für ihre antiapoptotische Funktion benötigen (Borner et al., 1994). Sie sind über ihre Membranverankerungsdomäne an allen subzellulären Membranen lokalisiert. Die Domänen BH1 bis BH3 formen eine hydrophobe Tasche und die BH4-Domäne stabilisiert diese durch Bedeckung hydrophober Reste (Petros et al., 2001). Der funktionelle Teil der ced-9-homologen Proteine scheint diese hydrophobe Tasche zu sein. In *C. elegans* ist an dieser Stelle ced-4 gebunden, ein ATP-bindendes Adaptormolekül, das homolog zu Apaf-1 ist. Es wird durch EGL-1 aus dieser Bindung verdrängt und aktiviert dann ced-3 (Chinnaiyan et al., 1997). Anhand der NMR-Struktur von Bcl-x<sub>L</sub> und Bax konnte das Bindungsverhalten der BH3-Domäne von Bax untersucht werden. Die BH3-Domäne liegt in Lösung als ungeordnete Spirale vor, die nach Bindung ihre Konformation ändert und als  $\alpha$ -Helix durch hydrophobe und elektrostatische Bindungen in der hydrophoben Tasche von Bcl-x<sub>L</sub> verankert wird. Glycin 138 in Bcl-x<sub>L</sub> hat eine entscheidende Funktion bei der Interaktion der BH3-Domäne mit der Tasche, da eine Punktmutation an dieser Stelle die Bindung verhindert und die antiapoptotische Eigenschaft von Bcl-x<sub>L</sub> davon abhängt (Petros et al., 2000). Obwohl Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> jeweils eine BH-3-Domäne besitzen, ist eine Di- oder Oligomerisierung beider Proteine *in vivo* nicht wahrscheinlich. Da beide BH-3-Domänen Bestandteil der hydrophoben Tasche sind, können sie nicht zur gegenseitigen Bindung exponiert werden (Conus et al., 2000). Eine Reihe von Untersuchungsergebnissen deuten an, dass die Bcl-2-like Überlebensfaktoren, neben der Hauptfunktion als antiapoptotische Bindungspartner von proapoptotischen Proteinen, die eine BH3-Domäne enthalten, noch weitere Aufgaben in der Zelle erfüllen könnten. So binden sie eine Vielzahl von Proteinen ohne BH3-Domäne, die entweder in der hydrophoben Tasche binden oder an der BH4-Domäne. Als Beispiele seien Raf-1, Calcineurin und das p53-bindende-Protein-2 (p53BP-2) genannt. Die Signifikanz

## 1. Einleitung

dieser Interaktionen ist aber völlig ungeklärt (Reed, 1998). Eine Verzögerung der Zellzyklusprogression als Folge der Überexpression von Bcl-2 konnte in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden. Diese Proliferationshemmung mit Anhäufung der Zellen in der G0/G1-Phase hängt u.a. von dem Funktionszustand der BH4-Domäne ab (Huang et al., 1997). Die strukturelle Homologie der BH1-Domäne von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> mit bakteriellen porenbildenden Toxinen zeigte die Möglichkeit auf, dass Bcl-2 porenbildende Eigenschaften besitzen könnte. Nur an artifiziellen Membranen gelang bisher der Nachweis der Kanalbildung mit Ionenleitfähigkeit bei einem pH von 4. *In vivo* konnte dies bisher nicht bestätigt werden (Schendel et al., 1998).

Bax und verwandte Proteine erhöhen die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, jedoch ist der genaue Mechanismus der Cytochrom C-Freisetzung noch ungeklärt. Zellen aus Bax/Bak-doppel-Knock-out Mäusen sind resistent gegenüber einer Reihe von apoptotischen Stimuli, da deren äußere Mitochondrienmembran in Antwort auf tBid nicht permeabilisiert (Wei et al., 2001). Mehrere Modelle bieten Erklärungsansätze.

Die unspezifische Freisetzung von Proteinen aus dem intermembranösen Raum durch Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran ist die eine Hypothese und entspricht der *mitochondrial permeability transition* (MPT). In diesem Fall öffnet sich die *permeability transition pore* (PTP), das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi$ ) fällt aufgrund von Protonenverlusten und dabei erlischt die oxidative Phosphorylierung. Die Folge ist Schwellung der Matrix und Zerreißen der äußeren Membran. An der Kontaktstelle zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran ist die PTP lokalisiert. Der *voltage-dependent anionen channel* (VDAC) an der äußeren Membran, der *adenin nucleotide translocator* (ANT) an der inneren Membran und weitere assoziierte Proteine bilden diesen Kanal, der für Moleküle bis 1,5 kDa passierbar ist (Crompton, 1999). Man nahm zunächst an, dass die Öffnung des PTP und der Verlust des  $\Delta\psi$  die Cytochrom C-Freisetzung initiieren (Zamzami et al., 1996; Heiskanen et al., 1999) und Bcl-2 und Bax die Leitfähigkeit dieses Kanals regulieren könnten (Shimizu et al., 1998; Pastorino et al., 1999). Echtzeituntersuchungen mit Fluoreszenz-markiertem Cytochrom C deuten jedoch an, dass der Verlust des  $\Delta\psi$  sich als Folge der Cytochrom C-Freisetzung ereignet (Waterhouse et al., 2001). Danach wird in einem Zeitraum von 5 min Cytochrom C aus dem intermembranösen Raum freigesetzt, während das  $\Delta\psi$  noch weitere 7 min aufrecht erhalten wird. Funktion und Struktur des Mitochondriums, auch der inneren Membran, bleiben weitgehend intakt. Erst aktivierte Caspasen depolarisieren das mitochondriale Membranpotential. Für den Funktionsmechanismus von Bax ist daher eher eine selektive Permeabilisierung der äußeren Membran anzunehmen.

## 1. Einleitung

Drei Modelle, die zu erklären versuchen, wie Bax diese Funktion vermittelt, werden diskutiert. Zum einen nimmt man an, dass Bax nach einem entsprechenden Stimulus zu Tetrameren oligomerisiert, um Kanäle zu bilden, die groß genug sind, um Cytochrom C passieren zu lassen (Korsmeyer et al., 2000). Eine weitere Hypothese besagt, dass Bax direkt die Lipidmembran destabilisiert und sich Lipidporen ausbilden, die die Cytochrom C-Freisetzung ermöglichen (Basanez et al., 1999). Nach einer weiteren Annahme interagiert Bax mit VDAC. Es soll ein Kanal entstehen, der im Durchmesser größer ist als der offene VDAC ohne Bax-Assoziation (Shimizu et al., 2000). Bekannt ist von Bax, dass die Domänen BH1-BH3 ähnlich wie in Bcl-2 eine hydrophobe Tasche formen, die BH3-Domäne jedoch flexibel um ihre Achse beweglich ist. So kann sie exponiert werden, um in einer hydrophoben Tasche eines antiapoptotischen Bcl-2-Proteins zu binden. Es hat wie Bcl-2 strukturelle Homologie zu bakteriellen porenbildenden Toxinen. Die C-terminale Membranverankerungsdomäne von Bax liegt in der Tasche, um eine Membranlokalisation zu verhindern (Sattler et al., 1997; Suzuki et al., 2000).

Die subzelluläre Verteilung von Bax wird durch posttranslationale Modifikation oder Proteinregulation der C-terminalen Domäne gesteuert. Während im Gewebe Bax im Zytosol vorliegt, ist in Zellsystemen Bax auch am Mitochondrium lokalisiert (Antonsson et al., 2001). Nach Membranassoziation wird Bax durch Bindung von Bcl-2 inaktiviert. In Folge eines proapoptotischen Signals unterläuft Bax eine konformationelle Änderung, die eine Membraninsertion gestattet und die Membranpermeabilisierung nach den vermuteten Modellen vermittelt (Borner, 2003).

Vermutlich spielen in der Zelle mehrere Mechanismen gleichzeitig eine Rolle. Je nach Art, Stärke, Zellviabilität und Ausmass des Stimulus könnte man annehmen, dass die MPT das eine Extrem darstellt, dessen morphologisches Substrat die Nekrose ist. Andererseits ist die isolierte Permeabilisierung der äusseren Membran, wie es Waterhouse (2001) vorschlägt, mit der klassischen Morphologie der Apoptose in Verbindung zu bringen. Zwischenformen sind angesichts der Komplexität der Regulationsmechanismen gut vorstellbar. Speziell für Bax ist wahrscheinlich, dass eine evolutionäre Redundanz der Signaltransduktionmöglichkeiten vorliegt, um die Weiterleitung über einen der zentralen Apoptoseregulatoren sicherzustellen. Daher sind die oben genannten Modelle der Bax-Signaltransduktion parallel möglich. Es wird auf molekularer Ebene deutlich, dass Apoptose und Nekrose eng verbunden sind.

Die Weiterleitung des apoptotischen Signals erfolgt an einem oligomeren Aktivatorkomplex (Apoptosom), der ähnlich wie der DISC durch induzierte Annäherung, die Proform der Caspase-9 allosterisch aktiviert, welche dann Caspase-3 prozessiert. Zytosolisches Cytochrom C bindet an Apaf-1, das ATP-abhängig oligomerisiert und über homophile Assoziation die

## 1. Einleitung

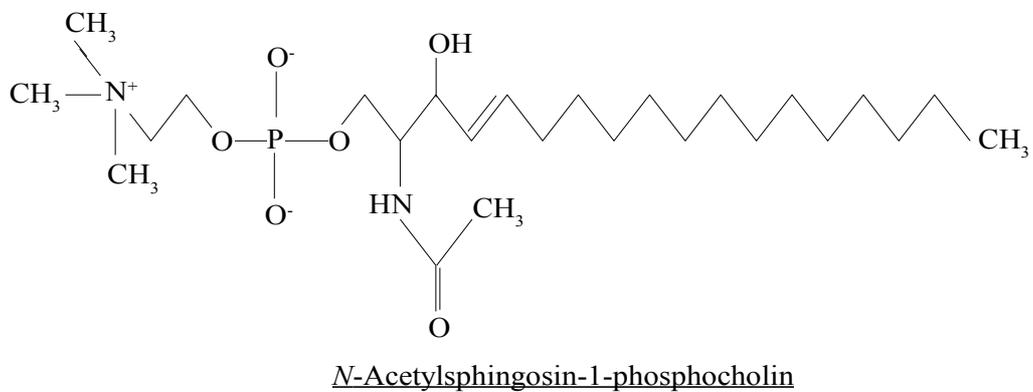
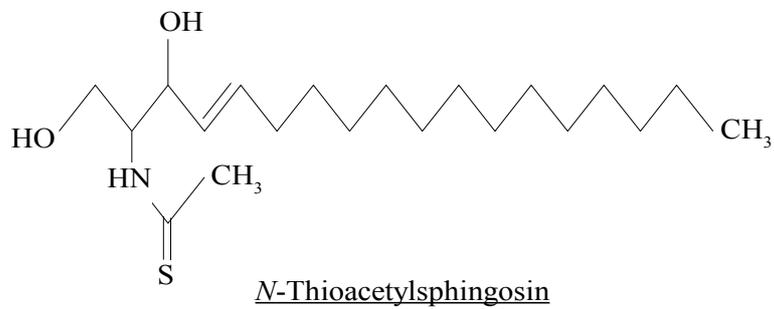
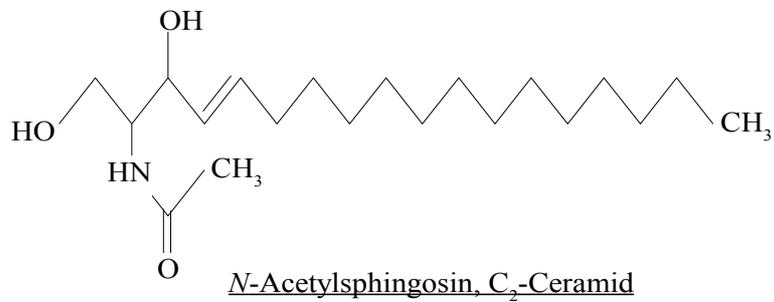
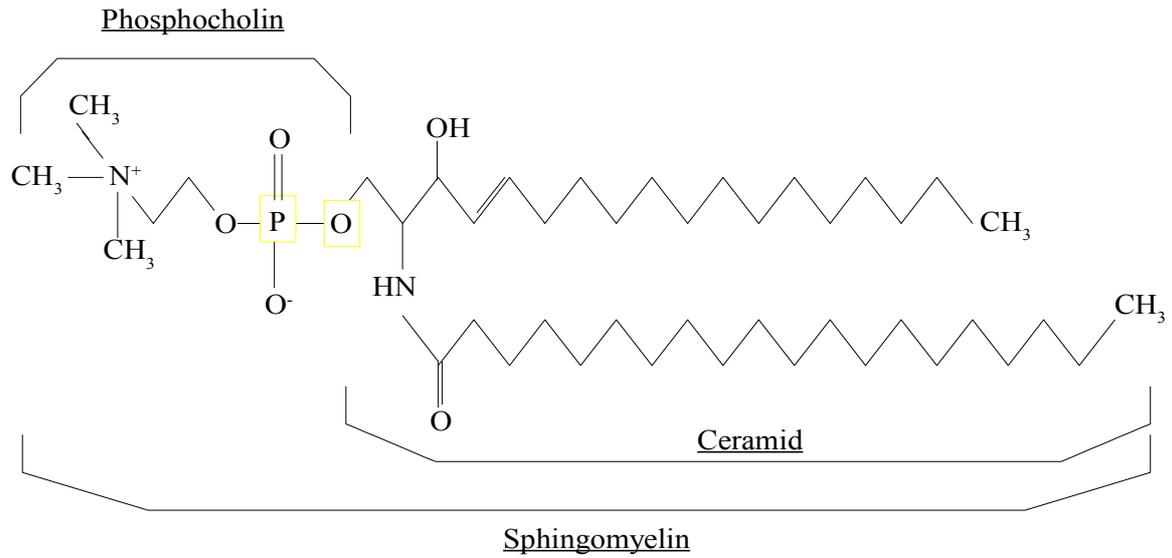
CARD-Domain von Caspase-9 bindet. Der entstandene heptamere Komplex mit radiärer Anordnung der Caspase-9 hat ein Molekulargewicht von 1,4 MDa (Acehan et al., 2002) Das sogenannte Apoptosom erhöht die Aktivität der Proform von Caspase-9 um das 1000-fache. (Rodriguez und Lazebnik, 1999). Smac/Diablo und Htr2A/Omi, die gleichzeitig mit Cytochrom C freigesetzt werden, verdrängen bzw. prozessieren IAPs, die an prozessierte, mature Caspase-3 gebunden sind und erst dann die vollständige Aktivität erlangt (Ekert et al., 2001; Suzuki et al., 2001).

### 1.1.2.4. Die Rolle von Ceramid in der Regulation der Apoptose

Den Metaboliten des Sphingolipidstoffwechsels wurde in den letzten Jahren die Funktion von *second messenger* zugeschrieben, die eine zentrale Bedeutung bei der Regulation von Proliferation, Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose haben. Seit der Entdeckung, dass  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin- $D_3$  die Sphingomyelin-Hydrolyse in HL-60-Zellen stimuliert, um Ceramid zu produzieren, ist bekannt, dass der Sphingolipidstoffwechsel durch extrazelluläre Signale moduliert werden kann (Okazaki et al., 1989). Der Begriff „Sphingolipid-Rheostat“ basiert auf der Beobachtung, dass verschiedene Sphingolipid-Metabolite z.T. gegenläufige Effekte in der Zelle steuern (Geilen et al., 2001). Insbesondere Ceramid wird als entscheidender Mediator der Apoptose angesehen (Obeid et al., 1993), der seine Funktion wie Diacylglycerol (DAG) durch Bindung und Aktivierung von Proteinkinasen oder Phosphatasen vermittelt. TNF- $\alpha$ , CD95-Ligand, Chemotherapeutika, Radiatio und viele andere Apoptoseinduktoren erhöhen den Ceramid-Spiegel in der Zelle (Kolesnick und Hannun, 1999). In letzter Zeit finden die physiko-chemischen Eigenschaften von Ceramid und deren Auswirkungen auf die Membranstruktur und Signaltransduktionswege immer größere Beachtung. Auch die Lokalisation der Ceramidgeneration hat Implikationen auf die biologischen Effekte in der Zelle (Blitterswijk et al., 2001).

Als Sphingolipid besteht der hydrophobe Anteil von Ceramid aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin und einer Fettsäure, die über eine Amidbindung gebunden wird. Diese Fettsäure ist normalerweise gesättigt oder einfach ungesättigt und variiert in ihrer Länge meist zwischen C16 und C24. Es ist das hydrophobe Grundgerüst aller komplexen Sphingolipide wie Sphingomyelin, Cerebroside, Ganglioside und Sulfatide (Abbildung 1.4. und 1.8.) (Geilen et al., 2001).

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.4.:** Struktur verschiedener natürlicher und synthetischer Sphingolipide.

## 1. Einleitung

In der Zelle kann Ceramid entweder *de novo* am Endoplasmatischen Retikulum produziert werden oder entsteht durch die Sphingomyelin-Hydrolyse an subzellulären Membranen, v.a. an der Plasmamembran. Für beide Wege konnte die Ceramid-Generierung in Abhängigkeit von TNF- $\alpha$  und anderen apoptotischen Stimuli mehrfach bestätigt werden (Pettus et al., 2002). Die *De-novo*-Synthese von Ceramid startet mit der Kondensierung von L-Serin und Palmitoyl-CoA zu Ketosphinganin durch die Serinpalmitoyltransferase, was zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Nach Reduzierung und N-Acylierung entsteht aus Dihydroceramid durch eine Desaturase Ceramid, das zum Golgi-Apparat transloziert, um dort als Vorläufer für Glykosphingolipide und Sphingomyelin bereitzustehen. Via vesikulären Transport erreichen die Sphingolipide alle subzelluläre Kompartimente, v.a. aber die Plasmamembran und reichern sich überwiegend im äußeren Blatt, in sogenannten Mikrodomänen, den *rafts* und Caveolen, an (Van Meer und Holthuis, 2000).

Die Spingomyelinasen (SMase) katalysieren die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid. Fünf verschiedene Enzyme werden nach pH-Optimum, Lokalisation und Ionenabhängigkeit unterschieden. Die neutrale Smase (nSMase) wird am Golgi, Mitochondrium und an der zytosolischen Seite der Plasmamembran vermutet. An letzterer Lokalisation wird sie durch TNF- $\alpha$ - und CD95/Fas-Rezeptoren sowie weiteren apoptotischen Stimuli aktiviert. Es folgt ein schneller, transients und geringer Ceramid-Anstieg (15-60 min), der FAN-abhängig ist (*factor associated with N-SMase activation*), das an den TNF-Rezeptor bindet (Pettus et al., 2002). Diese Ceramid-Akkumulation soll proapoptische Signalwege initiieren und Apoptose auslösen. Molt-4-Zellen, die mit bakterieller nSMase transfiziert wurden, produzierten Ceramid, das Apoptose aus einem intrazellulären SM-Pool auslösen konnte aus (Zhang et al., 1997).

Eine Reihe von Zielmolekülen, denen Ceramid als *second messenger* für ihre Aktivierung zugeordnet wird, hat man inzwischen identifiziert. Darunter finden sich PKC, *kinase suppressor of Ras* (KSR), Raf-1 und einige Phosphatasen wie die Ceramid-activated protein phosphatases (CAPP1 und CAPP2A) sowie Cathepsin D (Pettus et al., 2002).

Die saure SMase (aSMase) ist klassischerweise im lysosomalen bzw. endosomalen Kompartiment lokalisiert (Levade und Jaffrézou, 1999). In jüngster Zeit gibt es Hinweise für eine Aktivität auch auf dem äußeren Blatt der Zellmembran, deren Signifikanz in der Apoptosekaskade aber umstritten ist. Die Arbeitsgruppen von Kolesnick und Gulbins vertreten die Ansicht, dass Ceramid in Antwort auf eine CD95-Triggerung in *lipid rafts* auf der Außenseite der Zellmembran gebildet wird. Sie beschreiben einen schnellen Ceramid-Anstieg innerhalb einer Minute, der das Rezeptor-*clustering* und *capping* von CD95 und CD40 in Jurkat T-Zellen initiiert, das für die optimale Signaltransduktion notwendig ist

## 1. Einleitung

(Cremesti et al., 2001). Es wird vermutet, dass die Ceramid-Generierung der aSMase, wegen ihres pH-Optimums zunächst im sauren Milieu der Endosomen abläuft, die dann mit der Plasmamembran fusionieren und so Ceramid und die aSMase auf die Außenseite der Zelle translozieren (Grassme et al., 2002). An Zellen mit defizienter aSMase konnte der Zusammenhang zwischen Apoptoseresistenz und Ceramid-Produktion gezeigt werden. Durch Zugaben von exogenem Ceramid wurden die Zellen nach Behandlung mit CD95-Ligand wieder sensibel (Grassme et al., 2002). Aber nicht unter allen Umständen ist die aSMase in der Signaltransduktion von CD95 essentiell (Bezombes et al., 2001).

Die Grundlage für den obengenannten Signaltransduktionsmechanismus von CD95 und CD40 sind die speziellen biophysikalischen Eigenschaften von Ceramid. Sphingolipide bilden zahlreich Wasserstoffbrückenbindungen untereinander und mit benachbarten Molekülen aus, weil sie, im Gegensatz zu Phospholipiden, die nur Akzeptoren sind, als Akzeptoren und Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen fungieren. Sphingolipide tendieren daher zur Separation und Autoaggregation in Phospholipiddoppelschichten. Sie erhöhen die Membranordnung und vermindern ihre Fluidität (Kolesnick et al., 2000).

SM hat zusätzlich noch eine starke Affinität zu Cholesterol. Zusammen mit GD1, einem komplexen Glykosphingolipid formen sie (SM, Cholesterol und GD1), definierte Microdomänen in der Zellmembran. Diese Mikrodomänen werden wegen ihrer Unlöslichkeit in Triton-X-100 als *detergent-resistant membranes* (DRM) bezeichnet, die entweder das Strukturprotein Caveolin-1 tragen und Caveolen ausformen, oder mit Flotillin assoziiert sind und plane *rafts* von ~ 50 nm Durchmesser in der Membran bilden. Sie stellen z.B. die Plattform für Signaltransduktionskomponenten von Rezeptortyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und uva. Sie regulieren die Signalwege durch Ein- und Ausschluß von Komponenten oder Aggregation von inaktiven Einheiten. Der EGF-Rezeptor verläßt z.B. nach Aktivierung die *rafts* (Pike, 2003). Im CD95-Signalweg sollen *rafts* bzw. Caveolae die Initiationspunkte für die Ceramid-Generierung und die laterale Segregation der Ceramid-angereicherten Mikrodomänen zu größeren Plattformen sein, die das Rezeptor-*clustering* und die Signaltransduktion ermöglichen (Cremesti et al., 2002).

Weiterhin assoziiert man die endozytotische Aufnahme von Rezeptoren, Proteinen und Bakterien mit der lokalen Alterierung der Membranstruktur durch die Ceramid-Bildung in Caveolae und *rafts*. Das Bakterium *N. gonorrhoeae* benötigt zur Infizierung von Epithelzellen die Aktivierung der aSMase auf der Zelloberfläche (Grassme et al., 1997). Die asymmetrische Ceramid-Generierung an SM-angereicherten Liposomen induzierte die kontralaterale Bildung von Membranausstülpungen (Holopainen et al., 2000). Auch bei der endozytotischen Rezeptorinternalisierung des aktivierten CD95-Rezeptors und der nachfolgenden

## 1. Einleitung

Modulierung der weiteren Signaltransduktion in den Endosomen/Lysosomen wird die Beteiligung von Ceramid diskutiert (Algericas-Schimmich et al., 2002). Ceramid erleichtert wegen seiner kleinen Hydroxylkopfgruppe und geringen Hydratisierung den Übergang von lamellären Phospholipidmembranen in eine hexagonale Anordnung mit negativer Oberflächenspannung. Diese Transition könnte prinzipiell bei allen Prozessen von Bedeutung sein, bei denen Membrananteile abgespalten oder aufgenommen werden (Veiga et al., 1999). An zwei Beispielen soll die Relevanz dieser Eigenschaft von Ceramid für die Ausführung der Apoptose verdeutlicht werden. Während der Effektorphase der Apoptose kann eine langsame und ausgeprägte Ceramid-Akkumulation gemessen werden, die nicht von der Aktivität der aSMase abhängig ist (Boesen-de Cock et al., 1999; Hannun, 1996). Eine bisher unidentifizierte nSMase an der zytoplasmatischen Membranseite oder die *De-novo*-Synthese soll für die Ceramid-Generation verantwortlich sein, die unterhalb der Caspasen-Aktivierung steht. In dieser Phase der Apoptose finden wir *membrane blebbing* und *apoptotic body*-Formierung, was durch die membrandestabilisierenden Eigenschaften von Ceramid erleichtert werden könnte (Tepper et al., 2000). Im Mitochondrium konnte während der CD95-medierten Apoptose ein erhöhter Ceramid-Gehalt gemessen werden (Matsako et al., 2001). Es kann entweder durch direkten Membrankontakt von ER und Mitochondrium ausgetauscht werden (Daum und Vance, 1997) oder durch SM-Hydrolyse erzeugt werden. Die Transfektion von MCF7-Zellen mit einer bakteriellen SMase, die mittels entsprechender Zielsequenzen gegen unterschiedliche zelluläre Kompartimente gerichtet war, konnte nur am Mitochondrium Apoptose durch Cytochrom C-Freisetzung auslösen (Birbes et al., 2001). Am isolierten Mitochondrium wurde gezeigt, dass Ceramid Kanäle bildet, die für Cytochrom C passierbar sind (Siskind et al., 2000).

### 1.1.3. Die Beutung der Apoptose unter klinischen Aspekten

Die Apoptose ist ein essentieller physiologischer Bestandteil der Entwicklung des Lebens eines komplexen, multizellulären Organismus. Während der Embryogenese werden unerwünschte bzw. überflüssige Zellen durch Apoptose beseitigt und in proliferierenden Geweben wie z. B. Haut oder Immunsystem wird die Homöostase mittels Apoptose reguliert. Aber auch einzellige Protozoen steuern ihre Population in einem Wirt durch Apoptose (Knight, 2002).

## 1. Einleitung

Unter vielen pathologischen Bedingungen erlangt diese Form des Zelltodes eine zentrale Bedeutung. In der Epidermis findet man histologisch nach prolongierter Sonnenexposition sog. *sunburn cells*, die als apoptotische Zellen identifiziert wurden (Sheehan und Young, 2002). Bei der Psoriasis, einer benignen hyperproliferativen Erkrankung der Haut, ist die TNF- $\alpha$ -induzierte-Apoptose wegen der irregulären NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion supprimiert (Victor und Gottlieb, 2002). Beim Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wird die Neurodegeneration mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang gebracht und eine Koronarischämie löst Apoptose im Myokard aus (Reed, 2002). Bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem systemische Lupus erythematodes oder Typ-I-Diabetes mißlingt die Elimination autoreaktiver Immunzellen aufgrund von Mutationen im CD95-Rezeptor oder CD95-Liganden, die eine Apoptoseresistenz der Lymphozyten verursachen (Hayashi und Faustmann, 2003). Das HIV-Virus aktiviert den extrinsischen und den intrinsischen Apoptoseweg, um das Immunsystem des Wirtes, d.h. die virusspezifischen CD4+-T-Lymphozyten zu unterdrücken (Gougeon, 2003). Die Entwicklung von Krebs basiert auf deregulierter Proliferation und Suppression der Apoptose (Green und Evan, 2002).

Die Entschlüsselung der apoptotischen Singalwege bereitete auch den Weg zur Entwicklung von Substanzen, die gezielt die Apoptosekaskade entweder inhibieren oder aktivieren. Einige Substanzen befinden sich bereits in klinischer Erprobung. Die Bcl-2-Proteine sind diesbezüglich ein wesentliches Forschungsfeld, da eine Bcl-2-Überexpression in vielen Tumoren ein wesentliches Kennzeichen ist. 80 % aller B-Zell-Lymphome und 90 % der colorektalen Adenokarzinome überexprimieren Bcl-2. In einer Phase-I-Studie sensibilisierte Bcl-2-Antisense-Gentherapie Melanome gegenüber Standardchemotherapie (Jansen et al., 2000). Das Antibiotikum Tetrocarcin A, das spezifisch die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert, durchbrach die suppressive Wirkung der Bcl-2 Überexpression, da daraufhin die Behandlung mit CD95-Ligand Apoptose induzierte (Nakashima et al., 2000). Eine weitere Strategie verfolgt den Einsatz von Peptiden mit Sequenzhomologie zur BH3-Domäne, die die Heterodimerisierung von Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> mit Bax unterbinden. Dies konnte in der PC-3-Prostata-Karzinomlinie Apoptose auslösen (Finnegan et al., 2001).

Die Todesrezeptoren DR4 und DR5 erlauben die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges spezifisch nur in transformierten Zellen. Deshalb erscheint der Einsatz von Anti-TRAIL-R1-Antikörpern bei vielen humanen Tumoren potentiell erfolgversprechend.

Die Anwendung von Caspasen-Inhibitoren bei Inflammation, Sepsis oder metabolischen Dysfunktionen wie Coronar- und ZNS-Ischämie erweitert in Zukunft vermutlich die therapeutischen Optionen bei akuten Erkrankungen. Im Mausmodell reduzierte ein Caspase-3-Inhibitor die Mortalität bei Sepsis um 80 % (Los et al., 2003).

## 1. Einleitung

### 1.2. Phosphatidylcholinbiosynthese

Die Fähigkeit von Phospholipiden zur spontanen Ausbildung von Lipiddoppelschichten in wässriger Lösung stellt die Grundlage für die Struktur von Biomembranen dar und ist Ausdruck ihres amphiphilen Charakters. Aufgaben und Eigenschaften von Plasmamembranen sind grundlegende Elemente der Lebensfähigkeit von Zellen. Drei Hauptfunktionen lassen sich hierbei unterscheiden:

- a. Abgrenzung und Schutz der Zelle von und vor der Umgebung als hochselektive Permeabilitätsschranken zur Wahrung der Molekül- und Ionenhomöostase. In eukaryonten Zellen findet sich zusätzlich eine intrazelluläre Kompartimentierung als Ausdruck einer evolutionären Spezialisierung der Zellfunktionen (Mitochondrien, Lysosomen, Kernmembran, Golgi).
- b. Energieumwandlung durch Photosynthese bzw. oxidative Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran.
- c. Kontrolle der interzellulären und intrazellulären Signalverarbeitung (Rezeptoren, *second messenger* Systeme aus Membranbestandteilen, Weiterleitung und Generierung von Nervenimpulsen).

Im *fluid mosaic model* nach Singer und Nicholson (1972) ist das Zusammenspiel der einzelnen Membranbestandteile als theoretisches Konzept zur Struktur und Funktion von Biomembranen zusammengefaßt. Erweitert um die Vorstellung von einer lateralen Heterogenität und Restriktion der Membranlipide und Membranproteine ergibt es das derzeitige Verständnis von Biomembranen (Jacobson et al., 1995)

Phosphatidylcholin (PC) ist das Hauptphospholipid in eukaryonten Zellen. Somit nimmt die Regulation des PC-Metabolismus eine zentrale Stellung in der Aufrechterhaltung der Membranhomöostase ein. Weiterhin ist PC an der intra- und interzellulären Signaltransduktion beteiligt.

## 1. Einleitung

**Tabelle 1.3.:** Lipidzusammensetzung biologischer Membranen (% der gesamten Lipidmasse)

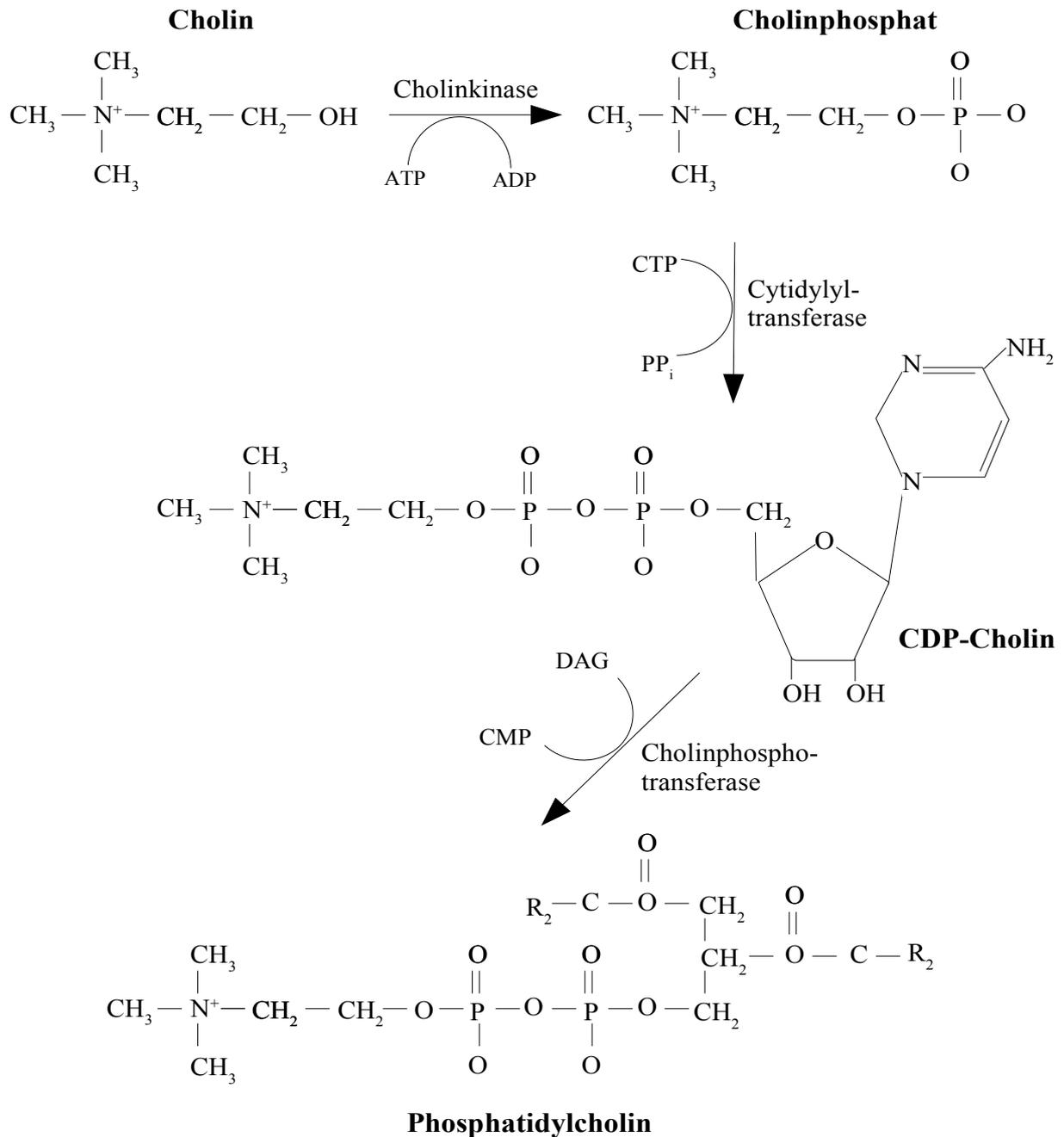
| Membrantyp |               | Phospholipid | Glykolipid | Sterole |
|------------|---------------|--------------|------------|---------|
| Säugetier  | Plasmamembran | 50 – 60      | 5 – 17     | 15 – 22 |
|            | ER            | 70 – 80      | < 5        | 5 -10   |
|            | Mitochondrium | 80 - 90      | < 5        | < 5     |
| Pflanzen   | Plasmamembran | 30 – 65      | 10 -20     | 25 – 50 |
|            | Mitochondrien | 90 - 95      | < 5        | < 5     |
| Bakterien  | Plasmamembran | 30 - 65      | 10 – 50    | keine   |

Erstmals konnte Gobley 1847 ein Phospholipid im Eigelb nachweisen und bezeichnete es deshalb als Lecithin (gr. Lekithos, Eigelb) (Deuel, 1951). Weitere Untersuchungen zeigten als Strukturbestandteile von PC neben Glycerin daran verestert zwei Fettsäuren sowie Phosphat und Cholin. Die chemische Synthese gelang 1927 durch Grün und Limpächer, die damit die Struktur von PC bestätigen konnten. Die einzelnen Phosphatidylcholone unterscheiden sich in ihrer Fettsäurezusammensetzung, wobei in *sn*-1-Position des Glyceringerüsts meist eine gesättigte und in *sn*-2-Position eine ungesättigte Fettsäure verestert ist (Parkes und Thompson, 1973).

Grundsätzlich kann PC in der Zelle auf drei verschiedenen Wegen synthetisiert werden:

- a. die *De-novo*-Synthese aus exogenem Cholin entlang des CDP-Cholin-Stoffwechselweges;
- b. Methylierung von Phosphatidylethanolamin (PE);
- c. Phospholipid-Basenaustausch-Reaktion.

# 1. Einleitung



**Abbildung 1.5.:** Phosphatidylcholinbiosynthese oder Kennedy-Weiss-Weg. CTP = Cytidintriphosphat, PP<sub>i</sub> = Pyrophosphat, DAG = Diacylglycerin, CMP = Cytidinmonophosphat, CDP = Cytidindiphosphat.

## 1. Einleitung

Insbesondere in Säugetierzellen ist die *De-novo*-Synthese der wichtigste Syntheseweg; hierbei ist Cholin ein essentieller Nahrungsbestandteil (Tijburg et al., 1989). In der Leber scheint auch unter normotrophen Bedingungen der Methylierung von PE zu PC durch die Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase eine gewisse Bedeutung zuteil. Mittels schrittweisen Transfer von drei Methylgruppen auf PE werden ca. 30 % des hepatischen Bedarfs gedeckt. Unter Cholin-Mangel kann über diese Reaktion bis zu 50 % des Bedarfs substituiert werden (Walkey et al., 1998).

Beim Basenaustausch wird die Kopfgruppe eines präexisten Phospholipids durch Cholin, Serin oder Ethanolamin ersetzt und die Synthese einer anderen Phospholipid-Spezies ermöglicht. Über diese Reaktion, die von einem Multisubstrat-Enzym katalysiert wird, entsteht in Säuger-Zellen v.a. Phosphatidylserin (Rakowska et al., 1997).

Die Aufklärung der einzelnen Reaktionsschritte zur *De-novo*-Synthese von PC beruht auf den Arbeiten von Kennedy und Weiss aus den Jahren 1955 und 1956 (Kennedy-Weiss-Weg). Ihnen gelang der Nachweis, dass die Synthese sowohl ATP- als auch Cytidintriphosphat-(CTP)-abhängig ist und Cytidindiphosphat-(CDP)-Cholin als Zwischenprodukt eine bedeutende Rolle spielt (CDP-Cholin-Weg) (Abbildung 1.5).

Cholin wird in nicht-neuronalen Zellen über erleichterte Diffusion aufgenommen, hingegen besitzen cholinerge Neurone einen hochaffinen, Natrium-abhängigen Transporter ( $K_m$ -Wert  $< 6 \mu\text{mol/l}$ ). Den ersten Schritt der PC-Biosynthese stellt die Phosphorylierung von Cholin unter ATP-Verbrauch durch die Cholin kinase (CK) (ATP: Cholinphosphotransferase, EC 2.7.1.31) dar. Hierbei entstehen ADP und Phosphocholin (PCho), das dann durch die CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase (CT, EC 2.7.7.15) zu CDP-Cholin umgesetzt wird. Zuletzt wird der Phosphocholin-Rest durch die Cholinphosphotransferase (CDP-Cholin:1,2-Diacylglycerol Cholinphosphotransferase, EC 2.7.8.2, CPT) auf Diacylglycerol übertragen und es entsteht Phosphatidylcholin. Unter den meisten Bedingungen stellt hierbei die Cytidyltransferase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dar, jedoch wird auch der CK in einigen Situationen diese Funktion zugeschrieben (Kent, 1990).

Für diverse Zellen nahm man an, dass die einzelnen Schritte der PC-Synthese entlang eines sog. Metabolon statt findet, d.h. dass die Intermediate kompartimentiert sind. Nach Elektropermeabilisierung von Zellen wurde nur Cholin in PC inkorporiert, nicht aber Phosphocholin oder CDP-Cholin (Bladergroen et al., 1998). Inzwischen konnte aber nachgewiesen werden, dass auch Phosphocholin, das bei der Hydrolyse von SM in späten Lysosomen/Endosomen entsteht, direkten Zugang zum CDP-Cholin-Weg hat, was gegen die Channeling-Hypothese spricht (Jansen et al., 2001).

## 1. Einleitung

Wittenberg und Kornberg konnten 1953 die Cholinase in Hefe nachweisen. Sie findet sich in allen eukaryonten Zellen als zytoplasmatisches Enzym und zusätzlich in neuronalen Geweben von Ratten auch auf subzellulären Membranen und Myelin. Es ist ein  $Mg^{2+}$ -abhängiges Enzym mit einem pH-Optimum zwischen 8,0 und 9,5 mit Substratspezifität für Cholin (Km-Wert: 30  $\mu$ M), Ethanolamin (Km-Wert: 10 mM) und ATP (Km-Wert: 2 mM). Homogene CK-Präparationen aus verschiedenen Rattengeweben zeigten alle signifikante Ethanolaminkinase-Aktivität, sodass für beide Reaktionen nur ein Enzym angenommen wird. Andererseits konnte in Pflanzen und Insekten eine autonome Ethanolaminkinase-Aktivität (EK) festgestellt werden und in humanen Leberpräparationen wurde eine höhere EK-Aktivität als CK-Aktivität gemessen, was auf ein gewebespezifisches Expressionsmuster schließen lässt (Ishidate, 1997). Bei unter 100  $\mu$ mol/l Cholin im Nährmedium wird sie zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im CDP-Cholin-Weg (McMaster und Bell, 1994).

In einer Reihe von Zelllinien, die von epithelialen Tumoren abstammten, war die CK-Expression und der Phosphocholin-Pool erhöht. PCho wird mit der mitogenen Signaltransduktion von PDGF, FGF und IGF-1 in Zusammenhang gebracht. In NIH-3T3-Zellen verstärkte PCho die DNA-Synthese, was möglicherweise über den Transkriptionsfaktor *activation protein 1* (AP-1) mediiert wird (Kiss, 1999).

Die humane Cytidyltransferase katalysiert die Reaktion von Cholinphosphat zu CDP-Cholin unter Verbrauch von CTP. Sie wird von zwei Genen kodiert. Entsprechend existieren zwei Isoformen: CT $\alpha$  und CT $\beta$ . Das CT $\alpha$ -Gen ist auf Chromosom 16 lokalisiert, jenes der CT $\beta$  auf dem X-Chromosom. Der CT-Promoter hat Bindungsstellen für AP1, *sterol response binding protein* (Sp1) und überlappende Konsensussequenzen für NF $\kappa$ B, E2F und Elk-1 (Bakovic et al., 2000). Die CT $\beta$  liegt in zwei Splice-Varianten mit differierenden Expressionsmuster vor. Vorrangig im Gehirn wird die CT $\beta$ 2-Isoform exprimiert, hingegen detektiert man die CT $\beta$ 1-Isoform in den meisten adulten und fetalen Geweben. Die CT $\alpha$  wird ubiquitär exprimiert (Lykidis et al., 1999). Eine weitere murine Isoform des Proteins (Ct $\beta$ 3) konnte erst kürzlich als Splice-Variante identifiziert werden, die in den meisten adulten Geweben exprimiert wird (Karim et al., 2003). In Abhängigkeit der Zellzyklusprogression oszilliert die CT $\alpha$  zwischen Nukleus und ER bzw. Golgi-Apparat. Die CT $\beta$ -Isoformen residieren ausschließlich am ER (Northwood et al., 1999). Das Enzym CT $\alpha$  hat ein pH-Optimum bei 7. Es setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten (je 42 kDa) zusammen mit jeweils vier funktionstragenden Domänen: eine Targeting-Sequenz zur nukleären Lokalisation, eine katalytische Domäne zur Substratbindung, eine amphipathische  $\alpha$ -helikale Membranbindungsdomäne und eine C-terminale Phosphorylierungsdomäne.

## 1. Einleitung

Die Cytidylyltransferase ist ein amphitropes Enzym, das in seiner aktiven Form membrangebunden vorliegt (M-Form) und in der inaktiven Form (L-Form) im Zytosol oder Karyoplasma. In HepG2-Zellen und in Zellen alveolären Ursprungs konnte auch eine aktive, zytosolische Form nachgewiesen werden. Dies ist ein Lipoprotein-Komplex mit scheinbar erhöhtem Molekulargewicht (H-Form). Die drei Formen sind ineinander überführbar (Weinhold et al., 1989).

Nach der Translokationshypothese (Pelech und Vance, 1984), die in modifizierter Form immer noch gültig ist, wird die Aktivität des Enzyms durch reversible Lipidbindung und Proteinphosphorylierung reguliert. Welcher physikalischer Membranparameter für die Membranbindung ausschlaggebend ist, wird noch diskutiert.

Eine Hypothese besagt, dass die negative Oberflächenladung der Membran die Translokation der CT steuert (Cornell, 1991a). Eine andere Hypothese erklärt die Membranbindung über eine verstärkte Oberflächenbiegung, wie sie bei unilammellären Vesikeln vorkommt (Cornell, 1991b). Die Arbeitsgruppe von Vance postulierte hingegen (Jamil et al., 1993), dass das Verhältnis von Doppelschicht-bildenden zu Nicht-Doppelschicht-bildenden Lipiden der bestimmende Faktor sei.

Eine weitere Hypothese, die den Vorteil besitzt alle bisherigen Ergebnisse zu integrieren, formuliert, dass die Translokation abhängig sei vom Verhältnis der Lipide, die eine Cholinopfgruppe tragen. Eine Erhöhung des Anteils cholinhaltiger Lipide bewirkt demnach eine Erniedrigung der Membranbindung und *vice versa* (Geilen et al., 1994). Bei Untersuchungen mit antiproliferativ wirksamen, cholinhaltigen Phospholipid- und Sphingomyelin-Analoga, unter anderen das in vorliegender Arbeit eingesetzte Hexadecylphosphocholin (HePC), ergaben die Ermittlung der subzellulären Distribution des Enzyms bei allen Substanzen eine verminderte Aktivität der membrangebundenen Fraktion. Dieser Effekt auf die Translokation war kopfgruppenspezifisch, da die Kontrollsubstanzen Hexadecylphosphoserin und Hexadecylethanolamin weder Einfluss auf die Membranbindung hatten, noch zeigten sie eine antiproliferative Wirkung (Wieder et al., 1995). Der vorgeschlagene Regulationsmechanismus für das Enzym impliziert einen negativen Feedback-Zyklus, der auch in Hinblick auf physiologische Bedürfnisse der PC-Synthese sinnvoll erscheint. Er ermöglicht die Aufrechterhaltung der Membranhomöostase in Abhängigkeit des PC-Gehaltes.

Den letzten Schritt der PC-Synthese katalysiert die CDP-Cholin-spezifische Cholinphosphotransferase (CPT) oder die Cholin/Ethanolaminphosphotransferase (CEPT) mit Spezifität für beide CDP-konjugierten Substrate. Sie sind integrale Membranproteine mit sieben transmembranären Domänen. Das Aktivitätszentrum des Enzyms ist nach der

## 1. Einleitung

zytoplasmatischen Seite orientiert (Henneberry et al., 2000). Die CPT wird nur am Golgi gefunden, dagegen ist die CEPT am ER und in der nukleären Membran lokalisiert. Diese zellulären Stellen definieren somit die Hauptsyntheseorte der *De-novo*-PC-Generierung. An der nukleären Membran scheinen die beiden Enzyme CEPT1 und CT $\alpha$  in enger räumlicher Assoziation zu stehen (Henneberry et al., 2002).

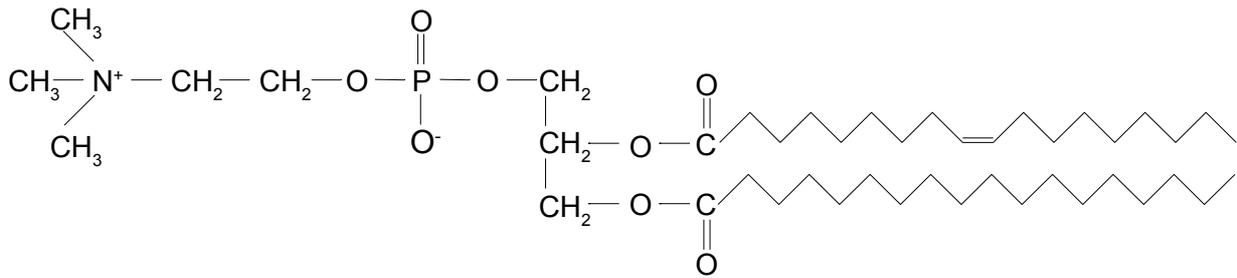
Die Cholinphosphotransferase spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Auswahl der Acyl-Reste von DAG, was die Signaltransduktion im PC-Zyklus und die Membraneigenschaften beeinflussen kann. In malignen Zellen ist die Fettsäurekomposition von Phospholipiden verändert. In einer Studie, die eine humane Mammakarzinom-Zelllinie mit einer benignen epithelialen mammäre Zelllinie verglich, war die mRNA-Expression in der malignen Zelllinie signifikant erhöht und die Aktivität des Enzyms um den Faktor 2,3 gesteigert (Ghosh et al., 2002).

### 1.3. Das Etherlipid Hexadecylphosphocholin

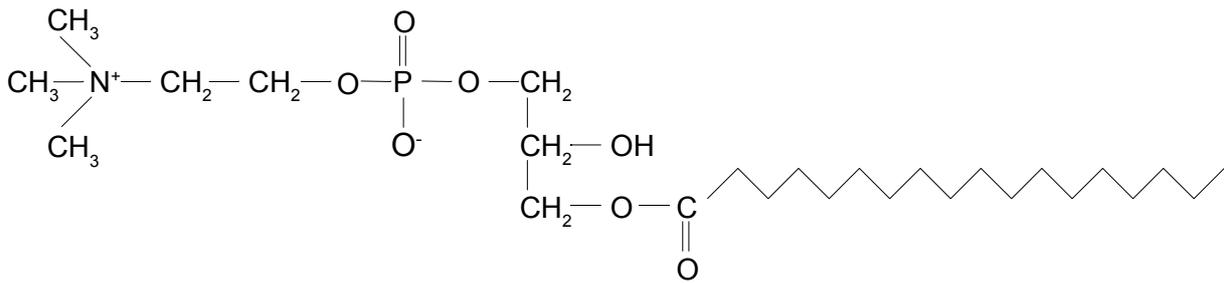
#### 1.3.1. Struktur der Alkylphosphocholine

Hexadecylphosphocholin ist als Zytostatikum (Miltefosin, Miltex<sup>TM</sup>, HePC ) seit 1992 in Deutschland zur lokalen Therapie von Hautmetastasen des Mammakarzinoms zugelassen. Es gehört zu einer Gruppe von neuartigen, antiproliferativ-wirksamen Substanzen, den Etherlipiden, die sich in zwei Klassen unterteilen lassen: Alkyllysophospholipide (ALP) und Alkylphosphocholine (APC) (Berkovic, 1998). Der Prototyp der Alkylphosphocholine ist das HePC, das sich von den ALPs durch das Fehlen des Glyceringerüsts unterscheidet.

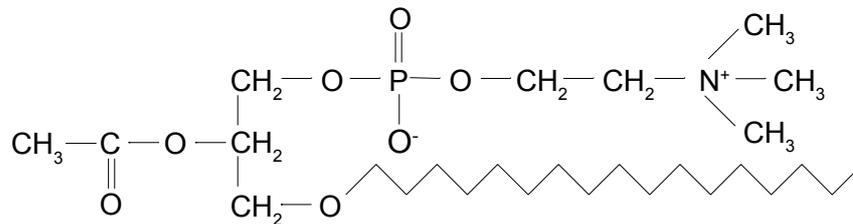
## 1. Einleitung



1-Stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin



Lyso-Phosphatidylcholin



platelet activated factor

**Abbildung 1.6.:** Struktur natürlicher Phospholipide

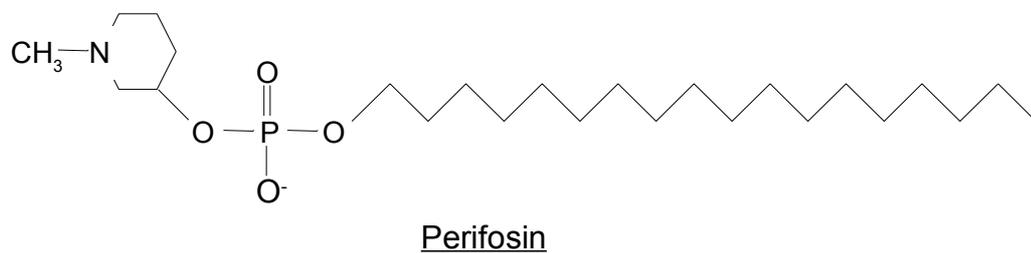
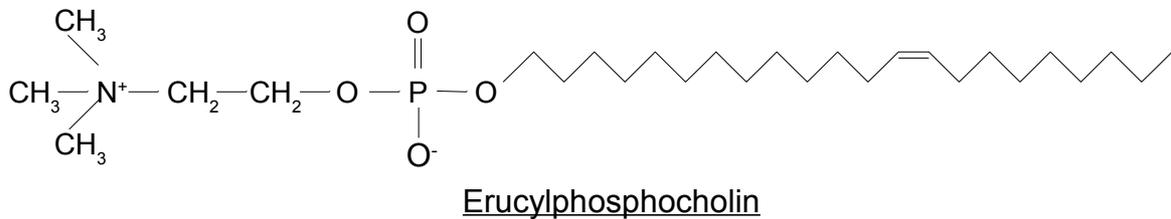
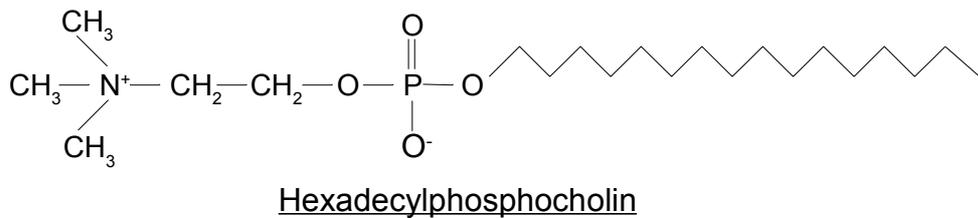
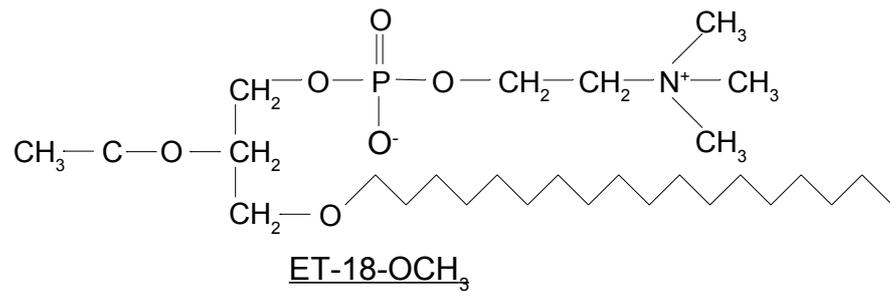
Die antiproliferative Wirksamkeit dieser Substanzen wurde entdeckt, als man Alkylderivate von Lysophospholipiden synthetisierte, um deren immunmodulatorischen Eigenschaften zu verstärken (Andresen et al., 1978). Die Blockierung der *sn*-2-Position dieser Alkyllysophospholipide verhinderte deren Inaktivierung durch Reacylierung. Bei Edelfosin (Et-18-OCH<sub>3</sub>, 1-O-Oktadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin), dem Prototyp dieser Substanzen, ist an dieser Stelle eine Methylgruppe in Etherbindung. Nach weiteren Untersuchungen zur Struktur/Wirkungsbeziehung entwickelten Unger und Eibl ein Derivat, Hexadecylphosphocholin, bei dem eine Phosphocholinkopfgruppe direkt über eine Etherbindung mit einer C-16 Kette verknüpft war, der Prototyp einer neuen Substanzklasse,

## 1. Einleitung

den Alkylphosphocholinen (Unger, 1989). Die ersten Experimente mit HePC führten Unger und Eibl im Jahre 1984 durch. Die Halbwertszeit dieser synthetischen Lyso-Phospholipidanaloga konnte im Vergleich zu den Lysophosphatidylcholinen von 1 h auf 70 h verlängert werden, eine wichtige Voraussetzung für ihre Akkumulation in Zellen und Wirksamkeit gegen Tumoren und wie sich später herausstellte gegen Leishmanien (Unger und Eibl, 2001). Bei oraler Applikation wird HePC sehr gut aus dem Intestinaltrakt resorbiert und im gesamten Organismus verteilt. Die höchsten Anreicherungen der Substanz finden sich in Leber, Niere und Lunge (Breiser et al., 1987).

Die räumliche Anordnung von Lipiden in wässriger Lösung kann anhand des Packungsparameters  $S = v/a_0l_c$  vorausgesagt werden. Es bedeutet  $v$  das hydrophobe Volumen pro Molekül,  $a_0$  die optimale Fläche pro Kopfgruppe an der Lipid-Wassergrenze und  $l_c$  die Länge der Kohlenwasserstoffkette. Für Etherlipid-Analoga gilt  $S < 1$ , d.h. es bildet sich eine mizellare Struktur aus, die detergenzartige Wirkung besitzt. Bei Phosphatidylcholin ist  $S = 1$ , was die Bildung der Phospholipiddoppelschichtmembran ermöglicht. An Phosphatidylserin-Liposomen wurde die membranschädigenden Eigenschaften von Glyceroglukophospholipid-Analoga nachgewiesen (Wiese et al., 2000).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.7.:** Struktur synthetischer Phospholipidanaloga

### 1.3.2. Klinische Anwendung antiproliverativer Lipid-Analoga

In verschiedenen klinischen Studien konnte die antineoplastische Wirkung der Etherlipide nachgewiesen werden. So zeigte sich unter topischer Applikation eine partielle bzw. vollständige Remission von Hautmetastasen eines Mammakarzinoms bei ca. 30% der Patientinnen (Unger et al., 1988, 1990; Leonard et al., 2001). In einer anderen Studie zur Wirkung bei kutanen Lymphomen ergaben sich Remissionsraten von 70% unter

## 1. Einleitung

Lokaltherapie (Dummer et al., 1992). In ersten systemischen Therapieansätzen konnten erfolgversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen und Nicht-kleinzelligen-Lungen-Karzinom erzielt werden. Jedoch traten in diesen Studien bei oraler Gabe von Dosen über 200 mg/d schwere gastrointestinale Nebenwirkungen auf, die eine Effizienzsteigerung verhinderten, ohne dabei jedoch die typischen myelodepressiven Nebenwirkung einer herkömmlichen Chemotherapie hervorzurufen (Bredel, 1994).

Eine i.v.-Therapie mit Miltefosin ist nicht möglich, da es *in vitro* an Erythrozyten Spontanhämolysen auslöste (Kötting et al., 1992). Um diese Nebenwirkungen zu vermeiden, entwickelte man liposomale Zubereitungen von HePC, die eine i.v.-Applikation ermöglichen (Kaufmann-Kolle et al., 1994), aber auch Analoga, wie z.B. Perifosin (D-21266) mit reduzierten gastrointestinalen Nebenwirkungen. In einer Phase-I-Studie mit Perifosin als orale Medikation bei Patienten mit soliden Tumoren in fortgeschrittenen Stadien ihrer Erkrankung traten proportional zur gegebenen Dosis gastrointestinale Nebenwirkungen auf. 52 % der Patienten litten an Nausea. 4 von 7 Patienten mit Tagesdosen über 200 mg mußten die Behandlung wegen ausgeprägter Nebenwirkungen abbrechen. Eine maximal tolerierbare Dosis von 200 mg/d wurde von den Autoren vorgeschlagen. Die chronische tägliche Behandlung, die für eine optimale Wirksamkeit dieser Medikamente nötig ist, wurde durch die Häufigkeit der gastrointestinalen Nebenwirkungen behindert (Crul et al., 2002). Insgesamt ist diese Substanz allerdings besser verträglich als HePC (Sausville et al., 2003).

Erucylphosphocholin ist ein neueres Analogon, das parenteral applizierbar ist und keine Hämolyse induziert, da es aufgrund einer *cis*-Doppelbindung in der Alkylkette keine mizellare, sondern eine lamelläre Struktur ausbildet (Kaufmann-Kolle et al., 1996). V.a. maligne therapieresistente Gehirntumoren könnten ein spezielles Therapieziel für erste klinische Versuche dieser Substanz werden. Erucylphosphocholin induzierte Apoptose in Gehirnzelllinien, die resistent waren gegenüber Standardtherapeutika wie Cisplatin (Erdlenbruch et al., 1998). Weiterhin scheint diese Substanz die Blut-Hirn-Schranke gut zu passieren, da sie im ZNS von Ratten akkumuliert (Erdlenbruch, et al., 1999).

Derzeit werden Untersuchungen zur kombinierten Radiochemotherapie durchgeführt (50 mg/d Perifosin oral, eskalierend), da man *in vitro* synergistische, apoptotische Effekte fand (Ruiter et al., 1999). Auch die kombinierte Chemotherapie mit Nukleosidantimetaboliten und Alkylphosphocholinen könnte sich als vorteilhaft erweisen. Die Leukämiezelllinie K-562 mit einer relativen Resistenz gegenüber den Einzelpräparaten konnte nach konsekutiver Gabe von Gemcitabin und HePC sensibilisiert werden und synergistische zytotoxische Effekte gemessen werden (Georgieva et al., 2002). Zusätzlich ist klinisch eine Verminderung der

## 1. Einleitung

myelosuppressiven Eigenschaften der Antimetaboliten, durch deren mögliche Dosisreduktion einerseits und Stimulation der Hämatopoese durch APC andererseits, zu erwarten (Stekar et al., 1995).

Eine weitere interessante Anwendung dieser Substanzen könnte also in der Behandlung von Leukämien bestehen. Edelfosin zeigt eine ausgeprägte zytotoxische Aktivität gegenüber leukämischen Blasten *in vitro*, ohne dabei normale hämatopoetische Stammzellen zu zerstören. So wurde autologes Knochenmarktransplantat vor der Reimplantation mit Edelfosin gereinigt. Bei 30 % der Patienten mit einem zweiten oder dritten Rezidiv einer akuten Leukämie erreichte man eine Remission, die im Median 365 Tage anhielt (Vogler et al., 1992).

Seit Ende der 80er Jahre wurde durch Unger die Wirkung von HePC auf Leishmanien in Mäusen, die mit *L. donovani*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniose (Kala-Azar), infiziert wurden, untersucht. Im Vergleich zum Standardmedikament Antimon erzielte HePC überzeugende Therapieerfolge. Die Ergebnisse einer Phase-II-Studie, die an 120 Kala-Azar-Patienten in Indien durchgeführt wurden, ergaben Heilungsraten von 95% nach dreiwöchiger Therapie mit einer oralen Dosis von 50 - 100 mg HePC täglich. Die Parasitenfreiheit wurde durch Milzpunktion gesichert (Jha et al., 1999). Möglicherweise wird HePC bei der Behandlung dieser sich ausbreitenden Tropenkrankheit, die auch als opportunistische Infektion bei HIV-Patienten auftritt, eine Alternative zur bisherigen i.v.-Therapie mit Antimon-Präparaten (z.B.: Pentostam).

Derzeit gibt es weltweit 12 Mio. Menschen, die an Leishmaniose erkrankt sind. Unter den vielfältigen klinischen Erscheinungsformen dieser, durch die Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* übertragenen, parasitären Anthroozoonose, ist die viszerale Leishmaniose (Inzidenz: weltweit 500.000 / Jahr) eine tödlich verlaufende Variante. Unbehandelt führt die Krankheit, die lymphatische Organe und das Myelon befällt, in 6 - 12 Monaten zum Tode. Der Erreger proliferiert bzw. persistiert in den Phagolysosomen der Makrophagen. In vielen Epidemiegebieten bestehen bereits bei bis zu 40 % der Patienten Resistenzen gegenüber Pentostam. HePC wirkt unabhängig vom Immunstatus des Patienten auch auf resistente Stämme von *L. donovani* und steht als kostengünstige orale Alternative zur Verfügung. Wahrscheinlich wird HePC weltweit als Standardmedikation empfohlen werden (Unger und Eibl, 2001). Seit 2004 ist es unter dem Namen Impavido® in Deutschland zugelassen.

## 1. Einleitung

### 1.3.3. Biologische Effekte

Neben der selektiven antiproliferativen Wirkung der Etherlipide gegenüber Tumorzellen, werden in der Literatur noch eine Reihe sehr unterschiedlicher Effekte beschrieben, die im folgenden kurz umrissen werden.

Bereits von den Lysophospholipiden wußte man, dass sie immunmodulatorische Eigenschaften besitzen (Berkovic, 1998), die auch bei deren Derivaten, den Etherlipidanaloga zu finden sind. HePC und liposomales HePC (L-HePC) aktivieren Monozyten/Makrophagen. In der humanen Monozytenzelllinie U 937 beobachtete man eine Hochregulation des MHC-1-Antigens und eine verstärkte ICAM-1-Expression (Eue, 2002). Anhand eines orthotopen Mausmodells mit einer humanen Mammakarzinom-Zelllinie (MDA-MB435) konnte in HePC-behandelten Mäusen eine Zunahme der Tumordinfiltration mit aktivierten Makrophagen gezeigt werden. Anschliessende *In-vitro*-Studien ergaben eine direkte zytotoxische Makrophagenaktivität gegenüber MDA-MB435-Zellen nach Stimulation mit L-HePC. Als Effektormoleküle wurden IL-6 und TNF- $\alpha$  identifiziert (Eue, 2001). Auch in U 937-Zellen stimulierte HePC die TNF- $\alpha$ -Produktion (Eue et al., 1995). Es ist anzunehmen, dass *in vivo* neben der direkten antiproliferativen Wirkung, eine HePC-induzierte Aktivierung von Makrophagen zur Tumorregression beiträgt. Dies besonders bei L-HePC, da Liposomen bevorzugt von Makrophagen aufgenommen werden und die Substanz dort akkumuliert (Eue, 2001). Weiterhin findet man in peripheren T-Lymphozyten eine verstärkte IL-2-induzierte INF- $\gamma$ -Produktion, eine Erhöhung des IL-2-Rezeptors und des HLA-DR Antigens (Vehmeier et al., 1991)

In verschiedenen Phase-II-Studien konnten bisher keine myelodepressiven Nebenwirkungen von HePC festgestellt werden. Im Gegenteil, bei 70 % der Patienten beobachtete man eine Granulozytose und eine Thrombozytose (Pronk et al., 1994). Der Einfluss auf das hämatopoetische System scheint einerseits unspezifisch über eine Kostimulation der Vorläuferzellen zusammen mit Wachstumsfaktoren vermittelt zu sein, andererseits gilt HePC als potenter Aktivator von Monozyten und Knochenmarksfibroblasten. HePC hat keine direkte proliferationsfördernde Wirkung auf Myeloblasten und Megakaryoblasten. Zusammen mit G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) stimulierte HePC das Wachstum von Myeloblasten *in vitro* auch ohne akzessorische Zellen (Vehmeier et al., 1989). Die Wirkung auf Megakaryoblasten bedarf neben einer nur gering ausgeprägten Kostimulation mit Thrombopoietin (TPO) v.a. die Aktivierung von Fibroblasten und Monozyten durch HePC und deren Sekretion von IL-6, TPO, und GM-CSF (Berkovic et al., 2001).

## 1. Einleitung

Als weitere Effekte werden Veränderungen bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beschrieben. An *Madin-Darby-canine-kidney*-Zellen (*MDCK*-Zellen), die als *in vitro*-Modell für Epithelien geeignet sind, konnte, nach Behandlung mit Miltefosin, eine Zunahme der *tight-junction*-Permeabilität gemessen werden, sowie eine Reorganisation der Actinfilamente beobachtet werden. Hierbei scheint die Hemmung der Phospholipase-C $\beta$  mit nachfolgender Alteration der PKC-vermittelten Signaltransduktion im Mittelpunkt zu stehen (Ward et al., 2002). Durch HePC konnte an Fibroblasten aus Keloiden eine Veränderung der Kollagenmatrix zu Gunsten von elastischen Fasern ausgelöst werden (Blume-Peytavi et al., 1997); ET-18-OCH<sub>3</sub> erniedrigt die Expression von *cell adhesion molecules* (CAM) (Bosse et al., 1995).

Der antiparasitäre Effekt von Miltefosin *in vitro* gegenüber Protozoen konnte an *Entamoeba histolytica* (Seifert et al., 2001), *Acanthamoeba* spp. (Walochnik et al., 2002), an *Trypanosoma cruzi* (Croft et al., 1996) und an verschiedenen *Leishmania* spp. (Escobar et al., 2002) gezeigt werden. Für Leishmanien wird eine Hemmung der Alkyl-Acyl-Transferase im Ether-Lipidmetabolismus als Wirkmechanismus angenommen (Lux, et al., 2000). In der Membran von Leishmanien liegt der Anteil an Etherphospholipiden bei über 50 % (Beach, 1979). PE und PI enthalten mehr als 90 % der Alk-1-enyl- und Alkylreste (Wassef et al., 1985). Glykosylphosphatidylinositole (GPI) verankern in der Plasmamembran der Flagellaten Glykoproteine und Phosphoglycanketten oder liegen als freie GPI's vor. Diese Glykokonjugate sind essentieller Bestandteil der Protozoenmembran und determinieren unter anderem deren Infektiosität und Viabilität (McConville, 1993).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Trypanosoma cruzi* nach HePC-Applikation zeigten eine Mitochondrienschwellung, intensive Vakuolisierung und unspezifisches *blebbing* der Membran v.a. am begeißelten Pol (Santa-Rita et al., 2000). Es finden sich also morphologische Kriterien des nekrotischen Zelltodes in diesem einzelligen Organismus. In anderen Protozoen wurden apoptoseähnliche Veränderungen festgestellt. Pentostam induziert in *Leishmania donovani* eine Caspasen-abhängige Apoptose mit Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials und Kernfragmentierung. Für HePC existieren bisher keine genaueren Daten diesbezüglich in Protozoa, jedoch ist es in höheren Eukaryonten als starker Apoptosestimulus bekannt, sodass anzunehmen ist, dass zumindest ein Teil des antiparasitären Effektes durch Induktion der Apoptose bzw. Nekrose erklärbar ist (Lee et al., 2002).

Die Parasitenelimination durch HePC *in vivo* ist unabhängig vom Immunstatus des Patienten, da z.B. Heilungserfolge auch bei AIDS-Patienten erzielt wurden (Thakur et al., 2000). Dies wurde auch an Mausmodellen mit unterschiedlichen humoralen oder zellulären

## 1. Einleitung

Immundefekten bestätigt (Escobar et al., 2001; Murray et al., 2000). Interessanterweise scheint bei der Abwehrreaktion des Wirtes *in vivo* dem natürlichen Etherlipid PAF eine bedeutende Rolle zuzukommen (Lonardoni et al., 2000).

### 1.3.4. Wirkmechanismen von HePC

Obwohl eine Fülle von Untersuchungen zum antineoplastischen Effekt auf ein breites Spektrum von Tumor-Zellen *in vitro* und *in vivo* in der Literatur zu finden sind, ist letztendlich nicht geklärt, wie synthetische Etherlipide diese Wirkung vermitteln. HePC interferiert mit mitogenen bzw. proliferationsfördernden Signalkaskaden und induziert Zellzyklus-Stop bzw. Zellreifung *in vitro*; die Auslösung der Apoptose ist eines der wichtigsten Merkmale.

Aufgrund der amphiphilen Struktur der Phospholipidanaloga fügen sie sich direkt in natürliche und synthetischen Phospholipiddoppelmembranen ein, sodass der primäre Angriffspunkt, im Gegensatz zu etablierten Chemotherapeutika, auf Membranebene zu vermuten ist.

Nach Insertion im äußeren Blatt der Plasmamembran akkumuliert Et-18-OCH<sub>3</sub> in *lipid rafts*. Innerhalb von 30 min wird der grösste Teil des ALPs internalisiert, da es sich durch Albumin-Rückextraktion nicht mehr extrahieren lässt. Über *raft*-abhängige Endozytose wird es intrazellulär verteilt und gelangt zum ER (Luit van der et al., 2002). *Raft*-abhängige Endozytose wird mit vesikulären Transportwegen in Verbindung gebracht, die direkt zwischen Membran und Golgi/ER und wieder zur Membran pendeln und einen schnellen Austausch und Ersatz von Membranlipiden und Proteine gewährleisten (Ikonen, 2001). Durch subzelluläre Fraktionierung konnte gezeigt werden, dass nach 4 h HePC in allen Membrankompartimenten, d.h. ER/Golgi, Mitochondrium und Kern, erscheint. Eine zytosolische Fraktion von HePC war trotz des amphiphilen Charakters nicht zu detektieren. Die Aufnahme von HePC war hierbei zeit-, dosis- und temperaturabhängig, was die Annahme einer *raft*-abhängigen Endozytose stützt.

Die Metabolisierung von HePC verläuft sehr langsam. So waren in MDCK-Zellen nach 6 h erst 5 % des radioaktiv markierten HePC abgebaut. Nach 24 h waren die Hauptmetabolite Phosphocholin und Phosphatidylcholin. Die durch die Einwirkung von Phospholipase C und D entstandenen Metabolite können also wieder in den CDP-Cholin-Weg eingeschleust werden (Geilen et al., 1994).

## 1. Einleitung

Neben den oben bereits beschriebenen apoptotischen SM-Zyklus existieren in der Zelle zwei weitere wichtige lipidabhängige Signaltransduktionswege: der Phosphatidylinositol-Zyklus (PI-Zyklus) und der Phosphatidylcholinzyklus (PC-Zyklus). Sie regulieren mitogene Signalwege in der Zelle und werden durch bekannte wachstumsfördernde Agonisten wie z.B. EGF im PI-Zyklus und PDGF im PC-Zyklus stimuliert. Mit beiden Zyklen interferieren ALPs.

Gesichert ist derzeit wohl die Inhibition der PI-spezifischen und PC-spezifischen PLC durch HePC (Berkovic et al., 1996). Die Erniedrigung der intrazellulären *second messenger*  $IP_3$  und DAG durch die Interferenz mit der PI-spezifischen PLC hemmt die Calcium-Freisetzung und die Calcium-abhängige PKC-Aktivierung. Die Calcium-unabhängige PKC-Aktivierung mit anhaltender DAG-Generierung über die PC-spezifische PLC oder sequentiell über die PLD wird ebenfalls gestört. Die Wirkung der ALPs auf die Phospholipase D wird hierbei aber in der Literatur sehr uneinheitlich beschrieben. *In-vitro*-Befunde an gereinigten Enzymen deuten auf eine kompetitive Hemmung des Enzyms, jedoch konnte *in vivo* keine Hemmung oder sogar eine Aktivierung des Enzyms gemessen werden (Berkovic et al., 2002; Wieder et al., 1996). Eine anhaltende Inhibition der mitogenen Signaltransduktion über die PKC könnte also einen Teil des antiproliferativen Effektes von HePC verursachen. Auch die Signalübertragung unterhalb der PKC wird durch HePC und Et-18-OCH<sub>3</sub> beeinflusst. In mehreren Studien hemmten diese Substanzen den MAPK/ERK-Weg (Zhou et al., 1996; Ruiter et al., 2001), dessen anhaltende Aktivierung über die PKC die mitogene Signaltransduktion gestattet (Exton, 1994).

Die nicht-kompetitive Hemmung der Wachstumsfaktor-aktivierten  $PI_3$ -Kinase, wie sie für HePC und andere Etherlipide mehrfach gezeigt wurde, beeinträchtigt die nachfolgende Proteinkinase B (PKB)-Signaltransduktion (Berggren et al., 1993; Ruiter et al., 2003). Dies kann den proapoptischen SAPK/JNK-Weg aktivieren und damit den Transkriptionsfaktor AP-1. Antisense Oligonukleotide gegen die c-jun-Untereinheit des AP-1-Transkriptionsfaktors blockierten die Apoptose durch ET-18-OCH<sub>3</sub> (Gajate et al., 1997).

Der Einfluß von HePC auf die  $PLA_2$ , einem weiteren Enzym des Phospholipid-Metabolismus, war zelltypspezifisch bzw. abhängig vom Reifungsgrad der Zelllinie (Berkovic, et al., 1997). Die SMase-Aktivität wird durch HePC nicht verändert (Berkovic et al., 2002).

Insgesamt ist also eine deutlich Alteration der intrazellulären Phospholipid-Signaltransduktion durch ALPs oder APCs zu verzeichnen. Die Frage der Signifikanz und der Selektivität der Effekte bleibt hierbei aber unbeantwortet. In einer Studie hemmte z.B. das antiproliferativ nicht wirksame Etherlipid Hexadecylphosphoserin die  $IP_3$ -Formation (Junghahn et al., 1995). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Signaltransduktion durch die PLC nicht unter allen

## 1. Einleitung

Umständen ein entscheidendes Kriterium der Mitogenese ist (Arthur und Bittmann, 1998). Bei Vergleichen von resistenten und sensiblen Lungenkarzinom-Zelllinien korrelierte die Aktivität von JNK-, ERK-, p38-MAP-Kinasen sowie von PARP nicht mit der Zytotoxizität von ET-18-OCH<sub>3</sub> (Shafer und Williams, 2003).

Ein weiterer Mechanismus, der z.T. die Tumorselektivität der ALPs und APCs erklären könnte, wird seit einiger Zeit von zwei Arbeitsgruppen vorgeschlagen. Et-18-OCH<sub>3</sub> und andere APCs induzierten eine Liganden-unabhängige Triggerung des CD95/Fas-Rezeptors. Die Daten wurden v.a. an humanen Leukämie-Zelllinien wie HL-60 und Jurkat erhoben. Nach 3 h Inkubation mit 5 µg/ml Et-18-OCH<sub>3</sub> beobachtete man fluoreszenzmikroskopisch erste Zeichen von *capping* des CD95/Fas-Rezeptors der Jurkat-Zellen. Die Autoren zeigten, dass der CD95/Fas-Rezeptor in die *raft*-Fraktion der Zellmembran transloziert und durch Methyl-β-Zyklodextrin und Filipin, welche die *raft*-Struktur der Zellmembran zerstören, das *capping* verhindert wird (Gajate und Mollinedo, 2001). Die Wirkung war abhängig von der Aufnahme von Et-18-OCH<sub>3</sub>. Die Fas-negative, murine Fibroblasten-Zelllinie L929 konnte wegen eines Aufnahmedefekts für ET-18-OCH<sub>3</sub> erst nach intrazellulärer Mikroinjektion von ET-18-OCH<sub>3</sub> und zusätzlicher CD95/Fas-Rezeptor-Transfektion sensibilisiert werden. Der blockierende Anti-Fas-Antikörper SM1/23 inhibierte jedoch nicht die Apoptose (Gajate et al., 2000). Die Unterbrechung des Fas-Signalweges durch dominant negative Expression von FADD in BJAB-Zellen, inhibierte hingegen die 2-N-Acetyl-Oktadecylphosphocholin-induzierte Apoptose, was die Bedeutung der intrazellulären Fas-Signaltransduktion unterstreicht (Matzke et al., 2001).

Im Gegensatz dazu schlossen zwei andere Autoren eine Beteiligung des Fas-Systems aus. Interessanterweise vermochte Erucylphosphocholin (ErPC) in der FADD-negativen BAJB-Zelllinie Apoptose zu induzieren. Die differierenden Ergebnisse zu Matzke (2001) reflektieren möglicherweise deutliche Unterschiede beider Substanzen hinsichtlich der Konformation. Ähnliche Ergebnisse beobachteten Jendrossek et al. auch in Jurkat-Zellen, die Caspase-8- bzw. FADD-negativ waren. ErPC löste in beiden Fällen Apoptose aus. Auch eine TRAIL- oder Fas-Resistenz der Jurkat-Zellen beeinflusste nicht die Auslösung des Zelltodes durch ErPC (Jendrossek et al., 2003). Eine weitere Studie untersuchte mit Hilfe des inhibierenden Fas-Antikörpers ZB4 die Rolle des Fas-Weges. Jurkat-Zellen wurden mit liposomalen ET-OCH<sub>3</sub> behandelt. Die Koinkubation mit ZB4 verhinderte hierbei nicht die Induktion des programmierten Zelltodes, die Caspase-8- und -3-Spaltung sowie Caspase-8-Aktivierung (Cuvillier et al., 1999). Beide Gruppen heben dagegen die Bedeutung des intrinsischen Apoptose-Weges hervor. Bcl-2- und Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression in Jurkat-Zellen verhinderte die

## 1. Einleitung

Cytochrom C-Freisetzung und Caspase-9, -3, -8-Spaltung. Jurkat-Zellen mit dominant negativer Expression der Caspase-9 waren ebenfalls ErPC-resistent.

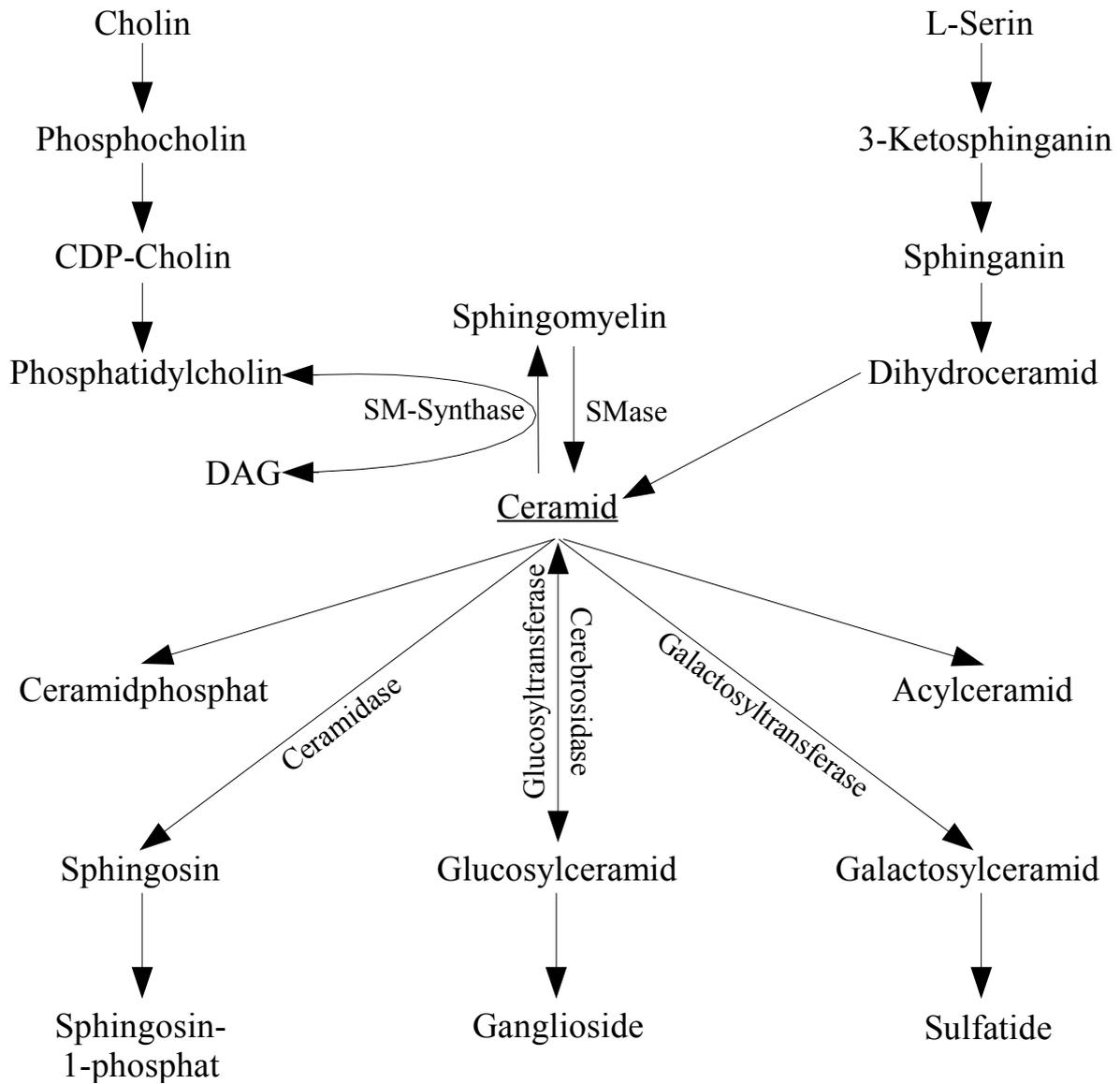
Wohl einer der wichtigsten Effekte von HePC ist die Hemmung der Cytidylyltransferase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der *De-novo*-PC-Synthese, was in verschiedenen Zelllinien konsistent reproduziert werden konnte. Geilen et al. zeigte in MDCK-Zellen, dass 50  $\mu$ M HePC die Aktivierung der CT hemmt, indem es die membrangebundene Fraktion der CT, d.h. die aktive Form, um 50 % verminderte. Dabei war der Einbau von radiaktiven Cholin in PC um 50 % erniedrigt. Die Radioaktivität erhöhte sich dagegen im Phosphocholin-Pool, was auf die Hemmung der CT schließen lässt (Geilen et al., 1992a). Der antiproliferative Effekt verschiedener neu synthetisierter Alkylphosphocholine korrelierte sehr gut ( $R = 0,95$ ) mit der Hemmung der Phosphatidylcholin-Biosynthese in MDCK-Zellen. Hexadecylserin und Hexadecylethanolamin, die keine cholinhaltige Kopfgruppe tragen, blieben hinsichtlich Proliferation und PC-Synthese wirkungslos (Geilen et al., 1994). Untersuchungen an HaCaT- (Wieder et al., 1998), HL60- (Boggs et al., 1998) und HepG2-Zellen (Jimenez-Lopez et al., 2002) bestätigten die Hemmung der CT und die Auslösung der Apoptose durch HePC.

Versuchsansätze, die die Bedeutung der Phosphatidylcholin-Synthese in der Apoptose-Regulation beleuchten, unterstützen obige Annahmen. Die Zelllinie MT58 exprimiert eine temperatursensitive CT, die bei 33°C stabil ist und die PC-Synthese und das Überleben der Zellen gewährleistet. Bei nonpermissiver Temperatur von 40°C sinkt der PC-Gehalt der Zellen um 50 % und Apoptose wird induziert. Die Zugabe von PC oder Lyso-PC bei 40 °C verhinderte die Auslösung der Apoptose (Esko et al., 1982; Cui et al., 1996). Auch die Kultivierung von PC12-Zellen in Cholin-defizienten Medium erniedrigte den PC-Gehalt der Zellen um 50 % und induzierte Apoptose (Holmes-McNary et al., 1997). Die Wirkung von HePC und ET-18-OCH<sub>3</sub> war ebenfalls aufhebbar durch Zugabe von Lyso-PC oder Überexpression der CT (Boggs et al., 1998; Barburina und Jackowski, 1998).

Eine Verbindung zwischen der PC-Synthese und der Induktion der Apoptose könnte Ceramid darstellen. Ca. 95 % der SM-Produktion entstehen durch Transfer der Phosphocholin-Kopfgruppe von PC auf Ceramid unter Freisetzung von DAG. Das bidirektionale Enzym SM-Synthase katalysiert diesen Schritt, der den CDP-Cholin-Weg und den SM-Zyklus verbindet. Wieder et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass HePC in HaCaT-Zellen den SM-Pool um 40 % reduziert und den Ceramid-Pool gleichzeitig um 50 % ansteigt. Die Messungen beruhen auf den Einbau von Methyl-H<sup>3</sup>-Cholin in SM bzw. den Einbau von L-H<sup>3</sup>-Serin in Ceramid. Fumonisin-B1, das die *De-novo*-Ceramid-Synthese hemmt, reduzierte den Ceramid-Gehalt in HaCaT-Zellen um 70 % und antagonisierte den apoptotischen Effekt von HePC (Wieder et al., 1998). In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse an PC12-Zellen, die unter

## 1. Einleitung

Cholin-Mangel kultiviert wurden, was Apoptose induzierte. Der SM- und PC-Pool war erniedrigt, dagegen der Ceramid- und der DAG-Pool erhöht (Yen et al., 1999).



**Abbildung 1.8.:** Sphingolipidstoffwechsel und PC-Biosynthese. DAG: Diacylglycerin, SMase: Sphingomyelinase, SM: Sphingomyelin, CDP: Cytidindiphosphat.

## 1. Einleitung

### 1.4. Synthetische Sphingolipidanaloga

Wie weiter oben dargestellt, regulieren Ceramide das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von Zellen. Alternativ zur indirekten Beeinflussung des zellulären Ceramidgehaltes über die Hemmung der CT, kann den Zellen entweder exogenes Ceramid zugeführt werden, um Apoptose auszulösen, oder der Sphingolipidstoffwechsel kann mittels Enzyminhibitoren beeinflusst werden. Das zellpermeable und wasserlösliche C<sub>2</sub>-Ceramid löst beispielsweise in HaCaT-Keratinocyten Differenzierung, Zellzyklusstop, Apoptose, TNF- $\alpha$ -, MAP-Kinasen- und AP-1-Aktivierung aus (Müller et al., 2003).

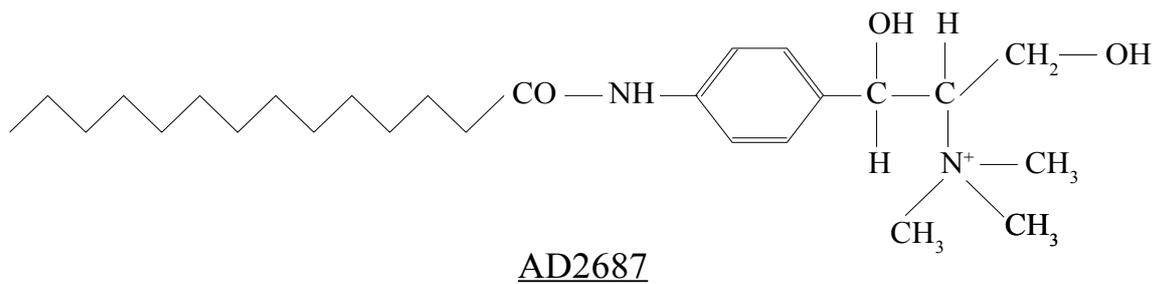
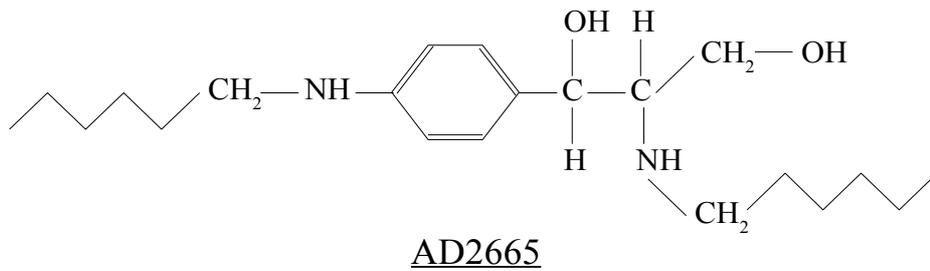
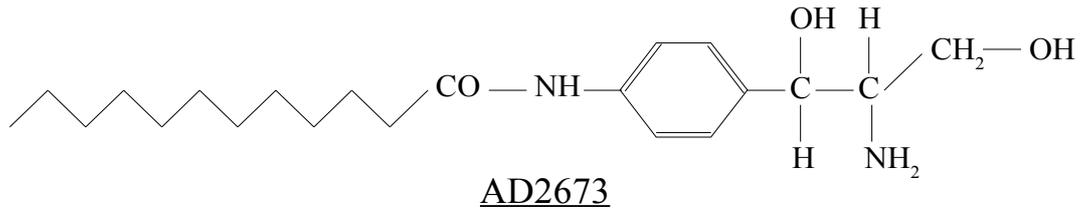
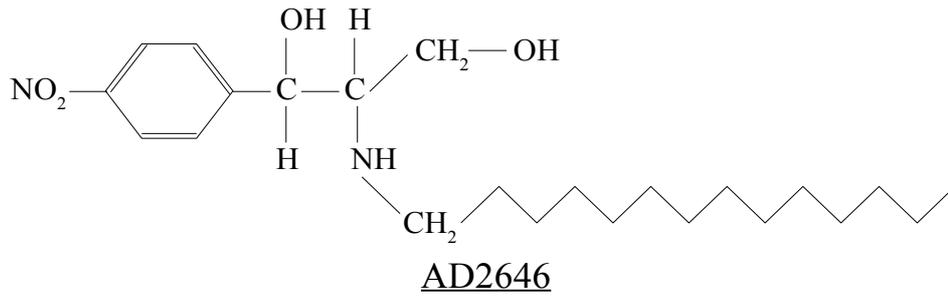
Das Vitamin D<sub>3</sub>-Analogon Calcipotriol, das in den vergangenen Jahren als gut verträgliches Antipsoriatikum weitere Verbreitung fand, induziert in HaCaT-Keratinocyten die SM-Hydrolyse über die Induktion von TNF- $\alpha$  (Geilen et al., 1997). Daher könnte die Entwicklung verträglicher und wirksamer Ceramid-Analoga zur Behandlung der Psoriasis und anderer hyperproliferativer Hautkrankheiten von klinischem Interesse sein.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ceramidanaloga weichen in ihrer chemischen Struktur stark von natürlichen Ceramiden ab. Ihnen gemeinsam ist die Bindung eines Ringsubstituenten und das Fehlen des langkettigen Sphingosins, anstelle dessen nur ein Aminoalkoholrest vorliegt. AD2646 besitzt einen Nitrophenyl/Aminopropandiol-Rest und ist ein Ceramin-Analogon. AD2673 ist ein Sphingosin-Analogon, das eine Dodecanoylamin/2-Amino-4-Aminophenyl-1,3-propandiol-Gruppe trägt. Bei AD2665 sind zwei Hexylgruppen an Aminophenyl/Aminopropandiol gebunden. Es ist ein Ceramin-Analogon. AD2687 ist ein Analogon zu Trimethylsphingosin.

Bereits in unserer Arbeitsgruppe getestete SM- bzw. Ceramidanaloga induzierten Proliferationshemmung und Apoptose. Das cholinhaltige Acetyl-SM hemmte hierbei die CT, das zellpermeable Ceramidanalogen *N*-Thioacetylsphingosin weist wegen des Schwefelatoms in Amidbindung eine erhöhte Stabilität gegenüber *N*-Deacylasen auf. B13 inhibiert Ceramidasen und erhöht so den intrazellulären Ceramidpool (Raisova et al., 2003; Wieder et al., 1997).

Ergebnisse zu den vier neuen Komponenten liegen ebenfalls vor. Alle vier lösten Proliferationshemmung und Apoptose aus. Sie inhibierten die SM- und-Glykosphingolipid-Synthese sowie die saure Ceramidase. Die Alterationen im Sphingolipidstoffwechsel deuten an, dass sie möglicherweise verschiedene Enzyme kompetitiv hemmen könnten, was den Ceramidgehalt der Zelle erhöht. Dies konnte in zwei verschiedenen Versuchsansätzen gezeigt werden (Dagan et al., 2003).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.9.:** Struktur der zu untersuchenden Ceramidanaloga

### 1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll der intrazelluläre Wirkmechanismus von HePC an Hand eines Bcl-2-überexprimierenden *In-vitro*-Zellsystemes überprüft werden. HaCaT-Zellen exprimieren wegen der Mutation des Transkriptionsfaktors p53 kein endogenes, humanes Bcl-2-Protein, daher eignen sie sich besonders zur Untersuchung Bcl-2-abhängiger Prozesse. Ergebnisse liegen diesbezüglich in der Arbeitsgruppe bereits vor (Wieder et al., 1997).

Es soll die Hypothese geprüft werden, dass, falls Ceramid der Hauptmediator der HePC-induzierten Apoptose ist, eine Bcl-2-Überexpression die Wirkung von HePC antagonisieren müßte. Dazu liegen in der Literatur divergierende Berichte vor. Es wird die proliferationshemmende Wirkung untersucht, die DNA-Fragmentierung mittels ELISA-Technik gemessen, die Apoptose auf Einzelzelleben mittels Bisbenzimid-Färbung dargestellt und es werden FACS-Analysen angefertigt.

Mit Hilfe des Inhibitors Fumonisin B1, der die *De-novo*-Biosynthese von Ceramid hemmt, wird die Ceramid-Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung in diesem Zellsystem untersucht.

Zum Vergleich werden erstmals zwei Bcl-2-transfizierte Melanomzelllinien mit HePC behandelt und die DNA-Fragmentierung bestimmt.

Weiterhin soll die Untersuchung typischer Apoptosekomponenten Aufschluß darüber geben, welche weiteren Signalkaskaden aktiviert werden. Insbesondere soll herausgearbeitet werden, ob der extrinsische oder intrinsische Apoptose-Weg im Mittelpunkt der Signaltransduktion steht, da hierzu gegensätzliche Ergebnisse diskutiert werden. Mittels Zellfraktionierung soll die Cytochrom C-Freisetzung bestimmt werden. Durch den Einsatz von spezifischen Caspasen-Inhibitoren wird die Bedeutung der extrinsischen und intrinsischen Apoptosekaskade untersucht.

Darüberhinaus soll die Form des Zelltodes genauer untersucht werden, der durch HePC ausgelöst wird. Hierzu werden Experimente mittels Bisbenzimid-Färbung, Lichtmikroskopie und FACS-Analyse durchgeführt.

Desweiteren werden vier neue Etherlipid-Analoga vorgestellt und untersucht, die uns von Dr. Shimon Gatt, Hebrew University - Hadassah School of Medicine, Israel, zur Verfügung gestellt wurden. Ihre biologische Wirksamkeit soll ebenfalls in Abhängigkeit der Bcl-2-Expression untersucht werden.