

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

Abteilung Radioonkologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg

**Bedeutung der Tyrosinkinase p56/Lck  
für die Apoptose-Signaltransduktion**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

**Charlotte Luise Wilhelmine Gruber**

aus

Tübingen

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Belka

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

***Meiner Familie gewidmet***

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1 Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Abkürzungen</b> .....	<b>8</b>
2.1 Einheiten.....	8
2.2 Aminosäuren.....	8
2.3 Weitere Abkürzungen.....	8
<b>3 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
3.1 Historisches.....	13
3.2 Physiologische Bedeutung von Apoptose.....	14
3.3 Formen von Zelltod.....	15
3.4 Schematischer Ablauf der Apoptose.....	18
3.5 Zentrale Komponenten des apoptotischen Programms.....	19
3.5.1 Erkenntnisse aus der Evolutionsbiologie.....	19
3.5.2 Caspasen.....	21
3.5.3 Caspasensubstrate.....	24
3.5.4 Die Bcl-2-Familie.....	25
3.6 Apoptotische Signalwege.....	28
3.6.1 Der mitochondriale Weg.....	30
3.6.2 Todesrezeptoren.....	31
3.7 Tyrosinkinasen der Src-Familie.....	36
3.7.1 Struktur der Tyrosinkinasen der Src-Familie.....	36
3.7.2 Funktion von Lck in T-Lymphozyten.....	38
3.7.3 Regulation der Lck Aktivität.....	40
3.8 Fragestellung.....	42

<b>4 Material</b>	<b>43</b>
4.1 Chemikalien und Chemotherapeutika	43
4.2 Puffer und Lösungen	44
4.3 Antikörper und Liganden	46
4.3.1 Antikörper zur Western-Blot-Analyse	46
4.3.2 Antikörper zur Immunfluoreszenzanalyse	47
4.3.3 Antikörper und Liganden zur Stimulierung der Zellen	47
4.4 Zelllinien	47
4.5 Bakterien	48
4.6 Kits	48
4.7 Verbrauchsmaterial	48
4.8 Geräte	49
<b>5 Methoden</b>	<b>50</b>
5.1 Zellkultur	50
5.1.1 Kultivierung der Zellen	50
5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
5.2 Transfektion von Zellen	51
5.3 DNA-Vermehrung und -Aufreinigung	51
5.3.1 Transformation von Bakterien	51
5.3.2 Aufreinigung der DNA	52
5.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und Überprüfung der DNA-Reinheit	53
5.4 Bestimmung der CD95- und TRAIL-R-Oberflächenexpression	53
5.5 Proliferationsassay	53
5.6 Stimulierung der Zellen	54
5.6.1 Bestrahlung	54
5.6.2 CD95-Stimulation	54
5.6.3 TRAIL-R-Stimulation	54
5.6.4 Behandlung mit Chemotherapeutika	54

5.7	Bestimmung der Apoptose, Viabilität und $\Delta\Psi_m$	55
5.7.1	Durchflusszytometrie	55
5.7.2	Hoechst-Färbung	56
5.8	Western-Blot	56
5.8.1	Herstellung der Lysate	57
5.8.2	Proteinbestimmung	57
5.8.3	Vorbereitung der Proben	57
5.8.4	SDS-PAGE	57
5.8.5	Detektion der Proteine	58
5.9	Cytochrom-c-Färbung	59
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
6.1	Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen	61
6.2	Lck-Expression und -Funktion	64
6.3	Caspasenaktivierung durch ionisierende Strahlung	65
6.4	Mitochondriale Apoptoseschritte nach Bestrahlung	67
6.5	Vergleich mit Bcl-2 überexprimierenden Zellen	69
6.6	Untersuchung der basalen Expression von Proteinen der Bcl-2 Familie	73
6.7	Einfluss von Lck auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose	73
6.8	Untersuchung der basalen Expression von Proteinen, die an der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose beteiligt sind	81
6.9	Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika	82
6.10	Caspasenaktivierung durch Chemotherapeutika	86
6.11	Veränderungen am Mitochondrium durch Chemotherapeutika	88
6.12	Untersuchungen zum Funktionsmechanismus von Lck bei der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika	92
6.13	Kann die Lck Defizienz durch andere Tyrosinkinasen der Src-Familie kompensiert werden?	94

<b>7 Diskussion</b> .....	<b>99</b>
7.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	99
7.2 Bedeutung von Lck für die strahleninduzierte Apoptose.....	100
7.3 Bedeutung von Lck für die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika.....	101
7.4 Bedeutung von Lck für die rezeptorvermittelte Apoptose.....	102
7.5 Vergleich der Lck-Defizienz mit einer Bcl-2-Überexpression.....	105
7.6 Ersetzbarkeit von Lck bei der Apoptoseinduktion.....	106
7.7 Mögliche Mechanismen der proapoptotischen Wirkung von Lck.....	107
7.8 Eigenschaften der verwendeten Zelllinien als mögliche Ursachen für die Unterschiede bei der Apoptoseinduktion.....	112
7.9 Schlussfolgerung.....	115
<b>8 Zusammenfassung</b> .....	<b>116</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>119</b>
<b>10. Danksagung</b> .....	<b>146</b>
<b>11. Publikationen</b> .....	<b>147</b>
<b>12. Lebenslauf</b> .....	<b>149</b>

## 2 Abkürzungen

### 2.1 Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung
Gy	Gray
h	Stunden
min	Minuten
MV	Megavolt
µF	Mikrofarad
V	Volt

### 2.2 Aminosäuren

D	Aspartat
E	Glutamat
H	Histidin
L	Leucin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan

### 2.3 Weitere Abkürzungen

A1/Bfl-1	Bcl-2-related protein A1
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Transkriptionsfaktor Aktivatorprotein-1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1



APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest./bideest.	Aqua destillata/bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-x <sub>L</sub> /Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
Bcl-x <sub>L</sub>	Lange Splicevariante des Bcl-x-Gens
Bcl-x <sub>S</sub>	Kurze Splicevariante des Bcl-x-Gens
BH1-4	Bcl-2-Homologie-Domäne 1-4
Bid	Bcl-2 like inducer of death
Bik/Nbk	Bcl-2 interacting killer bzw. Natural born killer
Bim/Bod	Bcl-2 interacting mediator of cell death bzw. Bcl-2-related ovarian death gene
Blk	Bik-like killer protein
Bmf	Bcl-2-modifying factor
Bok/Mtd	Bcl-2 related ovarian killer bzw. Matador (spanisch: Mörder)
Boo/Diva	Bcl-2 homologue of ovary bzw. Death inducer binding to vBcl-2 and Apaf-1
CAD	Caspasen-aktivierte DNase
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CD	Cluster of Differentiation
CD95/Fas/Apo-1	CD95-Rezeptor bzw. Fibroblasten assoziierter Rezeptor bzw. Apoptoserezeptor-1
CD95L	CD95-Ligand
CED	C. elegans death gene
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CSK	Carboxyterminale Src-Kinase
Ctk	Csk-Typ-Proteinkinase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

DcR1 bzw. DcR2	Decoy Rezeptor 1 bzw. 2 (TRAIL)
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death Receptor
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL-1	Egg-laying Defective Gene 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal Related Kinase
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	Fas-associated Protein with Death Domain
FAP	Fas-associated Phosphatase
FCS	Fetales Kälberserum
FLICE	FADD like ICE
FLIP	FLICE-inhibitory Protein
FSC	Forward Scatter
5-FU	5-Fluorouracil
G1/S-Übergang	Übergang von der ersten Zwischen- zur Synthese-Phase
G2/M-Übergang	Übergang von der zweiten Zwischenphase zur Mitose
GPI	Glykosyliertes Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Hrk/DP5	A Product of Harakiri/Neuronal Death Protein 5
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of CAD

ICE	Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
ITAMs	Immunorezeptor-Tyrosin-beinhaltende-Aktivierungsmotive
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Jun	Ju-nana (japan. 17; von ASV 17: avian sarcoma virus 17)
kD	Kilodalton
Lck	Lymphocyte protein tyrosine kinase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Gene 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
myc	Avian myelocytomatosis viral oncogene
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor of immunoglobulin $\kappa$ locus in B cells,
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
p21/cip-1/waf	Cdk-interacting protein bzw. wild-type p53-activated fragment
p75 <sup>NTRF</sup>	Neurotrophinrezeptor
PI	Propidiumiodid
pI	Isoelektrischer Punkt
PLC $\gamma$	$\gamma$ -Domäne der Phospholipase C
PP2	Pyrazolopyrimidin 2
PT-Pore	Permeability Transition Pore
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PZT	Programmierter Zelltod
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat
SH-Domäne	Src-Homologie-Domäne
SMAC/DIABLO	Second Mitochondrial Activator of Caspase bzw. Direct IAP Binding Protein with Low PI
SSC	Sideward Scatter
Syk	Spleen tyrosine kinase
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran-Region
TMRE	Tetramethylrhodamin-ethylester-perchlorat
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL/Apo-2L	TNF-related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
TZR	T-Zellrezeptor
XIAP	X- linked Inhibitor of Apoptosis Protein
wt	Wildtyp
ZAP-70	Zeta-assoziiertes Protein von 70 kD Molekulargewicht

### **3 Einleitung**

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 350.000 Menschen neu an bösartigen Tumoren. Tumorerkrankungen sind derzeit nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache und werden, nach Einschätzung von Experten, in zehn Jahren an der Spitze der Todesursachenstatistik stehen.

Strahlentherapie, Chirurgie und zytostatische Therapie sind die drei wichtigsten Säulen der onkologischen Therapie. Ungefähr 60 bis 70 % aller Tumorpatienten werden im Verlauf ihrer Erkrankung strahlentherapeutisch behandelt, davon ca. 40-50 % im Rahmen der Primärtherapie. Die Bestrahlung kann dabei als alleinige Therapieform oder adjuvant in Kombination mit chirurgischen oder medikamentösen Maßnahmen eingesetzt werden. Ein Beispiel für eine kurative Therapie durch alleinige Bestrahlung stellt die Behandlung des Prostatakarzinoms dar. Bei anderen Erkrankungen hingegen wird eine Bestrahlung mit anderen Therapieformen kombiniert. Dies spielt eine besondere Rolle für den Erhalt von Organen, z.B. bei der brusterhaltenden Therapie des Mammakarzinoms.

Wesentliches Ziel jeder Strahlenbehandlung ist die Abtötung von Tumorzellen unter größtmöglicher Schonung des Normalgewebes. Für die weitere Optimierung der onkologischen Therapie sind daher die Erforschung der molekularen Grundlagen des Zelltodes und die Untersuchung dessen Regulation von wesentlicher Bedeutung.

#### **3.1 Historisches**

Einen ersten Hinweis auf apoptoseregulierte Prozesse lieferte bereits Galenus Galen im zweiten nachchristlichen Jahrhundert durch die Beschreibung der Regression von larvalen und fetalen Strukturen im Laufe der Ontogenese (Krammer, 2000). 1842 berichtete Carl Vogt, dass Zellen während der normalen Entwicklung sterben (Vogt, 1842). Die apoptotische Morphologie wurde schließlich 1885 erstmals beschrieben (Majno und Joris, 1995). Dennoch fanden zunächst

sehr wenige Forscher Interesse an der Untersuchung des physiologischen Zelltodes. Erst 1972 wurde der Begriff Apoptose für Zellen ähnlicher Morphologie geprägt (Kerr et al., 1972). Die aus dem Griechischen stammende Bezeichnung Apoptose (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung) beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das altruistische Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus. Seit 1988 Bcl-2 als erste Komponente des Zelltodsystems entdeckt wurde (Vaux et al., 1988), stieg das Interesse an der Zelltodforschung explosionsartig an und führte 2002 zur Verleihung des Nobelpreises für Medizin/Physiologie an die Wissenschaftler R. Horwitz, S. Brenner und B. Sulston, die durch ihre Untersuchungen an *C. elegans* einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung programmierter Zelltodvorgänge geleistet haben.

### ***3.2 Physiologische Bedeutung von Apoptose***

Apoptosevorgänge spielen sich bereits während der Embryonalentwicklung in praktisch allen Organen ab, so z.B. bei der Involution des Müller-Ganges beim männlich determinierten und des Wolff-Ganges beim weiblich determinierten Keim (Jacobson et al., 1997), bei der Bildung des Immunsystems, wo Leukozyten mit nicht funktionsfähigen oder autoreaktiven Rezeptoren eliminiert werden (Jacobson et al., 1997), bei der Entwicklung von Hand- und Fuß (Milligan et al., 1995) sowie bei der Entstehung des Nervensystem (Oppenheim, 1991; Raff et al., 1993; Vaux und Korsmeyer, 1999). Die Hauptfunktionen apoptotischer Zelltodvorgänge während der Entwicklung sind die Strukturbildung, die Entfernung nicht benötigter Strukturen, die Kontrolle der Zellzahl, die Elimination abnormer, fehlplazierter, nicht-funktioneller, oder schädlicher Zellen und die Produktion differenzierter Zellen ohne Organellen, was eine modifizierte Form des programmierten Zelltodes zu sein scheint (Jacobson et al., 1997).

Im Erwachsenenalter treten Apoptosevorgänge vor allem in Geweben mit hohem Zellumsatz auf, z. B. Haut, Magen-Darm-Trakt, kernhaltige Zellen des Blutes.

Außerdem werden nur temporär benötigte Zellen durch Apoptose entfernt, z.B. in der weiblichen Brust nach der Laktation (Kiess und Gallaher, 1998) und im Uterus während der Menstruation (Otsuki et al., 1994). Ebenso werden nach erfolgter Immunantwort nicht mehr benötigte T-Zellen durch Apoptose eliminiert, was als aktivierungsinduzierter Zelltod bezeichnet wird (Combadiere et al., 1998; Dhein et al., 1995). Darüber hinaus werden Zellen, die durch mutagene Agenzien beschädigt oder mit Viren infiziert sind, wegen der Gefahr der Entartung bzw. der Infektion anderer Zellen durch Apoptose eliminiert (Thompson, 1995).

Störungen des Gleichgewichts von Zellproliferation und Apoptose führen zu pathologischen Zuständen. Die Apoptoserate ist beispielsweise bei Tumoren (Igney und Krammer, 2002), Autoimmunerkrankungen (Fischer und Schulze-Osthoff, 2005) und Diabetes mellitus (Hui et al., 2004) zu niedrig. Eine erhöhte Apoptoserate findet man unter anderem bei AIDS, neurodegenerativen Erkrankungen, Herzversagen, Schlaganfall und Leberschäden (Fischer und Schulze-Osthoff, 2005).

### **3.3 Formen von Zelltod**

Die Strahlentherapie wird aufgrund ihrer Fähigkeit zur Auslösung von Zelltodvorgängen für die Behandlung von Neoplasien eingesetzt. Das Absterben der Tumorzellen erfolgt dabei über ganz unterschiedliche Formen des Zelltodes.

In der Vergangenheit wurden strahleninduzierte Zelltodvorgänge im Wesentlichen nach dem Zeitpunkt des Zelltodes in Interphasetod und reproduktiven Zelltod eingeteilt. Beim Interphasetod stirbt die Zelle bereits vor Erreichen der nächsten Mitose. Dagegen durchläuft die Zelle im Falle des reproduktiven Zelltodes eine oder mehrere Mitosen vor ihrem Absterben, wobei die Mehrzahl der Zellen nach der ersten oder zweiten Mitose stirbt (Forrester et al., 1999).

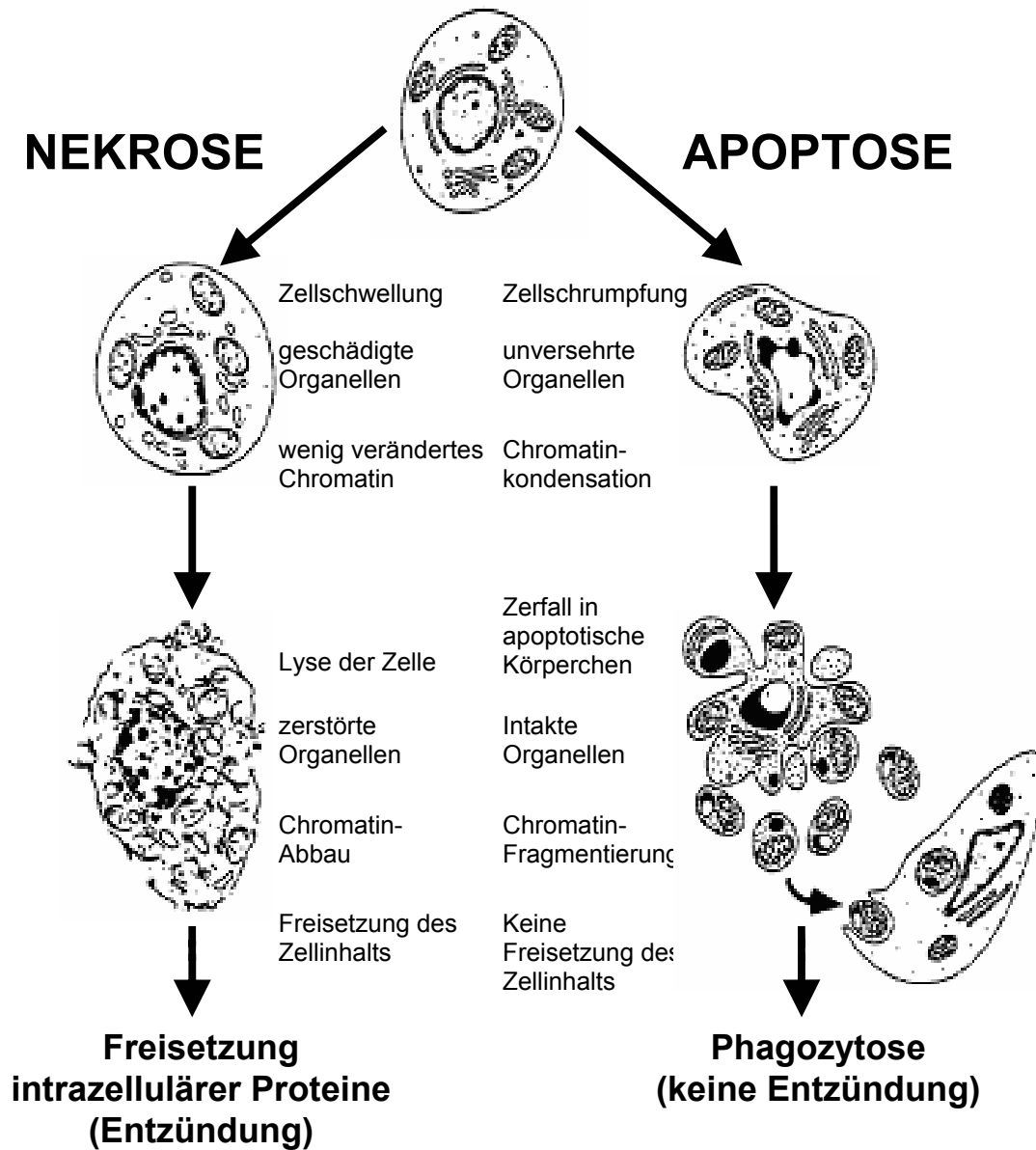
In der modernen Zelltodforschung stehen dagegen funktionelle und mechanistische Aspekte der Zelltodinduktion im Vordergrund.

Alle aktiv von der Zelle regulierten Zelltodvorgänge werden mit der Bezeichnung programmierter Zelltod (PZT) zusammengefasst, d.h. der Zelltod hat eine genetische Grundlage. Apoptose ist nicht synonym mit programmiertem Zelltod, sondern eine spezifische, morphologisch und biochemisch definierte Form des programmierten Zelltodes. Dabei ist ein wesentliches Merkmal der Apoptose u. a. die Aktivierung von so genannten Caspasen. Mit dem Begriff Apoptose werden die morphologischen Veränderungen bezeichnet, die als Folge der intrazellulären Caspasenaktivierung auftreten.

Die morphologischen Charakteristika der Apoptose umfassen die Margination von Chromatin, die Kernkondensation und -fragmentierung, das Anschwellen der äußeren Mitochondrienmembran und die Zellschrumpfung unter Erhalt der Organellen (Kerr et al., 1972; Vander Heiden et al., 1997). Diesem Vorgang folgt die Fragmentierung der Zellen in so genannte apoptotische Körperchen, die später von benachbarten Zellen, meist von Makrophagen, phagozytiert werden, ohne dass eine Entzündungsreaktion abläuft (Fadok und Henson, 1998) (Abb.1). Molekulare Veränderungen während der Apoptose sind u. a. die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997), die bereits erwähnte Caspasenaktivierung, die Verlagerung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Plasmamembran (Fadok und Henson, 2003) und die internukleosomale DNA-Spaltung, deren Nachweis durch die Darstellung der charakteristischen DNA-Leiter erfolgt (Wyllie, 1980).

Neben der Apoptose existieren Formen des programmierten Zelltodes, die unabhängig von Caspasen ablaufen. Dabei unterscheidet man Apoptose ähnlichen PZT, der mit Chromatinkondensation aber ohne Caspasenaktivierung abläuft, und Nekrose ähnlichen PZT, der ohne Chromatinkondensation und ohne Caspasenaktivierung erfolgt (Leist und Jaattela, 2001).





**Abbildung 1: Schematische Gegenüberstellung der morphologischen Veränderungen der Zelle bei nekrotischen und apoptotischen Prozessen** (nach Kerr et al., 1972).

Oben ist eine gesunde Zelle abgebildet. Auf der rechten Seite ist die Apoptose mit Kondensation von Zytoplasma und Zellkern und anschließender Fragmentation in apoptotische Körper dargestellt. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Nekrose mit Zellschwellung, Zerstörung der Organellen und Zerfall der Zellmembran mit Freisetzung des Zellinhalts.

Von programmierten Zelltodvorgängen lässt sich die reine Nekrose abgrenzen. Diese ist Folge einer irreversiblen Schädigung der Zelle durch starke äußere

Reize, die unmittelbar zur Aufgabe der Zellintegrität führen und ist mit Entzündungserscheinungen verbunden. Der Nekrose liegt im Gegensatz zur Apoptose kein genetisches Programm zugrunde und damit keine festgelegten Mechanismen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren. Durch Verlust der Membranintegrität kommt es zum Anschwellen der Zelle und der Organellen, sowie zur Freisetzung lysosomaler Enzyme (Schulze-Osthoff et al., 1998) (Abb.1). Obwohl reine Apoptose und reine Nekrose als Extreme grundsätzlich unterschiedliche Vorgänge sind, existieren auch Übergangsformen. Viele Toxine können sowohl Apoptose, als auch Nekrose auslösen. Die Entscheidung für eine der beiden Zelltodformen ist abhängig von der Konzentration, bei geringer Konzentration des Toxins wird Apoptose ausgelöst, bei höherer Nekrose (Kroemer, 1995). Der zelluläre ATP-Status scheint ebenfalls einen Einfluss darauf zu haben, ob eine Zelle einen nekrotischen oder einen apoptotischen Zelltod stirbt: Höhere ATP-Konzentrationen begünstigen Apoptose, niedrige ATP-Konzentrationen führen zu Nekrose oder nekrosähnlichem PZT (Eguchi et al., 1997; Ferrari et al., 1998; Leist et al., 1997). Außerdem kann selbst durch typische Apoptosestimuli wie Hypoxie, ionisierende Strahlen, TNF oder Zytostatika, Nekrose ausgelöst werden, wenn apoptotische Signalwege blockiert sind (Vercammen et al., 1998a).

### **3.4 Schematischer Ablauf der Apoptose**

Formal lässt sich die Apoptose in drei Stadien einteilen (Rudner et al., 2001; Salvesen und Dixit, 1997). In der Initiierungs- oder Effektorphase führt ein von außen stammender Befehl oder ein intrazellulärer Entscheidungsprozeß zur Aktivierung des apoptotischen Programms. Todessignale sind z. B. der Entzug von Wachstumsfaktoren oder Hormonen, der Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Aktivierung von Todesrezeptoren, DNA-Schädigung, Stoffwechsel- oder Zellzyklusstörungen und Signale von zytotoxischen T-Zellen. Die anschließende Integrationsphase dient der Zusammenfassung der pro- und antiapoptotischen Signale und der Entscheidung des Schicksals der Zelle. Während der

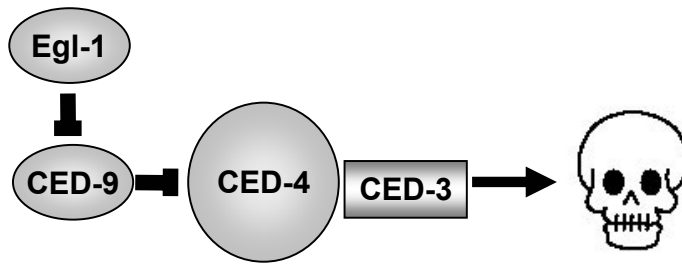
Exekutionsphase wird schließlich das Todessignal ausgeführt, wobei es zu spezifischen biochemischen und morphologischen Veränderungen der Zelle kommt. Die Initiierungsphase und die Integrationsphase sind in den verschiedenen Zelltypen und Geweben sehr unterschiedlich und abhängig vom Apoptosestimulus. Die Exekutionsphase läuft jedoch weitestgehend stereotyp ab.

### **3.5 Zentrale Komponenten des apoptotischen Programms**

#### **3.5.1 Erkenntnisse aus der Evolutionsbiologie**

Apoptose ist ein evolutionär hoch konservierter Prozess. Die Nematode *C. elegans* lieferte erste Erkenntnisse über eine genetische Grundlage der Apoptose (Ellis und Horvitz, 1986; Sulston, 1976). *C. elegans* eignet sich hervorragend für die Zelltodanalyse, da das Gesamtgenom kloniert ist und schnelle Phänotyp/Genotyp-Korrelationen erfolgen können. Während der Ontogenese des adulten Fadenwurms sterben genau 131 der 1090 somatischen Zellen durch programmierten Zelltod (Sulston et al., 1992). Genetische Studien in *C. elegans* führten schon früh zur Identifizierung von Genen, die für die Regulation der Elimination dieser 131 Zellen benötigt werden. CED-3 (**C. Elegans Death gene 3**) und CED-4 vermitteln das Absterben der Zellen, wohingegen CED-9 Zelltod inhibiert (Chinnaiyan et al., 1997; Conradt und Horvitz, 1998; Gartner et al., 2000). In vitalen Zellen liegen CED-3, CED-4 und CED-9 als ternärer Komplex vor. Apoptoseinduktion führt zur Dissoziation von CED-9 und ermöglicht dadurch die Aktivierung von CED-3 durch CED-4. (Cryns und Yuan, 1998).

Ein weiteres proapoptotisches Genprodukt, EGL-1 interagiert mit CED-9 und inhibiert dessen antiapoptotische Aktivität, was zur Aktivierung des CED-4/CED-3-Komplexes führt (Conradt und Horvitz, 1998) (Abb. 2).



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Apoptosesignalweges in *C. elegans*** (nach Meier et al., 2000).

CED-4 aktiviert CED-3 und bewirkt somit Zelltod. CED-9 verhindert durch Assoziation mit CED-4 die Aktivierung von CED-3 und wird durch EGL-1 antagonisiert.

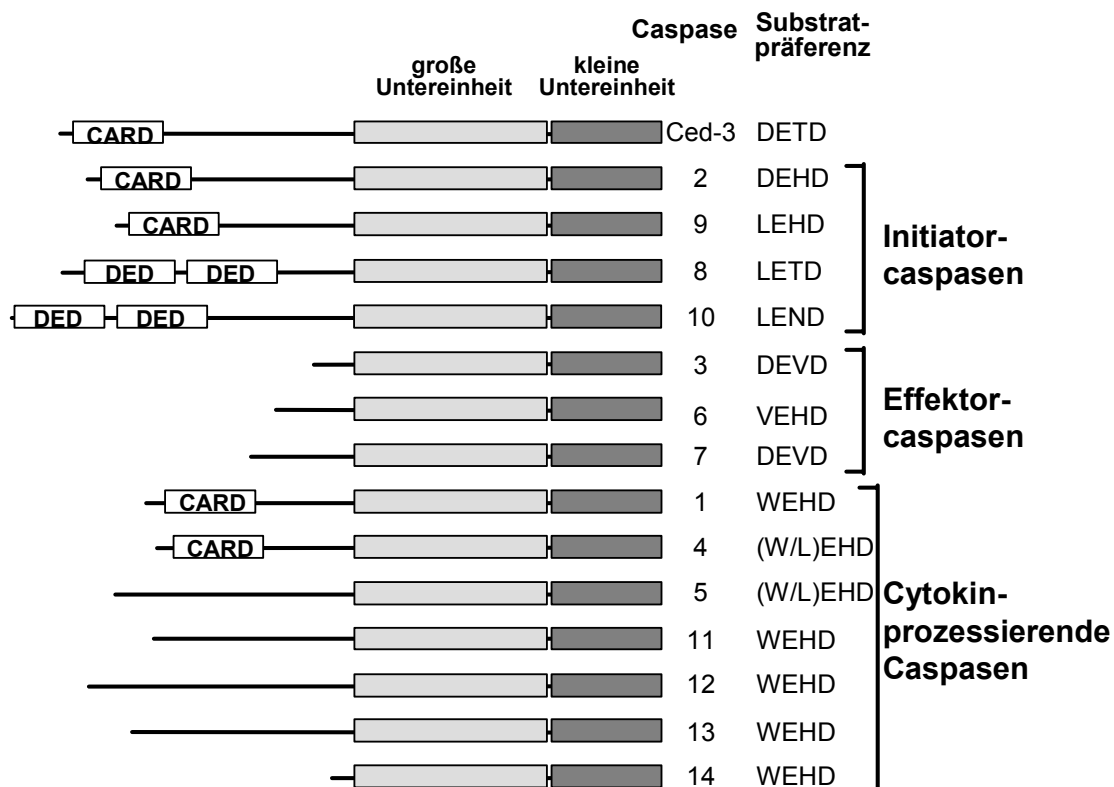
*C. elegans* entwickelte sich zum genetischen Modellorganismus für die Analyse von Apoptoseregulationsmechanismen, da es sich zeigte, dass CED-ähnliche Proteine auch in Säugerzellen existieren. CED-9 weist Sequenzhomologien zu Bcl-2 in Säugerzellen auf, das ebenfalls Apoptose inhibiert (Hengartner und Horvitz, 1994). Nach Klonierung von Bcl-2 wurde eine Vielzahl weiterer Bcl-2-Homologe entdeckt und zur Bcl-2-Familie zusammengefasst. Die Beobachtung, dass CED-3 Sequenzähnlichkeiten zum Interleukin-1 $\beta$ -Konversionsenzym (Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme; ICE), einem wichtigen Zelltod- und Entzündungseffektor, aufweist (Yuan et al., 1993), führte zur Charakterisierung der Caspasen-Familie. Nach der Entdeckung der CED-3- und CED-9-Homologe in Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass dem CED-4 der humane Apaf-1 (**A**ppototic **p**rotease-**a**ctivating **f**actor-1) entspricht, der Caspase 3 aktivieren kann (Zou et al., 1997). Die Ähnlichkeit der CED Genprodukte zu den homologen Proteinen in Säugerzellen reicht sogar soweit, dass sie sich gegenseitig funktionell ersetzen können. CED-3 und CED-4 können Apoptose in Säugerzellen induzieren (Chinnaiyan et al., 1997; Miura et al., 1993) und humanes Bcl-2 kann programmierten Zelltod in der Entwicklung von *C. elegans* verhindern (Vaux et al., 1992).

Dem relativ einfachen System der CED-Gene stehen komplexe, untereinander wechselwirkende Proteinfamilien in menschlichen Zellen gegenüber. Dies bedeutet, dass der Zelltod im Laufe der Evolution feiner regulierbar geworden ist,

um damit der Größe, langen Lebenszeit, Plastizität und Komplexität der Vertebraten gerecht zu werden. Apoptoseprozesse haben beim Menschen gegenüber *C. elegans* eine Bedeutungsausweitung erfahren. Im adulten *C. elegans* spielt Apoptose durch DNA-Schäden nur in Keimzellen, nicht aber in somatischen Zellen eine Rolle (Gartner et al., 2000). Dagegen ist beim Menschen die Apoptosesensitivität von Zellen gegenüber DNA-Schäden in vielen nichtgonadalen Geweben sehr hoch, z.B. hämatopoetische Zellen, Gliazellen, Epithelzellen im Darm. Somit dient Apoptose beim Menschen nicht nur der Strukturbildung und der Verhinderung der Weitergabe alterierter Erbinformationen, sondern auch der Elimination von geschädigten somatischen Zellen. Daher ist Apoptose ein wichtiger Mechanismus zur Verhinderung von Tumorerkrankungen.

### 3.5.2 Caspasen

Caspasen sind die Schlüsselenzyme der apoptotischen Maschinerie. Der Name leitet sich von der Tatsache ab, dass alle Caspasen **C**ystein-**P**roteasen sind und ihre Substrate spezifisch nach einem **A**sparat-Rest spalten. Ähnlich wie das Komplementsystem in der Immunabwehr sind sie in proteolytischen Kaskaden angeordnet, wodurch Todessignale intrazellulär übermittelt und verstärkt werden. Die erste Cystein-Protease, die im Zusammenhang mit programmiertem Zelltod beschrieben wurde, ist das in *C. elegans* entdeckte Protein CED-3 (Ellis und Horvitz, 1986), das Sequenzhomologien zum Interleukin-1 $\beta$ -Konversionsenzym (ICE) der Säuger aufweist (Miura et al., 1993). Mittlerweile sind 14 CED-3-Homologe bekannt und werden als Caspase 1 bis 14 bezeichnet (Alnemri et al., 1996; Strasser et al., 2000). Nach der Charakterisierung der Caspasen-Familie wurde schnell klar, dass nicht alle Caspasen in die Regulation der Apoptose eingebunden sind. So können Caspasen nach ihrer Funktion in Cytokin-prozessierende Caspasen und apoptotische Caspasen eingeteilt werden (Abb. 3). Bei den apoptotischen Caspasen werden außerdem Initiatorcaspasen mit langer Prodomäne (Caspase -2, -9, -8, -10) und Effektorcaspasen mit kurzer Prodomäne (Caspase-3, -6, -7) unterschieden.



**Abbildung 3: Übersicht über die Caspasen-Familie** (nach Strasser et al., 2000).

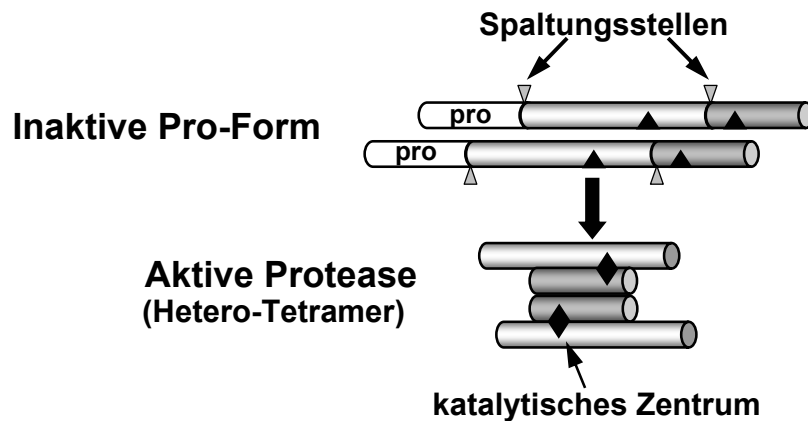
Die humanen Caspasen -1 bis -10, die murinen Caspasen -11 bis -14 und das *C.elegans*-Homolog Ced-3 sind mit Substratpräferenzen und strukturellen Unterschieden schematisch dargestellt.

Die so genannten Initiatorcaspasen stehen funktionell am Beginn der Signalkaskaden und beteiligen sich an der Bildung apoptoseinduzierender Komplexe. Dagegen werden die Effektorcaspasen im Allgemeinen durch andere Caspasen aktiviert und agieren als Effektoren, indem sie durch die Spaltung ihrer Substrate die Bildung des apoptotischen Phänotyps bewirken (Zhivotovsky, 2003). Die langen Prodomänen der Initiatorcaspasen verbinden entweder eine Caspase mit dem aktivierenden Todesrezeptor an der Zellmembran oder liefern die molekulare Grundlage für die Bildung des Caspasen-aktivierenden Apparates im Zytoplasma. Dies erfolgt über zwei verschiedene Protein-Protein-Interaktionsstellen, die Todeseffektor-Domäne (engl., **death effector domain**, DED) in Caspase-8 und -10 und die Caspasen-Rekrutierungs-Domäne (**caspase recruitment domain**, CARD) in Caspase-1, -2, -4, -9, CED-3 und CED-4 bzw. Apaf-

1 (Strasser et al., 2000). Diese zwei Domänen weisen geringe Sequenzhomologien innerhalb der Caspasenfamilie auf, ihre dreidimensionalen Strukturen sind sich jedoch sehr ähnlich (Hofmann, 1999). Entsprechende Strukturen wurden auch in der Todesdomäne (engl. **death domain**, DD) von FADD und CD95 gefunden (Huang et al., 1996). Diese Adaptermodule vermitteln homologe Interaktionen und schaffen damit die entscheidende Verbindung zwischen Todessignal und Caspasenaktivierung.

Für die Aktivierung der Caspasen sind verschiedene Mechanismen bekannt. Gemeinsam ist allen Caspasen, dass sie konstitutiv und ubiquitär als Zymogene mit keiner oder äußerst geringer proteolytischer Aktivität exprimiert werden (Thornberry und Lazebnik, 1998). Ihre Aktivierung erfolgt während der Apoptose entweder durch Assoziation mit Cofaktoren oder mittels proteolytischer Spaltung durch andere Caspasen. So benötigt Caspase-9 für ihre Aktivierung die Cofaktoren Apaf-1 und Cytochrom c (Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Dagegen erfolgt die Aktivierung von Caspase-8 durch autoproteolytische Spaltung. Von Caspase-8 existieren zwei Isoformen, die beide bei der rezeptorvermittelten Apoptose in großer Zahl zum Rezeptor rekrutiert werden (Scaffidi et al., 1997). Bei der extremen räumlichen Annäherung reicht die geringe intrinsische Proteaseaktivität der Procaspase-8-Moleküle aus, um sich gegenseitig zu aktivieren (Muzio et al., 1998). Procaspase-8 besteht wie alle inaktiven Caspasen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer intermediären großen und einer C-terminalen kleinen Untereinheit. Durch proteolytische Spaltung an spezifischen Aspartat-Resten mit subsequenter Heterodimerisierung der kleinen und der großen Untereinheit kommt es zur Aktivierung der Caspase (Nicholson et al., 1995; Wilson et al., 1994). Schließlich formen zwei solche Heterodimere zusammen die tetramere aktive Caspase mit zwei voneinander unabhängigen katalytischen Zentren (Blanchard et al., 1999; Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Watt et al., 1999; Wilson et al., 1994) (Abb. 4). Die Aktivierung der Effektorcaspasen erfolgt durch Spaltung durch die bereits aktivierten Initiatorcaspasen (Boatright und Salvesen, 2003). Die

Effektorcaspasen bewirken anschließend durch Spaltung ihrer Substrate die Bildung des apoptotischen Phänotyps.



**Abbildung 4: Caspasenaktivierung.**

Nach Spaltung der katalytisch inaktiven Procaspase, bestehend aus einer Prodomäne, sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit, kommt es zur Bildung eines Heterodimers aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Zwei derartige Heterodimere bilden zusammen die tetramere aktive Caspase mit zwei katalytischen Zentren.

### 3.5.3 Caspasensubstrate

Für das Verständnis der molekularen Mechanismen des programmierten Zelltodes ist die Identifizierung der Caspasensubstrate von zentraler Bedeutung. Bisher wurden mehr als 60 Proteine gefunden, die von Caspasen gespalten werden. Dabei sind alle funktionellen Bereiche der Zelle betroffen, was letztendlich zum Zellzyklusarrest, zur Hemmung von Reparaturmechanismen, zum Zusammenbruch molekularer Strukturen, zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten und zur Markierung der Zelle für die Phagozytose führt.

Die proteolytische Spaltung durch Caspasen kann den Verlust der biologischen Aktivität oder die Aktivierung des Substrates bewirken (Stroh und Schulze-Osthoff, 1998). Mit einem Verlust der biologischen Aktivität geht beispielsweise die Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) (Tewari et al., 1995) und die Spaltung des Lamin-Netzwerkes einher. PARP ist ein DNA-Reparaturenzym, das im Laufe der Apoptose von Caspase-3 gespalten und somit inaktiviert wird (Tewari



et al., 1995). Die Spaltung des Lamin-Netzwerkes führt zur Zellschrumpfung (Buendia et al., 1999; Rao et al., 1996).

Die Aktivierung von Caspasensubstraten kann durch Abspaltung inhibitorischer Domänen oder Untereinheiten erfolgen, wie z. B. bei CAD/ICAD. CAD (**C**aspasen-aktivierte **D**Nase) liegt in intakten Zellen im Komplex mit einer inhibitorischen Untereinheit (ICAD) vor. Während der Apoptose wird ICAD durch Caspase-3 abgespalten. (Sakahira et al., 1998). Die dadurch aktivierte CAD spaltet als Nuklease die DNA zwischen den Nukleosomen. Die entstehenden Spaltprodukte bestehen somit aus einem oder mehreren Nukleosomen. Daher entsprechen die Längen der Fragmente ganzzahligen Vielfachen von 180 Basenpaaren, welche die charakteristische DNA-Leiter bei der Gel-Elektrophorese ergeben.

### **3.5.4 Die Bcl-2-Familie**

Der Apoptoseinhibitor Bcl-2 wurde 1985 erstmals beschrieben und erhielt seinen Namen aufgrund seiner Beteiligung an der Pathogenese des B-Zell-Lymphoms (**B** cell lymphoma, bcl). Bcl-2 wurde als Onkogen identifiziert, das in Folge einer chromosomalen t(14;18)-Translokation im B-Zell-Lymphom stark überexprimiert wird (Tsujiimoto et al., 1985). Das führt dazu, dass die Zellen nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren keine Apoptose einleiten (McDonnell et al., 1990; Vaux et al., 1988). Nach der Entdeckung von Bcl-2 wurden durch Sequenzvergleich und Mutationsanalysen weitere Proteine mit ähnlicher Struktur gefunden, von denen einige vor Apoptose schützen, andere hingegen proapoptotisch wirken (Adams und Cory, 1998; Strasser et al., 2000). Diese homologen Proteine wurden zur Familie der Bcl-2 Proteine zusammengefasst. Sie sind durch das Vorhandensein von bis zu vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-4) gekennzeichnet und werden in drei funktionelle Gruppen unterteilt (Abb. 5).

Zu den antiapoptotischen Proteinen gehören neben Bcl-2 auch Bcl-x<sub>L</sub> (Boise et al., 1993), Bcl-w (Gibson et al., 1996), A1/Bfl-1 (Choi et al., 1995; Lin et al., 1996), Mcl-1 (Kozopas et al., 1993) und Boo/Diva (Inohara et al., 1998; Song et al., 1999), sowie das Nematodenprotein Ced-9 (Hengartner et al., 1992). Strukturelle

Gemeinsamkeit dieser antiapoptotischen Proteine ist die Existenz von mindestens drei der vier Bcl-2-Homologie-Domänen.

### Anti-apoptotische Bcl-2 verwandte Proteine

#### **Bcl-2-Subfamilie**



Bcl-2  
Bcl-x<sub>L</sub>  
Bcl-w  
A1/Bfl-1  
Mcl-1  
Bcl-2L1  
Ced-9

### Pro-apoptotische Bcl-2 verwandte Proteine

#### **Bax-Subfamilie**

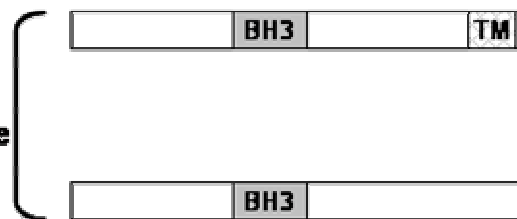


Bax  
Bak  
Bok/Mtd



Bcl-x<sub>S</sub>

#### **BH3-Subfamilie**



Bik/Nbk  
Hrk/DP5  
Bim/Bod  
Blk  
Bad  
Bid  
Bmf  
Noxa  
Puma/Bpc3  
Egl-1

### **Abbildung 5: Schematische Darstellung der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie.**

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind durch die Existenz von Bcl-2-Homologie(BH)-Domänen gekennzeichnet, mittels derer sie untereinander und mit anderen Proteinen interagieren können. Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie besitzen drei oder vier BH-Domänen. Zu den proapoptotischen Proteinen gehören die Bax-Subfamilie mit zwei oder drei BH-Domänen und die BH3-Subfamilie mit BH3 als einziger BH-Domäne. Viele Proteine der Bcl-2-Familie besitzen außerdem eine C-terminale Transmembran-Region (TM), die für die subzelluläre Verteilung in Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Kernmembran verantwortlich ist.

Dagegen enthalten die proapoptotischen Proteine Bax (Oltvai et al., 1993), Bak (Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995; Kiefer et al., 1995) und Bok/Mtd (Hsu et al., 1997) zwei oder drei BH-Domänen, jedoch nie eine BH4-Domäne. Das Protein Bcl-x<sub>S</sub>, eine Splicevariante von Bcl-x wirkt ebenfalls proapoptotisch, lässt sich jedoch strukturell keiner der drei Gruppen zuordnen (Boise et al., 1993). Die

stärksten Apoptoseinduktoren besitzen nur eine BH3-Domäne und haben darüber hinaus keine weitere Ähnlichkeit mit Bcl-2. Zu dieser dritten Gruppe gehören Bad (Yang et al., 1995), Bik/Nbk (Boyd et al., 1995; Han et al., 1996), Bid (Wang et al., 1996), Hrk/DP5 (Inohara et al., 1997), Bim/Bod (Hsu et al., 1998; O'Connor et al., 1998), Blk (Hegde et al., 1998), Noxa (Oda et al., 2000) und Puma (Nakano und Vousden, 2001; Yu et al., 2001), sowie das *C. elegans* Protein Egl-1 (Conradt und Horvitz, 1998) (Abb. 5). Die Tatsache, dass diese proapoptotischen Proteine abgesehen von der BH3-Domäne sehr unterschiedlich strukturiert sind, könnte bedeuten, dass jedes dieser Proteine eine spezifische Aktivität besitzt. Demnach interagieren diese Proteine selektiv mit ihren zugehörigen vorgeschalteten Signalmolekülen und antagonisieren die antiapoptotische Wirkung ihrer Liganden (Strasser et al., 2000). Dagegen sind die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie austauschbar. So kann Bcl-2 durch die homologen Proteine Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1/Bfl-1 und Mcl-1 funktionell ersetzt werden. Und Apoptosestimuli, die unabhängig von Bcl-2 sind, werden auch nicht durch andere antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie beeinflusst (Strasser et al., 2000). Das Vorhandensein von verschiedenen Genen für funktionell austauschbare Proteine erlaubt die gewebe- und stimulusspezifische Expression der antiapoptotischen Regulatoren. Viele Bcl-2 Proteine besitzen eine konservierte C-terminale Transmembranregion, die der Lokalisation an der Außenseite der Kernmembran, an der äußeren mitochondrialen Membran und am endoplasmatischen Retikulum dient (Chen-Levy und Cleary, 1990; Krajewski et al., 1993). Der Großteil von Bcl-2 ist an der cytosolischen Seite dieser Membranen lokalisiert, ebenso wie Bcl-x<sub>L</sub>, A1/Bfl-1, Mcl-1, Bax und Bak (Krajewski et al., 1993; Zamzami et al., 1998). Diese subzelluläre Lokalisation wird von einigen Proteinen streng eingehalten, andere können hingegen ihre Lokalisation ändern; was ein möglicher Mechanismus zur Kontrolle der Aktivität dieser Proteine sein kann (Gross et al., 1998; Nguyen et al., 1994), zumal die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen der Bcl-2-Familie an den genannten Membranen stattfindet (Borner et al., 1994; Zha et al., 1996).

Die Aktivität der Proteine der Bcl-2-Familie wird allerdings im Wesentlichen auf transkriptioneller Ebene, sowie durch distinkte posttranslationale Modifikationen reguliert. So wird beispielsweise Bax nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung vermehrt exprimiert (Kitada et al., 1996) und Bid wird posttranslational durch Caspasen-vermittelte Proteolyse aktiviert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998), was letztendlich Zelltod bewirkt. Die Expression antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> wird durch Wachstumsfaktor- oder Mitogenstimulation gesteigert, wodurch die Apoptose während der Zellproliferation gehemmt wird. Allerdings kann Bcl-x<sub>L</sub> unter bestimmten Bedingungen durch Caspasen in proapoptotische Moleküle umgewandelt werden (Clem et al., 1998; Xue und Horvitz, 1997).

### **3.6 Apoptotische Signalwege**

In Säugerzellen existieren mindestens zwei Signalwege mit globaler Relevanz zur Caspasenaktivierung und Apoptoseinduktion (Abb.6).

Der rezeptorvermittelte oder extrinsische Weg wird über Todesrezeptoren wie z. B. TNF-R, CD95, DR4-R und DR5-R gestartet, die Caspase-8 und-10 rekrutieren. In der Folge kommt es zur Aktivierung dieser Initiatorcaspasen, welche wiederum Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6, -7, und -9 aktivieren.

Der mitochondriale oder intrinsische Signalweg wird typischerweise durch DNA-Schäden, Zellzyklusdefekte, Ablösung von der extrazellulären Matrix, Hypoxie, Verlust von Überlebensfaktoren oder andere Stressfaktoren induziert und über die Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien und subsequente Aktivierung von Caspase-9 gestartet (Green und Reed, 1998).

Weitere Signalwege, z. B. über Ceramid-Freisetzung aus Sphingolipiden zellulärer Membranen durch die saure Sphingomyelinase (Santana et al., 1996) oder über Caspase-12 nach Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum (ER) durch zellulären Stress (Nakagawa et al., 2000), sowie Bcl-2-unabhängige mitochondriale Signalwege (Jendrossek et al., 2003) zeichnen sich ab.

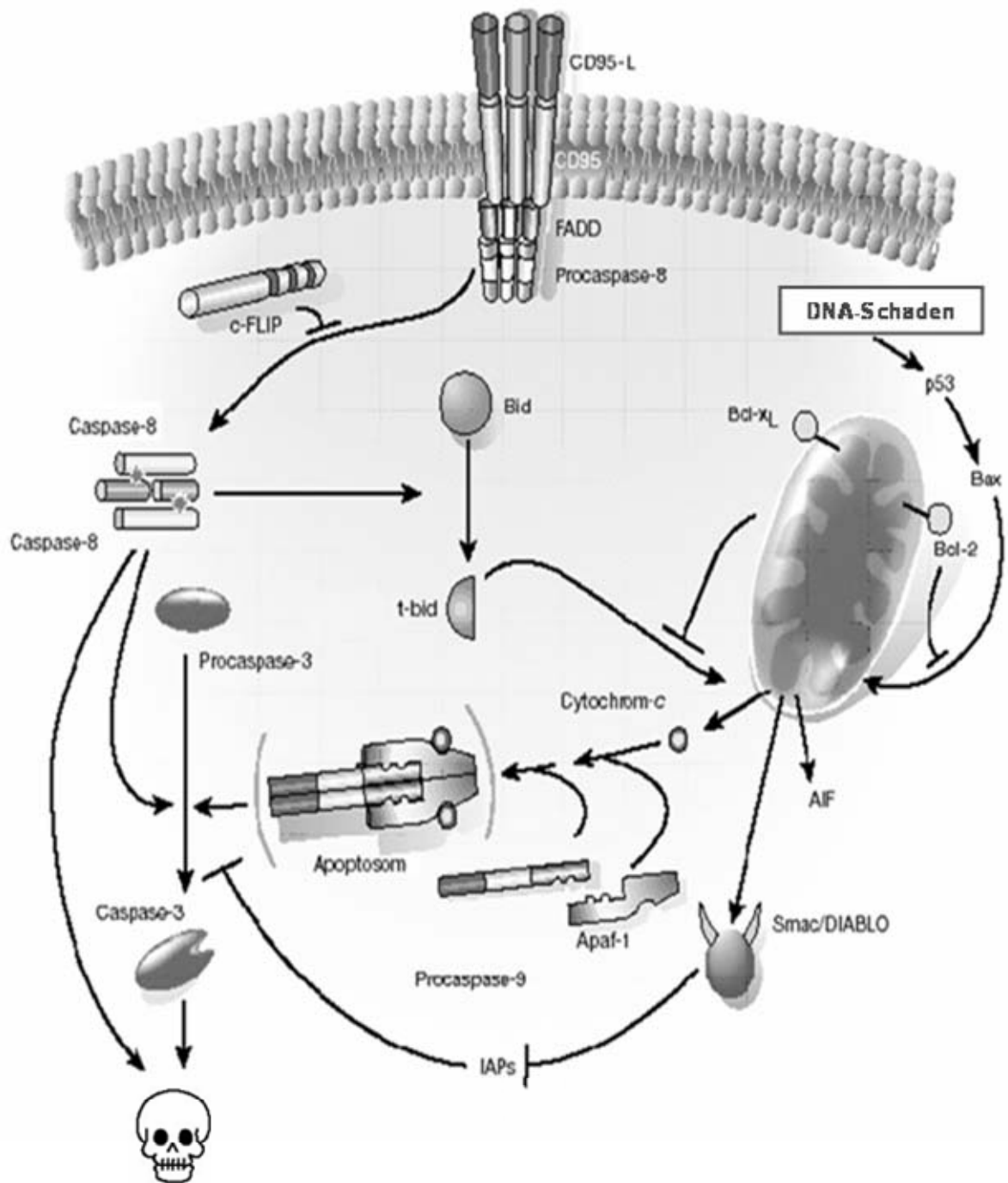


Abbildung 6: Darstellung des rezeptorvermittelten und des mitochondrialen Apoptose-Signalweges (nach Hengartner, 2000).

### 3.6.1 Der mitochondriale Weg

Apoptosesignalwege, die im Wesentlichen über eine Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium, wie Cytochrom c und SMAC/DIABLO, erfolgen, werden als mitochondriale Apoptosewege bezeichnet. Sie können beispielsweise durch Behandlung mit ionisierenden Strahlen oder Chemotherapeutika induziert werden. Der wichtigste hierbei involvierte Apoptosesignalweg basiert auf einer Aktivierung des p53-Moleküls und startet über Bax mitochondriale Apoptoseschritte (Abb. 6). Zellulärer Stress stabilisiert p53, bewirkt dessen Akkumulierung im Zellkern und Aktivierung als Transkriptionsfaktor (Ljungman, 2000). In unstimulierten Zellen liegt das tetramere Tumorsuppressor-Protein in latenter Form vor und wird durch gezielte Degradierung auf einem konstanten niedrigen Niveau gehalten. Die Aktivierung von p53 führt entweder zu Zellzyklusarrest am G1/S- oder G2/M-Übergang, zur Steigerung der Expression von proapoptotischen Genen oder zur DNA-Reparatur. Dabei entscheidet die Höhe des c-myc Proteinspiegels durch Blockade des negativen Zellzyklusregulators p21/cip-1/waf darüber, ob die p53-Aktivierung zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptoseinduktion führt (Seoane et al., 2002). Im Rahmen der Apoptoseinduktion bewirkt die p53-Aktivierung eine vermehrte Expression von Bax (Miyashita und Reed, 1995). Infolgedessen kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und SMAC bzw. DIABLO aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Du et al., 2000; Kluck et al., 1997; Verhagen et al., 2000) (Abb.6). Die exakten Mechanismen, die zur Freisetzung dieser proapoptotischer Faktoren führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung lieferte die Beobachtung, dass Bax die Öffnung der sogenannten „Mitochondrial Transition Pore“ (PT-Pore) induziert und dadurch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und den Austritt von Cytochrom c aus dem Mitochondrium verursacht (Marzo et al., 1998). Andererseits existieren Untersuchungen, die belegen, dass der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials keine Voraussetzung für die Freisetzung von Cytochrom c ist und dass die PT-Pore nicht direkt an der Freisetzung von Cytochrom c beteiligt ist (Bossy-Wetzel et al., 1998).

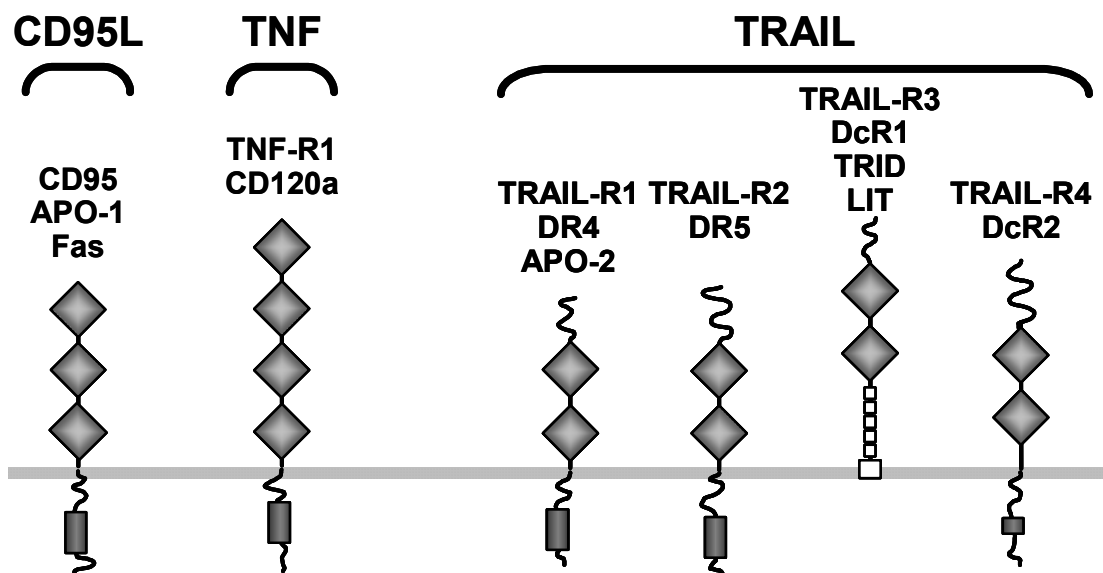
Obwohl die genauen Mechanismen, die zur Freisetzung von Cytochrom c führen noch nicht aufgeklärt sind, steht doch fest, dass Cytochrom c ein zentraler Vermittler apoptotischer Signale ist, denn die Freisetzung von Cytochrom c ist Voraussetzung für die Aktivierung der Caspasenkaskade. Während der Apoptose bildet Cytochrom c mit dem Adapterprotein Apaf-1 und dATP das sog. Apoptosom, welches die Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-9 bewirkt (Li et al., 1997). Caspase-9 aktiviert daraufhin Effektorcaspasen, wie z.B. Caspase-3. Dadurch kommt es zur kaskadenartigen Spaltung weiterer Caspasen und Caspasensubstrate und somit zur Einleitung finaler Apoptoseschritte (Slee et al., 1999) (Abb.6).

SMAC (**S**econd **M**itochondrial **A**ctivator of **C**aspase) beim Menschen, bzw. DIABLO (**D**irect **I**AP **B**inding Protein with **L**ow pI) bei Mäusen bindet an den Caspaseninhibitor XIAP (**X**-linked Inhibitor of **A**poptosis **P**rotein) und antagonisiert dessen antiapoptotische Aktivität (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000), wodurch das ungestörte Durchlaufen der Caspasenkaskade gewährleistet wird. XIAP gehört zu einer acht Mitglieder umfassenden Familie von endogenen Apoptoseinhibitoren, den IAPs (Inhibitor of **A**poptosis **P**roteins) (Vaux und Silke, 2005), und kann Caspase-3, -7 und -9 direkt inhibieren (Deveraux et al., 1997; Deveraux et al., 1998; Deveraux und Reed, 1999; Roy et al., 1997), sowie Zellzyklusarrest bewirken (Levkau et al., 2001).

### 3.6.2 Todesrezeptoren

Ein weiterer Mechanismus der Apoptoseinduktion erfolgt über sogenannte Todesrezeptoren. Diese werden zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in verschiedenen Geweben exprimiert und sind in der Lage, nach Interaktion mit ihren Liganden ein zytotoxisches Signal ins Zytosol weiterzuleiten. Todesrezeptoren gehören zu einer Reihe von strukturell verwandten Proteinen der sog. TNF(Tumornekrosefaktor)-Rezeptor-Superfamilie. Je nach Zelltyp und weiteren Signalen, die die Zelle empfängt, können diese Rezeptoren Proliferation, Differenzierung, Regulation der Genexpression, Überleben oder Zelltod vermitteln

(Ashkenazi und Dixit, 1998; Wajant, 2003; Wallach et al., 1998). Die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie sind durch cysteinreiche extrazelluläre Domänen charakterisiert, über die sie ihre Liganden binden (Smith et al., 1994) (Abb. 7). Sequenzhomologien der intrazellulären Region wurden nur bei den Todesrezeptoren, nicht aber bei den anderen Proteinen der TNF-R-Familie gefunden. Alle Todesrezeptoren besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne (engl. **death domain**, DD), welche für die Weiterleitung der apoptotischen Signale essentiell ist (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Todesrezeptoren** (nach Schulze-Osthoff et al., 1998).

Die intrazelluläre Todesdomäne ist als grauer Zylinder dargestellt, die Rauten stehen für die extrazellulären cysteinreichen Domänen. Die Decoy-Rezeptoren besitzen keine bzw. eine gekürzte Todesdomäne.

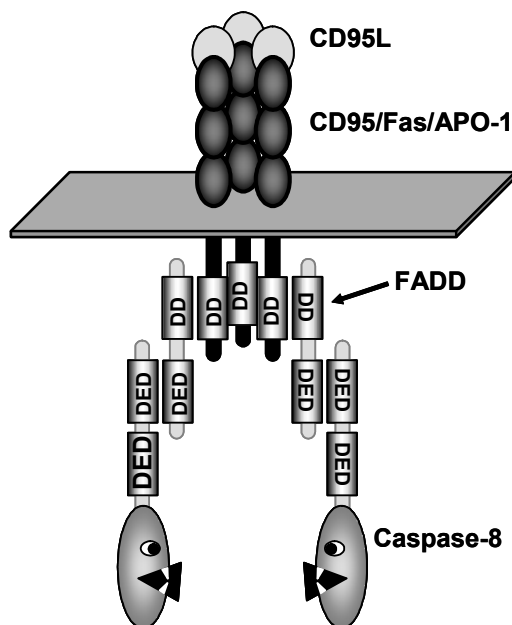
Zu den Todesrezeptoren gehören die Rezeptoren CD95/Fas/Apo-1 (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992), p55TNF-R1 (Boone et al., 2000; Brockhaus et al., 1990), DR3/APO-3/WSL-1/TRAMP/LARD (Bodmer et al., 1997; Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996; Screaton et al., 1997), DR4/TRAIL-R1/APO-2 und DR5/TRAIL-R2/KILLER (Chaudhary et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997b; Walczak et al., 1997; Wu et



al., 1997), DR6 (Pan et al., 1998) sowie der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTFR</sup> (Liepinsh et al., 1997).

Die Liganden der Zelltodrezeptoren werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur TNF-Superfamilie zusammengefasst (Ashkenazi, 2002). Die am besten untersuchten Mitglieder der TNF-Familie sind der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der CD95-Ligand (CD95-L) und der so genannte TNF- $\alpha$  related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL oder auch Apo-2L). TNF wurde ursprünglich identifiziert aufgrund seiner Eigenschaft, in transplantierten Tumoren hämorrhagische Nekrosen auszulösen (Carswell et al., 1975). Später zeigte sich, dass TNF- $\alpha$  in einigen Zellarten Apoptose induzieren kann (Ashkenazi und Dixit, 1998).

Das CD95-/CD95L-System ist u. a. für die Beseitigung peripherer aktivierter T-Zellen nach Beendigung der Immunantwort, sowie die Abtötung virusinfizierter und entarteter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten zuständig (Nagata und Golstein, 1995).



**Abbildung 8: Darstellung der Apoptose-Initiierung am CD95-Rezeptor.**

Nach Bindung von CD95-L an den Rezeptor kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und mit der Rekrutierung von Caspase-8 über das Adapterprotein FADD an den Rezeptor zur Bildung des DISC.

Neben CD95 wurde der in vielen Geweben exprimierte TRAIL als apoptoseinduzierender Todesrezeptor-Ligand identifiziert (Pitti et al., 1996). TRAIL

ist ein potentiell therapeutisch einsetzbarer Ligand, da die Anwendung von TRAIL bei Mäusen und Affen spezifisch und ohne größere Nebenwirkungen zur Rückbildung von Tumoren führt (Lawrence et al., 2001; Nagata, 2000).

Die Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade durch die Bindung von Mitgliedern der TNF-Familie an den zugehörigen Rezeptor soll hier am Beispiel des CD95-Systems erläutert werden. Die Stimulation des CD95-Rezeptors durch den CD95-Ligand bewirkt die Trimerisierung des Rezeptors, was zur Bildung des Todessignal-Komplexes DISC (engl. **D**eath **I**nducing **S**ignaling **C**omplex) führt (Abb. 8). Im DISC wird das Adapterprotein FADD (**F**as-**a**ssociated Protein with **DD**) über seine DD an die DD des CD95-Rezeptors gebunden (Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). FADD enthält neben seiner DD eine Todeseffektor-Domäne (engl. **d**eath **e**ffector **d**omain, DED), die der homophilen Interaktion mit den DEDs von Procaspase-8 oder -10 dient (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Die Rekrutierung vieler Procaspase-8-Moleküle an den CD95-Rezeptor führt durch die räumliche Nähe zu deren autoproteolytischen Aktivierung (Medema et al., 1997; Salvesen und Dixit, 1999). Aktive Caspase-8 spaltet und aktiviert anschließend Caspase-3. In der Folge kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung weiterer Caspasen und durch Spaltung einer Vielzahl von Caspasensubstraten zur Exekution des programmierten Zelltodes.

Über Caspase-8 existiert jedoch auch eine Verbindung zum mitochondrialen Signalweg. Caspase-8 kann Bid aktivieren, ein proapoptisches Bcl-2-Familienmitglied, welches die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium vermittelt (Li et al., 1998; Luo et al., 1998) (Abb. 6). Es wurde jedoch gezeigt, dass CD95-vermittelte Apoptose in lymphoiden Zellen von Mäusen, denen Bid fehlt, ungehindert abläuft (Yin et al., 1999). Da die proteolytische Bid-Aktivierung in der Signalkette nach der Caspasenaktivierung abläuft, dem „Point of no return“ in der Apoptosekontrolle, ist anzunehmen, dass die Bid-Spaltung nicht essentiell für die Apoptose in allen Geweben ist, aber dass sie möglicherweise zur Amplifizierung der Caspasenkaskade in Zellen mit initial geringer Caspase-8-Aktivität benötigt wird.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass in humanen Systemen eine weitere Caspase, Caspase-10, ebenso wie Caspase-8 an die DISC rekrutiert wird und dort autoproteolytisch aktiviert werden kann. Sie unterscheidet sich allerdings in ihrer Substratspezifität von Caspase-8 (Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002; Wang et al., 2001).

Der geordnete Ablauf der komplexen Apoptosesignalwege ist verschiedenen Störfaktoren ausgesetzt. So kann eine Überexpression antiapoptotischer Faktoren oder eine Deletion proapoptischer Proteine, wie FADD oder Caspase-8 zur Apoptoseresistenz führen. Auf Rezeptorebene kann beispielsweise die Expression von sogenannten Decoyrezeptoren die Apoptoseinduktion modulieren. Das sind trunkierte Todesrezeptoren, die im Verlauf der Evolution die für die intrazelluläre Signaltransduktion notwendigen Domänen verloren haben. Sie schwächen die Apoptoseinduktion ab, da sie mit den intakten Todesrezeptoren um die Liganden konkurrieren und selbst keine intrazelluläre Weiterleitung des Todessignals bewirken. Dieser Mechanismus der Apoptoseregulation ist bei der Apoptoseinduktion durch TRAIL/APO-2L von Bedeutung. Unter den vier Rezeptoren für TRAIL/APO-2L (Abb. 7), genannt DR4, DR5, DcR1 und DcR2 oder TRAIL-R1 bis TRAIL-R4, sind zwei Decoyrezeptoren, die die TRAIL/APO-2L vermittelte Zytotoxizität verhindern können (Degli-Esposti et al., 1997; Pan et al., 1997a; Pan et al., 1997b; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997).

Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose kann jedoch auch intrazellulär reguliert werden. Ein Beispiel dafür ist die Hemmung der Rekrutierung von Procaspase-8 (FLICE) zum Rezeptorkomplex durch das sogenannte FLIP-Molekül (**FLICE-Inhibitory Protein**) (Bertin et al., 1997; Hu et al., 1997; Thome et al., 1997). FLIP scheint für die Regulation der Apoptosesensitivität aktivierter T-Lymphozyten von Bedeutung zu sein. In der frühen Phase der T-Zellaktivierung wird FLIP stark exprimiert und in der späten Phase herunterreguliert, was mit Beobachtungen übereinstimmt, dass aktivierte T-Lymphozyten in der frühen Phase der Aktivierung resistent, in der späten Phase dagegen sensitiv für CD95-vermittelte Apoptose sind (Peter et al., 1997).

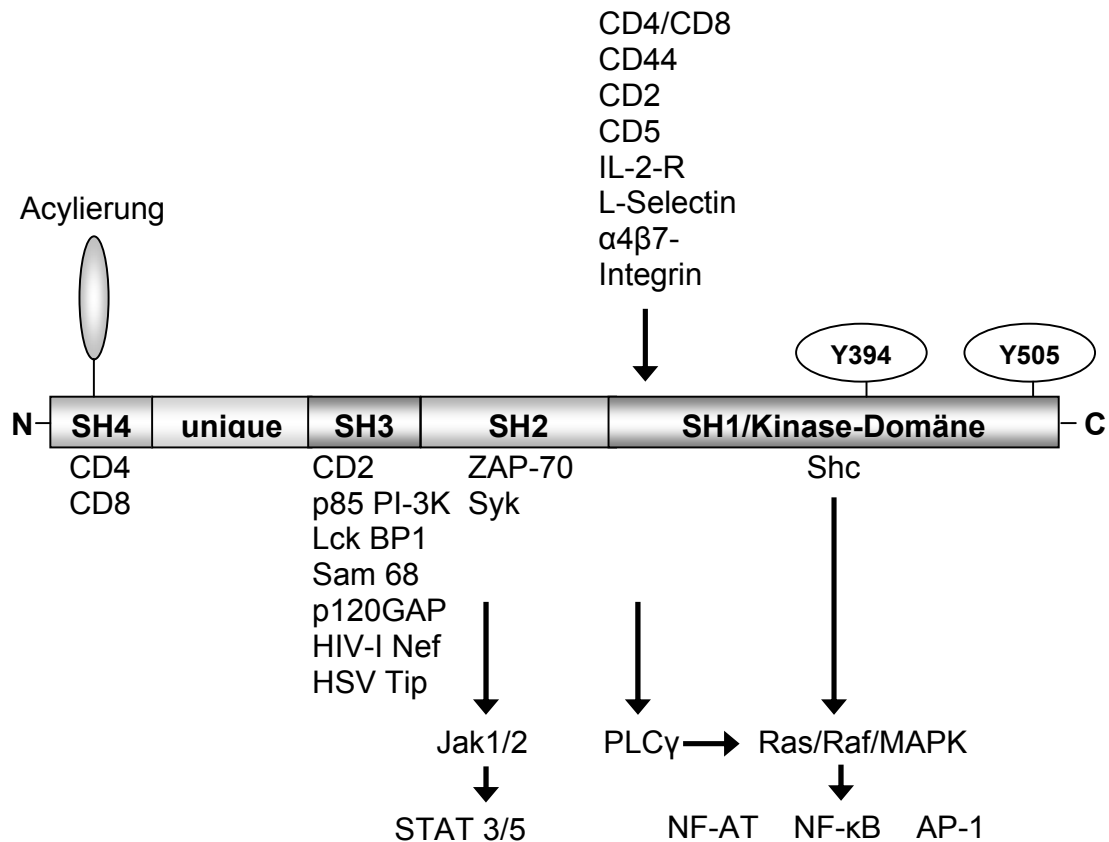
### **3.7 Tyrosinkinasen der Src-Familie**

Für die CD95-vermittelte Apoptose scheint die Aktivität von Proteintyrosinkinasen von Bedeutung zu sein, da die CD95-induzierte Apoptose durch Inhibition von Proteintyrosinkinasen (Eischen et al., 1994; Schlottmann et al., 1996) oder die Expression der Tyrosinphosphatase FAP (Sato et al., 1995) behindert wird. Bei der strahleninduzierten Apoptose in B-Lymphozyten werden ebenfalls Proteintyrosinkinasen benötigt (Eischen et al., 1994; Schlottmann et al., 1996; Uckun et al., 1996). Für T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinkinase Lck, die am stärksten exprimierte Tyrosinkinase der Src-Familie in humanen T-Zellen, durch ionisierende Strahlen schnell aktiviert wird und daher möglicherweise für die Apoptose in T-Lymphozyten von Bedeutung ist (Belka et al., 1999).

Die Familie der Src-Kinasen ist nach der onkogenen Tyrosinkinase des Rous-Sarkomvirus benannt, dessen zelluläres Homolog c-src das erste molekular beschriebene Protoonkogen war (Stehelin et al., 1976). Die Src-Familie beinhaltet neun Mitglieder. Davon werden p59Fyn, p62Yes, Yrk und p60Src ubiquitär exprimiert (Golden et al., 1986; Kawakami et al., 1989; Krueger et al., 1991; Zhao et al., 1991), wohingegen p56Lck, p56Lyn, p59Hck, p55Blk und p57Fgr vorwiegend in hämatopoetischen Zellen vorkommen (Bolen et al., 1992; Brown und Cooper, 1996; Cooper und Howell, 1993; Dymecki et al., 1990; Sudol et al., 1993; Veillette et al., 1989; Yamanashi et al., 1989) (Willman et al., 1991). Lck wird hauptsächlich in T-Lymphozyten exprimiert.

#### **3.7.1 Struktur der Tyrosinkinasen der Src-Familie**

Die Zusammenfassung dieser Tyrosinkinasen in einer Proteinfamilie erfolgte aufgrund von Strukturhomologien. Die Kinasen der Src-Familie bestehen aus jeweils vier sog. **Src-Homologie-Domänen (SH)** und einer für die jeweilige Kinase charakteristischen Domäne (engl. unique region) (Abb. 9).



**Abbildung 9: Struktur und Interaktionspartner der Tyrosinkinase Lck.**

Der Aufbau der Tyrosinkinase Lck ist schematisch dargestellt. Die mit Lck funktionell verbundenen Oberflächenrezeptoren sind im oberen Bereich aufgelistet. Im unteren Bereich sind die mit den Untereinheiten interagierenden Moleküle sowie Transkriptionsfaktoren und Signalwege, die durch Lck aktiviert werden, notiert. Ebenfalls dargestellt sind die Tyrosinreste an Position 394 und 505, an denen die Regulation der Lck-Aktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung stattfindet.

Die C-terminale SH1-Domäne, die die größte Sequenzhomologie innerhalb der Src-Kinasenfamilie aufweist, stellt die katalytische Region dar (Bolen et al., 1992; Cooper und Howell, 1993). Die SH2-Domäne beeinflusst die subzelluläre Lokalisation der Kinase (Bar-Sagi et al., 1993) und ist an der Steuerung der Kinaseaktivität beteiligt (Bolen et al., 1992; Cooper und Howell, 1993; Koch et al., 1991; Schlessinger, 1994). Die SH-3-Domäne spielt ebenfalls eine Rolle für die subzelluläre Lokalisation. Darüber hinaus vermittelt sie Wechselwirkungen mit prolinreichen Proteinen und kann eine negative regulatorische Funktion auf die Kinaseaktivität haben (Koch et al., 1991; Schlessinger, 1994; Superti-Furga et al.,

1993). Die N-terminale SH4 Domäne weist einen Myristylrest auf (Johnson et al., 1994), der für die transformierende Aktivität einzelner Kinasen notwendig ist und der Verankerung der Kinase in Membranen dient. Lck wird zusätzlich posttranslational an Cys3 und Cys5 palmitoyliert (Milligan et al., 1995). Die Membranlokalisation scheint eine wichtige Voraussetzung für die Funktion der Tyrosinkinase Lck zu sein (Anderson und Perlmutter, 1995; Weil und Veillette, 1996), da sie hauptsächlich in Membran-Mikrodomänen lokalisiert ist, die stark mit Cholesterol und GPI-verankerten Proteinen angereichert sind, wo sich der aktivierte T-Zell-Rezeptor (TZR) und assoziierte Signalmoleküle nach TZR-Stimulierung konzentrieren (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998). Zwischen der SH3 und der SH4-Domäne liegt die „unique region“, die der Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des CD4- und CD8-Antigen-Korezeptors auf T-Zellen dient.

### **3.7.2 Funktion von Lck in T-Lymphozyten**

Die Tyrosinkinase Lck ist ein wichtiges Signalmolekül der TZR/CD3-Signalkaskade (Anderson und Perlmutter, 1995; Straus und Weiss, 1992; Weil und Veillette, 1996). Erste Hinweise auf die Bedeutung von Lck bei der TZR-Signaltransduktion lieferte die Beobachtung an T-Zellen von Mäusen, dass die konstitutive Expression von Lck zu einer gesteigerten rezeptorvermittelten Tyrosinphosphorylierung und Lymphokinsekretion führt (Abraham et al., 1991). Untersuchungen an einer mutierten T-Zelllinie (JCaM1.6), die eine katalytisch inaktive Form von Lck exprimiert, bestätigten diese zentrale Bedeutung von Lck. In diesen Zellen ist die intrazelluläre Signaltransduktion nach TZR/CD3-Stimulierung gestört und kann durch Retransfektion von Wildtyp-Lck wiederhergestellt werden (Straus und Weiss, 1992). Heute weiß man, dass Lck initiale Ereignisse der TZR/CD3-Signaltransduktion vermittelt, wie Phosphorylierung des TZR-Komplexes und Aktivierung von MAP-Kinasen (**M**itogen-aktivierte **P**roteinkinasen) (Denny et al., 1999). Außerdem ist Lck an der Regulation der TZR-Oberflächenexpression beteiligt (D'Oro et al., 1997).

Die MAP-Kinasen-Kaskade stellt einen zentralen Signalweg dar, der die Verbindung von Membranrezeptoren mit Effektoren im Zytoplasma und im Zellkern vermittelt. ERK (**extracellular signal-related kinase**), JNK (**c-Jun N-terminale Kinase**) und p38 sind Seronin/Threonin-Kinasen, die die Hauptkomponenten dieses induzierbaren Signalweges darstellen und viele intrazelluläre Ereignisse wie Zellproliferation und Differenzierung regulieren (Kyriakis et al., 1994; Rincon, 2001). Nach Aktivierung phosphorylieren die MAP-Kinasen eine Vielzahl zytoplasmatischer Effektorproteine, darunter Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Genexpression mitwirken (Rincon, 2001; Wilkinson und Millar, 2000).

Außerdem bewirkt Lck die Phosphorylierung des TZR-Komplexes innerhalb von Aminosäuresequenzen, die als ITAMs (**Immunorezeptor-Tyrosin-beinhaltende Aktivierungsmotive**) bekannt sind, spezielle Tyrosin-beinhaltende Motive in der zytoplasmatischen Domäne aller Ketten des CD3/ $\zeta$ -Komplexes (Chan et al., 1994; Isakov und Biesinger, 2000; Kane et al., 2000; Straus und Weiss, 1992). Dies ermöglicht zum einen die Rekrutierung der Tyrosinkinasen ZAP-70 und Syk zum CD3/TZR-Komplex, die für die erfolgreiche TZR-Signalgebung und T-Zell-Aktivierung benötigt werden (Anderson et al., 1994; Chan et al., 1994; Isakov und Biesinger, 2000) und führt zum anderen zur Steigerung der Stabilität des TZR/Peptid/MHCII-Komplexes (Thome et al., 1995). Dabei wirkt Lck als Adaptermolekül, denn eine Deletion oder Mutation der Phosphotyrosin-Stelle der SH2-Domäne resultiert in einer funktionell inaktiven Lck trotz unverminderter katalytischer Aktivität (Fusaki et al., 1997).

Letztendlich bewirkt Lck nach TZR-Stimulierung die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-AT, NF- $\kappa$ B und AP-1 (Di Somma et al., 1996), die durch Regulation der Genexpression das Schicksal der T-Zelle bestimmen. So kann über eine Steigerung der Expression von IL-2 und IL-2R eine T-Zell-Proliferation bewirkt oder über eine Steigerung der Expression von Fas Apoptose induziert werden. Die Steigerung der Fas-Expression spielt insbesondere eine Rolle für die Beendigung der Immunantwort durch den sog. aktivierungsinduzierten

Zelltod (Anderson und Perlmutter, 1995; Brunner et al., 1995; Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995).

Neben der direkten Interaktion mit dem TZR/CD3-Komplex kann Lck indirekt TZR-vermittelte Signale verstärken. Lck kann mit CD4 und CD8 interagieren, die dann ihrerseits über die Assoziation mit dem TZR die T-Zellaktivierung verstärken, was insbesondere bei suboptimaler Antigenstimulation von Bedeutung ist (Weil und Veillette, 1996)

Außerdem sind noch weitere Rezeptoren, die an der T-Zell-Aktivierung und Proliferation beteiligt sind, wie CD2, CD5, CD28 und IL-2R, physikalisch oder funktionell mit Lck verbunden (Ruhwald et al., 1999; Weil und Veillette, 1996).

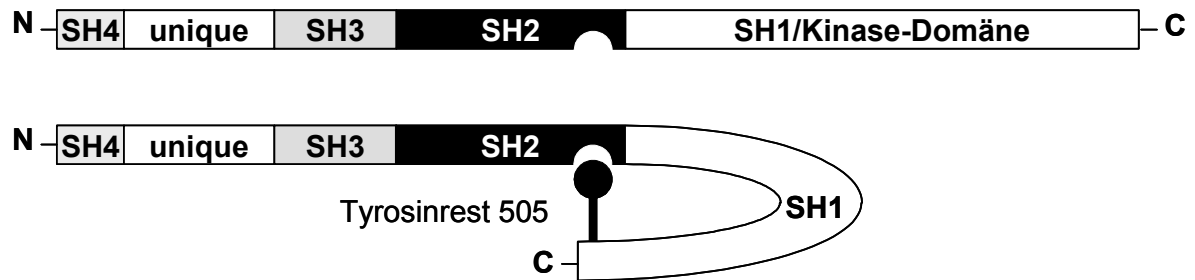
Ein weiterer Beleg für die Relevanz von Lck für die Funktion des lymphatischen Systems ist die Beobachtung, dass bei Mäusen, die keine Lck oder ein dominant negatives Lck-Transgen im Thymus exprimieren, schwere Defekte bei der T-Zell-Entwicklung auftreten (Levin et al., 1993; Molina et al., 1992).

### **3.7.3 Regulation der Lck Aktivität**

Die Lck-Aktivität wird durch Phosphorylierung der Aminosäurereste Tyr394 und Tyr505 in der katalytischen Domäne reguliert (Chow et al., 1993; Hardwick und Sefton, 1997; Ostergaard et al., 1989).

Phosphorylierung an Tyr505 führt zur Stabilisierung von Lck in einer biologisch inaktiven Konformation (Chow et al., 1993; Ostergaard et al., 1989). Dabei kommt es zu einer intramolekularen Wechselwirkung zwischen phosphoryliertem Tyr505 und der SH2-Domäne von Lck, wodurch die Interaktion der katalytischen Domäne mit anderen Signalmolekülen blockiert wird (Abb. 10). Dagegen stimuliert die Phosphorylierung an Tyr394 die katalytische Aktivität von Lck und wird durch CD4-Stimulation verstärkt (Hardwick und Sefton, 1997; Ostergaard et al., 1989). Die Aktivierung von Lck erfolgt somit durch Phosphorylierung von Tyr394 und Dephosphorylierung von Tyr505, wodurch die SH1-Domäne wieder für andere Partner zugänglich gemacht wird (Weil und Veillette, 1996).





**Abbildung 10: Regulation der Kinaseaktivität von Lck.**

Oben ist die aktive, unten die inaktive Form der Tyrosinkinase Lck dargestellt. Bei der inaktiven Form verhindert eine intramolekulare Assoziation zwischen dem phosphorylierten Tyr505 und der SH2-Domäne die Interaktion der katalytischen Domäne mit intrazellulären Substraten.

Die Regulation der Kinaseaktivität erfolgt über spezielle Tyrosinkinasen und Phosphatasen. Für die funktionelle Inaktivierung sind die sog. carboxyterminale Src-Kinase (CSK) und die Csk-Typ-Proteinkinase (Ctk) verantwortlich (Klages et al., 1994; Sabe et al., 1994; Superti-Furga et al., 1993). Die funktionelle Aktivierung von p56Lck erfolgt durch Dephosphorylierung an Tyr505 durch die auf Lymphozyten vorkommende Tyrosinphosphatase CD45 (Ostergaard et al., 1989).

### **3.8 Fragestellung**

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Tyrosinkinase Lck nach Bestrahlung von T-Lymphozyten aktiviert wird und dass die Apoptoserate in Lck-defizienten Zellen nach Bestrahlung deutlich reduziert ist (Belka et al., 1999). Weiterhin unklar ist jedoch, auf welcher Ebene der apoptotischen Signaltransduktion Lck in die Regulation eingebunden ist.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die Apoptoseinduktion und Signaltransduktion in Lck-defizienten Zellen und in Lck exprimierenden Zellen nach Bestrahlung bestimmt werden. Um Hinweise auf einen möglichen Angriffspunkt von Lck innerhalb mitochondrialer Apoptosesignalwege zu erhalten, wird die Lck-Defizienz mit einer Überexpression von Bcl-2 verglichen, eines bekannten Inhibitors mitochondrialer Apoptoseschritte.

Da strahleninduzierte und rezeptorvermittelte Apoptosewege über unterschiedliche Signalkaskaden verlaufen, soll außerdem geprüft werden, ob rezeptorvermittelte Apoptose Lck-unabhängig abläuft. Dadurch wären Rückschlüsse auf das Ausmaß der Bedeutung von Lck für Apoptosesensitivität bzw. -resistenz über die strahleninduzierte Apoptose hinaus möglich.

Um die Beteiligung von Lck an weiteren mitochondrialen Apoptosesignalwegen zu prüfen, soll außerdem die Wirkung von Chemotherapeutika mit unterschiedlichen intrazellulären Primärzielen auf Lck-defiziente und Lck-exprimierende Zellen verglichen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten dann in Verbindung mit den Beobachtungen bei Bestrahlung und Rezeptor-Stimulation Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von Lck liefern.

Zur Aufklärung des Funktionsmechanismus von Lck bei der Apoptosesignaltransduktion soll geprüft werden, ob die Tyrosinkinasedomäne von Lck die proapoptotische Wirkung vermittelt und ob Lck durch die verwandte Tyrosinkinase Src funktionell ersetzbar ist.

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien und Chemotherapeutika

Ampicillin	Sigma
Acrylamid	Roth
Aprotinin	Roth
APS	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
CSPD <sup>®</sup> -Substratlösung Tropix	Applied Biosystems, MA, USA
Desoxycholat	Sigma
DMSO	Sigma
Doxorubicin/Adriblastin <sup>®</sup>	Pharmacia&Upjohn
EDTA	Sigma
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco
Ficoll (Biocoll), d=1,077 g/l	Biochrom-Seromed
Fluorouracil/Fluoroblastin <sup>®</sup>	Pharmacia&Upjohn
Gel 30 (30%-ige AA/BisAA-Lösung, 37,5:1)	Roth
Genicitin=G418	Gibco
Glycin	Merck
HCl	Merck
HEPES	Sigma
Hoechst 33342	Calbiochem
KCL	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Leupeptin	Sigma
Methanol	Merck
NaCl	Merck

NaF	Merck/Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Napp-Natriumpyrophosphat	Sigma
Paclitaxel/Taxol <sup>®</sup>	Alexis
Para-Formaldehyd	Merck
Phytohemagglutinin-L (PHA-L)	Sigma
Ponceau-S-Lösung	Sigma
PP2	Calbiochem
2-Propanolol	Merck
Propidiumiodid	Calbiochem
Proteinmarker für SDS-PAGE	Amersham
Protein-Farbstoffkonzentrat	BioRad
RPMI 1640 Medium	Gibco
SDS	Sigma
SDS-Laufpuffer (10 fach)	Biorad
TEMED	Roth
TMRE	Molecular Probes, Mobitech
Tris-Base	Merck
Tris-HCL	Merck
Triton	Sigma
Tween 20	Sigma

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deidenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen, falls nicht anders angegeben.

#### **4.2 Puffer und Lösungen**

AP-Puffer: 100 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
auf pH 9,5 mit HCl eingestellt

Blocklösung: TBS + 0,05% (v/v) Tween 20 + 5% (v/v) FCS

Lysepuffer: 25 mM HEPES  
0,1 % (w/v) SDS  
0,5 % (w/v) Desoxycholat  
1,0 % (v/v) Triton X-100  
10 mM EDTA  
10 mM Napp-Natriumpyrophosphat  
10 mM NaF  
125 mM NaCl

unmittelbar vor Gebrauch: Zugabe von 20 µl/ml DTT Aprotinin/Leupeptin (je 5 mg/ml)

PBS: 8,0 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4

Probenpuffer: 2,0 ml Glycin  
2,0 ml SDS, 10%  
0,025 g Bromphenolblau  
2,5 ml Sammelpuffer  
ad 9,5 ml Aqua dest.

Sammelpuffer: 60,6 g/l Tris-Base  
0,4 % (w/v) SDS  
auf pH 6,8 mit HCl eingestellt

TBS:	1,75 g/l Tris-HCl 8,76 g/l NaCl pH 8,0
TBS-Triton:	TBS + 0,02 % (v/v) Triton X-100
TBS-Tween:	TBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer (Western-Blot):	14,4 g Glycin 3,03 g Tris-Base 200 ml Methanol 3 ml SDS, 20 % ad 1000 ml Aqua dest. pH 8,3
Trennpuffer:	18,17 g/l Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS auf pH 8,8 mit HCl eingestellt

### ***4.3 Antikörper und Liganden***

#### **4.3.1 Antikörper zur Western-Blot-Analyse**

##### **Primärantikörper**

Mouse-anti-avian-Src 1:200	Upstate Biotechnology
Mouse-anti-Bcl-2, 1:2000	Santa-Cruz-Biotech
Mouse-anti-Caspase-3, 1:1000	BD Transduction Laboratories
Mouse-anti-Caspase-8, 1:45	Freundlicherweise erhalten von K. Schulze-Osthoff, Uni. Münster
Rabbit-anti-active-Caspase-3, 1:1000	Cell Signaling
Rabbit-anti-active-Caspase-9, 1:1000	Cell Signaling

Rabbit-anti-active-MAP Kinase, 1:1000	Cell Signaling
Rabbit-anti-Bcl-xL, 1:1000	BD Transduction Laboratories
Rabbit-anti-Lck, 1:500	Biolabs
Rabbit-anti-Mcl-1, 1:500	Santa-Cruz-Biotech
Rabbit-anti-PARP, 1:1000	Cell Signaling
Rat-anti-Bid, 1:2000	freundlicherweise erhalten von J. Yuan, Boston, MA, USA

### **Sekundärantikörper**

Anti-mouse, AP-konjugiert	Santa-Cruz-Biotech
Anti-rabbit, AP-konjugiert	Santa-Cruz-Biotech
Anti-rat, AP-konjugiert	Santa-Cruz-Biotech

### **4.3.2 Antikörper zur Immunfluoreszenzanalyse**

#### **Primärantikörper:**

hTRAIL R1 (M272)	Immunex Corp., Seattle USA
hTRAIL R2 (M413)	Immunex Corp., Seattle USA
Mouse-anti-Cytochrom-c (65971A)	PharMingen

#### **Sekundärantikörper:**

Anti-mouse-Alexa488	Molecular Probes, Mobitech
Anti-mouse IgG (Fab specific), FITC Conjugate	Sigma

### **4.3.3 Antikörper und Liganden zur Stimulierung der Zellen**

Anti-CD95/Fas/APO-1-IgM-Antikörper,

Klon CH11	Upstate Biotechnology
Rekombinantes, humanes TRAIL	Alexis Biochemicals
Enhancer	Alexis Biochemicals

## **4.4 Zelllinien**

Jurkat-E6-T-Zell-Lymphoma-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, MD, USA bezogen.

Die Lck-defizienten Jurkat-Zellen (JCaM1.6) und die Lck-cDNA-exprimierenden JCaM1.6/Lck-Zellen waren ein Geschenk von A. Weiss (University of California, San Francisco, USA).

Bcl-2-überexprimierende Jurkat-Zellen und die entsprechenden Vektor-Kontrollzellen wurden 2000 von J.Rudner in unserem Labor stabil transfiziert (Rudner et al., 2001).

Aktive-Src-exprimierende (JCaM1.6/src.act), Wildtyp-Src-exprimierende (JCaM1.6/src.wt) und Bcl-2-exprimierende JCaM1.6-Zellen (JCaM1.6/Bcl-2), sowie die zugehörigen Vektorzellen wurden stabil transfiziert (siehe Abschnitt 5.2). Der Vektor pUSEamp und die aktive bzw. Wildtyp-Src kodierenden Vektoren wurden von Upstate Biotechnology bezogen. Wildtyp-Bcl-2 von B. Leber (McMaster University, Hamilton, Ont., USA) wurde in den Expressionsvektor pRC/cmv (Invitrogen) kloniert.

#### **4.5 Bakterien**

Es wurden kompetente Bakterien Escherichia coli DH5 $\alpha$  der Firma Clontech benutzt.

#### **4.6 Kits**

Der CONCERT™ High Purification Plasmid Maxiprep Kit der Firma Gibco BRL/Life Technologies wurde zur Aufreinigung der DNA verwendet.

#### **4.7 Verbrauchsmaterial**

Einfrierröhrchen	Greiner
Filterpapier Whatman 3MM	Roth
Kopierfolien	Xerox
0,4 cm Küvetten	BioRad
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech



1,5 ml- Reaktionsgefäße	Eppendorf
Hyperfilm <sup>®</sup> ECL	Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilm	Kodak
15 ml/50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner

#### **4.8 Geräte**

Brutschrank	Heraus Instruments
Bestrahlungsgerät	LINAC SL 25, Phillips
FACS Calibur Durchflußzytometer	Becton Dickinson
Filmentwickler	Sterling, Diagnostic Imaging
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Carl Zeiss, Jena
Konfokales Laser Scan Mikroskop	Leica TCS NT
Lichtmikroskop	Wilovert, Wild Leitz
Schüttler	Biometra
SDS-Gelelektrophoresekammer	Biometra
Sterilbank	Heraus Instruments
Trans-Blot <sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
4054 UV-VIS-Spektrophotometer	
Ultraspec Plus, LKB Biochrom	Pharmacia Biosys.
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Für Zellkultur: Rotanta RPC Laborzentrifuge	Hettich
Für DNA Aufreinigung: Sorvall <sup>®</sup> SUPER	
T21, Rotor SL-50T	Sorvall

## **5 Methoden**

### **5.1 Zellkultur**

#### **5.1.1 Kultivierung der Zellen**

Jurkat-, JurkatBcl-2-, JurkatVektor-, JCaM1.6-, JCaM1.6/Lck-, JCaM1.6/src.wt-, JCaM1.6/src.act-, JCaM1.6/Vektor- und JCaM1.6/Bcl-2-Zellen wurden in 75 ml Kulturflaschen in Konzentrationen von 50.000 bis 1.000.000 Zellen pro ml bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dazu wurde das Kulturmedium RPMI 1640 mit dem Zusatz von 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin (Biochrom-Seromed) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom-Seromed) verwendet (=Vollmedium). Die transfizierten Zellen wurden zusätzlich zweimal wöchentlich mit dem Selektionsantibiotikum G418 (800 µg/ml) supplementiert.

#### **5.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur Konservierung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurden sie in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Zum Einfrieren wurden ca.  $25 \times 10^6$  Zellen 5 min bei 500xg zentrifugiert und in 1,5 ml Einfriermedium (75 % RPMI, 20 % FCS, 5 % DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Einfrierröhrchen schonend in 4 Stufen eingefroren (15 min oberste Stufe, 30 min mittlere Stufe, 1 h unterste Stufe, zuletzt Lagerung in flüssigem Stickstoff).

Um die Zellen erneut zu kultivieren, wurden sie im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in 3 ml Vollmedium aufgenommen. Um das zytotoxische DMSO zu entfernen wurde die Zellsuspension 5 min bei 500xg zentrifugiert und das Pellet in Vollmedium resuspendiert, das zusätzlich mit 10 % FCS supplementiert wurde. Nach 48 h Kultivierung in 75 ml Zellkulturflaschen, wurde eine Aufreinigung mit FICOLL durchgeführt, um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Dafür wurde 5 ml Biocoll-Lösung mit den Zellen in einem Volumen von 5 ml

überschichtet. Nach 20 min Zentrifugation bei 500xg wurden die Zellen im Interphasenring abgesaugt und in frisches Medium überführt. Nach einer Erholungsphase von einer Woche konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

## **5.2 Transfektion von Zellen**

Vor der Transfektion wurden 25 Millionen Zellen zweimal mit 20 ml einer eiskalten (4 °C) TBS-Lösung gewaschen und anschließend in 700 µl TBS aufgenommen und in 0,4 cm Küvetten überführt. Nach Zugabe von 20 µg aufgereinigter DNA in einem Volumen <20 µl wurde der Ansatz 15 min. auf Eis inkubiert. Die Transfektion erfolgte bei 500 V und 150-200 µF im Elektroporator Gene Pulser® II (BioRad). Danach wurden die Zellen weitere 20 min. auf Eis inkubiert und anschließend in 10 ml Vollmedium aufgenommen, das zusätzlich mit 10 % FCS supplementiert wurde. Zur Entfernung von infolge der Strombehandlung abgetöteten Zellen wurde eine, wie oben beschriebene, Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt und die Zellen anschließend weiter kultiviert.

Ab dem 3. Tag nach der Elektroporation wurde zur Selektion der transfizierten Zellen das Kulturmedium mit dem Selektionsantibiotikum G418 (800 µg/ml) versetzt.

## **5.3 DNA-Vermehrung und -Aufreinigung**

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion in JCaM1.6 Zellen wurden die Plasmide in Bakterien vermehrt und aufgereinigt.

### **5.3.1 Transformation von Bakterien**

Für die Transformation wurden 50 µl der kompetenten Bakterien *Escherichia coli* DH5α mit 1 µg DNA vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Erwärmung auf 42 °C für 90 sec. wurden die Bakterien für weitere fünf Minuten auf Eis

abgekühlt. Anschließend wurden sie in 500 µl SOC-Medium (Gibco BRL/Life Technologies) bei 37 °C für 1 h geschüttelt, bevor sie auf LB-Agarplatten (3,05 % w/v Luria Agar Base, Miller, Sigma), die 50 µg/ml des Antibiotikums Ampicillin enthielten, ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien mit transformierten Bakterien gepickt und in LB-Medium (1,55 % w/v Luria Broth Base, Miller, Sigma) mit 50 µg/ml Ampicillin überimpft und weitervermehrt.

### **5.3.2 Aufreinigung der DNA**

Die in 200 ml des mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzten LB-Mediums vermehrten Bakterien wurden lysiert und die Plasmid-DNA wurde über Säulen des CONCERT™ High Purification Plasmid Maxiprep Kits mit den Puffern E1-E6 von Gibco BRL/Life Technologies nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte dabei über die von Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration abhängige Interaktion der DNA über ihre negativ geladenen Phosphatreste mit den positiven Ladungen des Austauschharzes.

Dazu wurden 200 ml der Übernachtskultur nach Zentrifugation bei 6000xg und Resuspendierung in 10 ml des Zellsuspensionspuffers E1 (mit 20mg/ml RNase A) durch Zugabe von 10 ml des Lysepuffers E2 und Inkubation für 5 min. bei RT lysiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer E3 wurde die Lösung neutralisiert und anschließend für 10 min. bei 1500xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Äquilibration der Säule mit 30 ml des Puffers E4 wurde der Überstand auf die Säule gegeben. Nachdem der Ansatz die Säule passiert hatte, wurde sie mit 60 ml des Puffers E5 gewaschen. Dann wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml des Puffers E6 eluiert. Schließlich erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 10,5 ml 2-Propanolol zum Eluat und anschließende Zentrifugation bei 12000xg für 30 min bei 4 °C. Abschließend wurde die DNA nach zweimaligem Waschen mit 5 ml 70%igem Alkohol und Zentrifugation bei 12000xg (4 °C, 5 min.) in 500 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

### **5.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und Überprüfung der DNA-Reinheit**

Nach geeigneter Verdünnung der DNA-Lösung wurde die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren mittels der Extinktionsmessungen in einem 4054 UV-VIS-Spektrophotometer Ultraspec Plus bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Für eine reine DNA-Lösung beträgt das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  1,8. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht einer ds-DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

### **5.4 Bestimmung der CD95- und TRAIL-R-Oberflächenexpression**

Die Bestimmung der CD95- und TRAIL-R-Oberflächenexpression erfolgte durch Bindung eines spezifischen Primärantikörpers und eines FITC-konjugierten Sekundärantikörper mit anschließender FACS-Messung.

Dafür wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit 500xg bei RT pelletiert und in 100 µl 5 % FCS in PBS resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit dem Primärantikörper in 5 % FCS in PBS inkubiert. Für den Nachweis der CD95-Rezeptoren wurde CH11 (Alexis) in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, für die Bestimmung der TRAIL-Rezeptoren wurde ein Antikörper gegen TRAIL-R1, hTRAIL R1 (M272), und ein Antikörper gegen TRAIL-R2, hTRAIL R2 (M413), in 1:100-Verdünnung verwendet. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus IgG (Fab specific) bzw. Anti-Maus-Alexa499 in 1:500 Verdünnung in 5 % FCS in PBS für 30 min. bei 4 °C. Abschließend wurden die Zellen mit 500xg bei RT pelletiert und in 500 µl FACS-Flow resuspendiert, bevor sie mit dem FACS in Kanal FI-1 detektiert und in einem Histogramm durch Auftragung der bei bestimmter Fluoreszenzintensität detektierten Ergebnisse dargestellt wurden.

### **5.5 Proliferationsassay**

Die Bestimmung der Zellproliferation wurde mit dem Wst-1 Zellproliferations-Reagens (Roche Molecular Biochemicals) durchgeführt. Die Zellen wurden in 96-

Well-Platten in einem Volumen von 100 µl/Well und einer Dichte von 2500, 5000, 7500 und 10000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Zellzahl ermittelt durch Zugabe des Wst-1-Reagens (10 µl/Well) für 2 h und anschließende Absorptionsmessung bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) mit einem Anthos 2010 Absorptionssmessgerät (Anthos).

## **5.6 Stimulierung der Zellen**

### **5.6.1 Bestrahlung**

Für die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml mit 6 MV Photonen mit dem Linearbeschleuniger LINAC SL25 mit einer Dosisrate von 4 Gy/min bei RT bestrahlt. Unter die Kulturplatten wurde ein 10 cm dicker und auf die Platten ein 1,5 cm dicker Plexiglasblock gelegt. Damit wurde der Aufbaueffekt vermindert und eine homogene Strahlendosis im Medium erreicht.

### **5.6.2 CD95-Stimulation**

Der Zelltodrezeptor CD95/Fas/APO-1 wurde mit dem agonistischen IgM-Antikörper  $\alpha$ CD95, Klon CH11 in einer Konzentration von 100 ng/ml Medium stimuliert.

### **5.6.3 TRAIL-R-Stimulation**

Zur Stimulierung der TRAIL-Rezeptoren wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ /ml Medium mit 100 ng/ml rekombinantem humanem TRAIL 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch anschließende Zugabe des Enhancers in einer Konzentration von 1 µg/ml wurde die Rezeptoraktivierung verstärkt.

### **3.6.4 Behandlung mit Chemotherapeutika**

Zur Behandlung mit Zytostatika wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Medium mit 0,5 µg/ml Doxorubicin/Adriblastin<sup>®</sup>, 100 nMol/l Paclitaxel/Taxol<sup>®</sup> oder 10 µMol/l 5-Fluorouracil/Fluoroblastin<sup>®</sup> inkubiert. Zur Hemmung der Kinaseaktivität von p56/Lck

wurden die Zellen eine Stunde vor Zugabe der Chemotherapeutika mit 5  $\mu$ M des Src-Kinasen-Inhibitor PP2 behandelt.

## **5.7 Bestimmung der Apoptose, Viabilität und $\Delta\psi_m$**

### **5.7.1 Durchflusszytometrie**

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden morphologische Charakteristika der Zellen herangezogen. Im Laufe der Apoptose verändert sich die Zellmorphologie und damit die Streulichteigenschaften der Zellen bei durchflusszytometrischer Messung. Apoptotische Zellen unterscheiden sich von gesunden Zellen in ihrer Zellgröße und Granularität. Diese entsprechen in der Durchflusszytometrie dem Durchlicht (FSC für forward scatter) bzw. dem im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreuten Licht (SSC für sideward scatter). Somit können mittels Bestimmung dieser Parameter apoptotische Zellen von gesunden Zellen abgegrenzt und quantifiziert werden. Für die Auswertung wurde die spezifische Apoptoserate berechnet. Hierfür wurde von der absoluten Apoptoserate stimulierter Zellen die Spontanapoptoserate unstimulierter Zellen abgezogen, die von Störvariablen wie der Zelldichte abhängig ist.

Zur Bestimmung der Viabilität wurde die Fähigkeit der Zellen, den DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) auszuschleusen, untersucht. Dafür wurden die Zellen vor der Durchflusszytometer-Messung mit 0,1  $\mu$ g/ml PI für 30 Minuten inkubiert. Gesunde Zellen nehmen Propidiumiodid kaum auf, da sie eine intakte Membran besitzen. Dagegen wird der Farbstoff in Zellen mit gestörter Membranintegrität vermehrt aufgenommen, wo er in die DNA interkaliert und zu einer erhöhten PI-Fluoreszenz führt. Nach Verlust der Membranintegrität der apoptotischen Zellen wird die DNA degradiert und in kleine Membranvesikel verpackt, die eine höhere PI-Fluoreszenz als gesunde Zellen aufweisen. Die Zellen mit intakter und geschädigter Membran wurden nach Auftragung von FL-2 gegen SSC in einem Koordinatensystem voneinander abgegrenzt.

Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Zellen mit dem Farbstoff TMRE angefärbt. Dies ist ein membranpermeabler potentialabhängiger Farbstoff, der in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential akkumuliert, bei Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials allerdings aus den Mitochondrien diffundiert. Daher weisen gesunde Zellen mit einem intakten mitochondrialen Stoffwechsel eine höhere Fluoreszenzintensität auf, als Zellen, in denen das mitochondriale Membranpotential zusammengebrochen ist. Für die Messung wurden die Zellen mit 25 nM TMRE für 30 min bei 37 °C inkubiert und mit dem FACS in Kanal FL-2 detektiert. Die Auswertung erfolgte in einem Koordinatensystem, in dem FL-2 gegen SSC aufgetragen wurde.

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt und von den erhaltenen Daten wurde Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

### **5.7.2 Hoechst-Färbung**

Die DNA-Färbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 dient der raschen morphologischen Analyse der Kernveränderungen während der Apoptose.

Hierfür wurden die Zellen 15 min. bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff Hoechst 33342 in einer Konzentration von 1 µg/ml Vollmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 135 beurteilt. Dabei wird der in die DNA interkalierende Farbstoff mit einer Quecksilberlampe angeregt und die Fluoreszenz unter Verwendung eines 380 nm Filters detektiert. Mit einer verstärkenden CCD-Videokamera (AxioCam MR, Zeiss) wurde ein repräsentativer Ausschnitt dokumentiert. Die Zellen können als apoptotisch bezeichnet werden, wenn sie mehr als zwei distinkte DNA-Verdichtungen aufweisen.

### **5.8 Western-Blot**

Die Analyse der Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung, sowie der Proteinexpression von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, FADD und Lck erfolgte durch Western-



Blotting. Dazu wurden die Zellen lysiert und die Lysate per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Für die Detektion wurde diese mit dem spezifischen Erstantikörper und einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper inkubiert, an den die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Das bei der Umsetzung der anschließend zugegebenen Substratlösung emittierte Licht wurde auf einem Röntgenfilm als Banden nachgewiesen.

### **5.8.1 Herstellung der Lysate**

Für die Herstellung der Lysate wurden  $2 \times 10^6$  Zellen 5min mit 500xg bei Raumtemperatur zentrifugiert, dann in 200 $\mu$ l SDS-Lysepuffer aufgenommen und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Zur Gewinnung der zytosolischen Fraktion wurden die lysierten Zellen 10 min bei 10000xg bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand (das Lysat) in ein neues Gefäß überführt.

### **5.8.2 Proteinbestimmung**

Um eine gleichmäßige Beladung der Spuren zu gewährleisten, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dazu wurde zu 3  $\mu$ l des Lysats 1 ml des 1:5 verdünnten Protein-Farbstoffkonzentrats von BioRad gegeben und dann die Extinktion mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

### **5.8.3 Vorbereitung der Proben**

Nach Normierung der Proben bezüglich der Proteinmenge wurden zu 25  $\mu$ l des Lysats 5  $\mu$ l SDS-enthaltender Probenpuffer und 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Denaturierung gegeben. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine und somit eine Auftrennung nach Proteingröße zu erzielen, wurden die Proben 5 min bei 100 °C im Thermoschüttler inkubiert.

### **5.8.4 SDS-PAGE**

In der SDS-PAGE (**S**odium**d**odecyl**s**ulfat-**P**olyacrylamid-**G**el-**E**lektrophorese) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen durch den Molekularsiebeffekt des Acrylamid-Gels nach ihrer Größe aufgetrennt. Es wurden

drei verschiedene Gele (10%, 12%, 14%) verwendet, um für jedes Protein die optimale Auflösung zu erhalten. Um trotz eines großen Lysatvolumens eine scharfe Auftrennung der Proteine zu erzielen, wurde dem Trenngel ein 4,5%-iges Sammelgel vorgeschaltet. Die Proteine durchwandern das Sammelgel sehr rasch und konzentrieren sich in der Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel, bevor die Auftrennung im 10-14%-igen Trenngel erfolgt.

Die Lysate wurden in Geltaschen im Sammelgel gegeben und in einer Multigel-Long Kammer (Biometra) bei 50mA gesammelt und bei 150mA aufgetrennt. Als Puffer diente das SDS-Laufpufferkonzentrat von BioRad nach 1:10 Verdünnung mit Aqua bidest.

Zusammensetzung der Gele:

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	14%	
Aqua bidest.	6,25 ml	5,25 ml	4,25 ml	3,00 ml
Trennpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	–
Sammelpuffer	–	–	–	1,25 ml
Gel 30	5,00 ml	6,00 ml	7,00 ml	0,75 ml
APS, 10% w/v	75 µl	75 µl	75 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	5 µl
SDS, 20% w/v	75 µl	75 µl	75 µl	–

### 5.8.5 Detektion der Proteine

Nach Auftrennung der Proteine wurden sie vom Gel auf eine Hybond ECL Nitrocellulosemembran transferiert, um die nachfolgende Antikörperbindung zu erleichtern und eine Diffusion der Proteine zu verhindern. Dafür wurde das Gel mit der Nitrocellulosemembran, Filterpapier und Schwämmchen zur Polsterung in eine Transferkassette gepackt und bei 0,1 A in einer mit Transferpuffer gefüllten Trans-Blot<sup>R</sup> Elektrophorese Transferkammer über Nacht geblottet. Nach dem Transfer wurde die gleichmäßige Proteinauftragung und -übertragung durch Anfärbung mit

Ponceau S Lösung (1:20 in Aqua bidest verdünnt) und anschließendem Waschen mit Aqua bidest. überprüft. Um freie Bindungsstellen auf der Membran, an die die Antikörper unspezifisch binden könnten, abzudecken, wurde die Membran anschließend 20 min. mit einer Blocklösung (5 % FCS in TBS-Tween) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blocklösung für 45 min. Nicht spezifisch gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für 15min mit TBS-Tween entfernt. Anschließend wurde die Membran für 30 min. mit dem AP-konjugierten Sekundärantikörper in Blocklösung inkubiert und danach viermal für 15 min. mit TBS-Triton, zweimal für 15 min. mit TBS und zweimal für 15 min. mit AP-Puffer gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran 5 min. in CSPD<sup>®</sup>-Substratlösung Tropix inkubiert und anschließend in einer Filmkassette zwischen zwei Folien glatt gestrichen. Durch das Enzym AP findet eine katalytische Reaktion statt, bei der Energie in Form von Licht frei wird. Deshalb wurde auf die Membran ein Film (Hyperfilm<sup>®</sup> ECL Filmmaterial, Amersham Pharmacia Biotech) aufgelegt, auf dem nach dem Entwickeln die Proteinbanden sichtbar wurden.

### **5.9 Cytochrom-c-Färbung**

Zum Nachweis der Cytochrom-c-Freisetzung während der Apoptose wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des konfokalen Mikroskops Leica TCS NT untersucht.

Dazu wurden zunächst Deckgläschen für 10 min bei Raumtemperatur mit einer 1:100 in Aqua bidest. verdünnten Poly-L-Lysinlösung (Sigma, 0,1% w/v) beschichtet. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 Million Zellen/ml auf die Deckgläschen pipettiert und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer Para-Formaldehydlösung (2,5 % w/v in PBS) für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit Triton X-100 (0,1 % w/v in PBS) permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit

PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 10 min bei RT mit einer Blocklösung (10 % FCS in PBS) abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, Maus-anti-Cytochrom c (PharMingen), über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 10 % FCS in PBS mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus-Alexa 488 (Molecular Probes, Mobitech) in 1:330 Verdünnung in Blocklösung für 45 min bei RT inkubiert. Nach abschließendem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf einem Objektträger in Mowiol eingedeckelt und anschließend mikroskopiert und fotografiert.

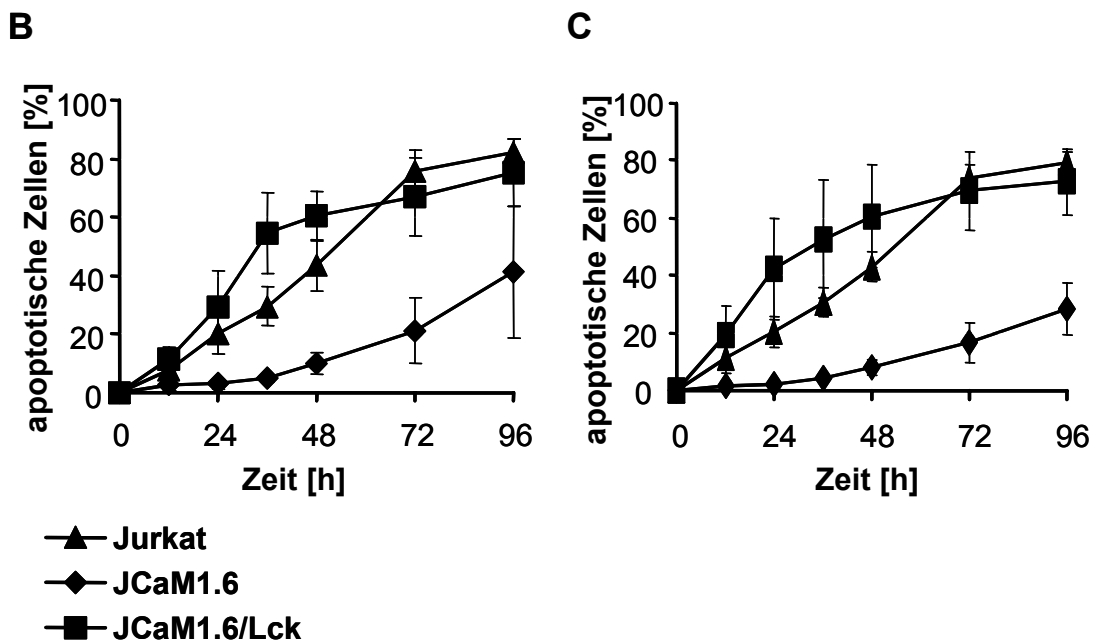
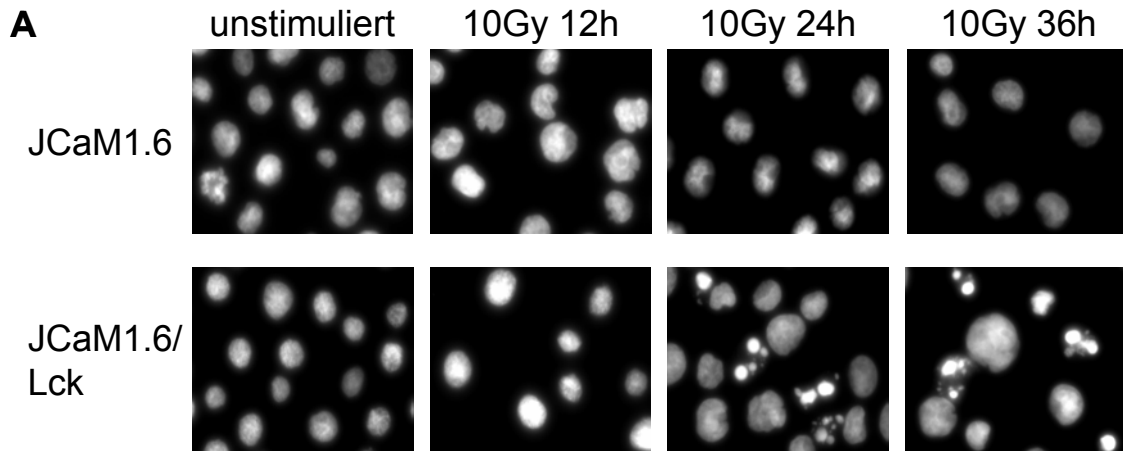
## 6 Ergebnisse

### **6.1 Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen**

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Lck für die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen von Bedeutung ist. Es war jedoch unklar, wie Lck die strahleninduzierte Apoptose beeinflusst, bzw. an welcher Stelle Lck in apoptotische Signalwege eingreifen kann. Daher sollte nun der Einfluss von Lck auf die Signaltransduktion bei der Apoptose genauer untersucht werden.

Dafür wurde zunächst die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen in Lck-exprimierenden und Lck-defizienten Zellen bestimmt. In Jurkat-T-Zellen, sowie in Lck-defizienten JCaM1.6-Zellen und Lck-retransfizierten JCaM1.6/Lck-Zellen wurde Apoptose durch Bestrahlung mit 10 Gy initiiert. Die Induktion von Apoptose wurde durch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der charakteristischen Kernmorphologie nach Kernfärbung mit Hoechst33342 nachgewiesen. Dieser Farbstoff lagert sich in die DNA ein und kann somit der Darstellung der Verteilung der DNA im Kern dienen. Intakte Lymphozyten zeigen dabei eine gleichmäßige Anfärbung des gesamten Kerns. Dagegen stellt sich bei apoptotischen Zellen die kondensierte DNA deutlich als kleine lichtintensive Punkte dar. In Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen waren bereits nach 24 h apoptotische Zellen sichtbar, wohingegen in Lck-defizienten JCaM1.6-Zellen keine Chromatinkondensation feststellbar war (Abb.11A).

Parallel dazu wurde die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb 11B,C). Dabei wurden die Morphologie der Zellen, sowie ihre Viabilität beurteilt. Die Zellmorphologie wurde durch Messung der Lichtbrechungseigenschaften untersucht. Diese werden durch die im Laufe der Apoptose stattfindenden Zellveränderungen, wie Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, Zellschrumpfung und Bildung apoptotischer Körperchen, beeinflusst.

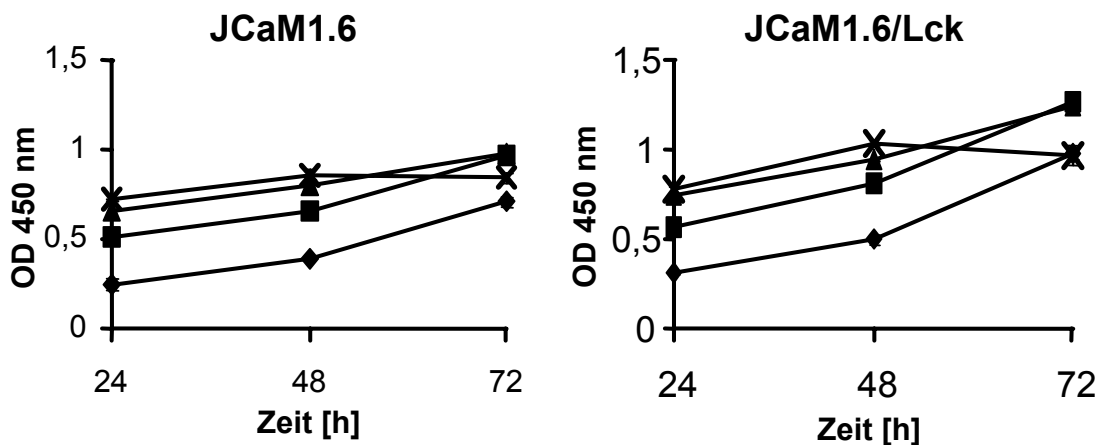


**Abbildung 11: Apoptoseinduktion durch Bestrahlung.**

**A:** Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Bilder der Kernmorphologie (nach Inkubation mit Hoechst 33342) von unstimulierten JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck- Zellen, bzw. 12, 24 oder 36 h nach Bestrahlung. JCaM1.6/Lck-, nicht jedoch JCaM1.6-Zellen weisen Chromatinkondensationen nach Bestrahlung auf. **B, C:** Apoptoserate von Jurkat-, JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen nach Bestrahlung, gemessen anhand von Scatter-Charakteristika (B) bzw. nach PI-Färbung (C). Darstellung der Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) +/- Standardabweichung.

In Lck-exprimierenden Zellen verlief die Apoptoseinduktion zeitabhängig und erreichte nach 96 h eine Apoptoserate von  $75,3 \pm 11,6$  % in JCaM1.6/Lck- und  $82,2 \pm 4,4$  % in Jurkat-Zellen. Dagegen war bis zu 72 h nach Bestrahlung kaum

Apoptose in den Lck-defizienten JCaM1.6-Zellen nachweisbar ( $21,2 \pm 11,1$  %). Nach 96 h stieg die Apoptoserate in JCaM1.6-Zellen zwar schließlich auf  $41,3 \pm 22,5$  % an, blieb damit jedoch deutlich unter der Apoptoserate in Lck-exprimierenden Zellen (Abb. 11B). Entsprechende Befunde ergaben sich auch bei der Bestimmung der Viabilität der Zellen mittels durchfluszytometrischer Analyse nach Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI). Dieser Farbstoff wird von gesunden Zellen mit intakter Membranfunktion kaum aufgenommen bzw. schnell nach extrazellulär transportiert. Die gestörte Membranintegrität apoptotischer Zellen hingegen führt zu einer intrazellulären Anreicherung von PI und somit zu einer erhöhten PI-Fluoreszenz im Vergleich zu gesunden Zellen. Die JCaM1.6/Lck-Zellen erreichten bereits nach 72 h eine Apoptoserate von  $69,4 \pm 13,7$  % und die Jurkat-T-Zellen eine Apoptoserate von  $73,7 \pm 5,1$  %. Dagegen waren nur  $17,7 \pm 7,0$  % der Lck-defizienten Zellen apoptotisch. Nach 96 h lag die Apoptoserate in JCaM1.6/Lck-Zellen bei  $72,5 \pm 11,7$  % und in Jurkat-Zellen bei  $79,0 \pm 4,0$  %, jedoch in JCaM1.6-Zellen lediglich bei  $28,3 \pm 9,3$  % (Abb.11C).



**Abbildung 12: Proliferationsverhalten von JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen.**

Die Lck-Defizienz bewirkt keine veränderte Zellproliferation. Die Zellen wurden in 96-well-Platten in einer Ausgangskonzentration von 2500, 5000, 7500 oder 10000 Zellen/Well ausgesät und die Dichte mittels des Proliferationsreagens Wst-1 nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus 3 Ansätzen +/- Standardabweichung.

—X— 10000 Zellen/Well

—▲— 7500 Zellen/Well

—■— 5000 Zellen/Well

—◆— 2500 Zellen/Well

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Verlust der Lck-Expression die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung deutlich reduziert, wobei bis zu 72 h nach Bestrahlung kaum Apoptoseinduktion in Lck-defizienten Zellen nachweisbar ist.

Um auszuschließen, dass ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der Zellen die beobachtete Reduktion der Apoptoserate in Lck-defizienten Zellen vortäuscht, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Hierbei wurden die basalen Proliferationsraten von unbehandelten JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Lck-Defizienz zu keiner verminderten Zellproliferation führt (Abb.12). Somit ist die beobachtete Apoptoseresistenz Lck-defizienter Zellen keiner veränderten Proliferation zuzuschreiben.

## **6.2 Lck-Expression und -Funktion**

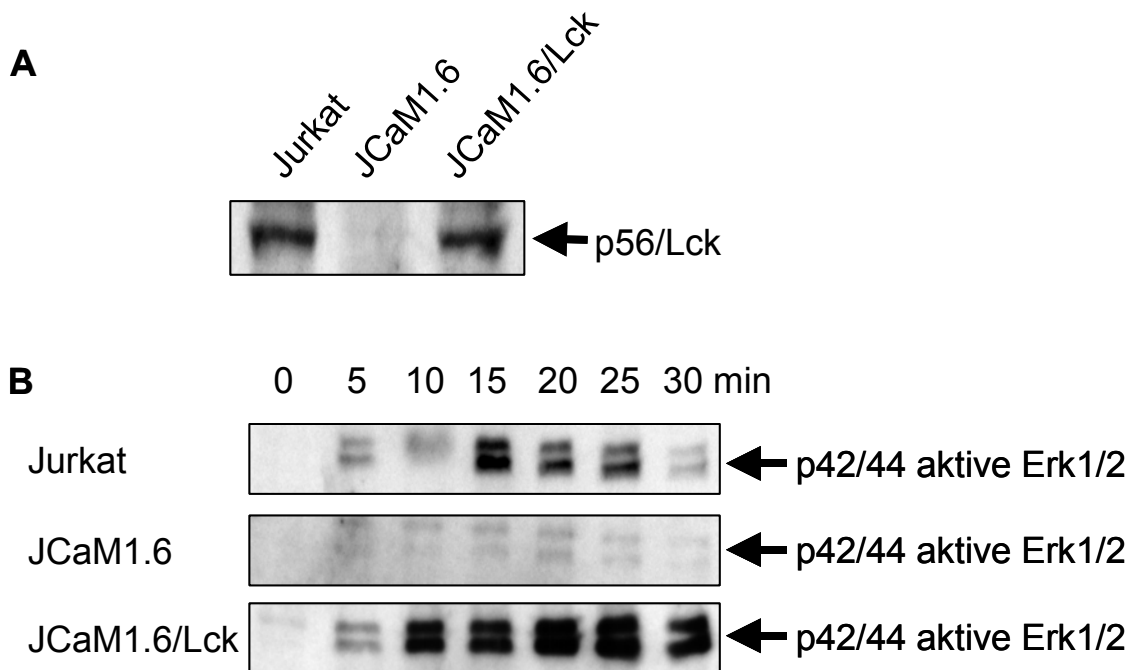
Die beobachteten Unterschiede der Apoptoseraten zwischen den Lck-exprimierenden Zelllinien und der als Lck-defizient bezeichneten Zelllinie deuten auf eine zentrale Bedeutung der Tyrosinkinase Lck für die strahleninduzierte Apoptose hin. Zum Nachweis der Expression von Lck in Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen, sowie dem Fehlen von intakter Lck in JCaM1.6-Zellen wurde ein Western-Blot mit einem Antikörper, der gegen den C-Terminus von Lck gerichtet ist, durchgeführt (Abb. 13A). Dabei waren die Lck-Expressionslevel in Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen vergleichbar, wohingegen in JCaM1.6-Zellen mit diesem Antikörper keine Lck-Expression festgestellt werden konnte.

Die funktionelle Integrität von Lck wurde mittels Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) und anschließender Analyse der Erk1/2-Aktivierung überprüft. Der CD3/TZR-Komplex wurde durch 50 µg/ml Phytohemagglutinin-L (PHA-L) stimuliert und die Aktivierung der Erk1/2-Kinasen wurde im Western-Blot mit einem Antikörper gegen die aktive phosphorylierte Kinase nachgewiesen. Stimulierung der Jurkat- und JCaM1.6-Zellen führte zur schnellen Aktivierung der Erk1/2-



Kinasen, wohingegen in JCaM1.6 Zellen keine Erk 1/2 Aktivierung nach PHA-L Stimulierung feststellbar war (Abb. 13B).

Somit wurde die Lck-Defizienz in JCaM1.6-Zellen und die Expression und Funktionalität von Lck in Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen eindeutig nachgewiesen.



**Abbildung 13: Lck-Expression und –Funktion.**

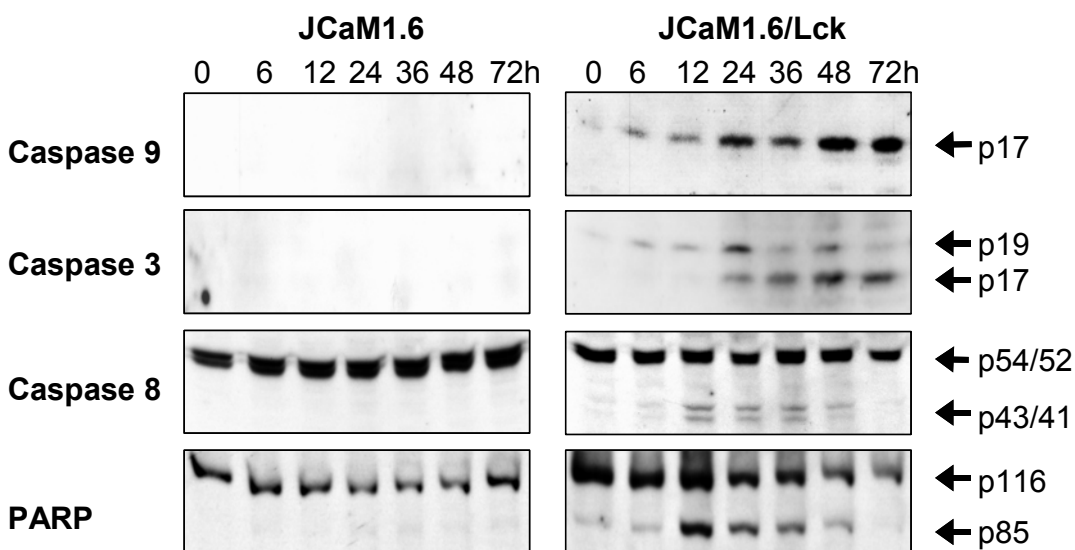
**A:** Die Lck-Expression wurde mittels eines Antikörpers verifiziert, der gegen den C-Terminus von Lck gerichtet ist. **B:** Erk1/2-Aktivierung nach TZR-Stimulierung durch 50 µg/ml PHA-L. Die Abbildung zeigt eines von je drei unabhängigen Experimenten.

### 6.3 Caspasenaktivierung durch ionisierende Strahlung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ionisierende Strahlung bei Lck-defizienten Zellen kaum zur Ausbildung der typischen apoptotischen Morphologie führt und die Viabilität der Lck-defizienten Zellen nach Bestrahlung erhalten bleibt, sollte der Einfluss der Lck –Defizienz auf die Aktivierung von Caspasen untersucht werden. Apoptose ist durch die Aktivierung von Caspasen definiert, deren proteolytische Aktivität essentiell für die Apoptoseinduktion und -ausführung ist. Während der strahleninduzierten Apoptose fungiert Caspase-9 als Initiatorcaspase und bewirkt

nach ihrer eigenen Aktivierung die Aktivierung weiterer Caspasen, wie Caspase-3 und -8.

Um den Einfluss von Lck auf die kaskadenartige Aktivierung der Caspasen nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde der Zeitverlauf der Caspasenaktivierung mittels Western-Blot bestimmt. Abbildung 14 zeigt die Aktivierung von Caspase-9 in Lck exprimierenden Zellen bereits 6 Stunden nach Bestrahlung. Dagegen war in Lck defizienten Zellen bis zu 72 h nach Bestrahlung keine Caspase-9-Aktivierung feststellbar.



**Abbildung 14: Caspasenaktivierung nach Bestrahlung.**

In JCaM1.6-Zellen erfolgt im Gegensatz zu JCaM1.6/Lck-Zellen nach Bestrahlung keine Caspasenaktivierung und keine Spaltung des Caspasensubstrats PARP. Die Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung wurde in zytosolischen Extrakten von JCaM1.6 und JCaM1.6/Lck-Zellen mittels Western-Blot bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus einem von drei unabhängigen Experimenten.

Die Effektorcaspase-3 wird von Caspase-9 aktiviert und ist für viele der morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich. Im Western-Blot konnte wie für Caspase-9 die Aktivierung von Caspase-3 in JCaM1.6/Lck-Zellen nach Bestrahlung eindeutig nachgewiesen werden, jedoch nicht in JCaM1.6-Zellen (Abb.14). Diese Beobachtung konnte durch Untersuchung des Caspase-3-Substrates PARP untermauert werden. In Lck-exprimierenden Zellen war die Spaltung von PARP bereits 12 Stunden nach Bestrahlung

nachweisbar, wohingegen in Lck-defizienten Zellen keine PARP-Spaltung detektierbar war (Abb.14).

Caspase-8 fungiert bei der Todesrezeptor-induzierten Apoptose als Initiatorcaspase, während der strahleninduzierten Apoptose jedoch auch als Effektorcaspase (Belka et al., 2000; Engels et al., 2000; Wieder et al., 2001). Daher wurde hier auch die Aktivierung von Caspase 8 untersucht. Entsprechend den bisherigen Ergebnissen konnte die Aktivierung von Caspase-8 in JCaM1.6/Lck-Zellen, jedoch nicht in JCaM1.6-Zellen, nachgewiesen werden.

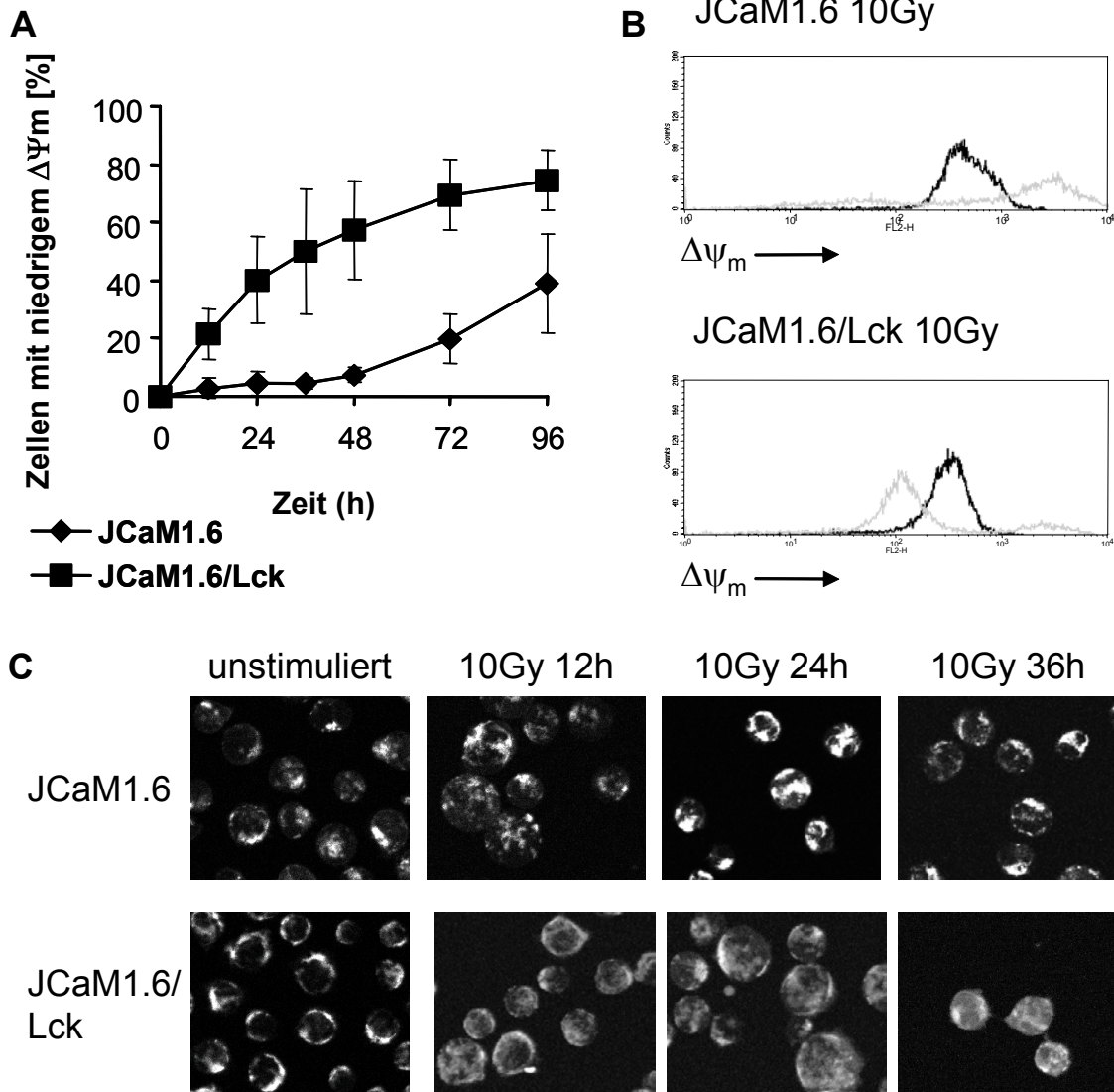
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine der zentralen Initiator- oder Effektorcaspasen in Lck-defizienten Zellen nach Bestrahlung aktiviert wird. In Lck-exprimierenden Zellen erfolgt die Aktivierung von Caspase-8 und -3 zeitlich nach Caspase-9, was der Einordnung von Caspase-9 als Initiatorcaspase und Caspase-3 und -8 als Effektorcaspasen entspricht.

#### **6.4 Mitochondriale Apoptoseschritte nach Bestrahlung**

Die Freisetzung von Cytochrom c und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) sind die entscheidenden Schritte für die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges und der Caspasenkaskade. Um herauszufinden, ob Lck die strahleninduzierte Apoptose bereits auf mitochondrialer Ebene beeinflusst, wurden hier die Veränderungen am Mitochondrium während der Apoptose in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit funktionell intakter Lck untersucht.

Der  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch wurde durchflusszytometrisch nach Färben der Zellen mit TMRE analysiert. TMRE wird nur in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential eingelagert und ermöglicht somit eine Unterscheidung zwischen Zellen mit intaktem und zusammengebrochenem Membranpotential. Bestrahlung induzierte in Lck-exprimierenden Zellen einen raschen  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch, wohingegen in JCaM1.6-Zellen beinahe kein  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nachweisbar war (Abb.15A, B). Bereits 48 h nach Bestrahlung war in  $57,3\pm 17$  % der Lck-

exprimierenden, aber nur in  $7,5 \pm 2,4$  % der Lck-defizienten Zellen  $\Delta\Psi_m$  zusammengebrochen.



**Abbildung 15: Mitochondriale Apoptoseschritte nach Bestrahlung.**

**A, B:** In JCaM1.6/Lck-Zellen, jedoch nicht in JCaM1.6-Zellen kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung. Darstellung der Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichung 12, 24, 36, 48, 72 und 96 h nach Bestrahlung (A) bzw. einer repräsentativen Messung 72 h nach Bestrahlung (B). Unbehandelte Zellen sind schwarz, bestrahlte Zellen grau dargestellt. **C:** Die Cytochrom-c-Freisetzung nach Bestrahlung wurde mittels Immunfärbung und anschließender konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Die Cytochrom-c-Freisetzung wurde durch Anfärben der Zellen mit einem gegen Cytochrom c gerichteten Primärantikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper bestimmt. Dabei zeigte sich in den bestrahlten JCaM1.6/Lck-Zellen eine diffuse Anfärbung der gesamten Zelle, was der Ausbreitung von Cytochrom c im Zytosol entspricht. Dagegen war die Verteilung von Cytochrom c in Lck-defizienten Zellen fokal, d.h. es war keine Cytochrom-c-Freisetzung vom mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol erfolgt (Abb. 15C).

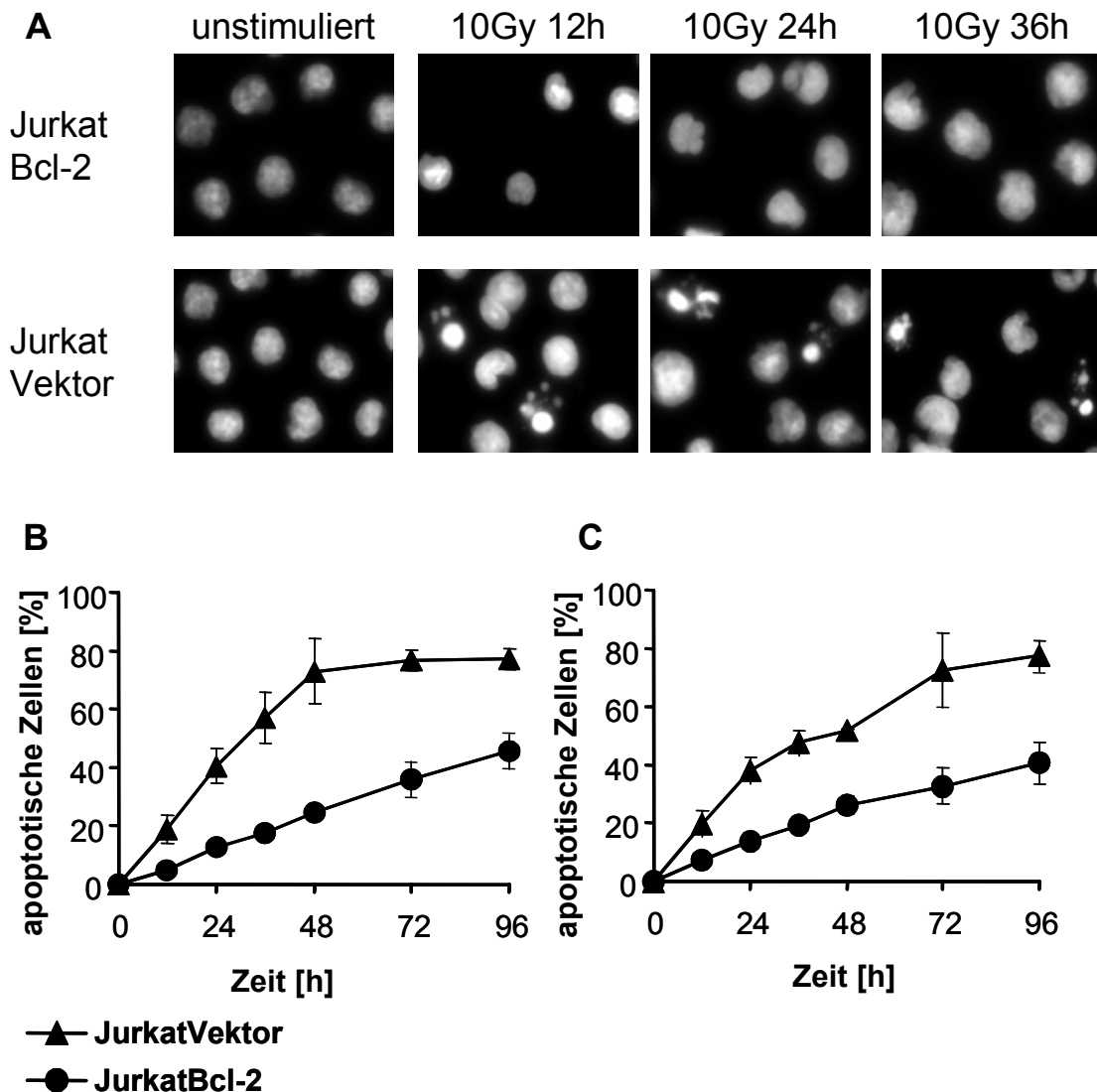
Diese Befunde belegen, dass die Lck-Defizienz zu schwerwiegenden Störungen der mitochondrialen Apoptoseschritte führt. Das heißt, Lck ist ein wichtiges Signalmolekül des mitochondrialen Apoptosesignalweges nach Bestrahlung.

### **6.5 Vergleich mit *Bcl-2* überexprimierenden Zellen**

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass Lck von wesentlicher Bedeutung für die mitochondrialen Veränderungen bei der strahleninduzierten Apoptose ist. Um den Einfluss von Lck auf mitochondriale Apoptoseschritte genauer zu untersuchen, wurde die Lck-Defizienz mit der Überexpression eines mitochondrialen Apoptoseinhibitors verglichen, dessen Wirkung auf die mitochondrialen Signaltransduktion bereits aufgeklärt ist. Da Bcl-2 ein bekannter Inhibitor der mitochondrialen Veränderungen während der Apoptose ist, wurden den Lck-defizienten Zellen JCaM1.6 die Bcl-2-überexprimierenden Zellen JurkatBcl-2-Zellen gegenübergestellt.

Die Apoptoseinduktion durch Bestrahlung wurde nach Färbung der DNA mit Hoechst33342 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigten die Bcl-2-überexprimierenden Zellen keine Chromatinkondensation, wohingegen die Chromatinkondensation in den zugehörigen Vektorzellen deutlich sichtbar war (Abb. 16A). Die Vektorzellen enthalten das Genom der Jurkat-Zellen und zusätzlich denselben Vektor wie die JurkatBcl-2-Zellen, allerdings ohne Bcl-2-Gen. Sie sollten sich somit wie die Jurkat-Zellen verhalten und dienen als Kontrolle

dafür, dass der Vektor selbst oder der Vorgang der Transfektion nicht für das abweichende Verhalten der JurkatBcl-2-Zellen verantwortlich ist.



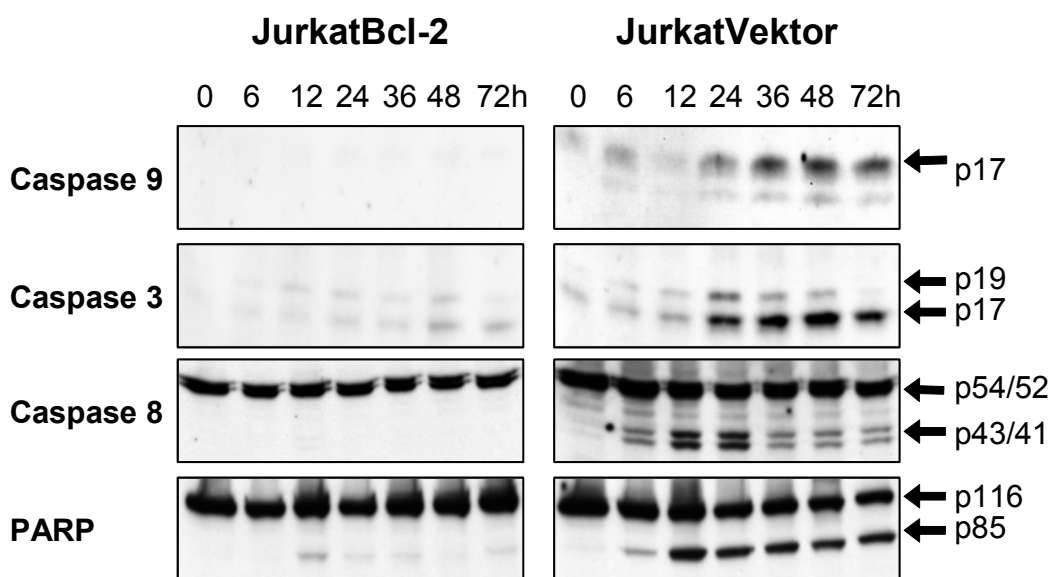
**Abbildung 16: Apoptoseinduktion nach Bestrahlung Bcl-2-überexprimierender Zellen.**

**A:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Kernmorphologie nach Inkubation mit Hoechst33342 (repräsentatives Ergebnis aus einem von drei Experimenten). **B, C:** Apoptoserate in JurkatBcl-2- und JurkatVektor-Zellen 12, 24, 48, 72 und 96 h nach Bestrahlung. Bestimmung der Apoptoserate (Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichung) anhand Scatter-Charakteristika (B) bzw. nach PI-Färbung (C).

Anschließend wurde die Apoptoseinduktion durchflusszytometrisch anhand Scatter-Charakteristika und PI-Fluoreszenz analysiert. Dabei zeigten die Bcl-2-

überexprimierenden Zellen 96 h nach Bestrahlung eine deutliche Reduktion der Apoptoserate ( $45,5 \pm 6,0$  % bzw.  $40,8 \pm 7,1$  %) im Vergleich zur Vektorkontrolle ( $77,1 \pm 3,4$  % bzw.  $77,4 \pm 5,3$  %) (Abb.16B).

Entsprechend den Lck defizienten Zellen erfolgte in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen auch keine Caspasenaktivierung nach Bestrahlung mit 10 Gy im Gegensatz zu den Vektorzellen, in denen bereits 6 h nach Bestrahlung Spaltprodukte von Caspasen nachgewiesen werden konnten (Abb. 17).

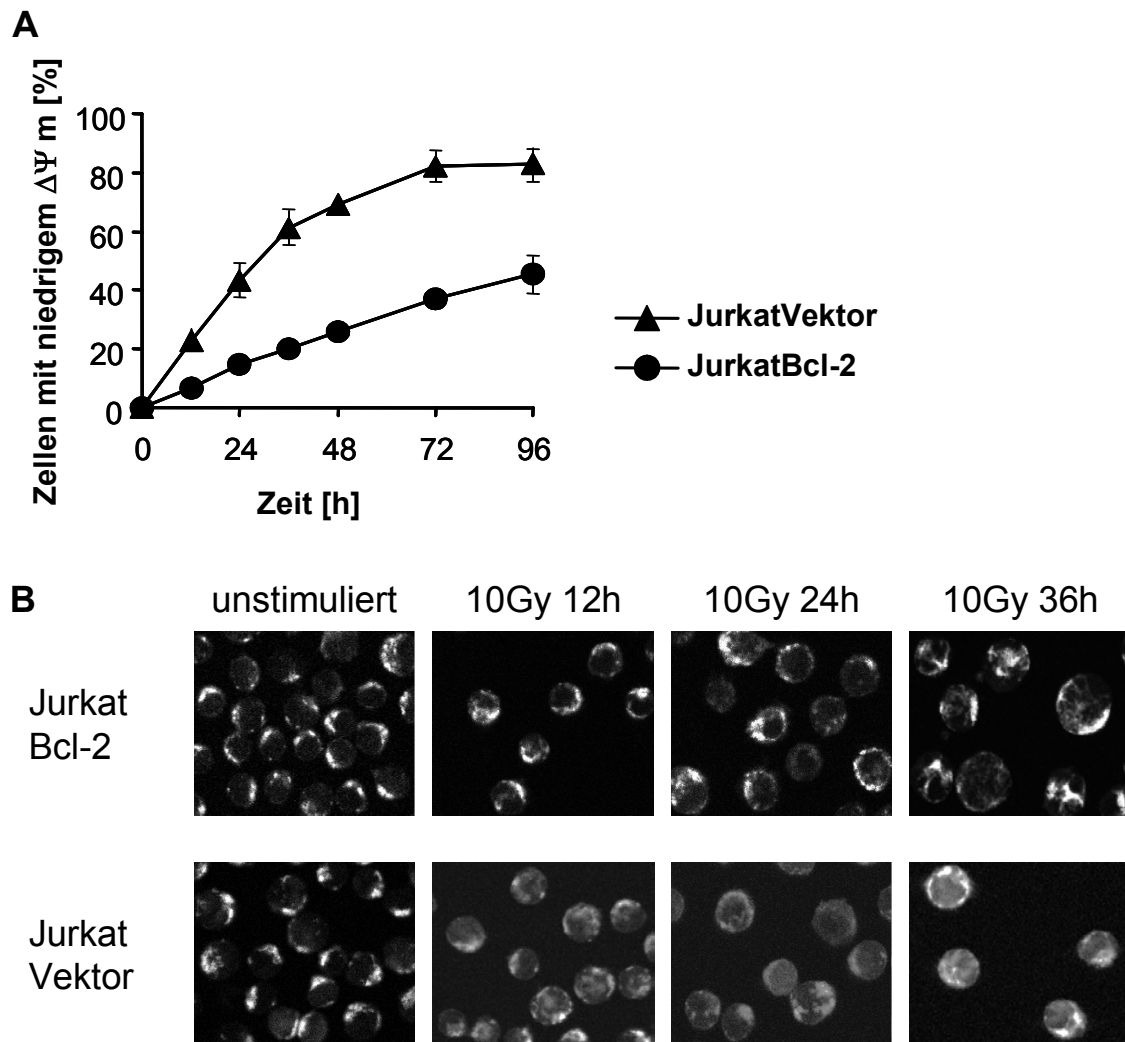


**Abbildung 17: Caspasenaktivierung nach Bestrahlung Bcl-2-überexprimierender Zellen.** Vergleich der Caspasenaktivierung bzw. PARP-Spaltung in JurkatBcl-2- und JurkatVektor-Zellen mittels Western-Blot-Analyse.

Bezüglich der mitochondrialen Apoptoseschritte wurden der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Cytochrom-c-Freisetzung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl der Zellen mit  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch und Cytochrom-c-Freisetzung bei den JurkatBcl-2 Zellen deutlich geringer war, als bei den JurkatVektor-Zellen (Abb.18). Dieser Befund entspricht den Ergebnissen in JCaM1.6-Zellen.

Somit wirkt sich die Bcl-2-Überexpression auf Apoptoseinduktion, Caspasenaktivierung und mitochondriale Apoptoseschritte ähnlich wie die Lck-

Defizienz aus. D. h. Bcl-2 und Lck greifen wahrscheinlich auf der gleichen Ebene in die Signaltransduktion der strahleninduzierten Apoptose ein.



**Abbildung 18: Mitochondriale Apoptoseschritte nach Bestrahlung Bcl-2-überexprimierender Zellen.**

**A:** Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Bestrahlung fällt in JurkatBcl-2-Zellen geringer aus als in JurkatVektor-Zellen. Darstellung der Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichungen. **B:** Konfokale Mikroskopie nach Cytochrom-c-Färbung bestrahlter Zellen (eines von drei unabhängigen Experimenten).



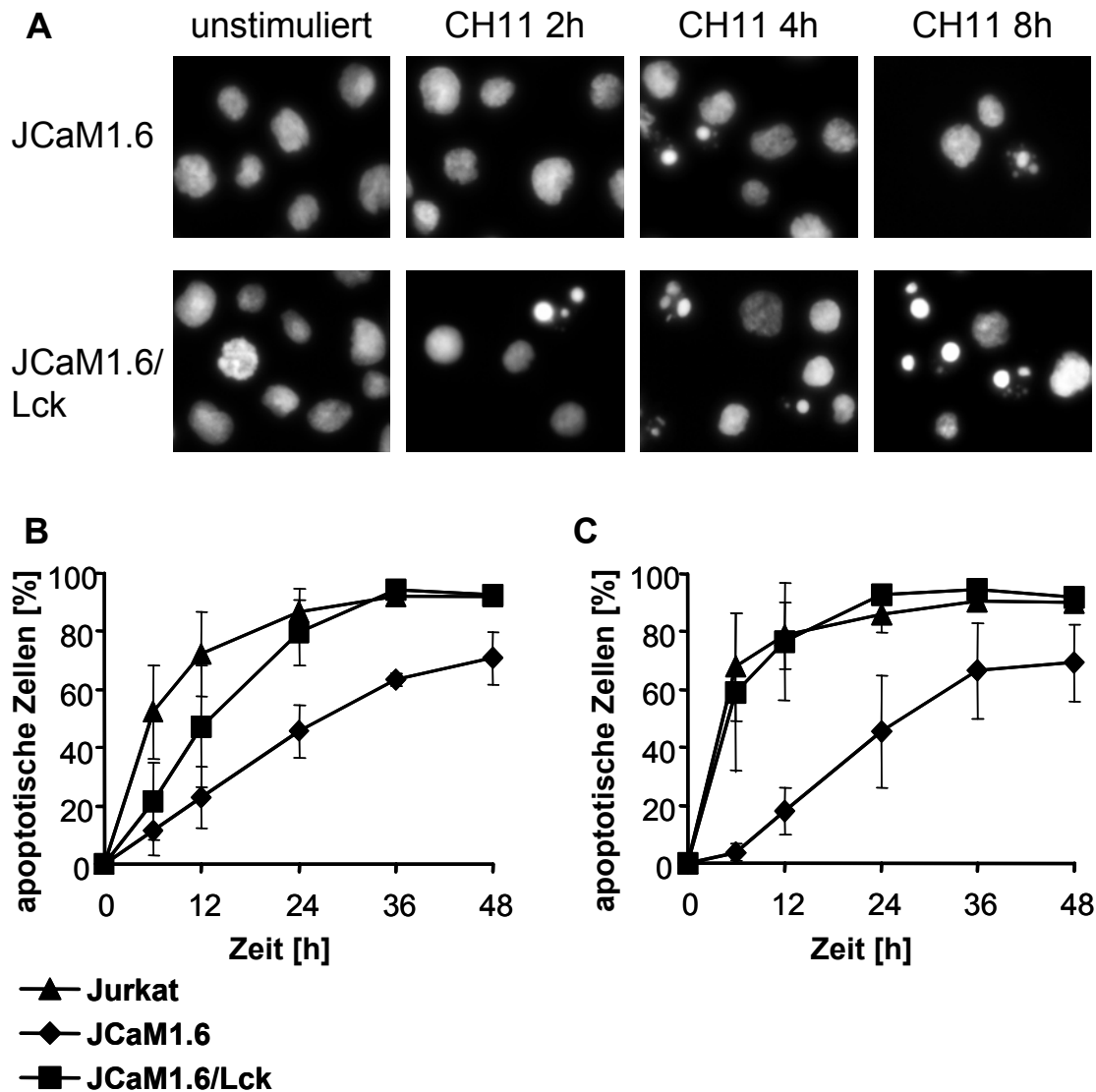
## **6.6 Untersuchung der basalen Expression von Proteinen der Bcl-2 Familie**

Mitochondriale Apoptoseschritte werden vor allem durch die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Um auszuschließen, dass Bcl-2 oder verwandte Proteine in JCaM1.6-Zellen vermehrt exprimiert werden und somit als Störvariablen fungieren, wurde die basale Expression von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bax und MCL-1 mittels Western-Blot analysiert. Dabei konnte keine Steigerung der basalen Expression dieser Proteine festgestellt werden.

## **6.7 Einfluss von Lck auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Lck an der Regulation der strahleninduzierten Apoptose beteiligt ist. Um herauszufinden, welche Rolle Lck bei anderen Apoptosesignalwegen spielt, wurde hier der Einfluss der Lck-Defizienz auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose untersucht.

In einer ersten Reihe von Untersuchungen wurde die Apoptoseinduktion durch Stimulation des CD95-Rezeptors (CD95) analysiert (Abb. 19). Dafür wurde der CD95-Rezeptor mit dem agonistischen IgM-Antikörper CH11 in einer Konzentration von 100 ng/ml Medium stimuliert. Hier wurden für die Messung frühere Zeitpunkte gewählt als für die Untersuchung der Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung, da bekannt ist, dass die rezeptorvermittelte Apoptose wesentlich schneller abläuft als die strahleninduzierte Apoptose. Die Untersuchung der apoptotischen Kernmorphologie nach Färbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst33342 zeigte bereits 2 h nach Stimulierung Chromatinkondensationen in JCaM1.6/Lck-Zellen, jedoch erst nach 4 h in JCaM1.6-Zellen (Abb. 19A).



**Abbildung 19: Einfluss von Lck auf die Apoptoseinduktion durch CD95-Stimulation.**

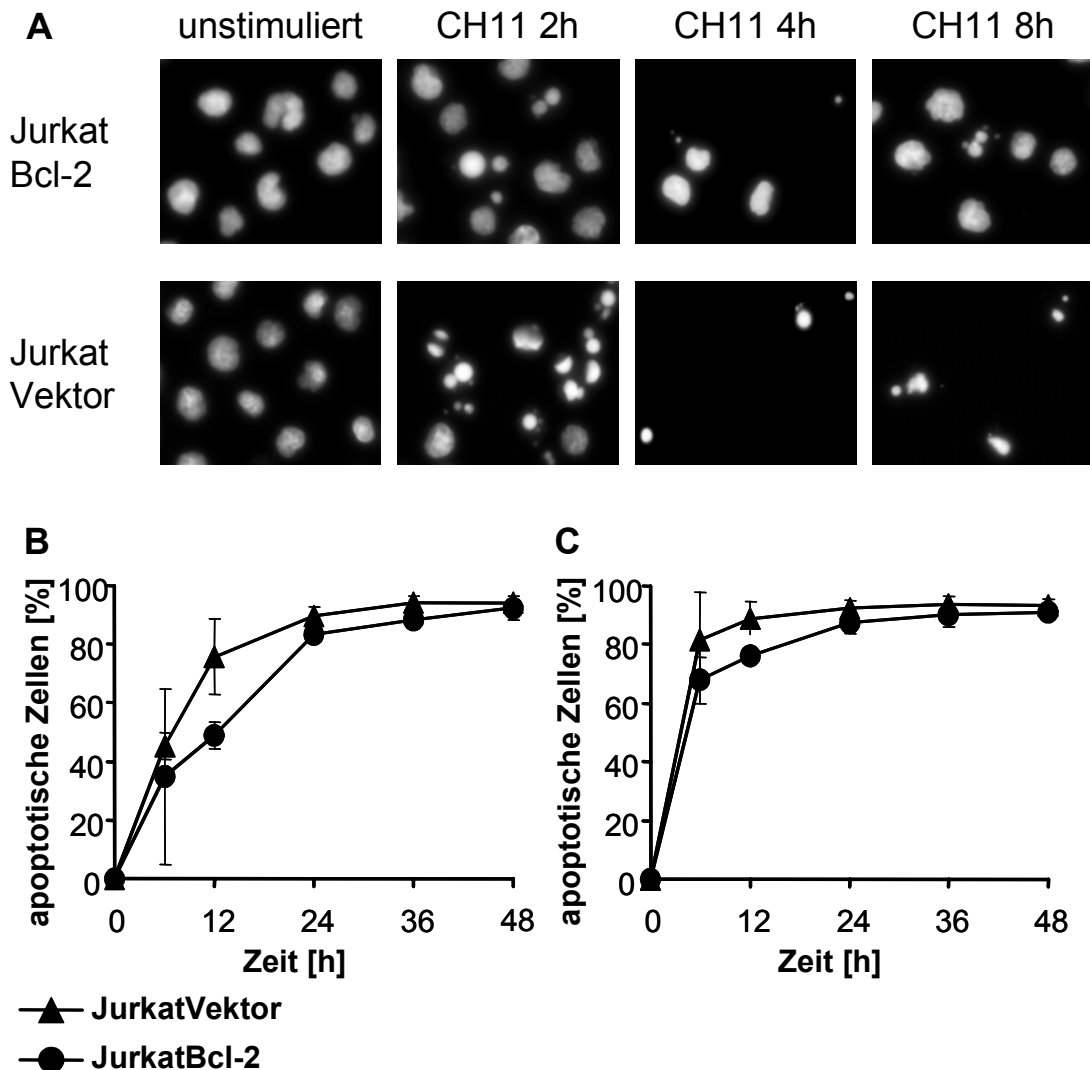
**A:** Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Kernmorphologie nach Inkubation mit Hoechst33342 (repräsentatives Ergebnis aus einem von drei unabhängigen Experimenten). **B, C:** Darstellung der Apoptoserate nach Stimulierung des CD95-Rezeptors mit dem agonistischen Antikörper CH11 (Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichung) anhand Scatter-Charakteristika (B) bzw. nach PI-Färbung (C).

Entsprechende Befunde ergaben sich bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptoseraten anhand von Scatter-Charakteristika und der Fähigkeit zur PI-Ausscheidung. Die Apoptoseinduktion in JCaM1.6/Lck- und Jurkat-Zellen verlief schnell und erreichte bereits nach 24h Werte von  $82,6 \pm 12,4$  %

(anhand Scatter Charakteristika) bzw.  $92,6 \pm 2,4$  % (anhand der Fähigkeit zur PI-Ausscheidung) in JCaM1.6/Lck-Zellen und  $86,7 \pm 8,2$  % bzw.  $86,1 \pm 6,6$  % in Jurkat-Zellen. 48 h nach Stimulierung des CD95-Rezeptors lag die Apoptoserate bei  $92,5 \pm 3,2$  % bzw.  $91,9 \pm 2,1$  % in JCaM1.6/Lck-Zellen und bei  $91,9 \pm 2,5$  % bzw.  $90,0 \pm 3,0$  % in Jurkat-Zellen. In Lck-defizienten JCaM1.6-Zellen lief die Apoptoseinduktion im Vergleich zu Lck-exprimierenden Zellen mit deutlicher Verzögerung ab,  $45,7 \pm 9,1$  % bzw.  $45,6 \pm 19,3$  % nach 24 h, erreichte schließlich jedoch Werte von  $70,7 \pm 9,1$  % bzw.  $69,3 \pm 13,3$  % nach 48 Stunden (Abb. 19B+C).

Zum Vergleich der Auswirkung der Lck-Defizienz mit einer Bcl-2-Überexpression auf die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion ist in Abb. 20 die Apoptoseinduktion in Bcl-2-überexprimierenden Zellen nach CD95-Stimulation dargestellt. In Bcl-2-überexprimierenden Zellen war bereits 2 h nach Stimulation des CD95 die Chromatinkondensation sichtbar, ebenso wie in den Vektorzellen (Abb. 20A). Durchflußzytometrisch ergab sich bezüglich der Scatter-Charakteristika keine ausgeprägte Verminderung der Apoptoseinduktion in Bcl-2-überexprimierenden Zellen mit  $48,8 \pm 4,6$  % apoptotischer Zellen 12 h nach Stimulation gegenüber  $75,7 \pm 13,0$  % bei den Vektorzellen (Abb. 20B). Bei der Messung der Viabilität nach Färbung mit PI lag die gemessene Apoptoserate in JurkatBcl-2-Zellen mit  $76,2 \pm 1,5$  % nach 12 h nur gering unter der Apoptoserate von  $88,9 \pm 5,8$  % in JurkatVektor-Zellen (Abb. 20C). Nach 48 h war die Apoptoserate in JurkatBcl-2-Zellen ( $92,4 \pm 4,0$  % bzw.  $91,2 \pm 2,4$  %) vergleichbar mit der in JurkatVektor-Zellen ( $94,0 \pm 1,2$  % bzw.  $93,3 \pm 2,0$  %).

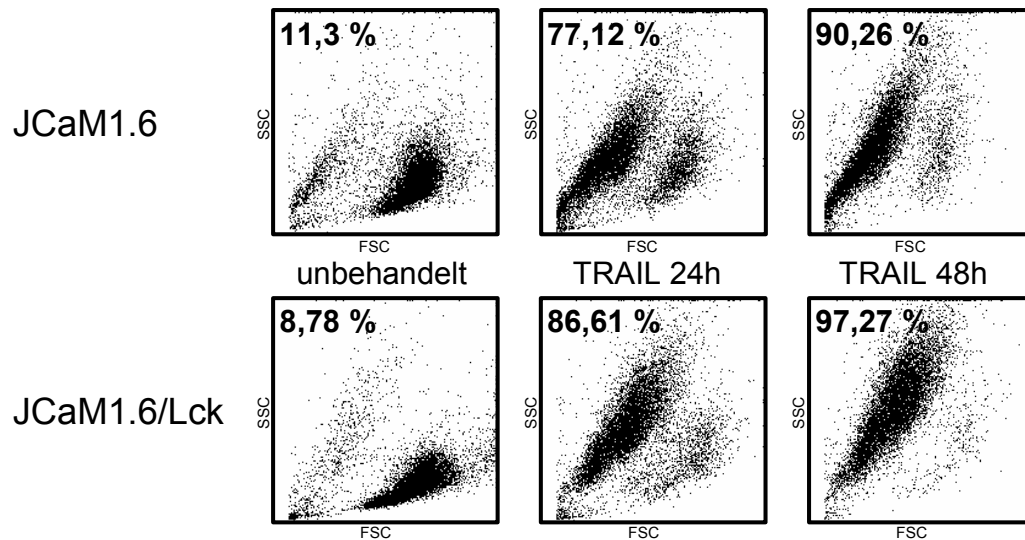
Somit bewirkt die Lck-Defizienz eine deutliche Verlangsamung der Apoptosekinetik nach CD95-Stimulation mit einer jedoch nur leicht reduzierten Apoptoserate nach längerer Beobachtung. Hier weichen die Untersuchungsergebnisse der Lck-defizienten Zellen allerdings von denen der Bcl-2-überexprimierenden Zellen ab, die kaum Verlangsamung der Apoptoseinduktion und keine Reduktion der Apoptoserate nach längerer Exposition zeigen.



**Abbildung 20: Apoptoseinduktion durch CD95-Stimulation in Bcl-2-überexprimierenden Zellen.**

**A:** Fluoreszenzmikroskopie der Kernmorphologie nach Färbung mit Hoechst33342 (n=3). **B, C:** Apoptoserate (B: Scatter-Charakteristika, C: PI-Färbung) nach Stimulierung mit CH11 (Mittelwerte (n≥4) mit Standardabweichung).

Exemplarisch wurde auch die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit 100 ng/ml TRAIL in einem Einzelexperiment anhand Scatter-Charakteristika im FACS untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls eine Verlangsamung der Apoptosekinetik in JCaM1.6-Zellen im Vergleich zu JCaM1.6/Lck-Zellen (Abb.21).



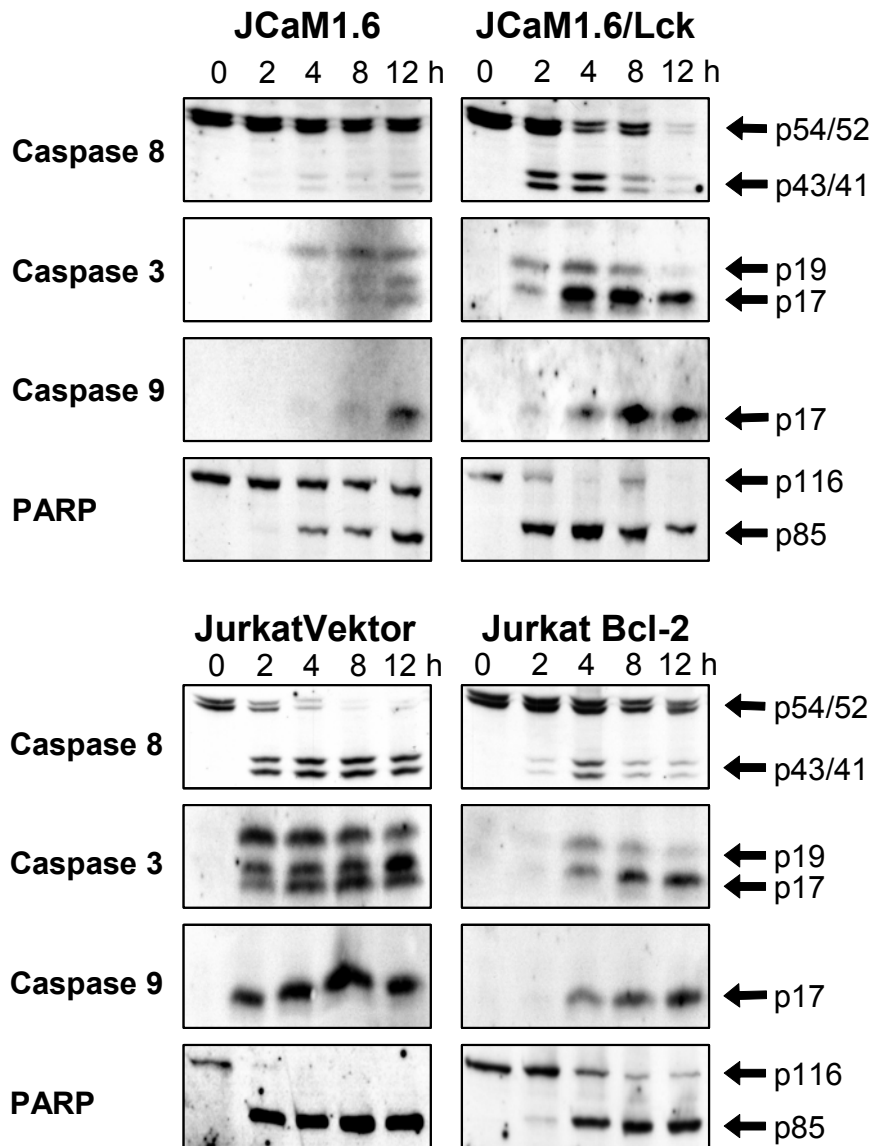
**Abbildung 21: TRAIL-induzierte Apoptoserate.**

FACS-Analyse von JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen nach Inkubation mit TRAIL für 24 bzw. 48 h.

Anschließend wurde auch bei der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose die Caspasenaktivierung mittels Western-Blot untersucht (Abb. 22).

In allen Zelllinien fand eine Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung nach CD95-Rezeptor-Stimulierung statt. Dabei konnte in JCaM1.6- und JurkatBcl-2-Zellen eine verspätete Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung im Vergleich zu JCaM1.6/Lck- und JurkatVektor-Zellen beobachtet werden. In JCaM1.6/Lck- und JurkatVektor-Zellen kam es bereits 2 h nach Stimulierung des CD95-Rezeptors zur Spaltung von Caspasen und PARP. Dagegen fand die früheste detektierbare Caspasenspaltung in JCaM1.6- und JurkatBcl-2-Zellen 4 h nach Todesrezeptor-Stimulation statt und fiel geringer aus, als in JCaM1.6/Lck- und JurkatVektor-Zellen. Zur genaueren Analyse der Bedeutung von Lck für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose wurden mitochondriale Veränderungen während der Apoptose untersucht. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach CD95-Stimulierung erfolgte dabei in JCaM1.6-Zellen mit deutlicher Verzögerung und auch in JurkatBcl-2-Zellen mit - wenn auch geringer ausgeprägter - Verzögerung im Vergleich zu JCaM1.6/Lck- und JurkatVektor-Zellen (Abb. 23A+D). Die exemplarische Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials nach Stimulierung der TRAIL-Rezeptoren ergab ebenfalls

einen leicht verspäteten  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch in JCaM1.6-Zellen im Vergleich zu JCaM1.6/Lck-Zellen (Abb. 23B).

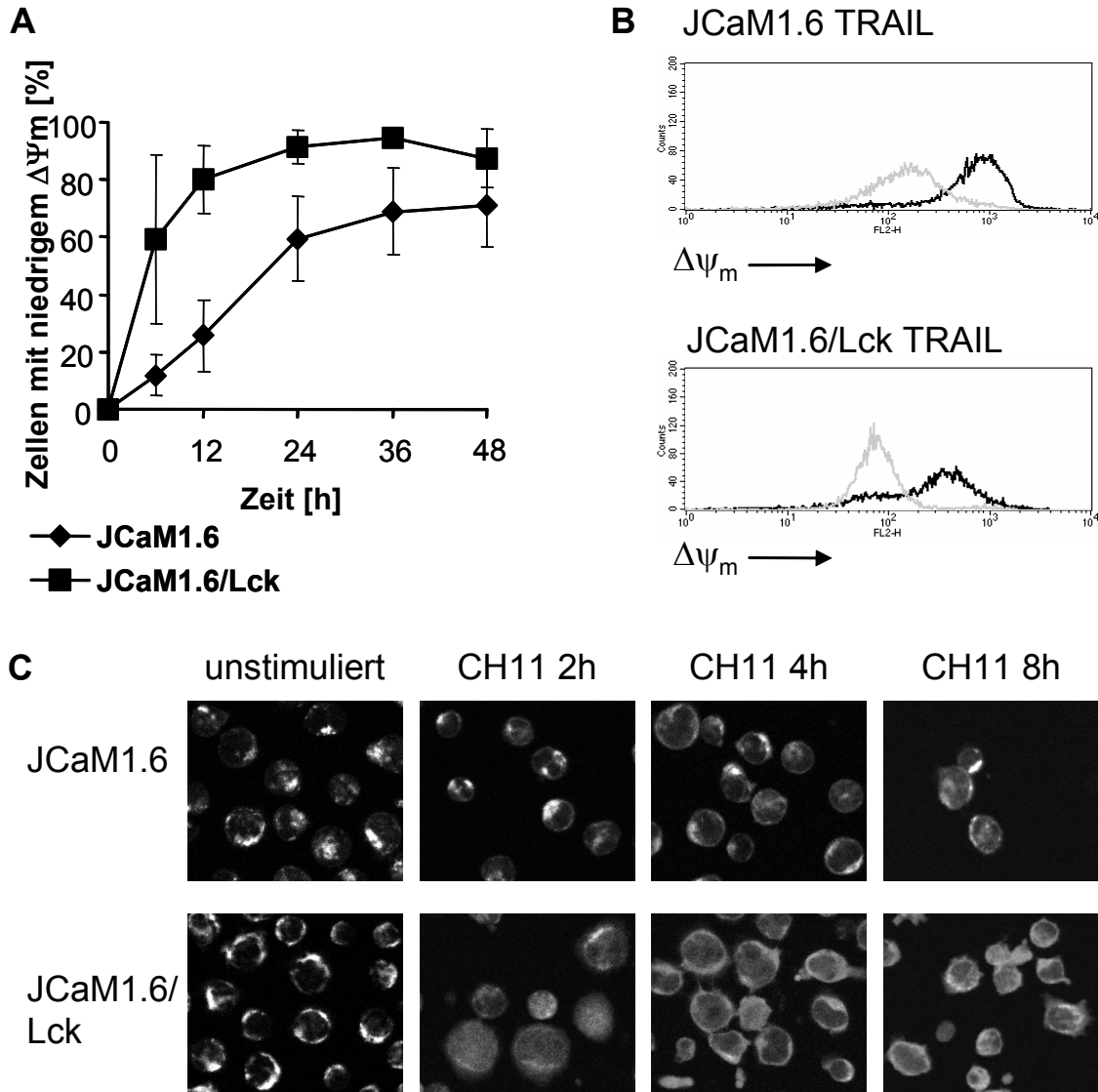


**Abbildung 22: Einfluss von Lck auf die Caspasenaktivierung nach CD95-Stimulation.**

Western-Blot-Analyse der Caspasenaktivierung bzw. PARP-Spaltung, Darstellung je eines von drei unabhängigen Experimenten. Die Caspasenaktivierung erfolgt in JCaM1.6- und JurkatBcl-2-Zellen später als in JCaM1.6/Lck- und JurkatVektor-Zellen.

Eine Cytochrom-c-Freisetzung fand nach CD95-Stimulation in allen untersuchten Zelllinien statt. Doch auch diese erfolgte in Lck-defizienten Zellen später als in Lck-

exprimierenden Zellen (Abb. 23 C). In Bcl-2-überexprimierenden Zellen konnte keine Verzögerung der Cytochrom-c-Freisetzung festgestellt werden (Abb. 23 E).



**Abbildung 23: Einfluss von Lck auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose.**

**A, D:** Zeitverlauf des  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs nach CD95-Stimulierung in JCaM1.6 und JCaM1.6/Lck-Zellen (A) bzw. JurkatBcl-2- und JurkatVektor-Zellen (D). **B:**  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch in JCaM1.6 und JCaM1.6/Lck-Zellen 48 h nach Stimulierung der TRAIL-Rezeptoren. Unstimulierte Kontrollzellen sind schwarz dargestellt, stimulierte Zellen sind grau dargestellt. **C, E:** Konfokalmikroskopische Analyse der Cytochrom-c-Freisetzung in JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen (C) bzw. JurkatBcl-2- und JurkatVektor-Zellen (E) nach CD95-Stimulierung. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichungen (A, D) bzw. ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen (B, C, E).

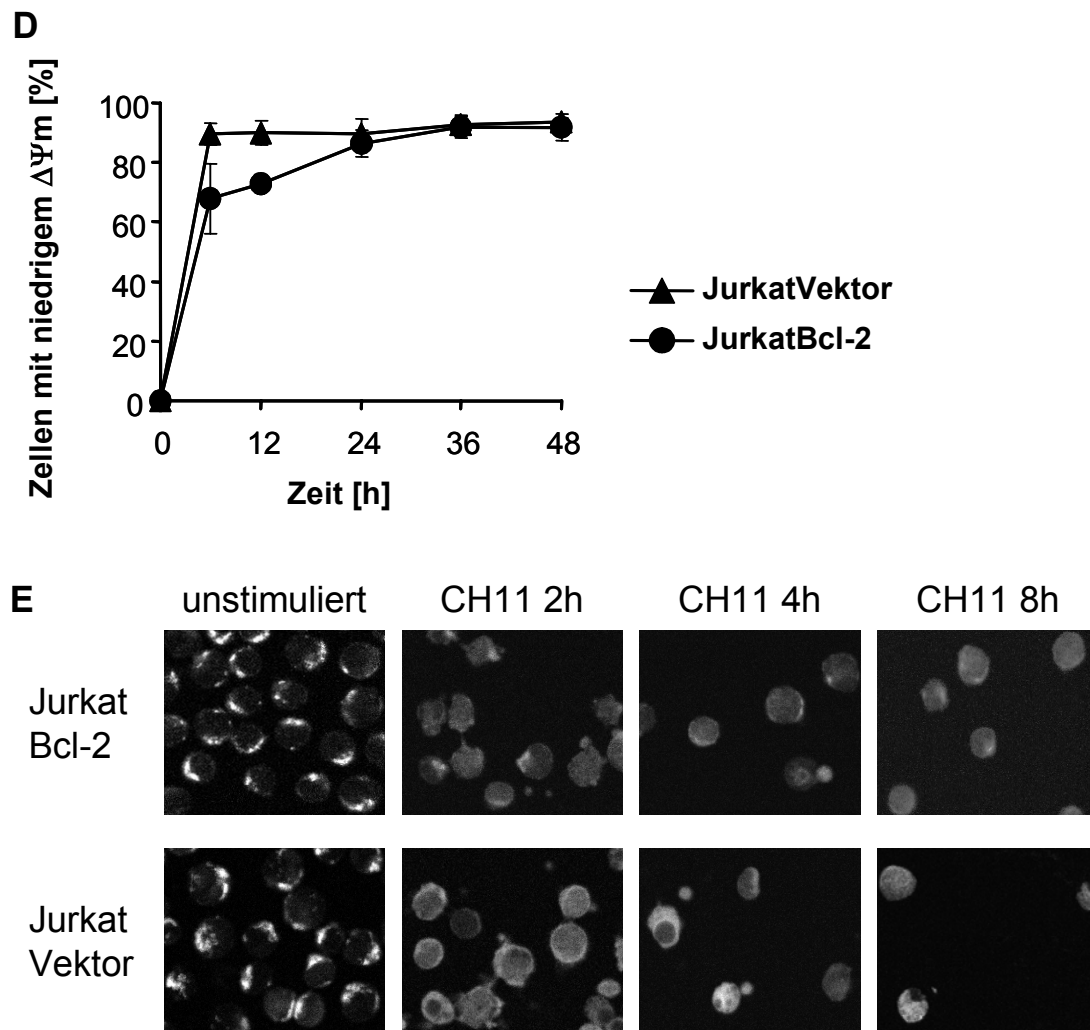
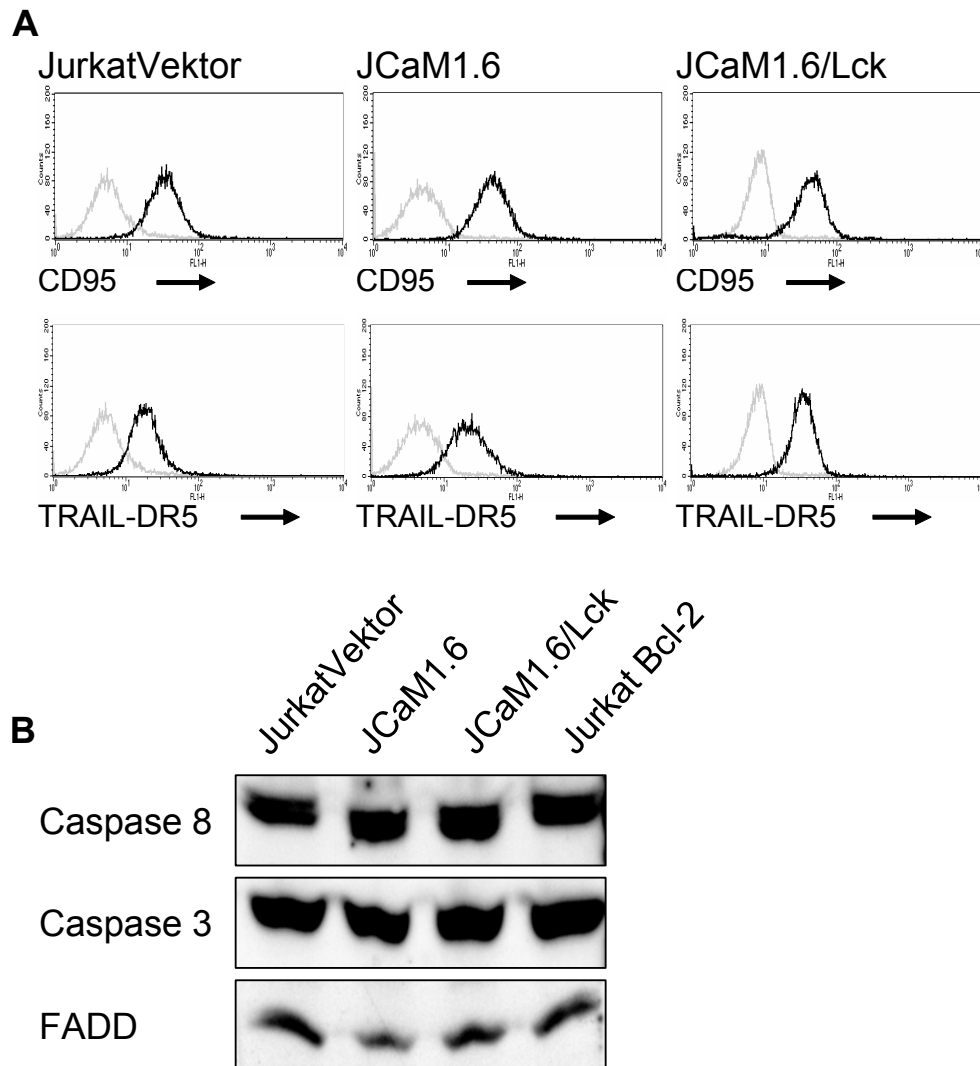


Abbildung 23 (Fortsetzung)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose durch die Lck-Defizienz nicht verhindert wird, aber verlangsamt abläuft. Dabei treten alle Apoptosecharakteristika wie morphologische Veränderungen, Caspasenaktivierung und mitochondriale Veränderungen verspätet auf. Dies entspricht der Situation in Bcl-2-überexprimierenden Zellen, wobei jedoch die Verzögerung der Apoptose in Bcl-2-überexprimierenden Zellen geringer ausfällt als in Lck-defizienten Zellen.





**Abbildung 24: Basale Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen, die an der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose beteiligt sind.**

**A:** FACS-Analyse der CD95- und TRAIL-Rezeptor-Expression in JurkatVektor-, JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen nach Inkubation von Zellen mit einem Antikörper gegen den Rezeptor (schwarz) bzw. unspezifische Kontrolle (grau). **B:** Western-Blot-Analyse der Expression von Caspase-8, Caspase-3 und FADD in JurkatVektor-, JCaM1.6-, JCaM1.6/Lck- und JurkatBcl-2-Zellen. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

### **6.8 Untersuchung der basalen Expression von Proteinen, die an der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose beteiligt sind**

Um auszuschließen, dass Unterschiede im Expressionslevel von Schlüssel-molekülen der Todesrezeptorvermittelten Apoptose für die beobachteten

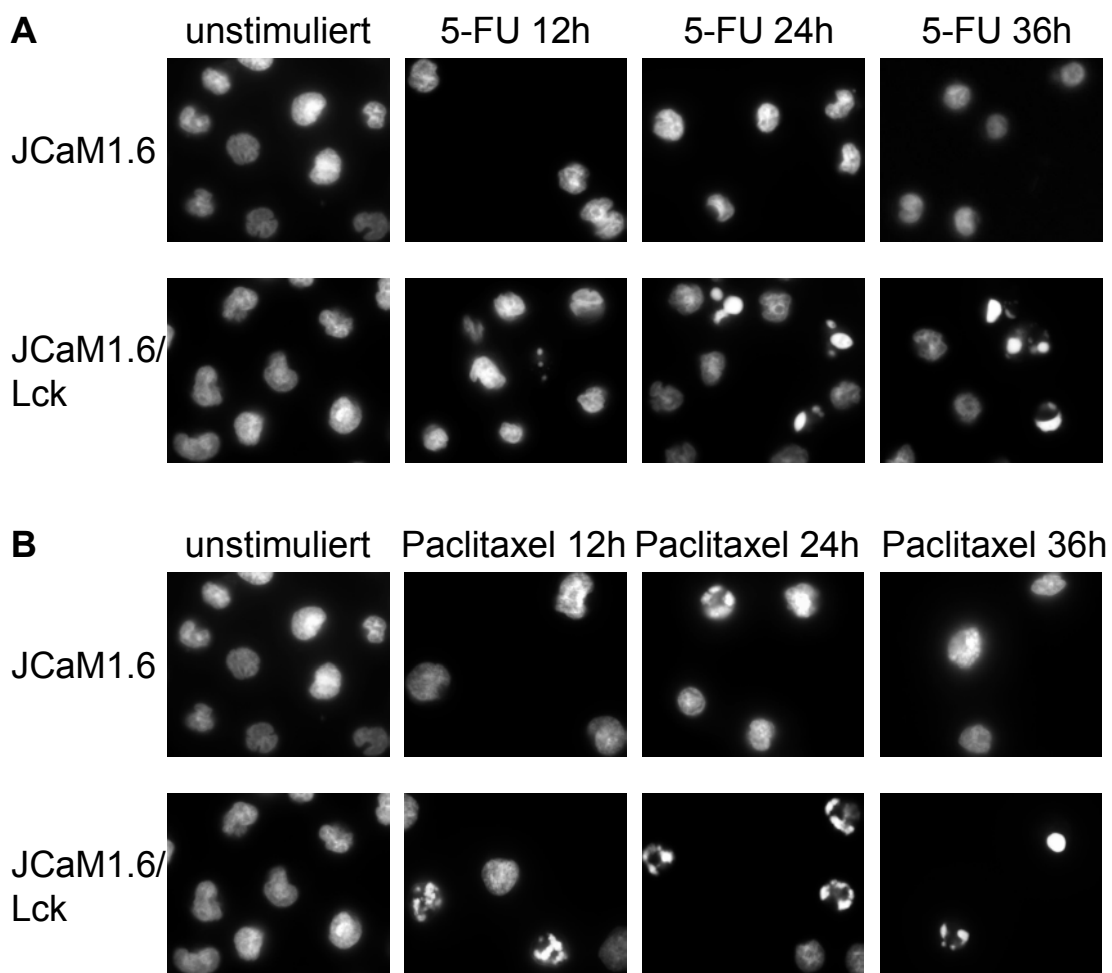
Unterschiede der Apoptoseinduktion verantwortlich sind, wurde die basale Expression dieser Proteine mittels Western-Blot und FACS-Analyse bestimmt. Dabei konnten keine Unterschiede bezüglich der basalen Expression von CD95, DR4, DR5, FADD, Caspase-8 und Caspase-3 festgestellt werden (Abb. 24).

### **6.9 Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Beteiligung der Tyrosinkinase Lck an der Signaltransduktion bzw. Regulation der strahlungsinduzierten Apoptose und der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Die strahlungsinduzierte Apoptose wird über mitochondriale Signalwege vermittelt. Daher scheint Lck mitochondriale Apoptoseschritte zu kontrollieren. Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose bewirkt zwar hauptsächlich eine direkte Caspasenaktivierung, allerdings existiert ein paralleler Verstärkungsweg über das Mitochondrium. Die Beteiligung von Lck an mitochondrialen Apoptoseschritten könnte daher Ursache der verlangsamten Kinetik der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose bei Lck-Defizienz sein. Fraglich bleibt jedoch noch, ob die Regulation apoptotischer Signalwege durch Lck ein allgemeingültiges Prinzip und somit übertragbar auf die Apoptoseinduktion durch weitere Stimuli ist. Um dies zu prüfen, wurden die Zellen mit Chemotherapeutika behandelt, die unterschiedliche primäre Angriffspunkte haben, aber letztendlich alle über mitochondriale Signalwege Apoptose induzieren. Hier wurden das Anthrazyklin Doxorubicin, der Antimetabolit 5-Fluorouracil (5-FU) und das Spindelgift Paclitaxel in den für Zellkulturversuche üblichen Konzentrationen eingesetzt.

Zunächst wurden die Zellen mikroskopisch nach DNA-Färbung mit Hoechst33342 untersucht. Dabei zeigten JCaM1.6/Lck-Zellen bereits 12 h nach Behandlung mit 10  $\mu$ M 5-FU oder 100 nM Paclitaxel deutliche Chromatinkondensationen, wohingegen in JCaM1.6-Zellen bis zu 36 h nach Stimulation keine apoptotischen Zellkerne sichtbar waren (Abb. 25 A+B). In Doxorubicin-behandelten JCaM1.6/Lck-Zellen, nicht jedoch in JCaM1.6-Zellen, war ebenfalls die Chromatinkondensation

zu sehen. Allerdings kam es bei der Fluoreszenzmikroskopie zu einer Überlagerung der Fluoreszenz des Doxorubicin und des Farbstoffes Hoechst33342. Deshalb können die Doxorubicin-stimulierten Zellen mit der Hoechst33342-Färbung nicht sicher beurteilt werden. Doch im Hinblick auf die mögliche Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels FACS kann die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Chromatinkondensation als entbehrlich betrachtet werden, zumal sich in den Scatter-Charakteristika unter anderem die Kernmorphologie widerspiegelt.



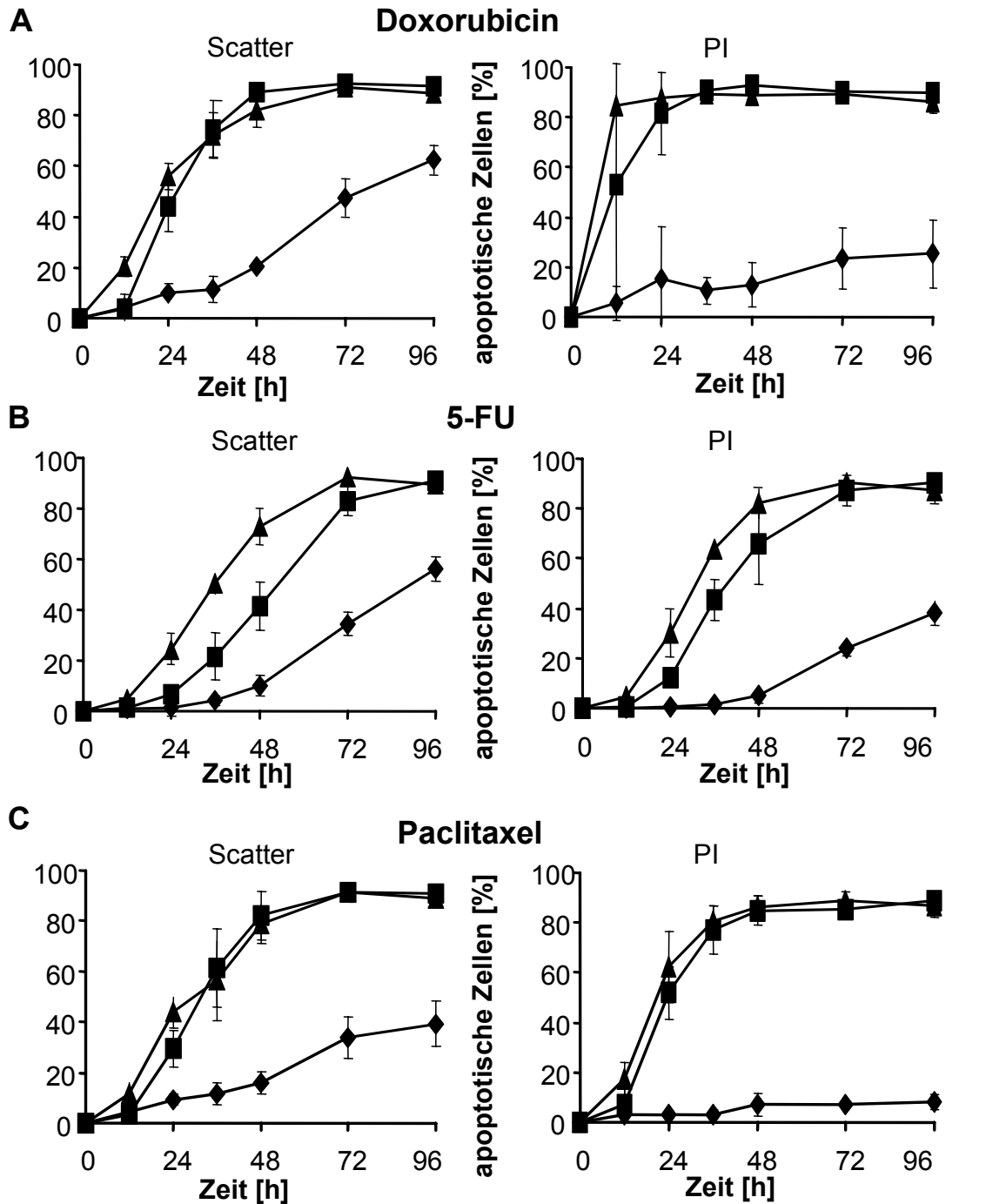
**Abbildung 25: Kernmorphologie nach Behandlung mit Chemotherapeutika**

Floureszenzmikroskopie der Kernmorphologien von JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen 12, 24 und 36 h nach Behandlung mit 10  $\mu$ M 5-FU (A) oder 100 nM Paclitaxel (B). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Chemotherapeutika wurde in Jurkat-, JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen bis zu 96 h nach Stimulation mittels FACS-Analyse bezüglich Scatter-Charakteristika quantifiziert. 0,5 µg/ml Doxorubicin induzierte bereits 48 Stunden nach Stimulation Apoptoseraten von  $82,0 \pm 6,5$  % in Jurkat-Zellen und  $89,1 \pm 3,4$  % in JCaM1.6/Lck-Zellen. Nach 96 Stunden erreichten die Apoptoseraten  $88,6 \pm 2,5$  % in Jurkat-Zellen und  $91,5 \pm 1,8$  % in JCaM1.6/Lck-Zellen. Dagegen fand in JCaM1.6-Zellen bis 48 h nach Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxorubicin fast keine Apoptose statt ( $20,3 \pm 1,8$  %) und nach 96 h lag die Apoptoserate lediglich bei  $62,6 \pm 5,7$  %. Entsprechende Ergebnisse lieferte auch die durchflußzytometrische Bestimmung der Fähigkeit zur PI-Ausscheidung. Dabei ergaben sich allerdings noch geringere Apoptoseraten für die JCaM1.6-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin (Abb. 26A).

5-FU führte ebenfalls zur Apoptoseinduktion in Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen, wo nach 72 h ein Plateau erreicht wurde und die Apoptoserate nach 96 h  $89,5 \pm 3,3$  % in Jurkat-Zellen und  $90,8 \pm 2,7$  % in JCaM1.6/Lck-Zellen betrug. Dagegen fand auch hier in JCaM1.6-Zellen bis 48h nach Stimulation kaum Apoptose statt und nach 96 h lag die Apoptoserate bei  $56,3 \pm 4,7$  %. Die durchflußzytometrische Messung der Viabilität ergab auch hier vergleichbare Ergebnisse, wobei jedoch wieder die Apoptoserate in JCaM1.6-Zellen noch geringer ausfiel, als bei der Scatter-Analyse (Abb. 26B).

Nach Behandlung der Zellen mit 100 nM Paclitaxel erfolgte die Apoptoseinduktion in Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen ebenfalls sehr rasch und erreichte bereits nach 48 Stunden Werte von  $78,8 \pm 7,6$  % in Jurkat-Zellen und  $82,1 \pm 9,8$  % in JCaM1.6/Lck-Zellen. 96 h nach Stimulation lag die Apoptoserate bei  $88,9 \pm 2,0$  % der Jurkat-Zellen und  $90,8 \pm 1,8$  % der JCaM1.6/Lck-Zellen. Dagegen fand in JCaM1.6 Zellen bis 48h nach Behandlung mit Paclitaxel kaum Apoptose statt ( $16,1 \pm 4,3$  %) und die maximale Apoptoserate nach 96h lag lediglich bei  $39,3 \pm 8,9$  %. Auch hier ergab die FACS-Messung nach PI-Färbung ähnliche Ergebnisse (Abb. 26 C).



**Abbildung 26: Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika.**

FACS-Analyse der Apoptoserate anhand von Scatter-Charakteristika bzw. mit PI-Färbung nach Behandlung mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin (A), 10  $\mu\text{M}$  5-FU (B) oder 100nM Paclitaxel (C). Darstellung der Mittelwerte ( $n=4$ ) mit Standardabweichungen.

▲ Jurkat  
◆ JCaM1.6  
■ JCaM1.6/Lck

Somit bewirkt eine Lck-Defizienz eine deutliche Reduktion der Apoptoserate nach Behandlung mit Doxorubicin, Paclitaxel und 5-Fluorouracil. D. h. die Tyrosinkinase Lck ist an der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika maßgeblich beteiligt.

### 6.10 Caspasenaktivierung durch Chemotherapeutika

Um die Bedeutung von Lck für die Apoptoseinduktion durch Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU zu konkretisieren, wurde die Caspasenaktivierung nach Stimulation Lck-defizienter und Lck-exprimierender Zellen mit diesen Chemotherapeutika untersucht. Bereits 24 h nach Behandlung der Zellen mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin konnte in JCaM1.6/Lck-Zellen eine deutliche Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung im Western-Blot nachgewiesen werden. Dagegen war in JCaM1.6-Zellen keine Caspasenaktivierung nach Stimulation mit Doxorubicin feststellbar (Abb. 27A).

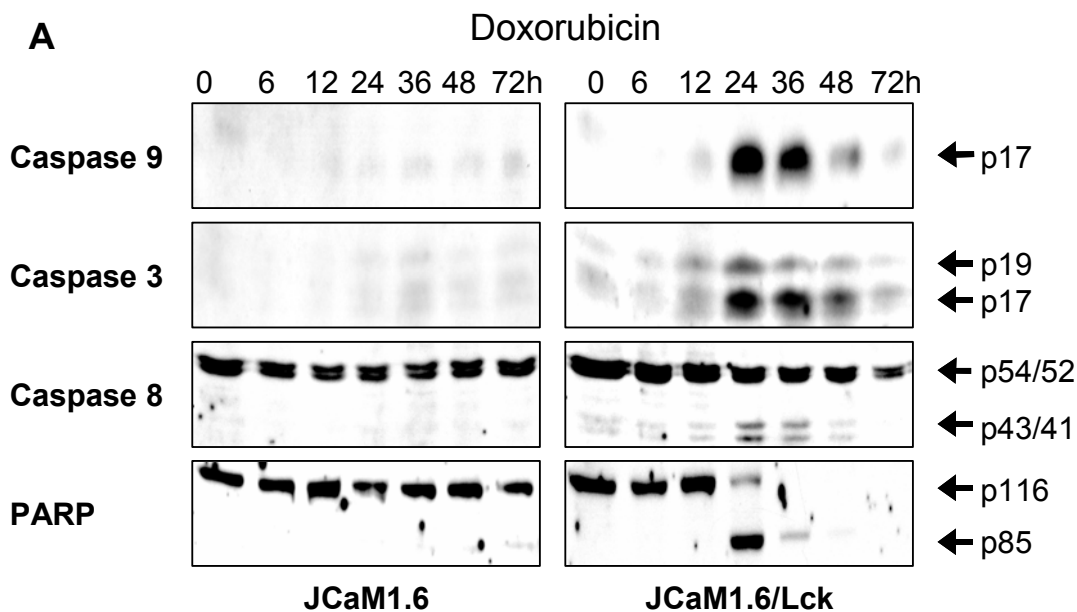
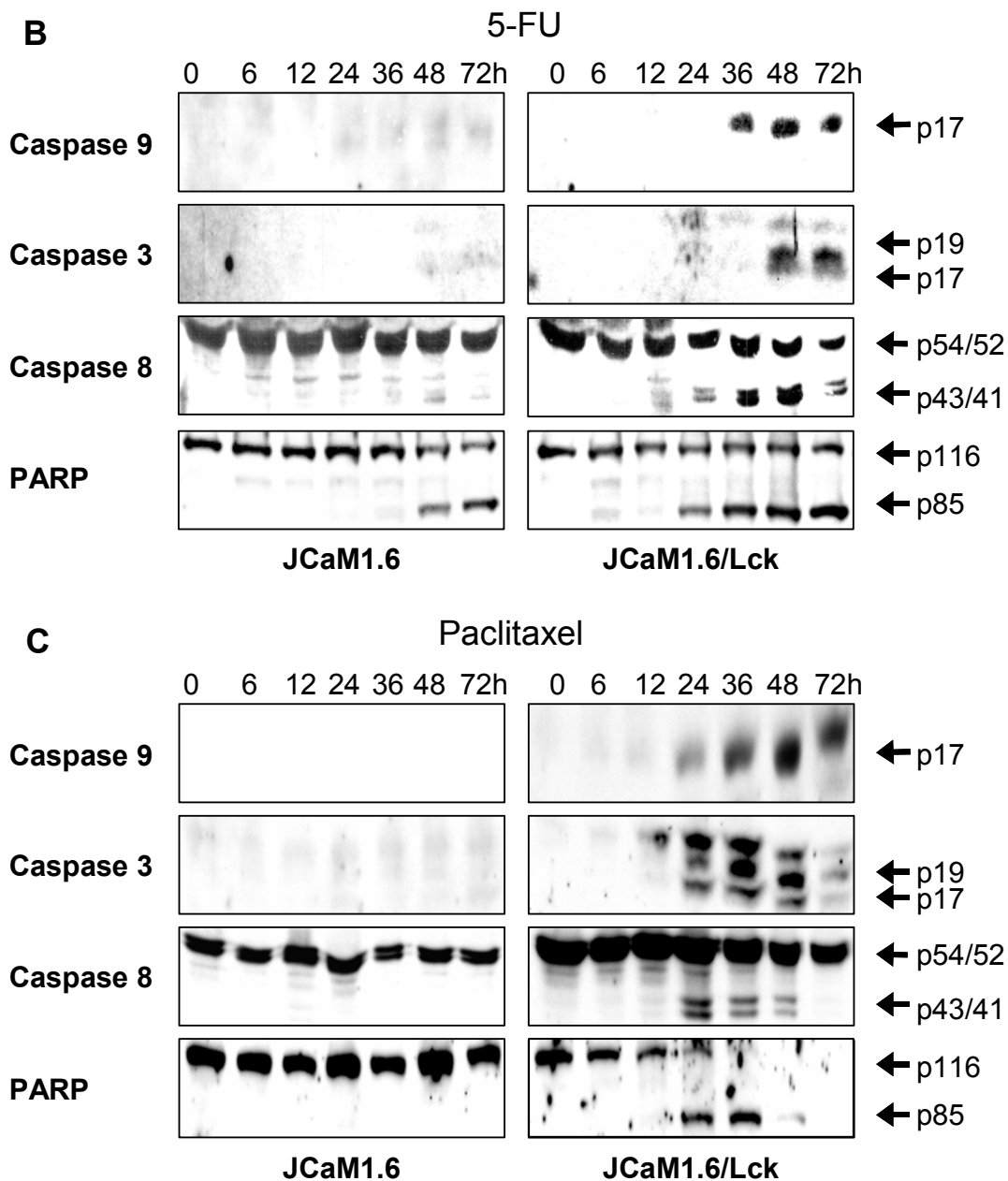


Abbildung 27: Caspasenaktivierung nach Inkubation mit Chemotherapeutika.



**Abbildung 27 (Fortsetzung): Caspasenaktivierung nach Inkubation mit Chemotherapeutika**  
 Western-Blot-Analyse der Caspasenaktivierung bzw. PARP-Spaltung in JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen nach Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxorubicin (A), 10 µM 5-FU (B) oder 100nM Paclitaxel (C). Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach Stimulierung mit 5-FU zeigte sich das gleiche Bild: in JCaM1.6-Lck-Zellen kam es zur raschen Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung und in den

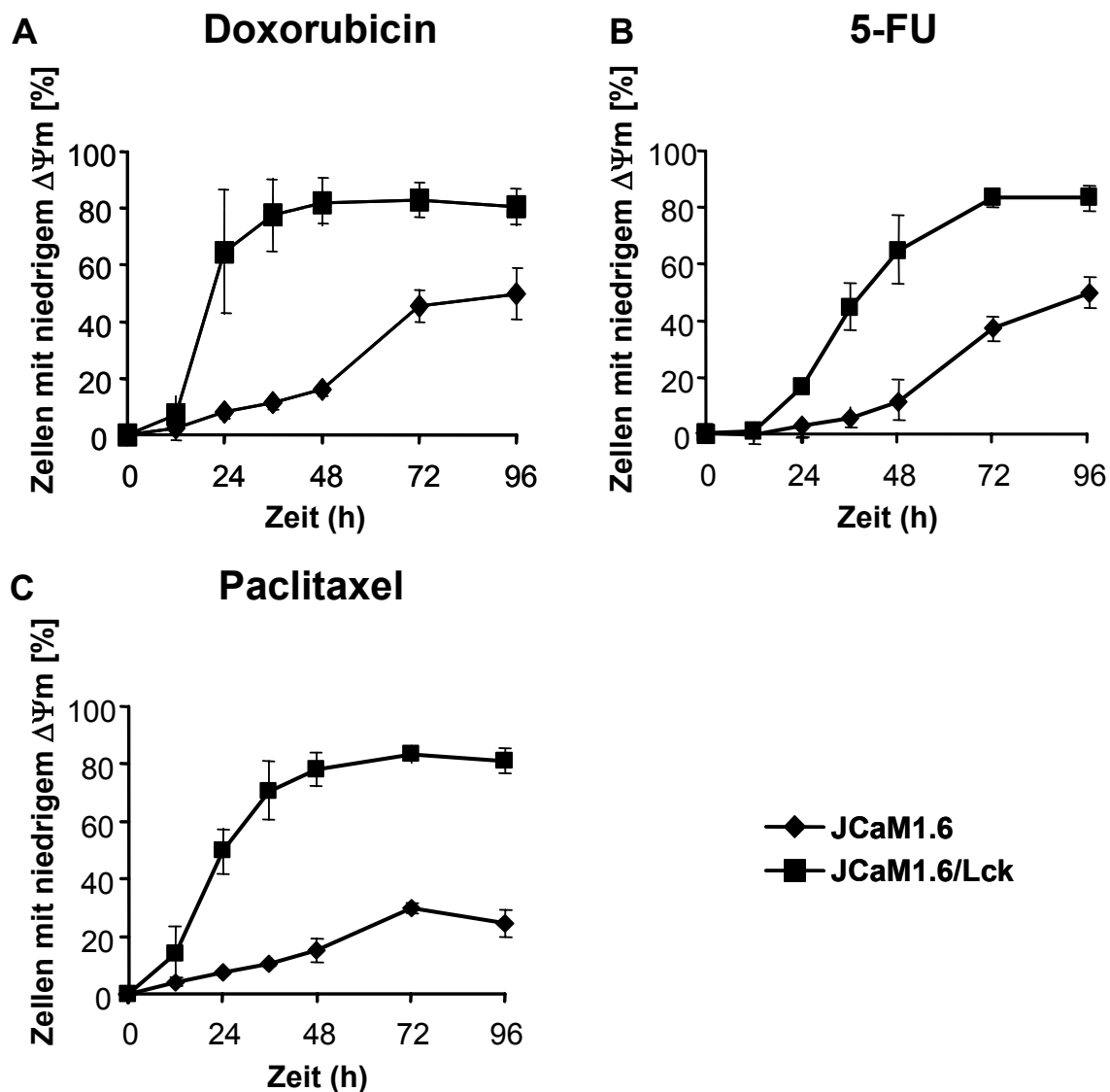
JCaM1.6-Zellen konnte während des untersuchten Zeitraumes von 72 h keine Caspasenaktivierung festgestellt werden. Hier zeigte sich jedoch eine geringfügige PARP-Spaltung nach 48 und 72 h (Abb. 27B). Paclitaxel-Behandlung führte bereits nach 24 h zur Caspasenaktivierung und PARP-Spaltung in JCaM1.6/Lck-Zellen, jedoch nicht in JCaM1.6-Zellen (Abb. 27C).

Infolgedessen wird Lck für die Aktivierung der zentralen Signalmoleküle der Apoptose, der Caspasen, benötigt. Doch bevor es zur Aktivierung von Caspasen kommen kann, muss bei der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika der mitochondriale Signalweg durchlaufen werden. Die Untersuchung der strahleninduzierten und rezeptorvermittelten Apoptose hatten bereits gezeigt, dass Lck in die Regulation mitochondrialer Apoptoseschritte involviert ist. Daher sollte im Folgenden die Beteiligung von Lck an der Auslösung mitochondrialer Veränderungen bei der Chemotherapie-induzierten Apoptose untersucht werden.

### **6.11 Veränderungen am Mitochondrium durch Chemotherapeutika**

Der Einfluss von Lck auf mitochondriale Veränderungen nach Behandlung mit Doxorubicin, 5-FU und Paclitaxel wurde durch Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und der Cytochrom-c-Freisetzung aus dem Mitochondrium während der Apoptose untersucht. Das mitochondriale Membranpotential wurde mittels TMRE-Färbung und FACS-Analyse bestimmt. In JCaM1.6/Lck-Zellen kam es nach Stimulation mit Doxorubicin oder Paclitaxel zum raschen Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$ . Dabei stieg der prozentuale Anteil an Zellen mit niedrigem  $\Delta\Psi_m$  bis zu 36 h nach Stimulation rasch an ( $77,7\pm 12,9$  % bzw.  $76,2\pm 10,9$  %) um dann nach 48 h in ein Plateau überzugehen (Abb. 28A,C). Dagegen zeigten die JCaM1.6-Zellen bis 48 h nach Stimulation fast keine Reduktion von  $\Delta\Psi_m$  ( $16,1\pm 2,5$  % bzw.  $16,4\pm 4,6$  %).



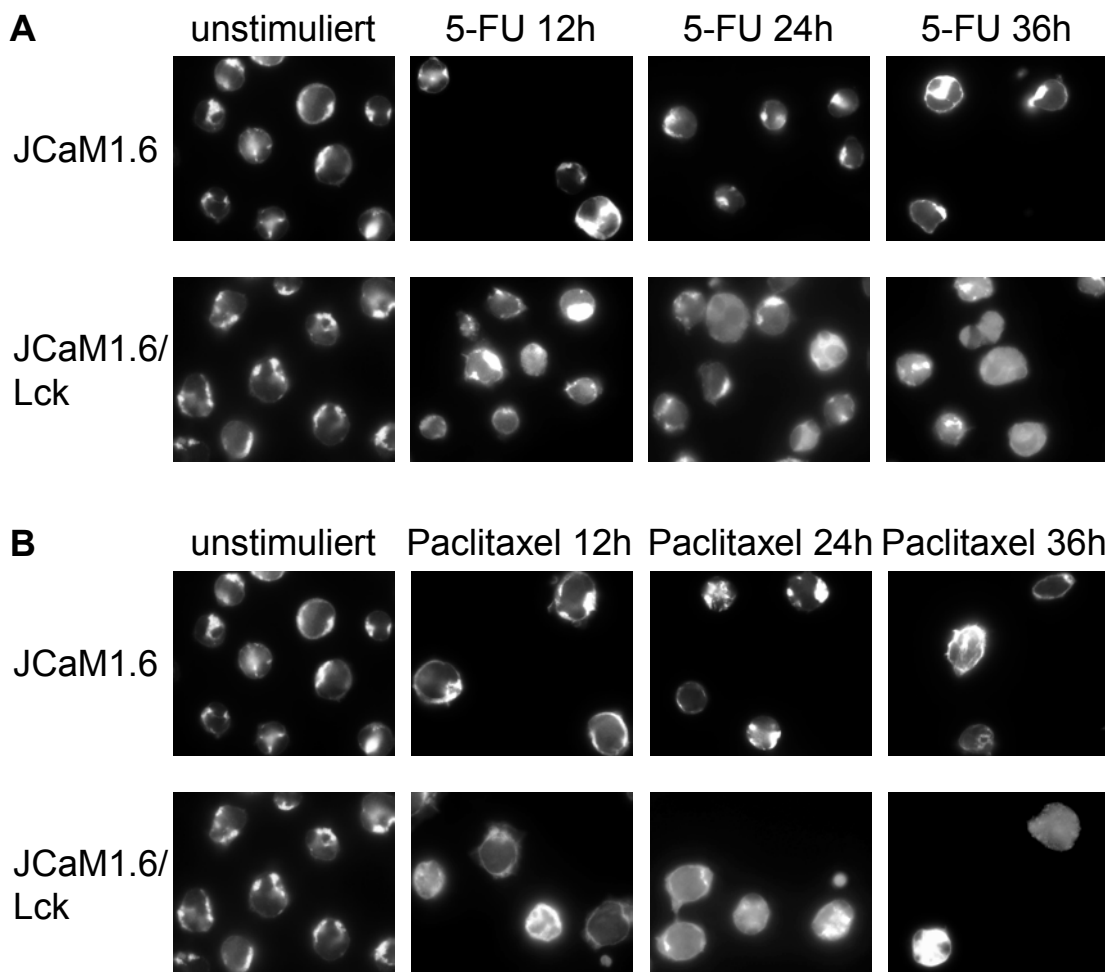


**Abbildung 28:  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nach Behandlung mit Chemotherapeutika.**

Zeitverlauf des  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs in JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen nach Behandlung mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin (A), 10  $\mu\text{M}$  5-FU (B) oder 100nM Paclitaxel (C). Dargestellt sind Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichungen.

Nach Behandlung mit 5-FU erfolgte der  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch, wie auch die Apoptoseinduktion, in Lck-exprimierenden Zellen etwas später als nach Stimulation mit Doxorubicin oder Paclitaxel (Abb. 28B). Allerdings war 48h nach Stimulation mit 5-FU in 68,9 $\pm$ 12,7 % der JCaM1.6/Lck-Zellen  $\Delta\Psi_m$  zusammengebrochen, unter den JCaM1.6-Zellen dagegen nur in 12,0 $\pm$ 7,2 %. Zwar stieg der Anteil an Zellen

mit  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch in JCaM1.6-Zellen 96 h nach Stimulation mit Doxorubicin auf  $49,6\pm 9,1$  %, mit Paclitaxel auf  $26,6\pm 4,8$  % und mit 5-FU auf  $52,5\pm 5,6$  % an, blieb damit jedoch weit unter den gemessenen Werten für JCaM1.6/Lck-Zellen ( $80,4\pm 6,3$  % für Doxorubicin,  $87,6\pm 4,4$  % für Paclitaxel,  $88,7\pm 4,5$  % für 5-FU).



**Abbildung 29: Cytochrom-c-Freisetzung nach Behandlung mit Chemotherapeutika.**

Cytochrom-c-Färbung und konfokale Mikroskopie von JCaM1.6- und JCaM1.6/Lck-Zellen 12, 24 und 36 h nach Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  5-FU (A) oder  $100\text{nM}$  Paclitaxel (B). Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung aus drei unabhängigen Experimenten.

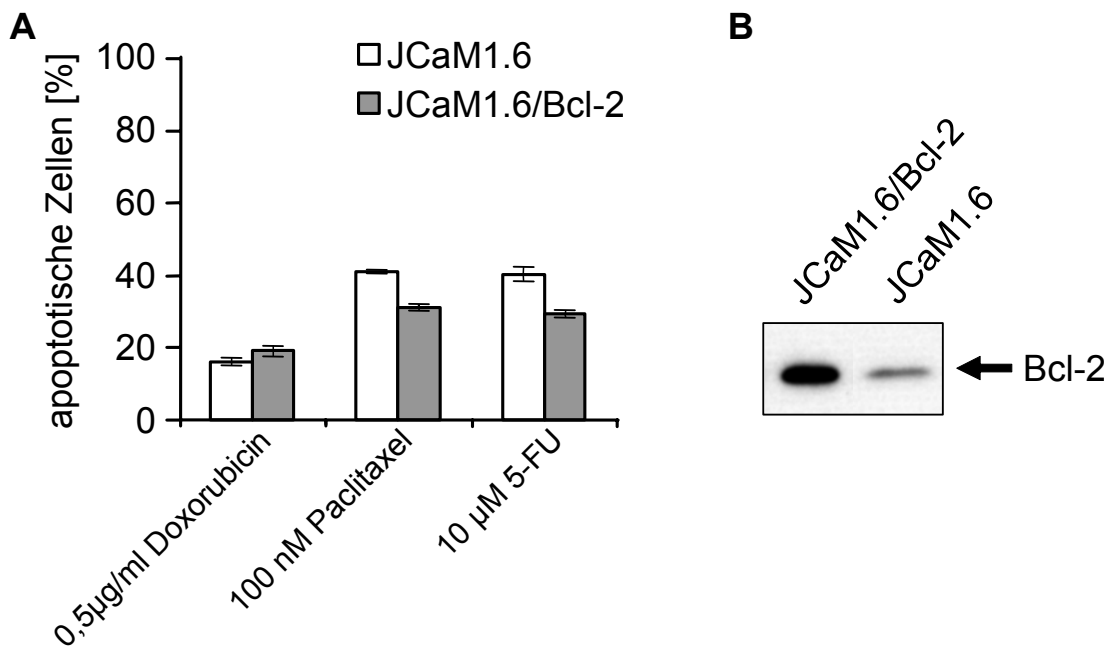
Parallel dazu wurde die Cytochrom-c-Freisetzung nach Behandlung mit Paclitaxel und 5-Fluorouracil fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass

die Freisetzung von Cytochrom c in Lck-defizienten Zellen im Vergleich zu Lck-exprimierenden Zellen deutlich reduziert war (Abb. 29). Die Untersuchung der Cytochrom-c-Freisetzung war aufgrund der Fluoreszenz von Doxorubicin nicht möglich. Die Wellenlängen der Fluoreszenz von Doxorubicin und des Cytochrom-c-Antikörpers liegen so nahe zusammen, dass es zu einer starken Überlagerung kommt, wodurch die Cytochrom-c-Freisetzung in Doxorubicin-stimulierten Zellen nicht sicher zu beurteilen ist. Daher können bezüglich mitochondrialer Apoptoseschritte nach Behandlung mit Doxorubicin nur Aussagen über den  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch gemacht werden.

Die Untersuchungen der apoptotischen Veränderungen am Mitochondrium belegen eindeutig, dass eine Lck-Defizienz den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach Behandlung mit Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU behindert. Außerdem wird die 5-FU- und Paclitaxel-induzierte Cytochrom-c-Freisetzung in Lck-defizienten Zellen im Vergleich zu Lck-exprimierenden Zellen deutlich vermindert. Die Tyrosinkinase Lck ist also ein wesentlicher Bestandteil der mitochondrialen Signalwege bei der Chemotherapie-induzierten Apoptose.

Dennoch zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen, dass Lck-defiziente Zellen nicht vollständig resistent gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose sind. Nach längerer Chemotherapie-Exposition (ab 72 h) findet auch in den Lck-defizienten Zellen Apoptose statt, wenn auch in geringerem Ausmaß als in den Zellen mit funktionell intakter Lck. Da Bcl-2 als antiapoptotisches Protein ein wesentlicher Regulator des mitochondrialen Apoptosesignalweges ist, wurde untersucht, ob die späte Apoptose in den Lck-defizienten Zellen durch Überexpression von Bcl-2 verhindert werden kann. Dafür wurden JCaM1.6-Zellen mit Bcl-2 transfiziert (JCaM1.6/Bcl-2-Zellen). Der Nachweis der Überexpression von Bcl-2 in den transfizierten Zellen ist in Abb. 30B dargestellt. Nach Inkubation mit 10  $\mu$ M 5-FU oder 100 nM Paclitaxel zeigte sich in den JCaM1.6/Bcl-2-Zellen eine leichte Reduktion der späten Apoptose im Vergleich zu JCaM1.6-Zellen, jedoch nicht nach Behandlung mit 0,5  $\mu$ g/ml Doxorubicin (Abb. 30A). Somit scheint

ein Teil der späten Apoptose nach Stimulation mit Chemotherapeutika in Lck-defizienten Zellen unabhängig von Bcl-2 abzulaufen.

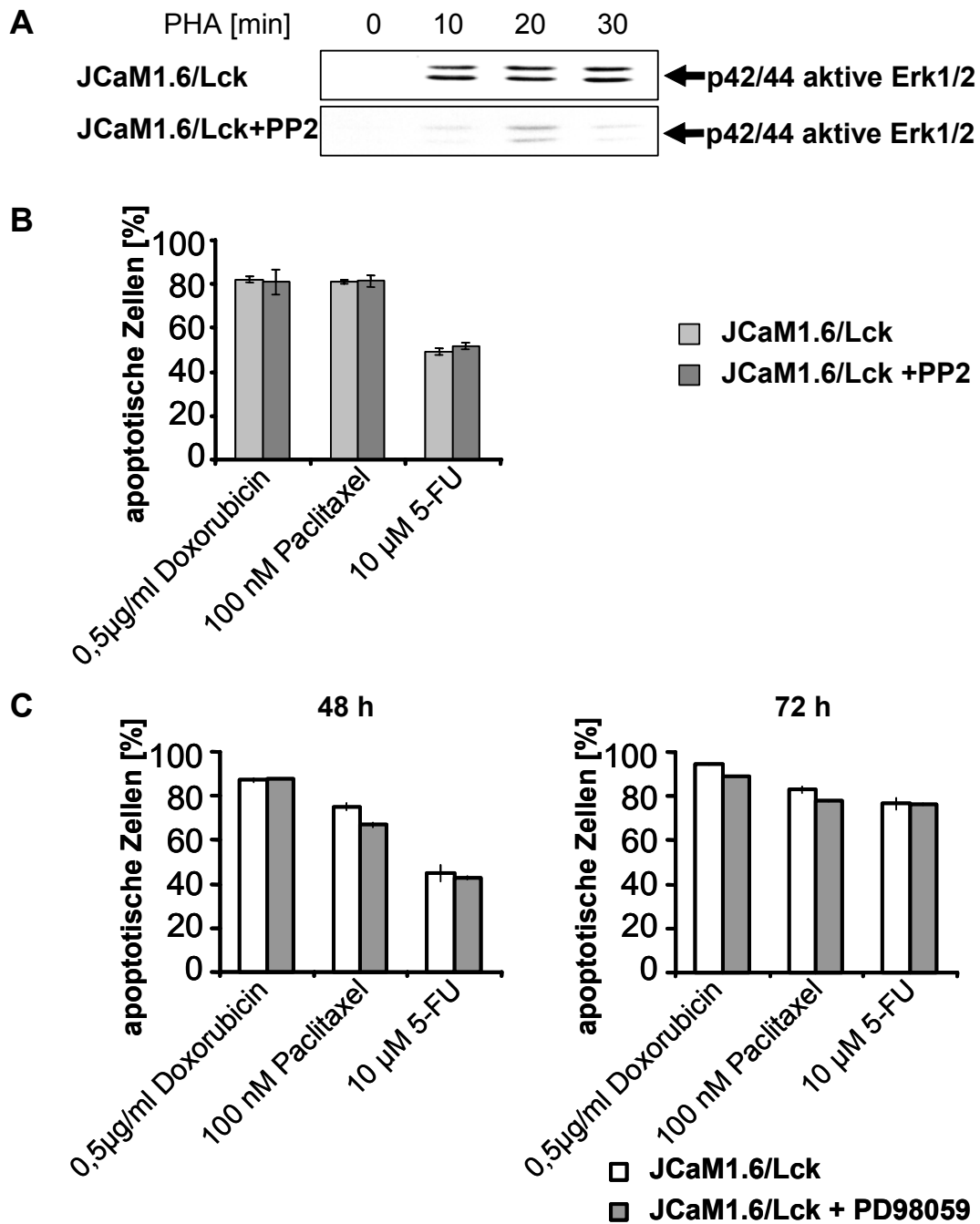


**Abbildung 30: Einfluss von Bcl-2 auf die späte Apoptose in Lck-defizienten Zellen.**

**A:** Apoptoseinduktion in JCaM1.6-Zellen und Bcl-2-überexprimierenden JCaM1.6/Bcl-2-Zellen nach Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxorubicin, 10 µM 5-FU oder 100nM Paclitaxel für 72 h. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichungen. **B:** Western-Blot-Nachweis der Bcl-2-Überexpression in JCaM1.6/Bcl-2-Zellen.

### 6.12 Untersuchungen zum Funktionsmechanismus von Lck bei der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika

Die bisher durchgeführten Experimente zeigen, dass Lck für die Chemotherapie-induzierte Apoptose benötigt wird. Der Wirkmechanismus von Lck bei der Apoptoseinduktion ist aber noch unklar. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Tyrosinkinaseaktivität von Lck für die Apoptoseinduktion benötigt wird. Dazu wurden die JCaM1.6/Lck-Zellen eine Stunde vor Chemotherapie-Stimulation mit dem Src-Kinasen-Inhibitor PP2 vorinkubiert. In Vorversuchen zeigte sich, dass 5 µM PP2 die Tyrosinkinase-Aktivität von Lck deutlich hemmt, nachweisbar mittels fehlender Erk-Aktivierung nach PHA-Stimulation (Abb. 31A).



**Abbildung 31: Bedeutung der Tyrosinkinaseaktivität von Lck für die Apoptoseinduktion.**

**A:** Auswirkung des Lck-Inhibitors PP2 auf die Erk-Aktivierung in JCaM1.6/Lck-Zellen nach TZR-Stimulierung durch 50 µg/ml PHA-L. **B:** Apoptoserate Lck-exprimierender Zellen 48 h nach Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxorubicin, 10 µM 5-FU oder 100nM Paclitaxel mit oder ohne Vorinkubation mit dem Lck-Inhibitor PP2. **C:** Apoptoserate in JCaM1.6/Lck-Zellen 48 und 72 h nach zytostatischer Behandlung unter Zugabe des Erk-Inhibitors PD98059. Die Abbildung zeigt eines von je drei unabhängigen Experimenten bzw. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichungen.

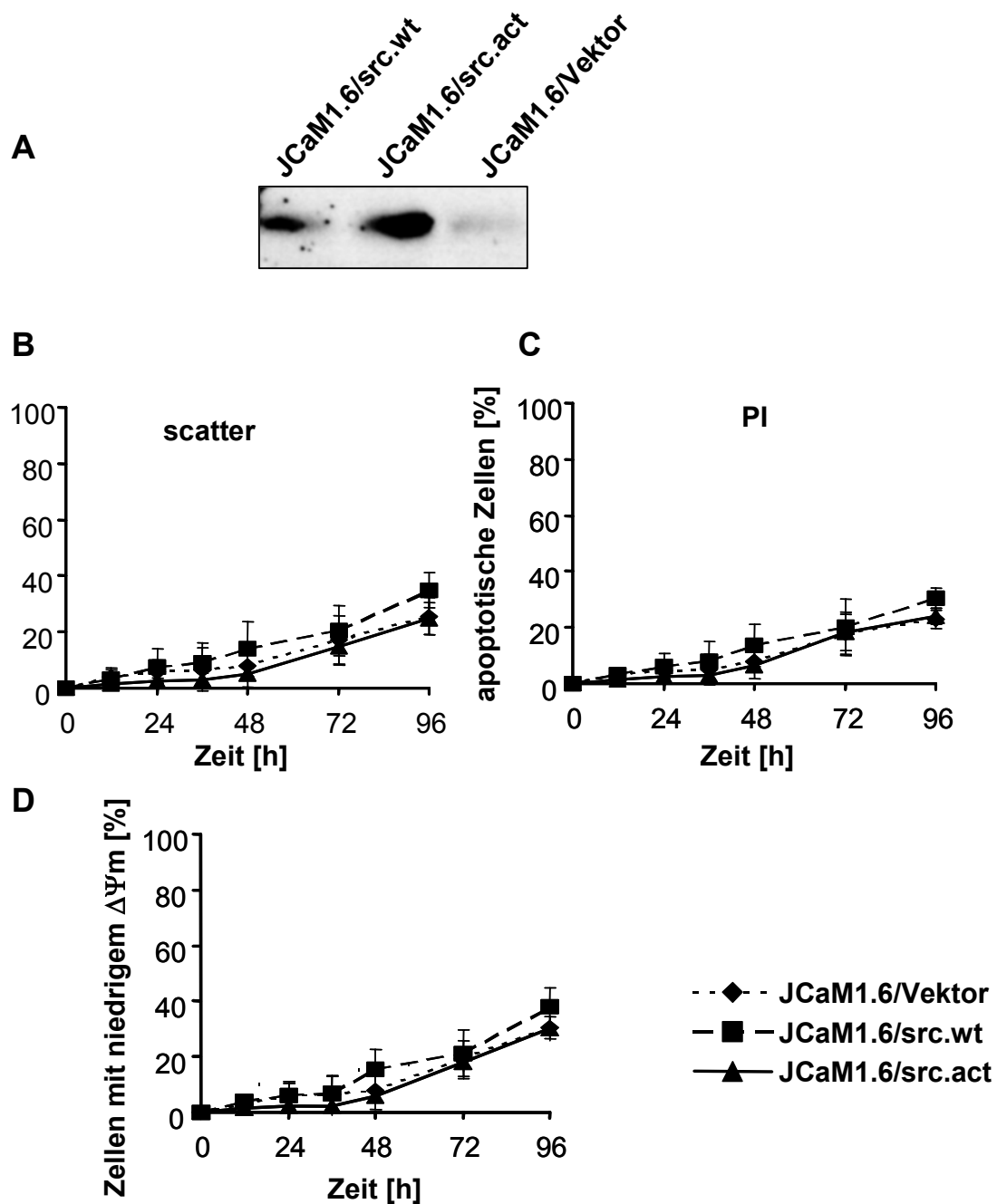
Dennoch bewirkte die Vorinkubation der JCaM1.6/Lck-Zellen mit PP2 keine Reduktion der Apoptoseraten bei Behandlung mit Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU (Abb. 31B). Des Weiteren bewirkte die Inhibierung von Erk keine Veränderung der Apoptoseraten in Lck-exprimierenden Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika (Abb. 31C). Das bedeutet, dass die proapoptotische Funktion von Lck nicht ihrer Tyrosinkinase-Aktivität zuzuschreiben ist.

### **6.13 Kann die Lck Defizienz durch andere Tyrosinkinasen der Src-Familie kompensiert werden?**

Die bisherigen Experimente zeigen, dass die Tyrosinkinase Lck an verschiedensten Apoptosesignalwegen beteiligt ist, wobei sie anscheinend mitochondriale Signalschritte kontrolliert. Lck ist eine für Lymphozyten spezifische Kinase der Src-Familie. Bisher ist jedoch vollkommen ungeklärt, ob die proapoptotische Funktion für Lck spezifisch ist, oder von anderen Tyrosinkinasen der Src-Familie übernommen werden kann. Die Beantwortung dieser Frage ist insofern interessant, als sie Hinweise auf die Art der Interaktion von Lck mit anderen Proteinen der Apoptosesignalwege geben kann. Dafür sollte die Lck-verwandte Tyrosinkinase Src in Lck-defizienten Zellen stabil transfiziert werden, um anschließend zu untersuchen, ob Src Lck bei der Apoptoseinduktion ersetzen kann.

Daher wurden JCaM1.6-Zellen mit src.wt und src.act stabil transfiziert. Das Wildtyp-src (src.wt) entspricht dem zellulären Protoonkogen c-src, dessen Expression einer Regulation unterliegt. Das aktivierte src (src.act) entspricht dem viralen Onkogen v-src, das konstitutiv aktiv ist.

Das Plasmid pUSEamp, das src.wt bzw. src.act und ein Resistenzgen für das Selektionsantibiotikum Gentamicin enthält, sowie der leere Vektor pUSEamp wurden in kompetenten E.coli vermehrt, dann extrahiert und aufgereinigt und in die Zellen transfiziert, die anschließend mit Gentamicin (G418) selektioniert wurden.



**Abbildung 32: Strahleninduzierte Apoptose in Src-exprimierenden JCaM1.6-Zellen**

**A:** Western-Blot-Nachweis der Src-Expression in den mit src transfizierten Zellen. **B,C:** FACS-Analyse der Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung in Src-exprimierenden JCaM1.6-Zellen anhand Scatter-Charakteristika (B) bzw. nach PI-Inkubation (C). **D:** FACS-Analyse des  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruchs nach Bestrahlung Src-exprimierender Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichungen.

Die Expression von v-src und c-src wurde mittels Western-Blot geprüft. Hier konnte Src in JCaM1.6/src.wt- und in JCaM1.6/src.act-Zellen nachgewiesen und die Abwesenheit von Src in JCaM1.6/Vektor-Zellen bestätigt werden (Abb. 32A).

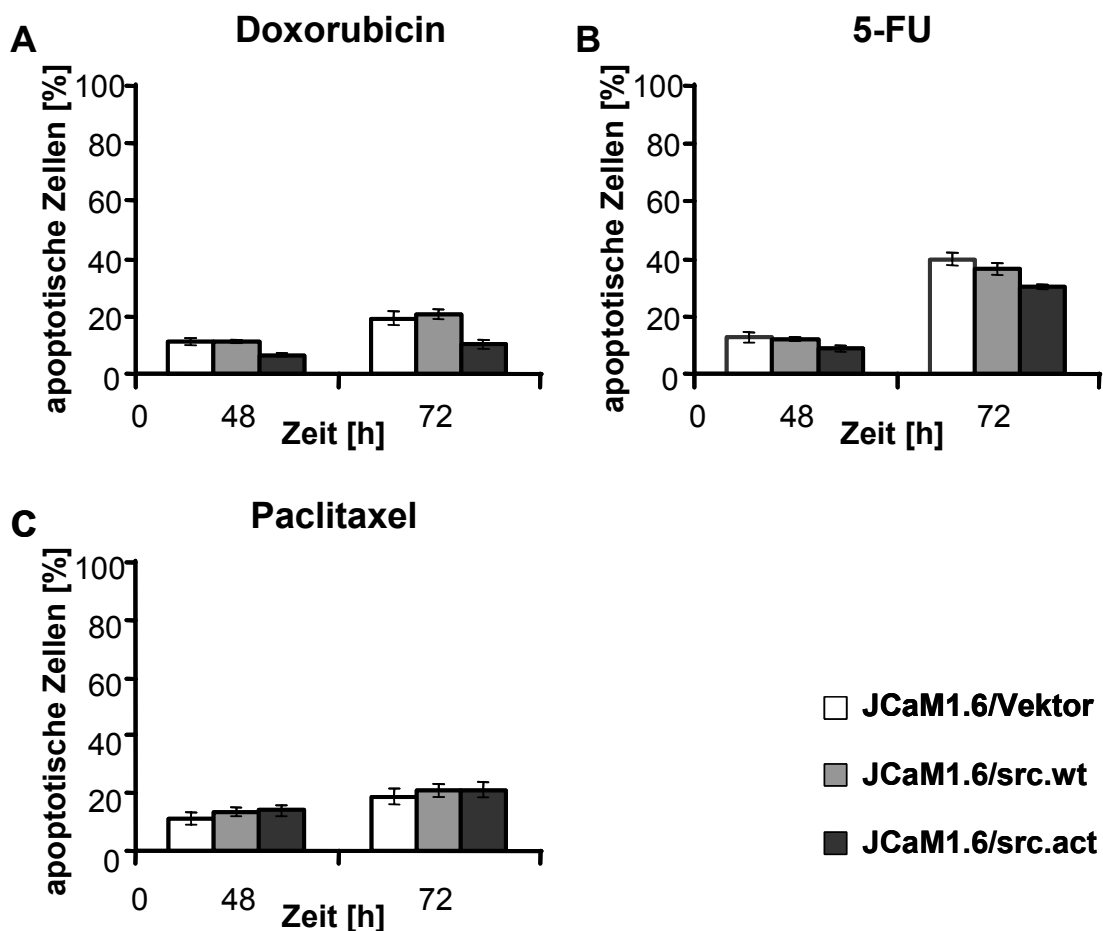
Anschließend wurde die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung in diesen Zelllinien untersucht (Abb. 32B,C). Die durchflusszytometrische Analyse der Zellmorphologie (Scatter-Charakteristika) zeigte, dass ionisierende Strahlung in allen drei Zelllinien kaum Apoptoseinduktion bewirkt. 48 h nach Bestrahlung mit 10 Gy lag die Apoptoserate der JCaM1.6/src.wt-Zellen bei  $13,9 \pm 9,7$  % und der JCaM1.6/src.act-Zellen bei  $5,1 \pm 1,9$  % und war damit der Apoptoserate in den zugehörigen Vektorzellen mit  $8,0 \pm 7,6$  % vergleichbar. Ab 72 h nach Bestrahlung kam es zwar zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate, dieser fiel jedoch in allen drei Zelllinien ungefähr gleich aus und entsprach im Ausmaß den JCaM1.6-Zellen nach Bestrahlung. So wurden 96 h nach Bestrahlung Apoptoseraten von  $34,8 \pm 6,3$  % der JCaM1.6/src.wt-,  $24,8 \pm 5,7$  % der JCaM1.6/src.act- und  $25,6 \pm 6,7$  % der JCaM1.6/Vektor-Zellen gemessen (Abb. 32B). Die Untersuchung der Viabilität (PI-Ausscheidung) bestätigte diese Ergebnisse, denn die hierbei ermittelten Apoptoseraten lagen im selben Bereich (Abb. 32C).

Folglich bewirkt eine Transfektion Lck-defizienter Zellen mit src keine Steigerung der strahleninduzierten Apoptose. Da die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung über den mitochondrialen Signalweg erfolgt, sind die Auswirkungen der Transfektion mit src auf mitochondriale Apoptoseschritte von Interesse für die Beurteilung der Ersetzbarkeit von Lck. Daher wurde hier das mitochondriale Membranpotential nach Bestrahlung der src-transfizierten Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die src-Transfektion Lck-defizienter Zellen nicht zum vermehrten Zusammenbrechen von  $\Delta\Psi_m$  nach Bestrahlung führt. Die Kurven der JCaM1.6/src.wt-, JCaM1.6/src.act- und JCaM1.6/Vektor-Zellen für den Prozentsatz an Zellen mit niedrigem  $\Delta\Psi_m$  lagen ganz nah beieinander und entsprachen der Kurve der JCaM1.6-Zellen. 48 h nach Bestrahlung war in  $37,8 \pm 7,1$  % der JCaM1.6/src.wt-Zellen und in  $30,0 \pm 4,3$  % der JCaM1.6/src.act-Zellen, sowie in



30,5±3,9 % der JCaM1.6/Vektor-Zellen ein  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch erfolgt. Und auch nach 96 h lagen die Werte zwar insgesamt höher, aber immer noch nahe zusammen (Abb. 32D).

Da die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika auch über mitochondriale Wege erfolgt, wurde außerdem geprüft, wie sich die Transfektion von src in JCaM1.6-Zellen auf die Apoptoserate bei Behandlung der Zellen mit Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU auswirkt.



**Abbildung 33: Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika in Src-exprimierenden JCaM1.6-Zellen.**

FACS-Analyse (Scatter-Charakteristika) der Apoptoseinduktion durch 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin (A), 10  $\mu\text{M}$  5-FU (B) oder 100nM Paclitaxel (C) in Src-exprimierenden Lck-defizienten JCaM1.6-Zellen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ( $n \geq 4$ ) mit Standardabweichungen.

Auch hier zeigte sich, dass die src-Transfektion die Apoptosesensitivität der Lck-defizienten Zellen nicht steigern konnte (Abb.33 A-C).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Lck-defiziente Zellen, die mit src transfiziert wurden, in ihrer Fähigkeit zur Apoptoseinduktion Lck-exprimierenden Zellen nicht entsprechen. Die src-transfizierten Zellen wiesen bei der FACS-Messung keine deutlich höheren Apoptoseraten auf als die Vektorzellen. Und die zusätzliche Messung des mitochondrialen Membranpotentials zeigte, dass der Anteil an Zellen mit  $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch in den src-transfizierten Zellen und den Vektorzellen vergleichbar ist.

## 7 Diskussion

### **7.1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Tyrosinkinase Lck für die Regulation von Apoptosesignalwegen in T-Lymphozyten zu analysieren. Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lck für mitochondriale Apoptosesignalwege essenziell ist. Bestrahlung oder zytostatische Behandlung Lck-defizienter Zellen führte zu deutlich reduzierten Apoptoseraten im Vergleich zu Lck-exprimierenden Zellen. In Lck-defizienten Zellen ließen sich kaum morphologischen Apoptosecharakteristika, mitochondrialen Apoptoseschritte oder Caspasenaktivierungen nachweisen. Dagegen bewirkte Bestrahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika eine rasche Apoptoseinduktion in Lck-exprimierenden Jurkat- und JCaM1.6/Lck-Zellen. Allerdings konnte durch Stimulierung von Todesrezeptoren auch in Lck-defizienten Zellen deutlich Apoptose induziert werden. Dabei bewirkte die Lck-Defizienz jedoch eine verlangsamte Apoptosekinetik. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Lck-defiziente Zellen einen ähnlichen apoptotischen Phänotyp wie Bcl-2-überexprimierende Zellen aufweisen. Da Bcl-2 ein wesentlicher Regulator mitochondrialer Apoptoseschritte ist, stellt dies einen Beleg dafür dar, dass Lck Apoptose auf mitochondrialer Ebene kontrolliert. Die Analyse des Wirkmechanismus der Apoptoseregulation durch Lck zeigte, dass die proapoptotische Wirkung von Lck unabhängig von der Tyrosinkinaseaktivität ist und dass Lck bei der Apoptoseinduktion durch Src funktionell nicht ersetzbar ist.

## **7.2 Bedeutung von Lck für die strahleninduzierte Apoptose**

In vorausgegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Lck während der Apoptoseinduktion durch Bestrahlung aktiviert wird. Davon ausgehend sollte hier zunächst der Einfluss von Lck auf die morphologischen und biochemischen Veränderungen während der strahleninduzierten Apoptose charakterisiert werden.

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass die intakte Tyrosinkinase Lck für die strahleninduzierte Apoptose benötigt wird. Die Apoptoseinduktion nach Bestrahlung erfolgt über den mitochondrialen Signalweg mit Cytochrom-c-Freisetzung und Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Nach Bestrahlung Lck-defizienter Zellen war jedoch weder ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, noch eine Freisetzung von Cytochrom c nachweisbar. Infolgedessen blieben die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung von Caspase-9 und Effektorcaspasen aus. Dementsprechend kam es nach Bestrahlung Lck-defizienter Zellen auch nicht zu den für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen der Zelle. Durch Untersuchung der Kernmorphologie, Zellgröße und Granularität, sowie der Fähigkeit zur PI-Ausschleusung konnte gezeigt werden, dass die Bildung des apoptotischen Phänotyps bis zu 96 h nach Bestrahlung weitestgehend ausbleibt. Der 96 h nach Bestrahlung im FACS gemessene Anstieg toter Zellen wird nicht durch apoptotischen Zelltod verursacht, da keine Caspasenaktivierung stattfindet. Möglicherweise führt die fehlende Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges in Lck-defizienten Zellen dazu, dass die durch die Bestrahlung geschädigten Zellen vermehrt nekrotisch sterben. Dafür sprechen Beobachtungen, dass es bei Behandlung mit klassischen Apoptoseinduktoren und gleichzeitiger Blockierung der apoptotischen Signalwege zu intrazellulären Veränderungen kommt, die Nekrose bewirken (Leist und Jaattela, 2001; Los et al., 2002; Vercaamen et al., 1998b).

Somit wird Lck für die Apoptoseinduktion durch Bestrahlung benötigt. In Lck-defizienten Zellen konnten nach Bestrahlung keine mitochondrialen

Apoptoseschritte nachgewiesen werden, welche Voraussetzung für den weiteren Ablauf der Apoptose sind. Diese Beobachtung legt nahe, dass Lck für die Initiierung mitochondrialer Apoptoseschritte im Rahmen der strahleninduzierten Apoptose essenziell ist und somit in die Regulation früher Ereignisse der Apoptosesignalkaskade eingebunden ist.

### **7.3 Bedeutung von Lck für die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika**

Die Beobachtung, dass Lck initiale Schritte der strahleninduzierten Apoptose reguliert, wirft die Frage auf, ob Lck generell für die Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Signalweg erforderlich ist. Daher wurde der Einfluss von Lck auf die Apoptoseinduktion durch weitere mitochondriale Apoptosestimuli untersucht. Hierfür wurden Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU - Chemotherapeutika mit unterschiedlichen intrazellulären Primärzielen - eingesetzt. Im Rahmen der hier dargestellten Untersuchungen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Lck für die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika benötigt wird. Die Untersuchung der Cytochrom-c-Freisetzung und des mitochondrialen Membranpotentials zeigt, dass in Lck-defizienten Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin, 5-FU oder Paclitaxel analog zur Bestrahlung keine mitochondrialen Apoptoseschritte stattfinden. Die Apoptoseinduktion durch Doxorubicin, Paclitaxel und 5-FU, gemessen mittels Bestimmung der Zellgröße, Granularität, Viabilität und Chromatinkondensation, wird durch eine Lck-Defizienz deutlich reduziert. Hierbei kann der späte Anstieg toter Zellen in der FACS-Messung nach 96 h wiederum durch Nekrose oder Nekrose-ähnlichen programmierten Zelltod erklärt werden. Hinzu kommt, dass Chemotherapeutika nicht nur Apoptose induzieren, sondern Veränderungen der Zellstruktur und -funktion verursachen, die bei der FACS-Messung nicht klar von der apoptotischen Morphologie abgegrenzt werden können. Interessanterweise lässt sich dieser späte Anstieg toter Zellen nicht durch eine Bcl-2-Überexpression verhindern. Dies spricht ebenfalls dafür, dass zu

diesem Zeitpunkt kein apoptotischer Zelltod stattfindet. Eine andere Erklärung wäre, dass Bcl-2-unabhängige apoptotische Prozesse stattfinden.

Wie bei der Bestrahlung Lck-defizienter Zellen, konnte nach Behandlung mit Chemotherapeutika in Lck-defizienten Zellen keine Caspasenaktivierung im Western-Blot nachgewiesen werden. Die geringe PARP-Spaltung zu späten Zeitpunkten nach der Stimulation mit 5-FU kommt allerdings möglicherweise durch eine geringe, nicht-detektierbare Caspasenaktivierung, zustande.

Somit liefert die Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika einen weiteren Hinweis darauf, dass Lck mitochondriale Apoptoseschritte reguliert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Beobachtungen, dass Lck für die Apoptoseinduktion durch Ceramid, HIV-tat und Rosmarinsäure notwendig ist (Hur et al., 2004; Manna und Aggarwal, 2000; Manna et al., 2000), welche ebenfalls über mitochondriale Signalwege ablaufen (Hur et al., 2004; Macho et al., 1999; von Haefen et al., 2002). Für die Apoptoseinduktion durch Rosmarinsäure wurde sogar direkt gezeigt, dass Lck mitochondriale Apoptoseschritte kontrolliert (Hur et al., 2004).

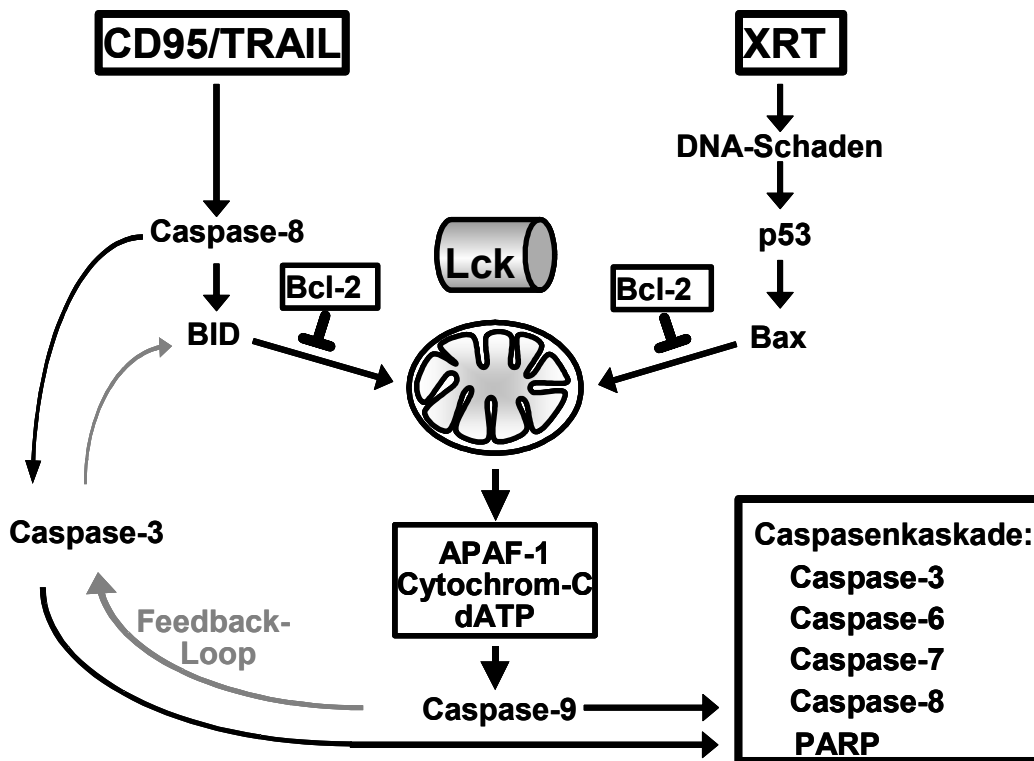
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Lck für die Initiierung mitochondrialer Apoptoseschritte durch Stimuli mit sehr unterschiedlichen Primärzielen benötigt wird. Daher kann eine generelle Kontrolle früher Schritte mitochondrialer Apoptosewege durch Lck angenommen werden.

#### **7.4 Bedeutung von Lck für die rezeptorvermittelte Apoptose**

Die bisherigen Untersuchungen belegen die Bedeutung von Lck für mitochondriale Apoptosesignalwege. Da in den meisten Zellsystemen getrennte Wege für die Apoptoseinduktion über mitochondriale Wege oder Zelltodrezeptorstimulation vorliegen (Belka et al., 2000; Engels et al., 2000; Newton und Strasser, 2000), sollte als Gegenprobe geprüft werden, ob die rezeptorvermittelte Apoptose in Lck-defizienten Zellen ungestört abläuft. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Apoptoseinduktion über Zelltodrezeptoren wie CD95 und TRAIL-DR5

durch eine Lck-Defizienz nicht verhindert wird. Allerdings läuft die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in Lck-defizienten Zellen verlangsamt ab. Dabei treten sämtliche Apoptosecharakteristika, wie Caspasenaktivierung, Zellschrumpfung, DNA-Kondensation und mitochondriale Veränderungen verspätet auf.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen über die Bedeutung von Tyrosinkinaseaktivierungen bei der Vermittlung von Apoptoseprozessen durch Zelltodrezeptoren. Schraven und Kollegen berichten, dass Lck nicht notwendig für die Apoptoseinduktion durch CD95 ist (Schraven und Peter, 1995). Dagegen postulieren Schlottmann und Kollegen, dass Lck für die CD95-induzierte Apoptose benötigt wird, da es nach CD95-Stimulation zur Aktivierung von Lck kommt und da die Hemmung von Tyrosinkinasen die CD95-induzierte Lck-Aktivierung, Tyrosinphosphorylierung und Apoptose behindert (Schlottmann et al., 1996). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen lässt sich durch genauere Betrachtung der Zeitpunkte der Apoptosebestimmungen finden. Schraven und Kollegen hatten die Apoptoseinduktion erst nach 18 Stunden bestimmt, wohingegen Schlottman und Kollegen die Lck-Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung bereits nach 4 Stunden untersucht hatten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Apoptoseinduktion nach 6, 12, 24, 36 und 48 h gemessen. Dabei konnte in Lck defizienten Zellen nach 6 h fast keine Apoptoseinduktion durch CD95 nachgewiesen werden, aber bereits nach 12 h war ein Anstieg der Apoptoserate feststellbar, der sich im weiteren Verlauf fortsetzte. Demnach bewirkt eine Lck-Defizienz lediglich eine verlangsamte Kinetik der Apoptoseinduktion nach Todesrezeptor-Stimulation. In dieses Modell der verzögerten Apoptosekinetik in Lck-defizienten Zellen lassen sich die Beobachtungen während der frühen Apoptoseinduktion von Schlottmann et al. und die Befunde nach längerer Inkubation von Schraven et al. schlüssig einordnen.



**Abbildung 34: Schematische Darstellung der Apoptosesignalwege.**

Links ist der Apoptosesignalweg bei Todesrezeptor-Stimulation, rechts bei Bestrahlung dargestellt. Nach Todesrezeptor-Stimulation kommt es zur raschen Caspasenaktivierung. Bestrahlung bewirkt primär mitochondriale Veränderungen, die zur Bildung des Apoptosoms und anschließend zur Caspasenaktivierung führen. Eine Verbindung vom rezeptorinduzierten Signalweg zum mitochondrialen Weg besteht über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid und subsequente Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium.

Die verzögerte Kinetik der rezeptorinduzierten Apoptose in Lck-defizienten Zellen lässt sich möglicherweise ebenfalls mit der Regulation mitochondrialer Apoptoseschritte durch Lck erklären, zumal über Caspase-8 und Bid eine Verbindung zwischen rezeptorvermitteltem und mitochondrialem Apoptosesignalweg besteht (Abb. 34). Die Bedeutung des mitochondrialen Weges für die rezeptorvermittelte Apoptose ist jedoch umstritten. In diesem Zusammenhang wurde eine Einteilung in Typ I und Typ II Zellen vorgeschlagen (Scaffidi et al., 1998). Demnach erfolgt die Apoptoseinduktion nach Stimulierung von Todesrezeptoren in Typ I Zellen über direkte Caspasenaktivierung ohne Beteiligung der Mitochondrien, wohingegen Typ II Zellen zusätzlich ein



verstärkendes Signal über den mitochondrialen Weg benötigen. Scaffidi und Kollegen definierten die Jurkat-Lymphomzelllinie als typische Typ II Zelllinie.

Betrachtet man die Apoptoseinduktion in Lck-defizienten Zellen, so kann der Ausfall des mitochondrialen Verstärkungsweges eine Erklärung für die verzögerte Apoptosekinetik nach Todesrezeptor-Stimulierung liefern. Somit kann angenommen werden, dass Lck die rezeptorvermittelte Apoptose ebenfalls innerhalb mitochondrialer Signalwege beeinflusst. Allerdings führt eine Lck-Defizienz nicht zu einer kompletten Hemmung der Todesrezeptor-induzierten Apoptose, sondern nur zu einer Verlangsamung. Daher können die Jurkat-Zellen und die davon abgeleiteten Zelllinien nicht streng in die Klasse der Typ II Zellen eingeordnet werden, in denen nach Blockierung des mitochondrialen Weges keine Apoptose stattfinden kann. Möglicherweise beruhen die beobachteten Unterschiede in Typ I und Typ II Zellen bei der CD95-Stimulation auch auf der Art des verwendeten Stimulus. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass bei Verwendung des CD95-L anstatt stimulierender Antikörper keine Unterschiede zwischen den Zelltypen mehr nachweisbar waren (Huang et al., 1999; Huang et al., 2000). Eine aktuelle Veröffentlichung befasst sich mit der kontroversen Diskussion über die Einteilung der Jurkat-Zelllinie in Typ I oder Typ II bei Stimulation mit TRAIL (Rudner et al., 2005). In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass sich die Jurkat-Zellen lediglich bei geringer und kurz dauernder Stimulation mit TRAIL wie klassische Typ II Zellen verhalten, wohingegen sie bei höheren TRAIL-Konzentrationen Typ I Zellen entsprechen.

### **7.5 Vergleich der Lck-Defizienz mit einer Bcl-2-Überexpression**

Die Ergebnisse der Analyse der Apoptoseinduktion durch Strahlung, Chemotherapeutika und Todesrezeptor-Stimulation deuten darauf hin, dass die Tyrosinkinase Lck mitochondriale Apoptoseschritte kontrolliert. Da Bcl-2 als negativer Regulator mitochondrialer Apoptoseschritte gut charakterisiert ist, wurde der Phänotyp der Lck-defizienten Zellen mit dem Bcl-2-überexprimierender Zellen

verglichen, um die Wirkung von Lck auf die Apoptoseinduktion genauer zu bestimmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate nach Bestrahlung Bcl-2-überexprimierender Zellen ebenso wie bei Lck-defizienten Zellen im Vergleich zu Jurkat-T-Zellen deutlich reduziert ist. Ebenso erfolgen keine Caspasenaktivierung und keine Initiierung mitochondrialer Apoptoseschritte in Bcl-2-überexprimierenden Zellen. Die Ähnlichkeit des Phänotyps der Lck-defizienten Zellen mit dem der Bcl-2-überexprimierenden Zellen ist ein weiterer Beleg dafür, dass Lck mitochondriale Apoptoseschritte reguliert.

Nach Todesrezeptor-Stimulation zeigten sich jedoch Unterschiede in der Apoptoseinduktion zwischen Lck-defizienten Zellen und Bcl-2-überexprimierenden Zellen. Während die CD95-vermittelte Apoptose durch die Lck-Defizienz deutlich verlangsamt wird, bewirkt die Bcl-2-Überexpression nur eine geringe Verzögerung mit rascher Angleichung an die Apoptoserate in den zugehörigen Vektorzellen. Somit scheint sich die Lck-Defizienz auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose stärker auszuwirken, als die Bcl-2-Überexpression. Dies kann dadurch bedingt sein, dass Lck die Aktivität anderer, übergeordneter oder einer größeren Anzahl von Interaktionspartnern als Bcl-2 reguliert.

### ***7.6 Ersetzbarkeit von Lck bei der Apoptoseinduktion***

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Lck mitochondriale Signalwege beeinflusst. Dennoch bleibt unklar, wie Lck mitochondriale Apoptosesignale kontrolliert. Um darüber genauere Kenntnis zu erlangen, wurde untersucht, ob Lck durch andere Tyrosinkinasen funktionell ersetzt werden kann. Dazu wurde die Lck-defiziente Zelllinie JCaM1.6 mit der verwandten Tyrosinkinase Src stabil transfiziert und die Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlung bzw. Chemotherapeutika untersucht. Die Apoptoseinduktion in den src-transfizierten Zellen war im Vergleich zu den JCaM1.6-Zellen nicht gesteigert. Dabei entsprachen sowohl die Apoptoseraten der JCaM1.6/src.wt-Zellen mit Wildtyp-Src, als auch der JCaM1.6/src.act-Zellen mit konstitutiv aktiver Src denen der Vektor-Zelllinie.

Die orientierende Untersuchung der mitochondrialen Veränderungen nach Bestrahlung durch Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials lieferte ebenfalls vergleichbare Werte in allen drei Zelllinien. Somit kann die Funktion von Lck nicht durch Src übernommen werden. Damit reguliert Lck spezifisch die Apoptoseinduktion in T-Lymphozyten.

Die Tatsache, dass Lck durch die verwandte Tyrosinkinase Src funktionell nicht ersetzbar ist, wirft die Frage auf, ob die Tyrosinkinaseaktivität überhaupt für die proapoptotische Funktion benötigt wird. Daher wurde hier untersucht, wie sich die Inhibition der Tyrosinkinase auf die Apoptoseinduktion auswirkt. Dabei zeigte sich, dass eine Inhibition der Kinasedomäne in Zellen mit intakter Lck keine verminderte Apoptoserate nach Behandlung mit Chemotherapeutika bewirkt. Entsprechende Befunde ergaben sich bei Tyrosinkinaseinhibition während der Apoptoseinduktion durch Rosmarinsäure (Hur et al., 2004). Somit scheint die Kinasedomäne von Lck nicht für die Apoptoseinduktion verantwortlich zu sein. Daher ist die Apoptosedefizienz in JCaM1.6-Zellen wahrscheinlich auf das Fehlen Kinase-unabhängiger proapoptotischer Effekte von Lck zurückzuführen.

### ***7.7 Mögliche Mechanismen der proapoptotischen Wirkung von Lck***

Da Lck sowohl an der Apoptoseinduktion durch Strahlung, als auch durch Chemotherapeutika mit unterschiedlichen primären Angriffspunkten beteiligt ist, muss angenommen werden, dass Lck an einem oder mehreren Signalschritten angreift, die durch jeden dieser Stimuli aktiviert werden. Mitochondriale Apoptosesignalwege werden hauptsächlich durch die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert. Somit könnte Lck direkt oder indirekt an der Regulation der Aktivität von Bcl-2-Familie-Proteinen beteiligt sein. Die bisher bekannten Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Doxorubicin, 5-FU und Paclitaxel sollen daher im Folgenden näher betrachtet werden (Abb.35).

Das Anthracyclin Doxorubicin interkaliert in die DNA, inhibiert Topoisomerase II und generiert reaktive Sauerstoffverbindungen. Diese Mechanismen bewirken

DNA-Schäden und führen infolgedessen zur Apoptoseinduktion (Muller et al., 1998). Die Doxorubicin-induzierte Apoptose wird typischerweise durch Bak- und Bax-vermittelte Cytochrom-c-Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum mit nachfolgender Caspasenaktivierung erreicht (Gamen et al., 2000; Panaretakis et al., 2002).

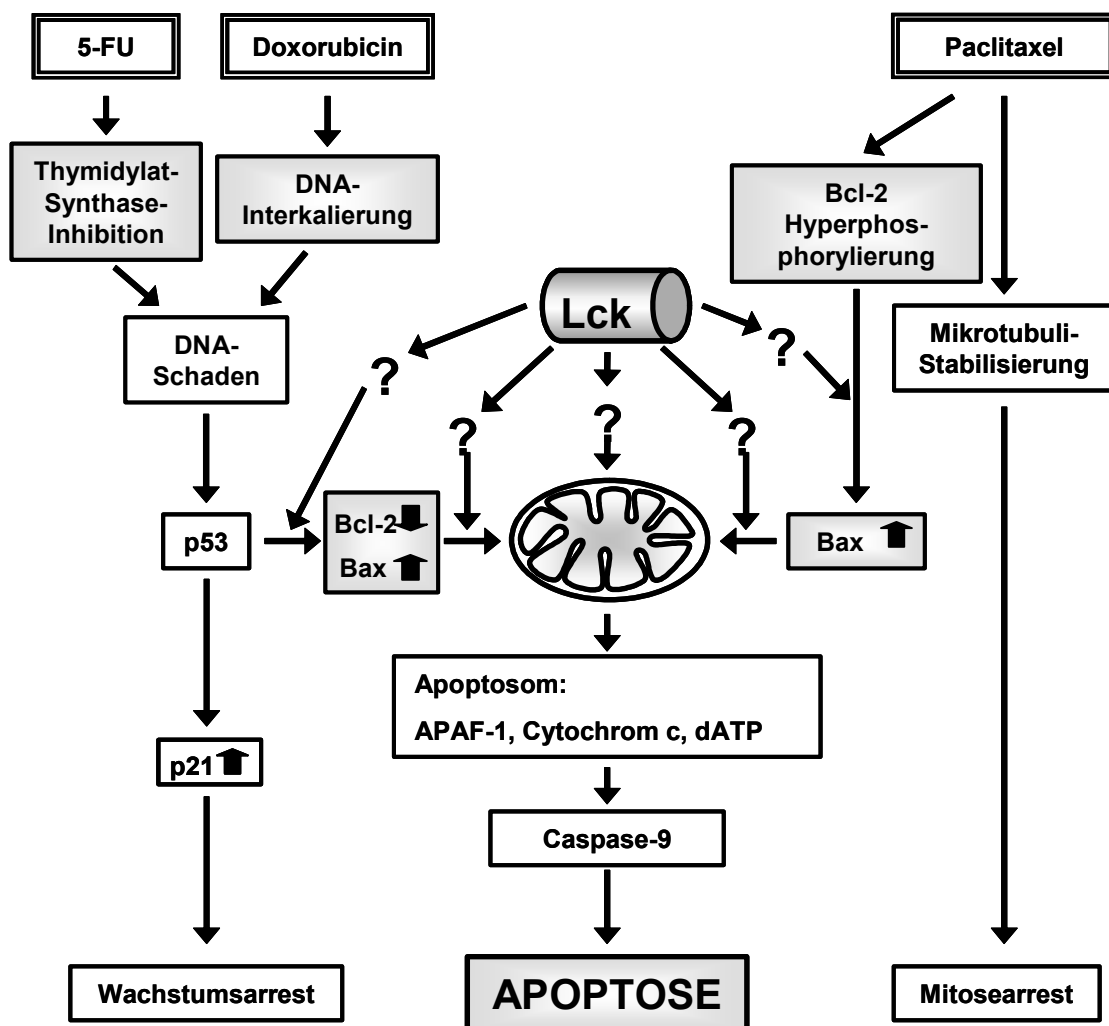


Abbildung 35: Intrazelluläre Signalwege nach Inkubation mit 5-FU, Doxorubicin oder Paclitaxel.

5-FU, ein Hemmstoff der Thymidylat-Synthase, bewirkt ebenfalls durch DNA-Schäden Apoptoseinduktion. Die Thymidylat-Synthase ist ein Enzym, das

essentiell für die de novo Synthese von Thymidylat und damit für die DNA-Synthese ist. 5-FU bewirkt daher eine Depletion von dTTP und eine Zunahme von dUTP. Infolgedessen wird dUTP anstelle von dTTP in die DNA eingebaut, dessen Exzision zu DNA-Schäden führt (Van Triest et al., 2000). DNA-schädigende Substanzen wie 5-FU induzieren Apoptose über p53-abhängige Hochregulation des proapoptotischen Bcl-2-Familie-Proteins Bax (Van Triest et al., 2000) mit subsequenter intrazellulärer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Gross et al., 1998; Jurgensmeier et al., 1998; Kluck et al., 1997; Pastorino et al., 1998). Außerdem zeigen weitere Untersuchungen, dass die relativen Expressionslevel von Bax, Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> die Apoptosesensitivität von Tumorzellen gegenüber 5-FU bestimmen (Mirjolet et al., 2000; Violette et al., 2002; Xu et al., 2002).

Paclitaxel bewirkt dagegen keine DNA-Schäden, sondern greift in die Bildung des Spindelapparates ein und stört die Funktion des Spindelapparates während der Mitose. Paclitaxel stabilisiert die Microtubuli und verhindert dynamische Veränderungen des Spindelapparates (Jordan et al., 1993; Jordan und Wilson, 1998). Dadurch können sich die Chromosomen nicht regulär anordnen und es kommt zum Mitosearrest am Übergang von der Meta- zur Anaphase (Jordan et al., 1996; Long und Fairchild, 1994). Paclitaxel induziert jedoch auch p53-unabhängigen apoptotischen Zelltod (Blagosklonny und Fojo, 1999; Jordan und Wilson, 1998) über den mitochondrialen Signalweg (Blagosklonny und Fojo, 1999; Perkins et al., 2000). Im Rahmen der Apoptoseinduktion durch Spindelgifte wie Paclitaxel kommt es zur Hyperphosphorylierung von Bcl-2 an mehreren Serin-Resten (Basu und Haldar, 1998; Haldar et al., 1998; Wang et al., 1999). Dies wird möglicherweise über die Aktivierung von Kinase-Signalwegen, wie den JNK-Signalweg oder die Inaktivierung von Proteinphosphatasen erreicht (Brichese et al., 2004; Kwan et al., 2001; Shiah et al., 2001; Wang et al., 1999). Die Hyperphosphorylierung von Bcl-2 führt zu dessen Inaktivierung und damit zur Aufhebung der antiapoptotischen Eigenschaft von Bcl-2 (Fan et al., 2000; Yamamoto et al., 1999). Nach bisherigen Erkenntnissen wird dies dadurch erreicht,

dass phosphoryliertes Bcl-2 nicht mit Bax assoziieren kann. Dadurch ist der Spiegel an freiem Bax erhöht, was zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges führt (Haldar et al., 1996; Ibrado et al., 1997). Als spätes Ereignis der Paclitaxel-induzierten Apoptose kommt es zur Akkumulierung von Bak, welches am Mitochondrium ebenfalls proapoptotisch wirkt (Tudor et al., 2000).

Somit wurden Chemotherapeutika mit sehr unterschiedlichen Primärzielen eingesetzt, um den Einfluss von Lck auf apoptotische Signalwege zu ermitteln. Sowohl ionisierende Strahlung, als auch die hier eingesetzten Chemotherapeutika vermitteln über Bak oder Bax mitochondriale Apoptoseschritte. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass Lck in die gemeinsame Endstrecke der Apoptoseinduktion durch diese Stimuli eingreift. Lck könnte an der Aktivierung oder der Vermittlung der Expression von Bax oder Bak und der nachfolgenden Freisetzung von Cytochrom c beteiligt sein. Tatsächlich konnte in Jurkat-T-Zellen gezeigt werden, dass Lck für die Expression von Bax bei der Apoptoseinduktion durch CD4-Rezeptor-Stimulation benötigt wird (Tuosto et al., 2002).

Bezüglich der CD95- und TRAIL-vermittelten Apoptose kommen ebenfalls Bax oder Bak als Angriffspunkt der Apoptoseregulation durch Lck in Frage. Der mitochondriale Verstärkungsweg der Todesrezeptor-induzierten Apoptose wird über Caspase-8-vermittelte Aktivierung von Bid gestartet (Li et al., 1998; Liu et al., 1998). Für die Wirkung von Bid am Mitochondrium wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen: Zum einen eine direkte Störung der Lipidstruktur der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung von Cytochrom c führt (Kluck et al., 1999; Kudla et al., 2000; Lutter et al., 2000) und zum anderen eine Interaktion von Bid mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak, was zu deren Aktivierung und darüber zur Cytochrom-c-Freisetzung führt (Eskes et al., 2000; Green, 2000; Wang et al., 1996). In Zellen, denen sowohl Bak, als auch Bax fehlt, kommt es oberhalb vom Mitochondrium zum Apoptosestopp (Cartron et al., 2003; Kandasamy et al., 2003; Wei et al., 2001; Zong et al., 2001). Somit könnte Lck durch direkte oder indirekte Interaktion mit Bax oder Bak oder durch Beeinflussung

deren Expression den mitochondrialen Verstärkungsweg der Todesrezeptor-induzierten Apoptose regulieren. Bcl-2 ist als weiterer möglicher Angriffspunkt von Lck eher unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, dass Lck nicht an der Regulation der Bcl-2-Funktion durch Hyperphosphorylierung beteiligt ist (Blagosklonny, 1999).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Lck die apoptotische Maschinerie durch Interaktion mit übergeordneten Proteinen der Apoptoseregulation moduliert. Es wurde berichtet, dass Lck an der Phosphoregulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase (von Willebrand et al., 1998), Erk1 und Erk2 (Kabouridis et al., 1997; Samelson, 2002) oder GTPasen der Rho-Familie (Han et al., 1997) beteiligt ist, die alle in die Kontrolle von Proliferation und Apoptose eingebunden sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika durch Inhibierung der Erk-Aktivierung mittels des MEK-I-Inhibitors PD98059 nicht gestört wird. Außerdem wurde gezeigt, dass die Apoptoseinduktion durch Inhibition der Kinaseaktivität von Lck, die Voraussetzung für die Erk-Aktivierung und weitere Signalwege ist, nicht gestört wird. Daher scheint die proapoptotische Funktion von Lck unabhängig von der Erk-Aktivierung zu sein.

Eine weitere wichtige zelluläre Funktion, die von Lck beeinflusst wird, ist der Ionenhaushalt. Lck wirkt an der Regulation verschiedener Ionenkanalsysteme mit, was in Zusammenhang mit der Apoptoseregulation von Bedeutung sein könnte. So wurde beobachtet, dass Lck für die Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum nach TZR-Stimulierung notwendig ist (al-Ramadi et al., 1996; Straus und Weiss, 1992; Straus et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass T-Zellen, die den für die Kalzium-Freisetzung benötigten IP3(Inositol-1,4,5-trisphosphat)-Rezeptor vom Typ 1 nicht und vom Typ 2 und 3 vermindert exprimieren, resistent gegenüber Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen, CD95-Stimulation und TZR-Stimulation sind (Jayaraman und Marks, 1997). Diese Beobachtungen zeigen, dass Kalzium an der Signalgebung bei der strahlen- und CD95-induzierten Apoptose beteiligt ist. Darüber hinaus liefern sie einen indirekten

Hinweis auf die Mitwirkung von Lck an der Regulation von Kalziumsignalen bei der Apoptoseinduktion.

Des Weiteren wurde dokumentiert, dass Lck für die Regulation des n-Typ Kaliumkanals (Szabo et al., 1996) und des auswärts-rectifizierenden Chloridkanals (Szabo et al., 1998) im Rahmen der Apoptoseinduktion durch Ceramid oder CD95 von Bedeutung ist. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Bax an der Signalgebung Ceramid-induzierter mitochondrialer Veränderungen und Apoptose beteiligt ist (von Haefen et al., 2002). Daher wäre auch bei der Ceramid-vermittelten Apoptose Bax ein möglicher Angriffspunkt für die Apoptoseregulation durch die Tyrosinkinase Lck. Ceramid bewirkt Veränderungen in der Zusammensetzung der Membranlipide (Huang et al., 1999). Dies kann wiederum die Anreicherung von Signalmolekülen, wie z.B. Oberflächenrezeptoren, in speziellen Cholesterol- und Sphingolipidreichen Membrandomänen erleichtern und dadurch deren Aktivierung auslösen (Boldin et al., 1995; Grassme et al., 2001). Neben Oberflächenrezeptoren wie CD95 wurden in diesen Membranbereichen Proteine der Src-Familie, darunter auch Lck, gefunden (Janes et al., 2000; Kosugi et al., 2001; Rodgers und Rose, 1996). Daher könnte die Aktivierung von Lck durch Ceramid-vermittelte Konzentrierung von übergeordneten Signalmolekülen in bestimmten Membranbereichen begünstigt werden.

### ***7.8 Eigenschaften der verwendeten Zelllinien als mögliche Ursachen für die Unterschiede bei der Apoptoseinduktion***

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die Zelllinie JCaM1.6 verwendet, in der kein genetischer Defekt der Lck Expression, sondern eine Splicevariante mit einem Defekt der ATP-Bindungsstelle in der Kinasedomäne vorliegt (Straus und Weiss, 1992). Da Apoptoseinhibition durch gespaltene Src-Kinasen oder isolierte SH2-Domänen beobachtet wurde (Evans et al., 1997; Farschon et al., 1997; Luciano et al., 2003), wäre es möglich, dass diese trunkierte Lck ebenfalls die Apoptoseinduktion in JCaM1.6-Zellen stört. Über die zur Src-Familie gehörende Tyrosinkinase Lyn wurde berichtet, dass Lyn nach B-



Zellrezeptoraktivierung Caspasen-abhängig gespalten wird und dass die gespaltene Form der Tyrosinkinase als negativer Regulator mitochondrialer Apoptoseschritte fungiert. Diese Apoptose-inhibierende Funktion des Spaltproduktes wurde einer Lyn-vermittelten Modulation der c-myc-Expression zugeschrieben (Luciano et al., 2003). Während hohe Myc-Spiegel Apoptose begünstigen, bewirken niedrige Myc-Spiegel Apoptoseresistenz (Seoane et al., 2002). Die Apoptoseinhibition durch Lyn-Spaltprodukte korreliert mit Beobachtungen, dass in zellfreien Systemen Peptide mit isolierten SH2 Domänen von Lck, Src, Abl oder der verwandten Tyrosinkinase Crk interagieren, wodurch Apoptose im initialen Stadium inhibiert wird (Evans et al., 1997; Farschon et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung wichtig, dass die SH2-Domäne für die proapoptotische Funktion von Lck bei der Apoptoseinduktion durch Rosmarinsäure von Bedeutung ist (Hur et al., 2004). Die SH2-Domänen von Lck vermitteln Interaktionen mit Tyrosin-phosphorylierten Liganden (Couture et al., 1996). Somit bewirkt die Zugabe von freien SH2-Domänen möglicherweise eine dominant negative Inhibition der Interaktion von Lck mit ihren Zielmolekülen. Da die hier eingesetzten JCaM1.6-Zellen keine eigentliche Lck-Defizienz aufweisen, sondern eine Splicevariante mit funktionsloser Kinasedomäne exprimieren (Straus und Weiss, 1992), könnte in diesen Zellen ein ähnlicher inhibitorischer Mechanismus wie durch Lyn-Spaltprodukte in den B-Zellen eine Rolle spielen. Somit könnte die Lck-Splicevariante in JCaM1.6-Zellen, die eine SH2-Domäne enthält, als dominant-negativer Inhibitor der Myc-Expression fungieren und so die Apoptosesensitivität modulieren. Diese Hypothese könnte dann auch als Erklärung dafür dienen, dass die Expression von Src in JCaM1.6-Zellen keine Apoptosesensitivität bewirkt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zu erwähnen, dass Lck zwar die am stärksten exprimierte Tyrosinkinase der Src-Familie in T-Lymphozyten ist, dass jedoch andere Src-Kinasen, wie Fyn, in geringer Menge ebenfalls exprimiert werden (Kawakami et al., 1989). Fyn kann sogar während der Entwicklung von T-Lymphozyten Lck teilweise ersetzen (Groves et al., 1996). Somit könnte die in JCaM1.6-Zellen exprimierte

Splicevariante von Lck die eventuell mögliche Interaktion von anderen Tyrosinkinasen der Src-Familie mit ihren Substraten unterbinden und damit verhindern, dass die proapoptotische Funktion von Lck durch andere Src-Kinasen ersetzt wird. Andererseits scheint diese dominant negative Inhibition in den mit Lck retransfizierten JCaM1.6/Lck-Zellen keine Rolle zu spielen, zumal die gemessenen Apoptoseraten in JCaM1.6/Lck-Zellen und der Ausgangszelllinie Jurkat nach Bestrahlung, Todesrezeptor-Stimulation oder Behandlung mit Chemotherapeutika zu den gewählten Zeitpunkten ungefähr gleich sind. Allerdings wird Lck in den JCaM1.6/Lck-Zellen überexprimiert und könnte daher die inhibierenden Splicevarianten von den Substraten verdrängen.

Eine neuere Untersuchung weist auf eine verminderte Bak-Expression in Lck-defizienten Zellen als Ursache für die verminderte Apoptoserate hin (Samraj et al., 2005). Die Autoren beobachteten eine Apoptoseresistenz und insbesondere fehlende mitochondriale Apoptoseschritte nach Behandlung Lck-defizienter Zellen mit Etoposid, Daunorubicin, Doxorubicin oder Mitomycin C. Interessanterweise stellten sie in Lck-defizienten Zellen eine sehr geringe Bak-Expression im Vergleich zu Lck-exprimierenden Zellen fest. Daher führen sie die positive Regulation mitochondrialer Apoptoseschritte durch Lck darauf zurück, dass Lck die Bax-Expression kontrolliert.

### **7.9 Schlussfolgerung**

Die Untersuchung der molekularen Mechanismen von Zelltodprozessen ist von wesentlicher Bedeutung für die Aufklärung von Tumorentstehung und Tumorprogression, sowie der Entstehung von Therapieresistenzen und ist daher ein grundlegender Schritt zur Verbesserung bisheriger Therapiestrategien und insbesondere für die Entwicklung spezifischer Therapien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Lck mitochondriale Apoptoseschritte unabhängig von der Art des verwendeten Stimulus vermittelt und dass Lck diese Funktion spezifisch erfüllt. Eine Lck-Defizienz führt in T-Lymphozyten zu schweren Apoptosedefekten. Somit könnte eine Lck-Defizienz sowohl an der Tumorentstehung und –progression beteiligt sein, als auch Therapieresistenzen bedingen. Bisher ist der genaue Mechanismus der Apoptoseregulation durch Lck jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Insbesondere besteht Unklarheit über mögliche Interaktionspartner von Lck im Rahmen der Apoptoseinduktion. Um darüber genauere Kenntnisse zu erlangen, müssten einzelne Proteine inhibiert werden und die Auswirkung dieser Inhibition in Lck-defizienten und Lck-exprimierenden Zellen verglichen werden. Außerdem sollte versucht werden, die direkte Interaktion von Lck mit Substraten nachzuweisen, die Teil der apoptotischen Signalwege sind.

## 8 Zusammenfassung

Strahlentherapeutische Behandlungsverfahren stellen als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie oder Chirurgie eine tragende Säule der Tumorthherapie dar. Die Effizienz der onkologischen Therapie wird jedoch durch die Toleranz der Normalgewebe und durch intrinsische Therapieresistenzen limitiert. Wesentliches Ziel der onkologischen Forschung ist daher die Verbesserung bisheriger Therapiekonzepte und die Entwicklung neuer, spezifischer Behandlungsverfahren. Voraussetzung für eine Optimierung der Tumorthherapie ist zum einen die Aufklärung der biologischen Grundlagen der Krebsentstehung und zum anderen die genaue Analyse der Wirkmechanismen üblicher Therapieverfahren. Radioonkologische Therapiestrategien haben die Abtötung von Tumorzellen unter größtmöglicher Schonung des Normalgewebes zum Ziel. Daher ist insbesondere die Untersuchung des strahleninduzierten Zelltodes von entscheidender Bedeutung für die Weiterentwicklung bisheriger Therapieverfahren. Erkenntnisse über Zelltodvorgänge und fehlerhafte Zelltodregulation in Tumorzellen können der Entwicklung verbesserter und spezifischer Therapiestrategien dienen und so eine verbesserte Tumorkontrolle und verringerte Schädigung von Normalgewebe zur Folge haben.

Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Signalwege des strahleninduzierten programmierten Zelltodes analysiert werden.

Programmierter Zelltod oder Apoptose ist ein wesentlicher Vorgang zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Molekularbiologische Charakteristika der Apoptose sind die Aktivierung von Caspasen und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials mit Freisetzung von Cytochrom c, was letztendlich zur Degradierung der DNA, Zellschrumpfung und Zellzerfall in apoptotische Körperchen führt. Der programmierte Zelltod unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen, insbesondere durch Proteine der Bcl-2-Familie. Aus

Vorarbeiten ergaben sich Hinweise, dass die Tyrosinkinase p56/Lck ebenfalls in die Apoptoseregulation eingebunden ist.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, die Funktion von p56/Lck für die Apoptoseinduktion genauer zu charakterisieren. Als Zellmodell dienten hierfür die von Jurkat-Zellen abgeleiteten Lck-defizienten JCaM1.6-Zellen und als Kontrolle Jurkat-Wildtyp-Zellen und mit Lck retransfizierte JCaM1.6-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass funktionell intakte Lck zur Apoptoseinduktion durch ionisierende Strahlen mit Caspasenaktivierung, Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, Cytochrom-c-Freisetzung, morphologischen Zellveränderungen und DNA-Kondensation benötigt wird. Bei der Apoptoseinduktion werden zwei wesentliche Signalwege abgegrenzt. Zum einen der rezeptorvermittelte Signalweg mit direkter Caspasenspaltung nach Aktivierung von Oberflächenrezeptoren und zum anderen der durch zellulären Stress gestartete Signalweg, der über mitochondriale Veränderungen die Caspasenaktivierung bewirkt. Da bekannt ist, dass ionisierende Strahlung Apoptose über mitochondriale Signalwege induziert, weisen die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass Lck mitochondriale Apoptoseschritte reguliert. Um diese Regulierung genauer zu spezifizieren, wurden die Lck-defizienten Zellen mit einer Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zelllinie verglichen, zumal Bcl-2 ein bekannter Inhibitor mitochondrialer Apoptosesignale ist. Dabei zeigte sich, dass sich die Lck-Defizienz auf die strahleninduzierte Apoptose ähnlich wie eine Bcl-2-Überexpression auswirkt.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Lck ebenfalls die rezeptorvermittelte Apoptose beeinflusst. Allerdings kann eine Lck-Defizienz die Apoptoseinduktion durch Stimulierung von Todesrezeptoren nicht unterbinden, sondern bewirkt lediglich eine verlangsamte Apoptosekinetik. Die Tatsache, dass die Lck-Defizienz die rezeptorvermittelte Apoptose nicht komplett verhindert, ist ein weiterer Beleg dafür, dass Lck in mitochondriale Apoptosesignalwege eingebunden ist. Die verlangsamte Kinetik bei der rezeptorvermittelten Apoptose wird

wahrscheinlich durch den Ausfall eines sekundären mitochondrialen Verstärkungsweges in Lck-defizienten Zellen verursacht.

Um die Bedeutung von Lck für mitochondriale Signalwege weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluss der Lck-Defizienz auf die Apoptoseinduktion durch andere Apoptosestimuli untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Lck-Defizienz die Apoptoseinduktion durch verschiedene Chemotherapeutika verhindert, die zwar unterschiedlichen Primärzielen haben, letztendlich aber über mitochondriale Veränderungen Apoptose induzieren. Damit belegen die hier vorliegenden Untersuchungen die globale Relevanz der Tyrosinkinase Lck für mitochondriale Apoptoseschritte.

Im Folgenden sollte der Funktionsmechanismus von Lck genauer untersucht werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität von Lck die Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika nicht behindert. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Apoptoseinduktion bei den JCaM1.6-Zellen, die eine trunkeierte Kinase mit funktionsloser Kinasedomäne exprimieren.

Um Hinweise auf die Art der Interaktion von Lck mit Proteinen der Apoptosesignalwege zu erhalten wurde geprüft, ob die verwandte Tyrosinkinase Src Lck funktionell ersetzen kann. Die Transfektion von Lck-defizienten Zellen mit src bewirkte jedoch keine Wiederherstellung der Apoptosesensitivität gegenüber ionisierender Strahlung oder Chemotherapeutika. Somit hat Lck eine spezifische Funktion innerhalb mitochondrialer Signalwege.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tyrosinkinase p56/Lck für den Ablauf mitochondrialer Apoptoseschritte essentiell ist, unabhängig von der Art des verwendeten Stimulus. Diese proapoptotische Funktion wird spezifisch durch Lck erfüllt und erfolgt unabhängig von der Tyrosinkinaseaktivität.

## 9. Literaturverzeichnis

Abraham, K. M., Levin, S. D., Marth, J. D., Forbush, K. A., and Perlmutter, R. M. (1991). Delayed thymocyte development induced by augmented expression of p56lck. *J Exp Med* *173*, 1421-1432.

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

al-Ramadi, B. K., Nakamura, T., Leitenberg, D., and Bothwell, A. L. (1996). Deficient expression of p56(lck) in Th2 cells leads to partial TCR signaling and a dysregulation in lymphokine mRNA levels. *J Immunol* *157*, 4751-4761.

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

Anderson, S. J., Levin, S. D., and Perlmutter, R. M. (1994). Involvement of the protein tyrosine kinase p56lck in T cell signaling and thymocyte development. *Adv Immunol* *56*, 151-178.

Anderson, S. J., and Perlmutter, R. M. (1995). A signaling pathway governing early thymocyte maturation. *Immunol Today* *16*, 99-105.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305-1308.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* *2*, 420-430.

Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V., and Schlessinger, J. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* *74*, 83-91.

Basu, A., and Haldar, S. (1998). Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein. *Int J Oncol* *13*, 659-664.

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

- Belka, C., Rudner, J., Wesselborg, S., Stepczynska, A., Marini, P., Lepple-Wienhues, A., Faltin, H., Bamberg, M., Budach, W., and Schulze-Osthoff, K. (2000). Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* *19*, 1181-1190.
- Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G. H., Senkevich, T. G., Alnemri, E. S., Moss, B., Lenardo, M. J., Tomaselli, K. J., and Cohen, J. I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1172-1176.
- Blagosklonny, M. V. (1999). Drug-resistance enables selective killing of resistant leukemia cells: exploiting of drug resistance instead of reversal. *Leukemia* *13*, 2031-2035.
- Blagosklonny, M. V., and Fojo, T. (1999). Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* *83*, 151-156.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P. R., Marco, S. D., Krebs, J. F., Wu, J. C., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure* *7*, 1125-1133.
- Boatright, K. M., and Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 725-731.
- Bodmer, J. L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L. E., Browning, J. L., MacDonald, H. R., and Tschopp, J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* *6*, 79-88.
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* *74*, 597-608.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* *270*, 7795-7798.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803-815.



- Bolen, J. B., Rowley, R. B., Spana, C., and Tsygankov, A. Y. (1992). The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *Faseb J* 6, 3403-3409.
- Boone, E., Vanden Berghe, T., Van Loo, G., De Wilde, G., De Wael, N., Vercammen, D., Fiers, W., Haegeman, G., and Vandenabeele, P. (2000). Structure/Function analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells. *J Biol Chem* 275, 37596-37603.
- Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., Schaerer, E., Martinou, J. C., and Tschopp, J. (1994). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Biol* 126, 1059-1068.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.
- Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., and et al. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11, 1921-1928.
- Brichese, L., Cazettes, G., and Valette, A. (2004). JNK is associated with Bcl-2 and PP1 in mitochondria: paclitaxel induces its activation and its association with the phosphorylated form of Bcl-2. *Cell Cycle* 3, 1312-1319.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H. J., Schlaeger, E. J., Hunziker, W., Lesslauer, W., and Loetscher, H. (1990). Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3127-3131.
- Brown, M. T., and Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287, 121-149.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F., and et al. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444.
- Buendia, B., Santa-Maria, A., and Courvalin, J. C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 11), 1743-1753.

- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Cartron, P. F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2003). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 23, 4701-4712.
- Chan, A. C., Desai, D. M., and Weiss, A. (1994). The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 12, 555-592.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7, 821-830.
- Chen-Levy, Z., and Cleary, M. L. (1990). Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem* 265, 4929-4933.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., and Dixit, V. M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-1126.
- Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733-736.
- Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I., and Shin, H. S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11, 1693-1698.
- Chow, L. M., Fournel, M., Davidson, D., and Veillette, A. (1993). Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* 365, 156-160.

Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A., and Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554-559.

Combadiere, B., Reis e Sousa, C., Trageser, C., Zheng, L. X., Kim, C. R., and Lenardo, M. J. (1998). Differential TCR signaling regulates apoptosis and immunopathology during antigen responses in vivo. *Immunity* 9, 305-313.

Conradt, B., and Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.

Cooper, J. A., and Howell, B. (1993). The when and how of Src regulation. *Cell* 73, 1051-1054.

Couture, C., Deckert, M., Williams, S., Russo, F. O., Altman, A., and Mustelin, T. (1996). Identification of the site in the Syk protein tyrosine kinase that binds the SH2 domain of Lck. *J Biol Chem* 271, 24294-24299.

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

D'Oro, U., Vacchio, M. S., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. (1997). Activation of the Lck tyrosine kinase targets cell surface T cell antigen receptors for lysosomal degradation. *Immunity* 7, 619-628.

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

Denny, M. F., Kaufman, H. C., Chan, A. C., and Straus, D. B. (1999). The lck SH3 domain is required for activation of the mitogen-activated protein kinase pathway but not the initiation of T-cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 274, 5146-5152.

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

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

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

Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-441.

Di Somma, M. M., Majolini, M. B., Burastero, S. E., Telford, J. L., and Baldari, C. T. (1996). Cyclosporin A sensitivity of the HIV-1 long terminal repeat identifies distinct p56lck-dependent pathways activated by CD4 triggering. *Eur J Immunol* 26, 2181-2188.

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

Dymecki, S. M., Niederhuber, J. E., and Desiderio, S. V. (1990). Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk*, in B lymphoid cells. *Science* 247, 332-336.

Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-1840.

Eischen, C. M., Dick, C. J., and Leibson, P. J. (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 153, 1947-1954.

Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

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

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-935.

Evans, E. K., Lu, W., Strum, S. L., Mayer, B. J., and Kornbluth, S. (1997). Crk is required for apoptosis in *Xenopus* egg extracts. *Embo J* 16, 230-241.

Fadok, V. A., and Henson, P. M. (1998). Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol* 8, R693-695.

Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2003). Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist--with a twist. *Curr Biol* 13, R655-657.

Fan, M., Goodwin, M., Vu, T., Brantley-Finley, C., Gaarde, W. A., and Chambers, T. C. (2000). Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J Biol Chem* 275, 29980-29985.

Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C., and Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.

Farschon, D. M., Couture, C., Mustelin, T., and Newmeyer, D. D. (1997). Temporal phases in apoptosis defined by the actions of Src homology 2 domains, ceramide, Bcl-2, interleukin-1beta converting enzyme family proteases, and a dense membrane fraction. *J Cell Biol* 137, 1117-1125.

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

Fischer, U., and Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 57, 187-215.

Forrester, H. B., Vidair, C. A., Albright, N., Ling, C. C., and Dewey, W. C. (1999). Using computerized video time lapse for quantifying cell death of X-irradiated rat embryo cells transfected with c-myc or c-Ha-ras. *Cancer Res* 59, 931-939.

Fusaki, N., Iwamatsu, A., Iwashima, M., and Fujisawa, J. (1997). Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 272, 6214-6219.

Gamen, S., Anel, A., Perez-Galan, P., Lasierra, P., Johnson, D., Pineiro, A., and Naval, J. (2000). Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltapسيم loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells. *Exp Cell Res* 258, 223-235.

Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., and Hengartner, M. O. (2000). A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage--induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol Cell* 5, 435-443.

Gibson, L., Holmgreen, S. P., Huang, D. C., Bernard, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sutherland, G. R., Baker, E., Adams, J. M., and Cory, S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665-675.

- Golden, A., Nemeth, S. P., and Brugge, J. S. (1986). Blood platelets express high levels of the pp60c-src-specific tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 852-856.
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **276**, 20589-20596.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1-4.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* **17**, 3878-3885.
- Groves, T., Smiley, P., Cooke, M. P., Forbush, K., Perlmutter, R. M., and Guidos, C. J. (1996). Fyn can partially substitute for Lck in T lymphocyte development. *Immunity* **5**, 417-428.
- Haldar, S., Chintapalli, J., and Croce, C. M. (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* **56**, 1253-1255.
- Haldar, S., Basu, A., and Croce, C. M. (1998). Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res* **58**, 1609-1615.
- Han, J., Sabbatini, P., and White, E. (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* **16**, 5857-5864.
- Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J., and Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol* **17**, 1346-1353.
- Hardwick, J. S., and Sefton, B. M. (1997). The activated form of the Lck tyrosine protein kinase in cells exposed to hydrogen peroxide is phosphorylated at both Tyr-394 and Tyr-505. *J Biol Chem* **272**, 25429-25432.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Blk, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* **273**, 7783-7786.
- Hengartner, M. O., Ellis, R. E., and Horvitz, H. R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499.

Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Hofmann, K. (1999). The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci* 55, 1113-1128.

Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A. J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12401-12406.

Hsu, S. Y., Lin, P., and Hsueh, A. J. (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol* 12, 1432-1440.

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

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.

Huang, D. C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., and Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14871-14876.

Huang, D. C., Tschopp, J., and Strasser, A. (2000). Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ* 7, 754-755.

Huang, H. W., Goldberg, E. M., and Zidovetzki, R. (1999). Ceramides modulate protein kinase C activity and perturb the structure of Phosphatidylcholine/Phosphatidylserine bilayers. *Biophys J* 77, 1489-1497.

Hui, H., Dotta, F., Di Mario, U., and Perfetti, R. (2004). Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol* 200, 177-200.

- Hur, Y. G., Yun, Y., and Won, J. (2004). Rosmarinic acid induces p56lck-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 172, 79-87.
- Ibrado, A. M., Liu, L., and Bhalla, K. (1997). Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 57, 1109-1115.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Nunez, G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* 16, 1686-1694.
- Inohara, N., Gourley, T. S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273, 32479-32486.
- Isakov, N., and Biesinger, B. (2000). Lck protein tyrosine kinase is a key regulator of T-cell activation and a target for signal intervention by Herpesvirus saimiri and other viral gene products. *Eur J Biochem* 267, 3413-3421.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 12, 23-34.
- Jayaraman, T., and Marks, A. R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Mol Cell Biol* 17, 3005-3012.
- Jendrossek, V., Handrick, R., and Belka, C. (2003). Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *Faseb J* 17, 1547-1549.
- Johnson, D. R., Bhatnagar, R. S., Knoll, L. J., and Gordon, J. I. (1994). Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem* 63, 869-914.



Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 9552-9556.

Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., and Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* *56*, 816-825.

Jordan, M. A., and Wilson, L. (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 123-130.

Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z., and Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* *373*, 444-448.

Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4997-5002.

Kabouridis, P. S., Magee, A. I., and Ley, S. C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *Embo J* *16*, 4983-4998.

Kandasamy, K., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., Bryant, J. L., and Srivastava, R. K. (2003). Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* *63*, 1712-1721.

Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* *12*, 242-249.

Kawakami, Y., Furue, M., and Kawakami, T. (1989). Identification of fyn-encoded proteins in normal human blood cells. *Oncogene* *4*, 389-391.

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

Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D., and Barr, P. J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* *374*, 736-739.

Kiess, W., and Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* *138*, 482-491.

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

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276, 46639-46646.

Kitada, S., Krajewski, S., Miyashita, T., Krajewska, M., and Reed, J. C. (1996). Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. *Oncogene* 12, 187-192.

Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y. P., Goeddel, D. V., Giles, K. M., Pun, K. T., Grinham, C. J., Brown, R., and Farrow, S. N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.

Klages, S., Adam, D., Class, K., Fargnoli, J., Bolen, J. B., and Penhallow, R. C. (1994). Ctk: a protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2597-2601.

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

Kluck, R. M., Esposti, M. D., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzel, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M. J., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1999). The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol* 147, 809-822.

Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252, 668-674.

Kosugi, A., Hayashi, F., Liddicoat, D. R., Yasuda, K., Saitoh, S., and Hamaoka, T. (2001). A pivotal role of cysteine 3 of Lck tyrosine kinase for localization to glycolipid-enriched microdomains and T cell activation. *Immunol Lett* 76, 133-138.

Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., and Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-3520.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.

Krammer, P. H. (2000). Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* 97, A-1752-1759.

Kroemer, G. (1995). The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol* 58, 211-296.

Krueger, J., Zhao, Y. H., Murphy, D., and Sudol, M. (1991). Differential expression of p62c-yes in normal, hyperplastic and neoplastic human epidermis. *Oncogene* 6, 933-940.

Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J. C., Ghazi, A., and Antonsson, B. (2000). The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem* 275, 22713-22718.

Kwan, R., Burnside, J., Kurosaki, T., and Cheng, G. (2001). MEKK1 is essential for DT40 cell apoptosis in response to microtubule disruption. *Mol Cell Biol* 21, 7183-7190.

Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.

Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., Hooley, J., Sherwood, S., Pai, R., Leung, S., Khan, L., Gliniak, B., Bussiere, J., Smith, C. A., Strom, S. S., Kelley, S., Fox, J. A., Thomas, D., and Ashkenazi, A. (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 7, 383-385.

Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481-1486.

Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.

Levin, S. D., Anderson, S. J., Forbush, K. A., and Perlmutter, R. M. (1993). A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis. *Embo J* 12, 1671-1680.

Levkau, B., Garton, K. J., Ferri, N., Kloke, K., Nofer, J. R., Baba, H. A., Raines, E. W., and Breithardt, G. (2001). XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB: new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res* 88, 282-290.

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

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

Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G., and Ibanez, C. F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* 16, 4999-5005.

Lin, E. Y., Orlofsky, A., Wang, H. G., Reed, J. C., and Prystowsky, M. B. (1996). A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood* 87, 983-992.

Liu, D., Ishima, R., Tong, K. I., Bagby, S., Kokubo, T., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Nakatani, Y., and Ikura, M. (1998). Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell* 94, 573-583.

Ljungman, M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2, 208-225.

Long, B. H., and Fairchild, C. R. (1994). Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telephase. *Cancer Res* 54, 4355-4361.

Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z. Q., and Schulze-Osthoff, K. (2002). Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13, 978-988.

Luciano, F., Herrant, M., Jacquelin, A., Ricci, J. E., and Auberger, P. (2003). The p54 cleaved form of the tyrosine kinase Lyn generated by caspases during BCR-induced cell death in B lymphoma acts as a negative regulator of apoptosis. *Faseb J* 17, 711-713.

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

- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* 2, 754-761.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272, 25417-25420.
- Macho, A., Calzado, M. A., Jimenez-Reina, L., Ceballos, E., Leon, J., and Munoz, E. (1999). Susceptibility of HIV-1-TAT transfected cells to undergo apoptosis. Biochemical mechanisms. *Oncogene* 18, 7543-7551.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Manna, S. K., and Aggarwal, B. B. (2000). Differential requirement for p56lck in HIV-tat versus TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol* 164, 5156-5166.
- Manna, S. K., Sah, N. K., and Aggarwal, B. B. (2000). Protein tyrosine kinase p56lck is required for ceramide-induced but not tumor necrosis factor-induced activation of NF-kappa B, AP-1, JNK, and apoptosis. *J Biol Chem* 275, 13297-13306.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Donahue, C. J., Pitti, R. M., Gray, C. L., Goddard, A. D., Bauer, K. D., and Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol* 6, 1669-1676.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187, 1261-1271.
- McDonnell, T. J., Nunez, G., Platt, F. M., Hockenberry, D., London, L., McKearn, J. P., and Korsmeyer, S. J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 10, 1901-1907.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.

Milligan, C. E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L. C., Tomaselli, K. J., Oppenheim, R. W., and Schwartz, L. M. (1995). Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron* 15, 385-393.

Milligan, G., Parenti, M., and Magee, A. I. (1995). The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 20, 181-187.

Mirjole, J. F., Barberi-Heyob, M., Didelot, C., Peyrat, J. P., Abecassis, J., Millon, R., and Merlin, J. L. (2000). Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br J Cancer* 83, 1380-1386.

Mittl, P. R., Di Marco, S., Krebs, J. F., Bai, X., Karanewsky, D. S., Priestle, J. P., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem* 272, 6539-6547.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E. A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-660.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80, 293-299.

Molina, T. J., Kishihara, K., Siderovski, D. P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C. J., Hartmann, K. U., Veillette, A., and et al. (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 357, 161-164.

Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 17, 5334-5348.

Muller, I., Niethammer, D., and Bruchelt, G. (1998). Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *Int J Mol Med* 1, 491-494.

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

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

Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.

Nagata, S. (2000). Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat Med* 6, 502-503.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.

Newton, K., and Strasser, A. (2000). Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med* 191, 195-200.

Nguyen, M., Branton, P. E., Walton, P. A., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1994). Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem* 269, 16521-16524.

Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., and et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., and Huang, D. C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 17, 384-395.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., and et al. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267, 10709-10715.

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

Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14, 453-501.

Ostergaard, H. L., Shackelford, D. A., Hurley, T. R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B. M., and Trowbridge, I. S. (1989). Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8959-8963.

Otsuki, Y., Misaki, O., Sugimoto, O., Ito, Y., Tsujimoto, Y., and Akao, Y. (1994). Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 344, 28-29.

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

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

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

Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Shoshan, M. C., and Grandier, D. (2002). Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem* 277, 44317-44326.

Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., and Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273, 7770-7775.

Perkins, C. L., Fang, G., Kim, C. N., and Bhalla, K. N. (2000). The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res* 60, 1645-1653.

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



Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.

Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.

Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-1455.

Rincon, M. (2001). MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol* 13, 339-345.

Rodgers, W., and Rose, J. K. (1996). Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J Cell Biol* 135, 1515-1523.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., and Becker, J. W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-625.

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

Rudner, J., Belka, C., Marini, P., Wagner, R. J., Faltin, H., Lepple-Wienhues, A., Bamberg, M., and Budach, W. (2001). Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. *Int J Radiat Biol* 77, 1-11.

Rudner, J., Jendrossek, V., Lauber, K., Daniel, P. T., Wesselborg, S., and Belka, C. (2005). Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene* 24, 130-140.

Ruhwald, M., Pedersen, A. E., and Claesson, M. H. (1999). MHC class I cross-talk with CD2 and CD28 induces specific intracellular signalling and leads to growth retardation and apoptosis via a p56(lck)-dependent mechanism. *Exp Clin Immunogenet* 16, 199-211.

Sabe, H., Hata, A., Okada, M., Nakagawa, H., and Hanafusa, H. (1994). Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3984-3988.

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.

Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-446.

Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10964-10967.

Samelson, L. E. (2002). Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* **20**, 371-394.

Samraj, A. K., Stroh, C., Fischer, U., and Schulze-Osthoff, K. (2005). The tyrosine kinase Lck is a positive regulator of the mitochondrial apoptosis pathway by controlling Bak expression. *Oncogene*.

Santana, P., Pena, L. A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E. H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**, 189-199.

Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. C. (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* **268**, 411-415.

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

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

Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 25-30.

Schlottmann, K. E., Gulbins, E., Lau, S. M., and Coggeshall, K. M. (1996). Activation of Src-family tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* **60**, 546-554.

Schraven, B., and Peter, M. E. (1995). APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src kinases or CD45. *FEBS Lett* **368**, 491-494.

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

Screaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4615-4619.

Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* *419*, 729-734.

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

Shiah, S. G., Chuang, S. E., and Kuo, M. L. (2001). Involvement of Asp-Glu-Val-Asp-directed, caspase-mediated mitogen-activated protein kinase kinase 1 Cleavage, c-Jun N-terminal kinase activation, and subsequent Bcl-2 phosphorylation for paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells. *Mol Pharmacol* *59*, 254-262.

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

Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* *76*, 959-962.

Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. M., and Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *Embo J* *18*, 167-178.

Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A., and Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* *21*, 4520-4530.

Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., and Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* *260*, 170-173.

Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* *69*, 217-245.

Straus, D. B., and Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the Lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.

Straus, D. B., Chan, A. C., Patai, B., and Weiss, A. (1996). SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J Biol Chem* 271, 9976-9981.

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

Sudol, M., Greulich, H., Newman, L., Sarkar, A., Sukegawa, J., and Yamamoto, T. (1993). A novel Yes-related kinase, Yrk, is expressed at elevated levels in neural and hematopoietic tissues. *Oncogene* 8, 823-831.

Sulston, J., Du, Z., Thomas, K., Wilson, R., Hillier, L., Staden, R., Halloran, N., Green, P., Thierry-Mieg, J., Qiu, L., and et al. (1992). The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* 356, 37-41.

Sulston, J. E. (1976). Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275, 287-297.

Superti-Furga, G., Fumagalli, S., Koegl, M., Courtneidge, S. A., and Draetta, G. (1993). Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *Embo J* 12, 2625-2634.

Szabo, I., Gulbins, E., Apfel, H., Zhang, X., Barth, P., Busch, A. E., Schlottmann, K., Pongs, O., and Lang, F. (1996). Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J Biol Chem* 271, 20465-20469.

Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Kaba, K. N., Zoratti, M., Gulbins, E., and Lang, F. (1998). Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6169-6174.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.

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

Thome, M., Duplay, P., Guttinger, M., and Acuto, O. (1995). Syk and ZAP-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *J Exp Med* 181, 1997-2006.

Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Tschopp, J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-521.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

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

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-1443.

Tudor, G., Aguilera, A., Halverson, D. O., Laing, N. D., and Sausville, E. A. (2000). Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels. *Cell Death Differ* **7**, 574-586.

Tuosto, L., Marinari, B., and Piccolella, E. (2002). CD4-Lck through TCR and in the absence of Vav exchange factor induces Bax increase and mitochondrial damage. *J Immunol* **168**, 6106-6112.

Uckun, F. M., Waddick, K. G., Mahajan, S., Jun, X., Takata, M., Bolen, J., and Kurosaki, T. (1996). BTK as a mediator of radiation-induced apoptosis in DT-40 lymphoma B cells. *Science* **273**, 1096-1100.

Van Triest, B., Pinedo, H. M., Giaccone, G., and Peters, G. J. (2000). Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Ann Oncol* **11**, 385-391.

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

Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-442.

Vaux, D. L., Weissman, I. L., and Kim, S. K. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* **258**, 1955-1957.

Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.

Vaux, D. L., and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-297.

Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Samelson, L. E., and Bolen, J. B. (1989). Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* **338**, 257-259.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* **187**, 1477-1485.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* **188**, 919-930.

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

Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A. M., Chambaz, J., Lacorte, J. M., Staedel, C., and Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* **98**, 498-504.

Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Jent & Gassman, Solothurn.

von Haefen, C., Wieder, T., Gillissen, B., Starck, L., Graupner, V., Dorken, B., and Daniel, P. T. (2002). Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* **21**, 4009-4019.

von Willebrand, M., Williams, S., Saxena, M., Gilman, J., Tailor, P., Jascur, T., Amarante-Mendes, G. P., Green, D. R., and Mustelin, T. (1998). Modification of phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain binding properties by Abl- or Lck-mediated tyrosine phosphorylation at Tyr-688. *J Biol Chem* **273**, 3994-4000.

Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays Biochem* **39**, 53-71.

Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Rauch, C. T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* **16**, 5386-5397.

Wallach, D., Kovalenko, A. V., Varfolomeev, E. E., and Boldin, M. P. (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* **10**, 279-288.

Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M., and Lenardo, M. J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13884-13888.

Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* **10**, 2859-2869.

Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W., and Budman, D. R. (1999). The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* **44**, 355-361.

Watt, W., Koeplinger, K. A., Mildner, A. M., Heinrikson, R. L., Tomasselli, A. G., and Watenpaugh, K. D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* **7**, 1135-1143.

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.

Weil, R., and Veillette, A. (1996). Signal transduction by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Curr Top Microbiol Immunol* **205**, 63-87.

Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B., and Daniel, P. T. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* **97**, 1378-1387.

Wilkinson, M. G., and Millar, J. B. (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *Faseb J* **14**, 2147-2157.

Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., and et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G., and el-Deiry, W. S. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* **17**, 141-143.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556.

Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**, 723-732.

- Xu, Z. W., Friess, H., Buchler, M. W., and Solioz, M. (2002). Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol* **49**, 504-510.
- Xue, D., and Horvitz, H. R. (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* **390**, 305-308.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* **19**, 8469-8478.
- Yamanashi, Y., Mori, S., Yoshida, M., Kishimoto, T., Inoue, K., Yamamoto, T., and Toyoshima, K. (1989). Selective expression of a protein-tyrosine kinase, p56lyn, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6538-6542.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-291.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., and Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**, 886-891.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**, 673-682.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**, 2265-2282.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628.
- Zhao, Y. H., Baker, H., Walaas, S. I., and Sudol, M. (1991). Localization of p62c-yes protein in mammalian neural tissues. *Oncogene* **6**, 1725-1733.



Zhivotovsky, B. (2003). Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39, 25-40.

Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15, 1481-1486.

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

## 10. Danksagung

Prof. Dr. Michael Bamberg danke ich für die Bereitstellung optimaler Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung und die Möglichkeit nationale und internationale Kongresse besuchen zu können.

Prof. Dr. Claus Belka und Prof. Dr. Wilfried Budach danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die uneingeschränkte Unterstützung. Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Claus Belka für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Heidi Faltin für die technische Einarbeitung und die schöne Zeit im Labor. Den Mitarbeitern der Klinik für Radioonkologie danke ich für die Hilfe bei der Bedienung der Linearbeschleuniger.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Sebastian Wesselborg und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für viele interessante Diskussionsbeiträge und die freundliche Überlassung einiger Vorlagen für schematische Abbildungen.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich ganz besonders dafür, dass sie mich auf meinem Weg immer unterstützt, gefördert und motiviert haben.

## 11. Publikationen

### **Teilergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:**

Belka, C., Gruber, C., Jendrossek, V., Wesselborg, S., Budach, W. (2003).

The tyrosine kinase Lck is involved in regulation of mitochondrial apoptosis pathways.

Oncogene 22, 176-185

Gruber, C., Henkel, M., Budach, W., Belka, C., Jendrossek, V. (2004).

Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs.

Biochem Pharmacol 67, 1859-1872

### **Weitere Publikationen:**

Marini, P., Jendrossek, V., Durand, E., Gruber, C., Budach, W., Belka, C. (2003).

Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionising radiation.

Radiother Oncol 86(2), 189-198

Habermehl D., Kammerer B., Handrick R., Eldh T., Gruber C., Cordes N., Daniel P.T., Plasswilm L., Bamberg M., Belka C., Jendrossek V. (2006).

Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway.

BMC Cancer 6(1):14

### **Kongressbeiträge:**

Gruber, C., Wagner, J., Rudner, J., Bamberg, M., Budach, W., Belka, C. (2001).  
Die Rolle von Tyrosinkinasen für die Apoptoseinduktion durch ionisierende  
Strahlung.

Molecular Radiation Biology/Oncology 2, 54

5. Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology in Ermatingen,  
Poster II.10

Gruber, C., Justine, R., Wagner, J., Bamberg, M., Budach, W., Belka, C., Faltin, H.  
(2001).

Die Rolle von Tyrosinkinasen für die Apoptoseinduktion durch ionisierende  
Strahlung.

Strahlentherapie und Onkologie 177 (Sondernummer 1), 55.

7. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie in Hamburg,  
Vortrag V25.3

Gruber, C., Wagner, J., Marini, P., Rudner, J., Schulze-Osthoff, K., Bamberg, M.,  
Budach, W., Belka, C. (2001).

Role of the tyrosine kinase lck for the induction of apoptosis in response to ionizing  
radiation.

European Journal of Cancer 37 (Supplement 6), S278.

ECCO 11, the European Cancer Conference in Lissabon, Proffered Paper 1026

## 12. Lebenslauf

Name: Charlotte Luise Wilhelmine Gruber  
Geburtsdatum: 12.05.1979  
Geburtsort: Tübingen  
Eltern: Dr. med. Hans-Herbert Gruber  
Lieselotte Klenk-Gruber  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

09/1985–07/1987 Grundschule in Eningen u.A.  
09/1987–07/1989 Grundschule in Lichtenstein-Unterhausen  
09/1989–07/1992 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Pfullingen  
09/1992–06/1998 Isolde-Kurz-Gymnasium in Reutlingen  
25.06.1998 Abitur (Note: 1,0)

### Studium

10/1998-05/2005 Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
05.09.2000 Ärztliche Vorprüfung  
21.03.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
02.04.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
13.05.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
(Gesamtnote: sehr gut)  
19.05.2005 Erteilung der Approbation als Ärztin

**Famulaturen:**

08/2001	Chirurgie/Kinderchirurgie bei Dr. Astfalk in Reutlingen
08/2002	Radiologie am Hôpital Notre-Dame der Université de Montréal (Kanada)
09/2002	Neurologie am Hôpital Notre-Dame der Université de Montréal (Kanada)
03/2003	Neuroophthalmologie am Universitätsklinikum Tübingen
04/2003	Pädiatrie bei meinem Vater, Dr. Gruber, in Pfullingen
09/2003	Gynäkologie bei Dr. Korte, Böblingen

**Praktisches Jahr:**

04-08/2004	Chirurgie am Kantonsspital Winterthur
08-12/2004	Innere Medizin am Universitätsspital Zürich
12/2004-03/2005	Pädiatrie am Olgahospital Stuttgart

**Berufstätigkeit**

Seit 09/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der III. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (Leiter: Prof. Dr. Christian Peschel)
--------------	--

**Stipendien und Auszeichnungen**

02/1999-05/2005	Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
2001	Wolfsberg Poster Award
2001	EACR-MSD(European Association for Cancer Research - Merck Sharp and Dohme)-Award
2002	Reisestipendium der Vereinten Krankenversicherung AG