

Identifizierung und Charakterisierung von c-FLIP-modulierenden Substanzen aus Myxobakterien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität
Magdeburg

von M.Sc. Erika Lisa Schwarz

geb. am 02.04.1990 in Stollberg/Erzgebirge

Gutachter: Prof. Dr. Ingo Schmitz

Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

eingereicht am: 17.12.2018

verteidigt am: 10.05.2018

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die drei myxobakteriellen Substanzen Argyrin C, Aurachin D und HZI 15 beschrieben, die einen c-FLIP_L-modulierenden Effekt aufweisen. Der Apoptose-sensitivierende Effekt dieser Wirkstoffe ist ein erster Schritt zur Entwicklung von Medikamenten, die etwa in der Tumormedizin, Transplantationsmedizin oder gegen Infektionen Anwendung finden können.

Apoptose ist ein elementarer Prozess in Eukaryoten. Sie spielt unter anderem eine Rolle in der Embryonalentwicklung, der Zellhomöostase des Immunsystems und der Eliminierung von entarteten oder infizierten Zellen. Dementsprechend hat eine deregulierte Apoptose gravierende Auswirkungen auf den jeweiligen Organismus und ist ein bedeutender Mechanismus in vielen Erkrankungen.

Ein wichtiges Apoptose-regulierendes Protein ist c-FLIP. Seine Rolle in Infektionen, Autoimmunerkrankungen und der Krebsentstehung wurden schon eingehend untersucht. Zudem sind auch andere klinisch relevante Prozesse wie Transplantationen auf die Regulierung von c-FLIP angewiesen, da die Entwicklung von T- und B-Zellen, sowie von regulatorischen T-Zellen, von diesem Protein abhängig ist. Trotz des offensichtlichen Potentials c-FLIP-modulierender Medikamente ist noch keine Substanz bekannt, die direkt auf c-FLIP wirkt. Ziel dieser Arbeit war es daher, c-FLIP-modulierende Wirkstoffe zu finden und diese zu charakterisieren. Die gefundenen Substanzen wurden auf eine mögliche Eignung als Medikament getestet und die ersten Experimente auf dem Weg zu klinischen Tests wurden mit ausgewählten Wirkstoffen durchgeführt. Dazu wurde eine Bibliothek von 259 myxobakteriellen Substanzen auf ihre Wirkung auf c-FLIP analysiert. Dreizehn dieser Substanzen konnten c-FLIP_L-überexprimierende Zellen zusammen mit dem Todesliganden CD95L auf den Zelltod sensitivieren. Bei Nachtests mit elf Wirkstoffen konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen die Zellen zur Apoptose stimulieren. Die drei Wirkstoffe Argyrin C, Aurachin D und HZI 15 wurden für eine nähere Charakterisierung ausgewählt.

Alle drei Substanzen sensitivieren c-FLIP_L-überexprimierende Zellen für Apoptose. Argyrin C wirkt bis zu einer Konzentration von 10 µM, wobei bei einer Konzentration von 25 µM toxische Effekte sichtbar sind. Aurachin D wirkt ebenfalls bis zu einer Konzentration von 10 µM. Ein leichter toxischer Effekt ist bei dieser Substanz nur im Langzeittest mit Leervektorzellen sichtbar, da hier die Viabilität unter Aurachin D-Einfluss nach 28 h beständig absinkt. Die in der niedrigsten Konzentration wirksame Substanz in dieser Arbeit ist HZI 15. Bei dieser konnten Effekte bis zur geringsten getesteten Konzentration von 10 nM beobachtet werden. HZI 15 zeigt dafür bei höheren Konzentrationen ab etwa 10 µM toxische Effekte. Alle Substanzen zeigen nur bei einem funktionellen extrinsischen Apoptosesignalweg eine Apoptose-sensitivierende Wirkung. Das mRNA-Level von FLIP sinkt unter dem Einfluss der drei genauer charakterisierten Substanzen nach 16 h nicht ab. Argyrin C hat kaum einen Effekt auf die Proteinexpression von c-FLIP_L, wobei die Expression von c-FLIP_S verringert ist. Aurachin D verringert die Expression von c-FLIP_L und c-FLIP_S. Unter HZI 15-Einfluss ist nach 24 h eine deutlich stärkere Verringerung der c-FLIP_L-Expression in c-FLIP_L-Zellen sichtbar als nach 16 h. Schon nach 16 h ist die Expression von c-FLIP_S in c-FLIP_S-überexprimierenden Zellen stark verringert.

Abstract

In this thesis, three myxobacterial compounds, Argyrin C, Aurachin D and HZI 15, are described, that show a c-FLIP modulating effect. The apoptosis-sensitising effect of these substances is a first step towards the development of drugs, that can be used in a wide range in the clinic, including tumor medicine, transplantation medicine or against infections.

Apoptosis is a fundamental process in eukaryotic organisms. It plays a role in the embryonic development, the homeostasis of the immune system and the elimination of mutated or infected cells. Therefore deregulated apoptosis has a serious impact on the affected organism and is an important mechanism in a number of diseases.

A major apoptotic-regulating protein is c-FLIP. Its role in infections, autoimmune-diseases and development of cancer has been studied intensively. Also other clinical relevant procedures like transplantations are dependent on the proper regulation of c-FLIP as some cell populations like T- and B-cells as well as Tregs are dependent on this protein. Despite the obvious potential of c-FLIP modulating drugs, no substances are known, yet, that directly interact with c-FLIP. So the aim of this thesis was to find and characterise c-FLIP modulating compounds. The respective substances were investigated for their suitability as a clinical drug and the first steps to clinical testings were performed with selected compounds. A library of 259 myxobacterial compounds were screened for their effect on c-FLIP. Thirteen of these substances could sensitise c-FLIP_L-overexpressing cells in combination with the death ligand CD95L to cell death. Additional tests with eleven of these thirteen compounds showed that all of the tested substances indeed induce apoptosis. The three compounds Argyrin C, Aurachin D and HZI 15 were chosen for further characterisation.

All of these three substances sensitise c-FLIP_L-overexpressing cells to apoptosis. Argyrin C shows an activity up to a concentration of 10 μ M, with toxic effects at a concentration of 25 μ M. Aurachin D was also active up to a concentration of 10 μ M. A slight toxic effect was visible in long-time experiments on empty vector cells. Here, the viability of the cells with Aurachin D treatment dropped steadily after 28 h. The most active compound in this screening was HZI 15, showing effects even in the lowest tested concentration of 10 nM. But HZI 15 also showed toxic effects at higher concentrations starting at approximately 10 μ M. All of the three tested compounds only show the apoptosis-sensitizing effect when tested on cells with a functional extrinsic apoptosis pathway. Interestingly, the mRNA level did not decrease when the cells were treated with the three substances for 16 h. Argyrin C only showed a slight effect on the protein expression of c-FLIP_L but c-FLIP_S-expression was decreased. Aurachin D reduced the expression of both, c-FLIP_L and c-FLIP_S. When treated with HZI 15, less c-FLIP_L was detected after 24 h of treatment. The c-FLIP_S-expression in c-FLIP_S-expressing cells was decreased already after 16 h of treatment.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Abstract	iii
1 Einleitung	5
1.1 Ohne Tod kein Leben - der Zelltod	5
1.2 Apoptose als elementarer Prozess im Immunsystem	6
1.2.1 Intrinsischer Apoptosesignalweg	8
1.2.2 Extrinsischer Apoptosesignalweg	8
1.2.3 Krankheitsbilder bei deregulierter extrinsischer Apoptose	19
1.3 Naturstoffe als Quelle neuartiger Wirkstoffe	21
1.3.1 Myxobakterien	21
1.3.2 Chemisch neuartige Strukturen	22
1.3.3 Myxobakterielle Substanzen als immunologische Modulatoren	23
1.3.4 Argyrine und ihre chemischen Derivate	23
1.3.5 Aurachine und ihre natürlichen Derivate	24
2 Verwendete Materialien und Methoden	27
2.1 Verwendete Chemikalien	27
2.2 Verwendete Puffer	27
2.2.1 Puffer für den Western Blot	27
2.2.2 Puffer für die Durchflusszytometrie	27
2.3 Verwendete Zelllinien	28
2.4 Verwendete Mauslinien	28
2.5 Verwendete Antikörper	29
2.5.1 Primärantikörper für Western Blot	29
2.5.2 Sekundärantikörper für Western Blot	29
2.5.3 Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	30
2.6 Verwendete Methoden	30
2.6.1 Zellkultur	30
2.6.2 Mycoplasmentest	30
2.6.3 Testen der Substanzen und Stimulierung mit CD95L	31
2.6.4 Resazurin Test	32
2.6.5 Mikroskopie von Zellen	32
2.6.6 Quantitative PCR	32
2.6.7 Western Blot	33
2.6.8 Durchflusszytometrie	35
2.6.9 Rezeptorfärbung	36
2.6.10 Gewinnung und Vitalitätsbestimmung muriner T-Zellen	36

Inhaltsverzeichnis

2.6.11	Toxizitätsbestimmung mittels humaner PBMCs	36
2.7	Rechnerische Auswertung	37
2.7.1	Sensitivierungskapazität	37
2.7.2	Spezifische Apoptoserate	37
2.7.3	Bewertung des Screenings mittels Z'-Faktor	37
2.7.4	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der verwendeten Zellen	39
3.2	Vorbereitung auf das Screening der Naturstoffe	39
3.3	Testscreening mit kommerziell erhältlichen Substanzen	44
3.4	Screening einer Naturstoffbibliothek aus myxobakteriellen Substanzen	44
3.5	Verifizierung der Wirkung der ausgewählten „Hits“	46
3.6	Abgrenzung von Apoptose-Stimulation gegenüber anderen Formen des Zelltods	49
3.6.1	Verifizierung der Aktivierung von Caspasen	49
3.6.2	Apoptosenachweis durch Messung der DNA-Fragmentierung	51
3.6.3	Bestätigung der Apoptose-Stimulation durch Annexin V/7AAD-Test	51
3.6.4	Morphologische Auswirkungen der Substanzbehandlungen	57
3.7	Charakterisierung von Argyrin C	57
3.7.1	Kinetiken der Argyrin C-Wirkung	59
3.7.2	Wirkung von Argyrin C auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen	59
3.7.3	Toxizitätsuntersuchung von Argyrin C auf humanen PBMCs	60
3.7.4	Effekt von Argyrin C auf murine T-Zellen	62
3.7.5	Argyrin C sensitiviert clearCa-4 Zellen	62
3.7.6	Argyrin C wirkt auf Protein-, aber nicht auf RNA-Ebene	62
3.7.7	Wirkung von Argyrin-Derivaten auf c-FLIP _L -Zellen	64
3.8	Charakterisierung von Aurachin D	66
3.8.1	Kinetiken der Aurachin D Wirkung	70
3.8.2	Wirkung von Aurachin D auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen	70
3.8.3	Untersuchungen der Toxizität von Aurachin D gegen humane PBMCs	71
3.8.4	Wirkung von Aurachin D auf murine T-Zellen	71
3.8.5	Einfluss von Aurachin D auf die Resistenz von clearCa-4 Zellen	74
3.8.6	Wirkung von Aurachin D auf den c-FLIP-mRNA-Gehalt und die c-FLIP- Expression	74
3.9	Charakterisierung von HZI 15	76
3.9.1	Kinetiken der HZI 15 Wirkung	76
3.9.2	Wirkung von HZI 15 auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen	77
3.9.3	Toxizität von HZI 15 auf humane PBMCs	77
3.9.4	Wirkung von HZI 15 auf murine T-Zellen	79
3.9.5	HZI 15 sensitiviert clearCa-4 Zellen auf die Wirkung von CD95L	80

3.9.6	Effekt von HZI 15 auf die Expression von c-FLIP auf Protein- und mRNA-Ebene	80
4	Diskussion	83
4.0.1	Identifizierung von c-FLIP-modulierenden Substanzen	83
4.0.2	Argyirin C als c-FLIP-inhibierende Substanz	84
4.0.3	Aurachin D als c-FLIP-inhibierende Substanz	88
4.0.4	HZI 15 als c-FLIP-inhibierende Substanz	89
4.0.5	Mögliche Wirkmechanismen der myxobakteriellen Substanzen	89
4.0.6	Schlussbemerkungen	91
	Verwendete Abkürzungen	93
	Literatur	95
	Ehrenerklärung	107

1 Einleitung

1.1 Ohne Tod kein Leben - der Zelltod

Für multizelluläre Organismen ist ein Leben ohne einen gesteuerten Zelltod nicht möglich. So findet schon in der Embryonalphase von Säugetieren ein gezieltes Absterben von Zellverbänden und Strukturen statt, um die Bildung von funktionierenden Organen zu gewährleisten (Hardy et al., 1989; Lindsten et al., 2000). Auch um die Zellhomöostase, also ein Gleichgewicht von funktionellen Zellen, zu gewährleisten, müssen ständig Zellen neu gebildet und abgebaut sowie verwertet werden. Dieser Effekt ist z.B. für das Nervensystem beschrieben (Barres und Raff, 1999). Diese Zellhomöostase ist insbesondere für ein optimal arbeitendes Immunsystem obligatorisch, da eine Dysregulation des Immunsystems einerseits zu einer Schwächung des Organismus gegenüber Pathogenen führen kann und andererseits entartete oder autoreaktive Zellen effektiv entfernt werden müssen (Opferman und Korsmeyer, 2003).

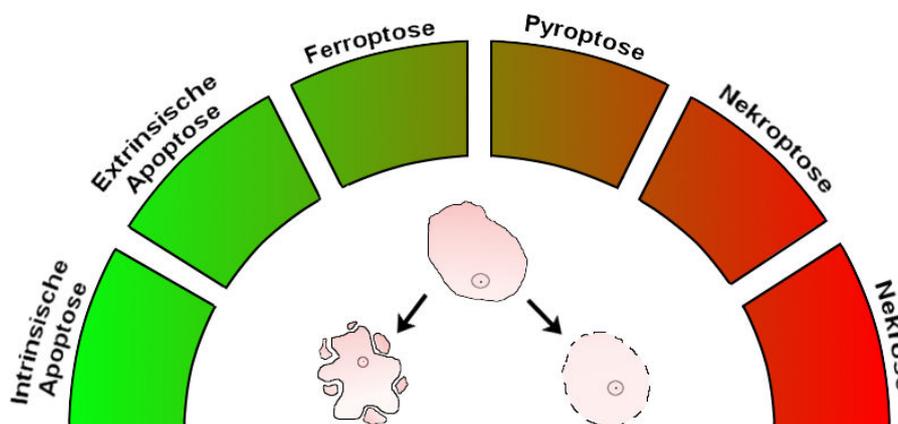


Abbildung 1.1: Verschiedene Arten des Zelltodes. Zellen können beim Zelltod eine geringe (grün) oder starke (rot) Entzündungsreaktion auslösen. Morphologisch ist Apoptose durch das Formen von Membrankörperchen charakterisiert, bei der Nekrose führt ein Anschwellen der Zelle zu Defekten in der Zellmembran (modifiziert nach Galluzzi et al., 2018).

Findet der Zelltod durch schädigende externe Einflüsse, z.B. Zellgifte oder Sauerstoffmangel, statt, so gelangen Zellbestandteile in die direkte Umgebung und lösen dort eine Entzündungsreaktion aus (Jacobson et al., 1997). Dies wird als ein nekrotischer, also ungesteuerter Zelltod bezeichnet. Die meisten Zellen sterben jedoch in einer gesteuerten Form des Zelltodes, der Apoptose. Diese wurde 1965 durch Lockshin und Williams zuerst als „programmierter Zelltod“ beschrieben und ab 1972 als Apoptose bezeichnet (Kerr et al., 1972). Dieser Zelltod ist morphologisch dadurch charakterisiert, dass die Zelle in kleine Membranvesikel aufgelöst wird, die durch Phagozytose eliminiert werden. Neben diesen beiden Extremen, der immunologisch relativ stillen Apoptose und der entzündungsfördernden Nekrose, gibt es noch diverse andere Formen des Zelltodes. Diese sind jeweils durch die Aktivierung bestimmter Proteine und der Auswirkungen auf die Umgebung charakterisiert und in Abbildung (Abb.) 1.1 dargestellt. Hier ist ersichtlich, dass die intrinsische und die extrinsische Apoptose eine geringe Immunreaktion auslösen. Diese beiden Wege unterscheiden sich in ihrer Initiierung, jedoch nicht in der Ausführung der Apoptose. Der intrinsische Apoptosesignalweg ist durch das Entlassen von Cytochrom C aus dem Intermembranraum

1 Einleitung

der Mitochondrien charakterisiert, das zur Aktivierung von ausführenden Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen (Caspasen) führt. Beim extrinsischen Signalweg führt die Stimulation mit einem Todesliganden (z.B. CD95L) über Zwischenschritte zur Aktivierung der ausführenden Caspasen (Galluzzi et al., 2018). Caspasen sind Proteasen, die andere Moleküle aktivieren oder abbauen können und so für die Ausführung des Zelltodes sorgen (Li und Yuan, 2008). Ferroptose ist ebenfalls eine Form des programmierten Zelltodes, die allerdings von Eisen abhängig und durch den oxidativen Abbau von Lipiden charakterisiert ist (Yang und Stockwell, 2016). Pyroptose stellt dagegen einen programmierten aber inflammatorisch wirkenden Zelltodmechanismus dar (Aachoui et al., 2013). Dieser Mechanismus reagiert vor allem auf intrazelluläre Pathogene und benötigt eine funktionelle Caspase. Vor allem Caspase-1 ist als aktive Caspase in der Pyroptose bekannt, es wird jedoch auch eine Pyroptoseinduktion durch Caspase-3 und murine Caspase-11 bzw. deren humane homologe Caspase-4 und Caspase-5 beschrieben (Wang et al., 2017). Die Aktivierung dieser Caspasen führt zur proteolytischen Spaltung von Gasdermin D, einem Effektormolekül der Pyroptose, das für die Freisetzung von Interleukin-1 β verantwortlich ist (Shi et al., 2015; Kayagaki et al., 2015). Pyroptose wird durch das Inflammasom aktiviert und führt zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Der Tod der Zelle tritt durch Anschwellen des Zellkörpers und letztendlich der Lyse der Zellmembran ein, wodurch sogenannte *danger associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt werden, die zusätzlich die Entzündungsreaktion verstärken (Jorgensen und Miao, 2015). Nekroptose verläuft morphologisch ähnlich zur Nekrose, hier finden allerdings im Gegensatz zur ungesteuerten Nekrose gesteuerte Prozesse statt (Kaczmarek et al., 2013). So wird in Abwesenheit von Caspase-8 durch die Aktivierung von Todesrezeptoren oder *Pattern recognition receptors* (PRR) RIPK3 von RIPK1 aktiviert. Rezeptor-interagierende Proteinkinase (RIPK) Proteine sind eine Gruppe von Serin/Threonin Proteinkinasen, die sowohl in Überlebens-als auch in Zelltodsignalwegen eine Rolle spielen (Lin, 2014). RIPK3 phosphoryliert dann *Mixed lineage kinase domain like pseudokinase* (MLKL)-Proteine, die sich zu Oligomeren zusammenlagern und Poren in der Zellmembran formen, was zum Tod der Zelle führt (Zhang et al., 2016).

1.2 Apoptose als elementarer Prozess im Immunsystem

Ein geregelter Zelltod, der auch programmierter Zelltod oder Apoptose genannt wird, ist für die Entwicklung, Funktionalität und Regulation des Immunsystems unverzichtbar (Nagata und Tanaka, 2017). In der Entwicklung von Lymphozyten von Vorläuferzellen zu naiven B- oder T-Zellen begehen Zellen mit nicht-reaktiven oder selbstreaktiven Antigenrezeptoren Apoptose, sodass nur Zellen mit optimalen reaktiven Antigenrezeptoren überleben. Dieser Auswahlprozess in der Entwicklung von Immunzellen stellt sicher, dass es zu keiner Autoimmunreaktion kommt und ausschließlich Zellen mit einem funktionalen Antigenrezeptor in Kontakt mit Antigenen kommen (Teh et al., 1988; Nemazee und Bürki, 1989; Hartley et al., 1991).

Apoptose ist ein elementarer Mechanismus bei peripheren T-Zellen (Krammer et al., 2007). So können cytotoxische T-Zellen infizierte oder entartete Zellen durch die Expression des Todesliganden CD95L in die Apoptose treiben (Zinkernagel und Doherty, 1974).

Auch während und nach einer Infektion reguliert Apoptose die Zahl aktiver Immunzellen. Zur Aktivierung von T-Zellen wird durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) ein pas-

1.2 Apoptose als elementarer Prozess im Immunsystem

sendes Antigen zusammen mit kostimulatorischen Signalen an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) von T-Zellen gebracht. Durch dieses Signal beginnt die Differenzierung und klonale Expansion der T-Zellen. Nach der effizienten Eliminierung des Pathogens muss die Zahl der Effektor-T-Zellen wieder reduziert werden, um die Zellhomöostase zu erhalten (Sprent und Tough, 2001). In dieser sogenannten Kontraktionsphase gibt es zwei Wege, über die T-Zellen eliminiert werden. So begehen etwa aktivierte T-Zellen durch eine erneute Aktivierung des T-Zell Rezeptors Apoptose (den sogenannten *activation-induced cell death* (AICD)), da die Restimulierung dazu führt, dass CD95L exprimiert wird (Krammer et al., 2007). Dies aktiviert den extrinsischen Apoptosesignalweg sowohl autokrin als auch in benachbarten T-Zellen sowie in dendritischen Zellen und B-Zellen (Brunner et al., 1995; Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995; Alderson et al., 1995). Funktioniert dieser Signalweg nicht und werden dementsprechend T-Zellen nach der Aktivierung nicht aus dem Immunsystem entfernt, führt dies zur Autoimmunerkrankung autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom (ALPS) (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). Die zweite Art, wie aktivierte T-Zellen eliminiert werden, ist der sogenannte „Tod durch Entzug“. Hierbei kommt es durch den Entzug von Zytokinen zu einer Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges. Dabei spielt das BH3-*only* Protein Bim eine Rolle, da es das Fehlen von Zytokinen registriert und dann den intrinsischen Apoptosesignalweg auslöst (Bouillet et al., 1999). Mäuse, die einen Defekt im CD95 Rezeptor besitzen und kein Bim exprimieren, entwickeln sehr schnell eine schwere Autoimmunerkrankung. Daher wird ein Zusammenspiel von extrinsischem (CD95-vermittelt) und intrinsischem (Bim-vermittelt) Apoptosesignalweg in der Eliminierung von aktivierten T-Zellen vermutet (Hughes et al., 2008; Hutcheson et al., 2008; Weant et al., 2008). Es wurde auch gezeigt, dass auch autoreaktive B-Zellen durch Apoptose aus dem Immunsystem entfernt werden (Rathmell et al., 1995). B-Zellen exprimieren im naiven Zustand kaum CD95, durch Aktivierung wird jedoch der Rezeptor stärker exprimiert (Mizuno et al., 2003). Im aktivierten Zustand werden zunächst auch anti-apoptotische Proteine wie c-FLIP hochreguliert, um einer Apoptose während der Antigeneliminierungsphase zu entgehen (Hennino et al., 2000). Wie wichtig die Apoptose jedoch für die darauf folgende Kontraktionsphase ist, zeigt sich in Mäusen, die einen Defekt im CD95 Rezeptor in B-Zellen oder dendritischen Zellen aufweisen. Diese entwickeln schwere Symptome von Autoimmunität (Stranges et al., 2007).

Auch eine zu starke Aktivierung von Apoptose kann negative Auswirkungen haben, so wird über eine Beteiligung des Todesliganden CD95L in der sogenannten *graft-versus-host disease*, die nach einer Organtransplantation auftreten kann, berichtet (Tsukada et al., 1999).

Eine besondere Stellung in der Regulation des Immunsystems haben regulatorische T-Zellen (Tregs). Sie sind unverzichtbar für die periphere Toleranz gegen körpereigene Strukturen und verhindern somit abnormale Immunreaktionen (Sakaguchi et al., 2008). Tregs benötigen die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 für ihre Entwicklung und Funktion. Mutationen im *Foxp3*-Gen führen beim Menschen zum *immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked* (IPEX) Syndrom, einer Autoimmunerkrankung, die mehrere Organe betrifft und unbehandelt tödlich ist (Bennett et al., 2001). Aber auch im Tumorumfeld sind Tregs wichtige Einflussfaktoren, da sie dort die Immunantwort dämpfen und somit Tumorzellen vor der Erkennung des Immunsystems und der Immunantwort schützen (Shimizu et al., 1999). Plaza-Sirvent et al. zeigen, dass Tregs nicht nur schneller proliferieren als andere T-Zellen, sondern auch sensitiver auf das Auslösen von Apoptose sind. Dadurch wird die Zellhomöostase bewahrt. Gleichzeitig ist c-FLIP, ein regulatorischer Faktor in der

1 Einleitung

extrinsischen Apoptose, essentiell für das Überleben von Tregs (Plaza-Sirvent et al., 2017). Dieser Zusammenhang zeigt, wie wichtig die korrekte Regulierung von Apoptose für das Immunsystem ist.

1.2.1 Intrinsischer Apoptosesignalweg

In der Initiierung von Apoptose gibt es zwei verschiedene Signalwege, die miteinander interagieren können. Diese sind in Abb. 1.2 zusammengefasst und werden im folgenden näher erläutert. Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch Faktoren, z.B. der Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden, ER-Stress oder mitotischen Stress initiiert. Dabei werden pro-apoptotische Proteine der BH3-*only*-Klasse aktiviert, die zu der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-Familie gehören (Czabotar et al., 2014; Pihan et al., 2017; Roos et al., 2015). Wenn die beiden Bcl-2 Proteine *Bcl-2 associated X* (BAX) und *Bcl-2 antagonist/ killer* (BAK) aktiviert werden, so formen sie Poren in die äußere Mitochondrienmembran, die zur Permeabilisierung dieser und der Freisetzung von Cytochrom C führt (Galluzzi et al., 2016). Das freigesetzte Cytochrom C kann sich dann in einem supramolekularen Komplex mit desoxyATP und *apoptotic peptidase activating factor 1* (Apaf-1) zusammenlagern, in dem auch pro-Caspase-9 zu finden ist. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und hier wird pro-Caspase-9 in die aktive Caspase-9 gespalten (Zou et al., 1997). Aktivierte Caspase-9 dient als Initiatorcaspase und spaltet weitere Proteine. Somit ist die Initiationsphase der intrinsischen Apoptose abgeschlossen und es kommt zur Durchführung der Apoptose, da Caspase-9 unter anderem Caspase-3, die als ausführende Caspase die Caspasen-Kaskade in Gang setzt und unzählige Substrate spaltet, aktiviert (Hengartner, 2000).

1.2.2 Extrinsischer Apoptosesignalweg

Der extrinsische Apoptosesignalweg ist durch seine Initiation mittels externer Signale von Todesliganden an Todesrezeptoren gekennzeichnet (Ashkenazi, 1998). Diese können entweder unter eine gewisse Schwelle fallen und so Apoptose durch signalabhängige Rezeptoren auslösen (Gibert und Mehlen, 2015) oder als Todesliganden an sogenannte Todesrezeptoren binden. Diese Todesrezeptoren sind Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie (Schulze-Osthoff et al., 1998). Bindet ein Todesligand an den zugehörigen Todesrezeptor, so lagern sich mehrere der jeweiligen Rezeptoren zusammen und es kommt zur Aktivierung der intrazellulären *Death Domains* (DDs) der Todesrezeptoren (Peter und Krammer, 2003). Dadurch kann das Adaptermolekül *Fas-associated protein with death domain* (FADD) mit Hilfe seiner C-terminalen DD an die DDs der Rezeptoren binden (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Die Todesrezeptoren, FADD und Pro-Caspase-8 bilden zusammen den sogenannten *Death-inducing signaling complex* (DISC), den funktionellen Signalkomplex der extrinsischen Apoptose (Kischkel et al., 1995). Im DISC werden die inaktiven Pro-Caspase-8 Proteine in räumliche Nähe gebracht, wodurch sie sich zusammenlagern. Dies führt zur Aktivierung und autoproteolytischen Spaltung der Caspase-8 (Donepudi et al., 2003). Damit wird die Signalkaskade eingeleitet, da durch die aktive Caspase-8 auch die ausführenden Caspasen-3 und -7 aktiviert werden. Die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 benötigen den Todesliganden TRAIL zum Bilden des DISC, CD95 benötigt den

1.2 Apoptose als elementarer Prozess im Immunsystem

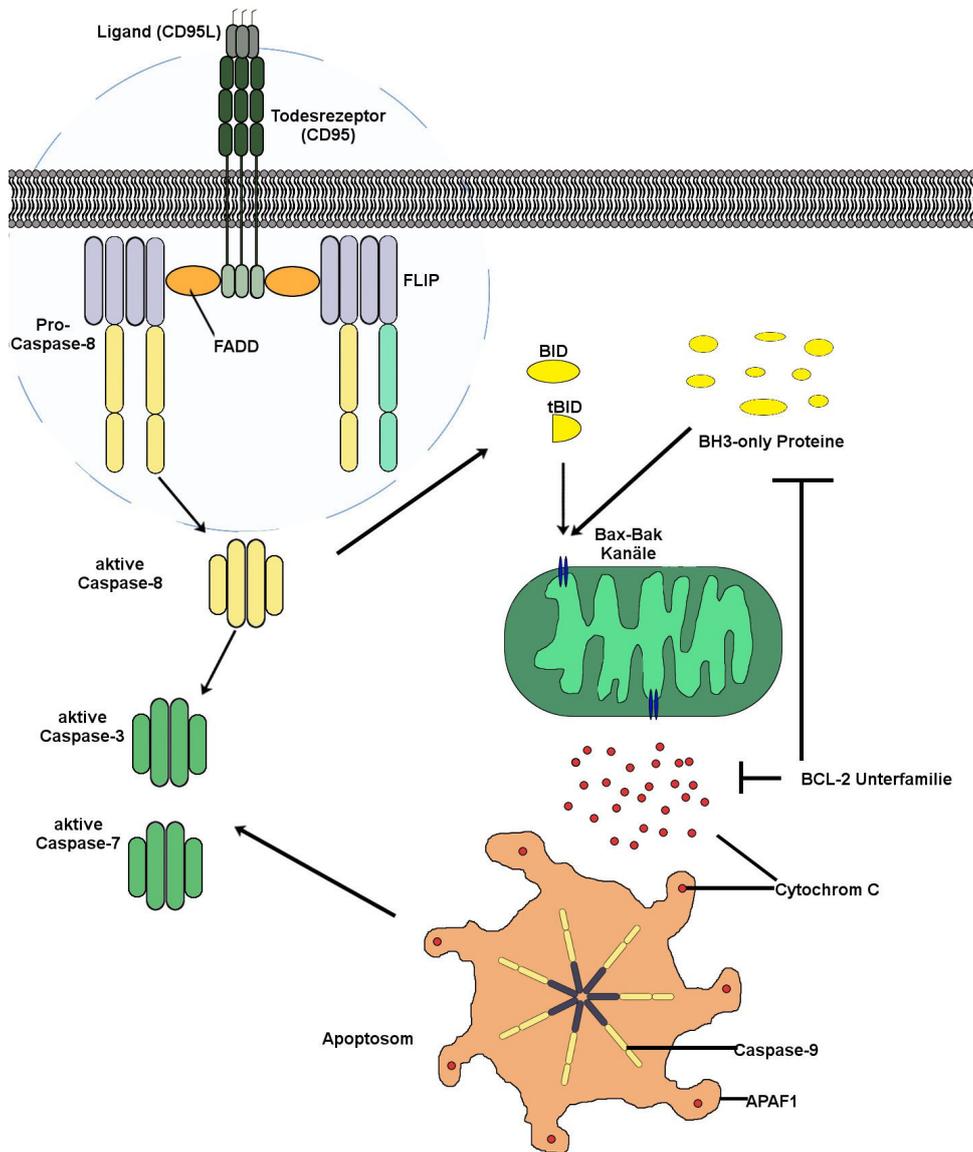


Abbildung 1.2: Apoptose kann über den extrinsischen und den intrinsischen Apoptosesignalweg ablaufen. Beiden Apoptosesignalwegen ist die Aktivierung von den ausführenden Caspasen-3 und -7 gemeinsam. Die Signalwege können interagieren, dabei kann der intrinsische Apoptosesignalweg den extrinsischen Apoptosesignalweg verstärken (modifiziert nach Taylor et al., 2008).

1 Einleitung

CD95L. Der Todesrezeptor TNF-R1 benötigt als zusätzliches Adaptermolekül das Tumornekrosefaktor Rezeptor Typ-I assoziierte Todesdomänenprotein (TRADD), um FADD und Caspase-8 zu rekrutieren (Aggarwal, 2003).

Zusammenspiel zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptosesignalweg

Nicht alle Zelltypen können mit Hilfe des extrinsischen Signalweges alleine effizient Apoptose auslösen. Zellen, die durch den externen Apoptosesignalweg effizient Apoptose begehen können, werden Typ I Zellen genannt. Dagegen werden Zellen, die nicht genug Caspase-8 für die Durchführung der Apoptose allein durch den extrinsischen Signalweg aktivieren können, Typ II Zellen genannt. Sie benötigen außer der Caspase-8-Aktivierung via des extrinsischen Signalweges noch eine Amplifizierung des Todessignals durch den intrinsischen Apoptosesignalweg, um effizient Apoptose auslösen zu können (Scaffidi et al., 1998; Scaffidi et al., 1999a). Diese Amplifizierung geschieht durch die Spaltung des *BH3-only* Proteins Bid durch Caspase-8. Das so aktivierte verkürzte tBid (tBid) kann anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie inhibieren und so für die Aktivierung von BAX und BAK sorgen, die dann die äußere Mitochondrienmembran permeabilisieren und den intrinsischen Signalweg der Apoptose in Gang setzen (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

Rezeptoren und Liganden

Zu den Todesrezeptoren gehören sechs bisher identifizierte Mitglieder der TNFR-Superfamilie. Zu ihnen zählen TNFR-1, CD95 (Fas, Apo-1, TNFRSF6), TRAILR-1 (DR4, Apo-2), TRAILR-2 (DR5, KILLER), DR3 (Apo-3) und DR6 (Ashkenazi, 1998). Sie enthalten bis zu sechs extrazelluläre, cysteinreiche Domänen (Ashkenazi, 2002) und intrazellulär ein 80-Aminosäuren langes Motiv, die sogenannte DD (Tartaglia et al., 1993; Itoh und Nagata, 1993). Die DD ist essentiell für die Signalweiterleitung in die Zelle, die erst nach Bindung der respektiven Liganden und der Zusammenlagerung von mehreren Rezeptoren zu Homo-Oligomeren erfolgt. Die jeweiligen Liganden sind TNF α und TNF- β oder TNF-C für TNFR-1, CD95L für CD95 und TRAIL für TRAILR-1 und TRAILR-2 (Körner und Sedgwick, 1996; Suda et al., 1993; Pan et al., 1997). Apo-3L bindet an DR-3 und das N-terminale Fragment des amyloiden Vorläuferproteins (APP) bindet an DR-6 (siehe Abb. 1.3) (Marsters et al., 1998; Nikolaev et al., 2009).

Caspasen

Die Initiierung und Ausführung von Apoptose wird vor allem durch Caspasen durchgeführt. Von dieser Proteingruppe sind bisher beim Menschen zwölf Mitglieder bekannt, die nach ihrer Funktion verschiedenen Gruppen zugeordnet werden können (siehe Abbildung 1.4) (Li und Yuan, 2008). Zu den entzündungsfördernden Caspasen gehören Caspase-1, -4, -5 und -12. Eine Funktion in der Apoptose besitzen Caspase-2, -3, sowie die Caspasen -6 bis -10. Dabei werden sie noch in Initiatorcaspasen, die für die Initiierung der Apoptose verantwortlich sind, und ausführende Caspasen, die für die letztendliche Durchführung der Apoptose sorgen, unterteilt (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004; Shi, 2002). Zudem gibt es

1.2 Apoptose als elementarer Prozess im Immunsystem

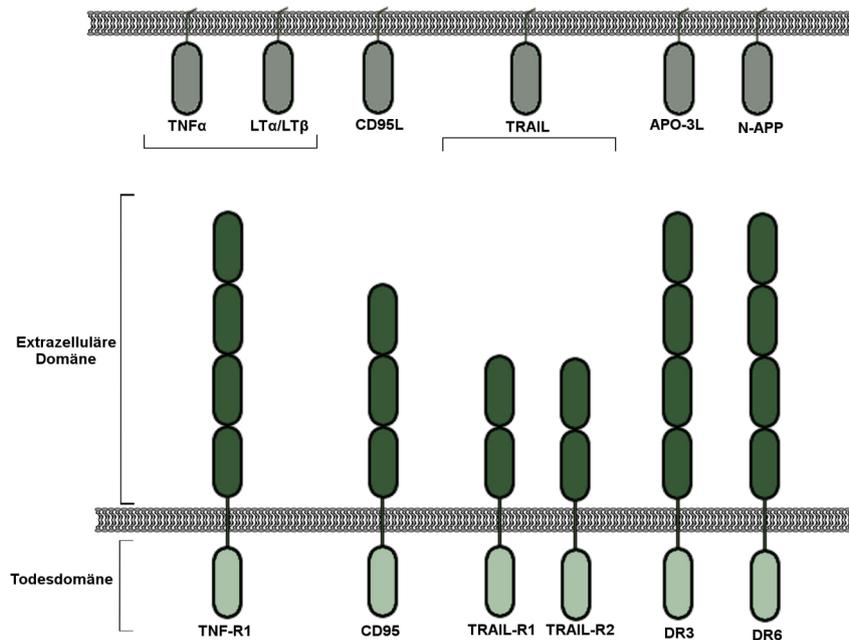


Abbildung 1.3: Todesrezeptoren und die zugehörigen Liganden. Die Liganden können nur den jeweils spezifischen Rezeptor stimulieren. TNF-Rezeptor 1 kann nur durch TNF- α , TNF- β oder TNF-C stimuliert werden. Der einzige für CD95 bekannte Ligand ist CD95L. TRAIL kann sowohl an TRAIL-Rezeptor 1 als auch an TRAIL-Rezeptor 2 binden. Der Todesrezeptor DR-3 wird durch Apo-3L, der Rezeptor DR-6 durch N-APP stimuliert (modifiziert nach Igney und Kramer, 2002).

noch Caspase-14, die als Keratinozyten-Differenzierungs-zugehörige Caspase klassifiziert wird (Rendl et al., 2002). In Mäusen gibt es elf bisher identifizierte Caspasen, da Caspase-10 im Mausgenom nicht vorhanden ist (Eckhart et al., 2008).

Alle Caspasen werden als inaktive Form exprimiert, als sogenanntes Zymogen (auch Pro-Caspase genannt), und müssen erst eine Aktivierung durch eine Faltung und/ oder Spaltung erfahren, um aktiviert zu werden (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004). Zur Rekrutierung dient bei Initiatorcaspasen die N-terminale *Death Effector Domain* (DED) bzw. Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) Domäne, durch die die Rekrutierung zur Signalplattform stattfindet (Kersse et al., 2011). Daneben besitzen alle Caspasen zwei C-terminale Untereinheiten, die für die katalytische Aktivität verantwortlich sind. Zwischen diesen Untereinheiten ist eine Spaltstelle zu finden (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004). Zur Aktivierung etwa durch den DISC wird die DED der Initiatorcaspase Caspase-8 zum DISC rekrutiert, wo mehrere Caspase-8 Proteine in räumliche Nähe gebracht und autoproteolytisch gespalten werden. Diese pro-aktive Form durchläuft eine erneute Spaltung, bis sie zum aktiven Heterotetramer geformt ist, das ins Cytosol entlassen wird. Dieses Heterotetramer besteht aus zwei p10 und zwei p18 Untereinheiten und kann ausführende Caspasen aktivieren (Chang et al., 2003; Kallenberger et al., 2014).

Ausführende Caspasen selbst besitzen keine CARD oder DED Domäne. Sie liegen bereits als Dimere im Zytosol vor und werden nicht in den DISC rekrutiert, sondern von Initiations-Caspasen oder anderen Proteasen direkt gespalten und so aktiviert (Li und Yuan, 2008; Fuentes-Prior und Salvesen, 2004). Diese ausführenden Caspasen spalten dann eine Vielzahl von Substraten, dabei zeigen sie leicht unterschiedliche Spezifitäten für verschie-

1 Einleitung

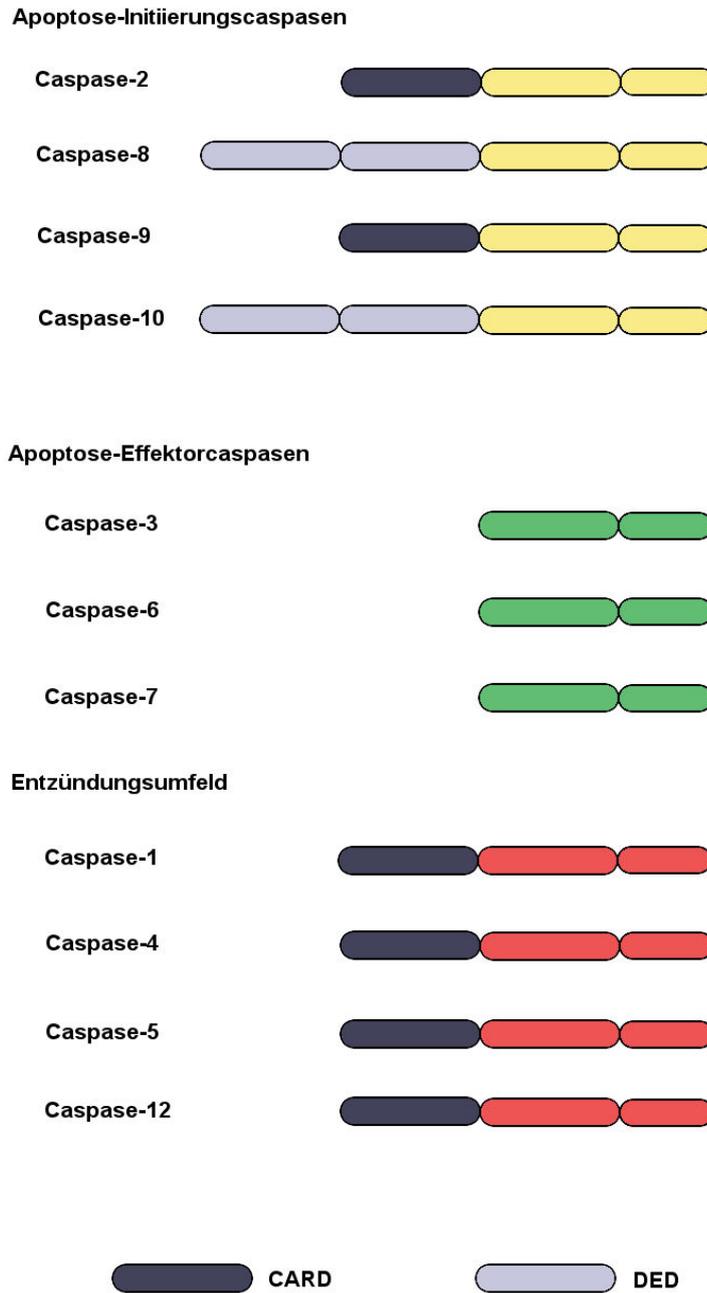


Abbildung 1.4: Struktur und Funktion verschiedener humaner Caspasen. Die Caspasen sind in ihrer Pro-Form (Zymogen) dargestellt. Zur Aktivierung müssen die Caspasen gespalten und umgelagert werden. DED bzw. CARD sind in grau dargestellt (modifiziert nach Fuentes-Prior und Salvesen, 2004).

dene Peptidsequenzen. Die inflammatorisch wirkenden Caspasen-1, -4 und -5 spalten die Peptidsequenzen (W/L)EXD (X steht für eine beliebige Aminosäure). Die apoptotischen Caspasen-2, -3 und -7 spalten vor allem die Peptidsequenz DEXD. Die Caspasen-6, -8, -9 und -10 spalten vorwiegend (L/I/V)EXD (Li und Yuan, 2008; Fuentes-Prior und Salvesen, 2004; Thornberry et al., 1997).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Caspase-8 und -10 im Menschen redundant vorkommen und dieselbe Funktion ausüben (Kischkel et al., 2001; Wang et al., 2001). In einer anderen Publikation wird gezeigt, dass Caspase-10 ähnlich wie Caspase-8 zum DISC rekrutiert und gespalten werden kann, jedoch funktioniell Caspase-8 nicht ersetzen kann (Sprick et al., 2002). Eine neuere Publikation zeigt allerdings, dass bei der Rekrutierung von Caspase-10 Caspase-8 eine Gerüstfunktion besitzt. Gleichzeitig zeigen Horn et al., dass Caspase-10 die DISC-Aktivierung von Caspase-8 negativ reguliert und auch durch die Aktivierung von NF- κ B eine Rolle im Überlebenssignalweg von Zellen besitzt (Horn et al., 2017).

FLIP-Proteine

Da Apoptose ein so fundamentaler Mechanismus ist, muss die Regulation dessen sehr strikt geregelt sein. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch anti-apoptotisch wirkende Proteine der Bcl-2 Familie reguliert. Inhibierend auf den extrinsischen Apoptoseweg wirkende Proteine wurden zuerst durch Datenbankscreenings auf DED-enhaltende Proteine gefunden. Dabei wurden die sogenannten viralen *FLICE-inhibitory proteins* (v-FLIP) entdeckt, die von Viren (γ -Herpesviren, z.B. dem humanen Herpesvirus-8 oder dem Herpesvirus saimiri) exprimiert werden und den extrinsischen Apoptoseweg inhibieren können (Thome et al., 1997). Kurz danach wurden auch FLIP Proteine in Zellen entdeckt, die dann zelluläres *FLICE-inhibitory protein* (c-FLIP) (anfangs auch: CASH, Casper, CLARP, FLAME-1, I-FLICE, MRIT und usurpin) genannt wurden (Goltsev et al., 1997; Shu et al., 1997; Inohara et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Hu et al., 1997; Han et al., 1997; Rasper et al., 1998). Das humane Gen für c-FLIP, *CFLAR*, ist auf dem Chromosom 2q33-34 den Genen von Caspase-8 und Caspase-10 vorgelagert zu finden, weshalb eine Entstehung von *CFLAR* durch eine Duplikation von Caspase-8 oder -10 entstanden sein könnte (Kischkel et al., 1998; Rasper et al., 1998). Eine genomische Analyse deutet auf das Vorkommen von elf Spleißvarianten von c-FLIP hin, wovon jedoch im Menschen drei Spleißvarianten auf Proteinlevel nachgewiesen werden konnten. Bei diesen handelt es sich um c-FLIP_L, c-FLIP_S und c-FLIP_R (Irmler et al., 1997; Scaffidi et al., 1999b; Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005).

Die bisher längste gefundene Isoform ist c-FLIP_L, bei dieser steht das „L“ für *long*. Das Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa und ähnelt in seiner Struktur sehr stark Caspase-8. Weiterhin besitzt c-FLIP_L eine Caspase-ähnliche Domäne, ist aber katalytisch inaktiv (Irmler et al., 1997; Fuentes-Prior und Salvesen, 2004).

Die beiden kurzen Isoformen c-FLIP_S (für *short*) und c-FLIP_R (für *Raji*, der Zelltyp, in dem diese Isoform das erste Mal beschrieben wurde), weisen ein Molekulargewicht von 26 bzw. 24 kDa auf. Die Isoform c-FLIP_S besitzt eine andere C-terminale Domäne als c-FLIP_L. Sie entsteht durch alternatives Spleißen, da Exon 7 anders als bei c-FLIP_L enthalten ist. Die humane Isoform c-FLIP_R unterscheidet sich von c-FLIP_S durch einen *single nucleotide polymorphism* (SNP) im C-Terminus des c-FLIP-Gens. Dieser führt zur Inaktivierung der Spleißstelle von Exon 7, sodass das Leseraster in Intron 6 in einem Stopp-Codon endet

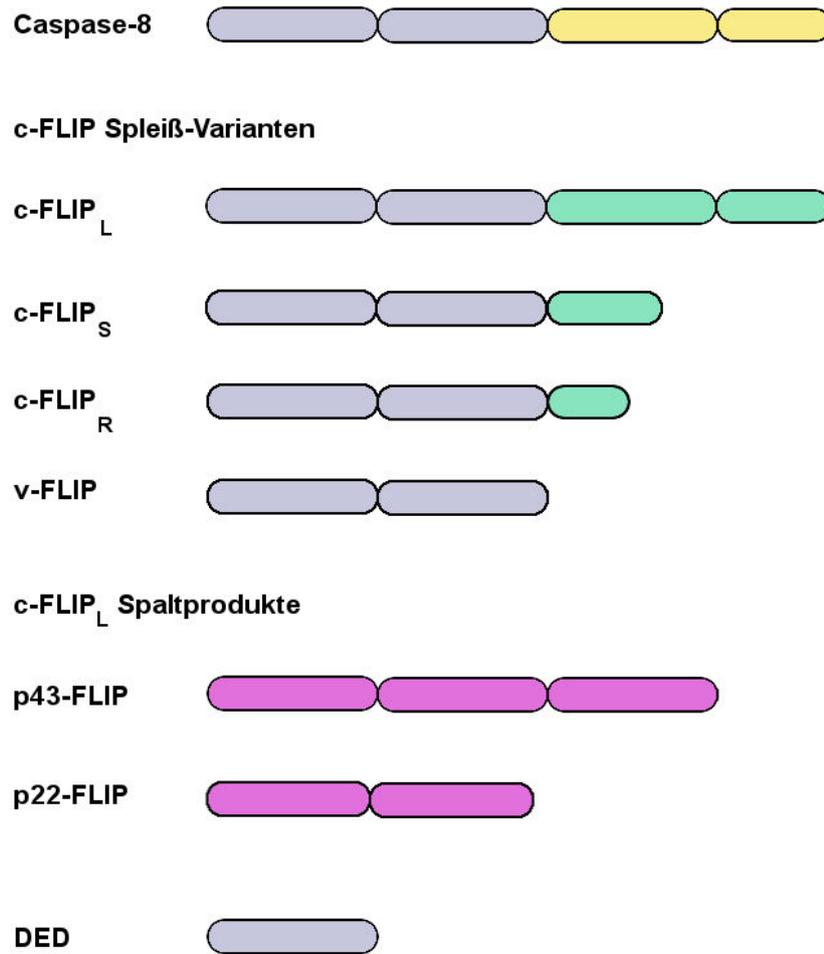


Abbildung 1.5: Struktur von verschiedenen FLIP-Proteinen. Im Vergleich zu Caspase-8 (oben) ist c-FLIP_L strukturell sehr ähnlich. Die Caspase-ähnliche Domäne von c-FLIP_L ist allerdings nicht katalytisch aktiv. Allen FLIP Isoformen gemeinsam ist die DED Domäne (modifiziert nach Budd et al., 2006).

(Ueffing et al., 2009). Im Mausgenom unterscheidet sich die murine *CFLAR* Struktur von der humanen Struktur des Gens (Ueffing et al., 2008a). So wird in Mäusen nur c-FLIP_L und c-FLIP_R exprimiert (Ueffing et al., 2008a).

In einer Vielzahl von Zellen wird c-FLIP exprimiert, z.B. in Immunzellen wie Makrophagen, T- und B-Zellen aber auch in Nervenzellen, Epithelzellen oder in Herzmuskelzellen (Budd et al., 2006). Die Expression hängt aber nicht nur vom Zelltyp ab, sondern kann durch verschiedene Stimuli reguliert werden. So kann NF- κ B, wenn es durch externe Stimuli aktiviert wird, die Expression von c-FLIP erhöhen (Kreuz et al., 2001). Diese c-FLIP Induktion wurde für B-Zellen mit den Stimuli TNF- α und IL-1 sowie Lipopolysaccharide (LPS) und CD40L gezeigt (Micheau et al., 2001). Für T-Zellen wurde mit den Stimuli Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin oder anti-CD3 und anti-CD28 eine c-FLIP Induktion nachgewiesen (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001). Ebenso wurde für T-Zellen eine Erhöhung der c-FLIP-Expression durch die Behandlung mit PHA oder anti-CD3-Antikörpern nachgewiesen, wobei die Expression *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-abhängig ist (Ueffing et al., 2008b).

Die Rolle von c-FLIP im DISC

Es gibt keine Kristallstruktur von c-FLIP, allerdings gibt es die Kristallstruktur von v-FLIP MC159 (Yang et al., 2005), auf dessen Basis ein wahrscheinliches strukturelles Modell von c-FLIP_R ermittelt wurde. Dabei wurden verschiedene Regionen identifiziert, welche für die Bindung zum DISC verantwortlich sein könnten. So befindet sich eine geladene Triade an der Oberfläche von c-FLIP_R. Es wurde jedoch gezeigt, dass diese Triade nicht das kritische Element für die DISC-Rekrutierung ist (Ueffing et al., 2008a). In ihren N-terminalen DEDs besitzen c-FLIP Proteine außerdem eine hydrophobe Stelle, die für die Rekrutierung zum DISC notwendig ist. Dies wurde gezeigt, da Mutationen in der hydrophoben Stelle einer der DEDs dazu führen, dass die mutierte Form nicht mehr im DISC nachzuweisen ist (Ueffing et al., 2008a; Majkut et al., 2014). Obwohl sowohl Caspase-8, Caspase-10 und FADD DEDs besitzen, scheint nur Caspase-8 c-FLIP zum DISC rekrutieren zu können (Hughes et al., 2016).

Durch die Interaktion der DEDs von c-FLIP und Caspase-8 kann die Aktivierung von Caspase-8 im DISC effizient unterdrückt werden. Dies funktioniert sowohl bei CD95- als auch bei TNF- und TRAIL-vermittelter Apoptose (Scaffidi et al., 1999b). Je nachdem welche c-FLIP Spleißvariante zum DISC rekrutiert wird, kann es zu verschiedenen Effekten kommen. Die beiden kurzen Isoformen c-FLIP_S und c-FLIP_R wurden bisher nur als reine Apoptose-Inhibitoren beschrieben, welche die Spaltung von Caspase-8 verhindern (Golks et al., 2005; Ueffing et al., 2008a). Je nach Konzentration und Stärke der Rezeptorstimulation kann c-FLIP_L entweder Apoptose inhibieren oder sogar stimulieren. Das liegt an der vorhandenen Caspase-ähnlichen Domäne, die sich mit Caspase-8 zusammenlagern kann und zu einer Prozessierung von beiden Proteinen zu p41 und p43-Fragmenten führt. Das entstehende Heterotetramer ist eingeschränkt dazu in der Lage, Apoptose auszulösen. Eine geringe Konzentration von c-FLIP_L kann die Aktivierung von Caspase-8 fördern, während hohe c-FLIP_L Konzentrationen die Apoptose verhindern (Chang et al., 2002). Zugleich scheint eine moderate Expression von c-FLIP_L nur in Verbindung mit einer starken Rezeptorstimulation pro-apoptotisch zu wirken (Fricker et al., 2010).

1 Einleitung

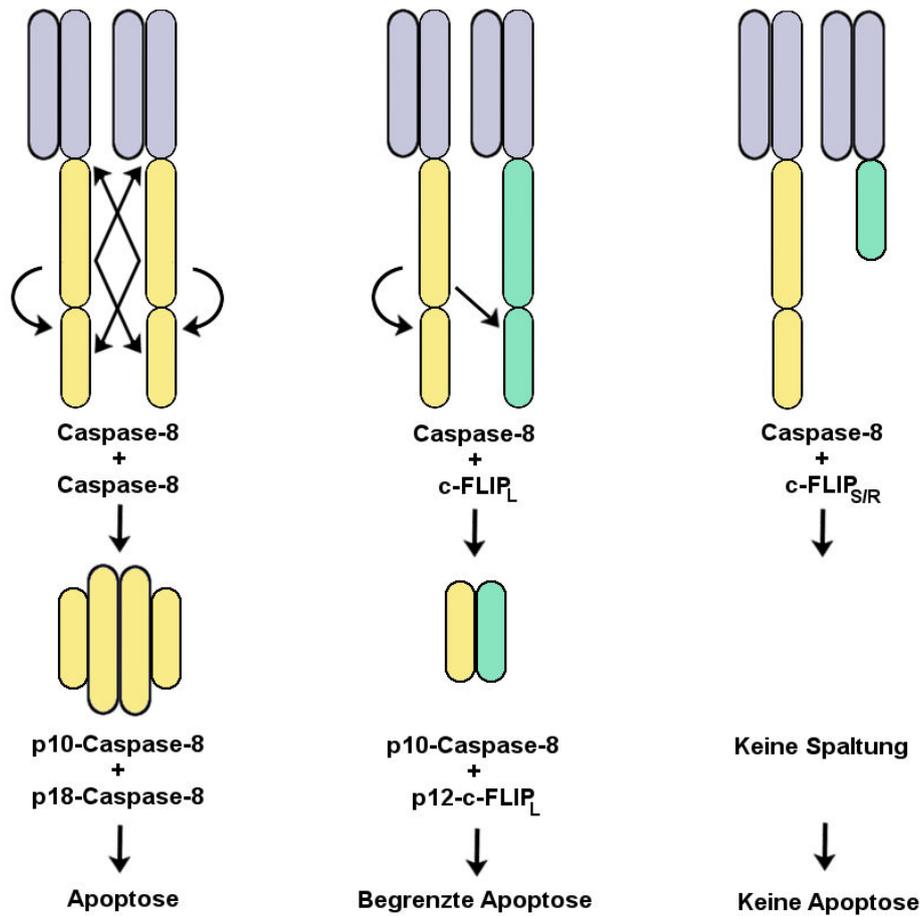


Abbildung 1.6: Wirkung von c-FLIP im DISC. Ohne c-FLIP können sich Caspase-8 Moleküle im DISC aneinander lagern, falten und autokatalytisch spalten. Dies führt zur Ausführung der Apoptose. Die Isoformen c-FLIP_R oder c-FLIP_S können die Aktivierung von Caspase-8 verhindern, somit findet keine Apoptose statt. Das Molekül c-FLIP_L kann mit Caspase-8 ein Heterodimer bilden, dessen Spaltprodukte begrenzt katalytisch aktiv sind, somit kann Apoptose eingeschränkt durchgeführt werden (modifiziert nach Krueger et al., 2001).

1.2 Apoptose als elementarer Prozess im Immunsystem

Ein weiterer Aspekt im Zusammenspiel von pro- und anti-apoptotischen Funktionen von c-FLIP_L ist, dass das p43-Fragment, das bei der Zusammenlagerung und Spaltung mit Caspase-8 entsteht, NF- κ B aktivieren kann und so eine Rolle im Überleben von Zellen spielt (Koenig et al., 2014; Kataoka und Tschopp, 2004). Ein Beispiel ist die durch Erk- und NF- κ B-regulierte Freisetzung von IL-2 bei aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen (Neumann et al., 2010; Kataoka et al., 2000; Golks et al., 2006). Das C-terminale Fragment von c-FLIP_L kann dagegen an RIP1 binden und so die Aktivierung von Caspase-8 unterbinden (Matsuda et al., 2014).

Zudem wurde c-FLIP in cytosolischen Signalkomplexen wie dem „Ripoptosom“, dem „FADD-osom“ oder dem „RIP1/RIP3 Nekrosom“ nachgewiesen, die eine Rolle in der Freisetzung von Zytokinen und dem Entstehen von Entzündungen haben (Sprick et al., 2000; Henry und Martin, 2017; Tenev et al., 2011). Die Rolle von c-FLIP in diesen Signalkomplexen wurde noch nicht genauer untersucht, aber eine Funktion, die Caspase-8 Aktivität zu begrenzen, wird vermutet (Henry und Martin, 2017).

In letzter Zeit wurden neue Modelle zur Zusammensetzung des DISC erstellt, die verschiedene Blickwinkel auf die Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-8 am DISC zeigen. Dem Modell, bei dem sich am DISC Homodimere von Caspase-8 oder Heterodimere von c-FLIP und Caspase-8 anlagern und so die Signalweiterleitung bestimmen, wurde 2012 ein sogenanntes Kettenmodell gegenübergestellt (Dickens et al., 2012; Schleich et al., 2012). In diesem wird wie im konventionellen Modell FADD an die zusammengelagerten Rezeptoren rekrutiert, doch dann lagern sich die DEDs von Caspase-8 zu langen Ketten zusammen, an denen dann Caspase-8 prozessiert wird. c-FLIP kann sich in diesem Modell an die DED von FADD anlagern und so die Prozessierung von Caspase-8 verhindern (Dickens et al., 2012). Aufbauend auf diesem Modell zeigte dieselbe Arbeitsgruppe in 2016, dass c-FLIP nicht direkt an den DISC binden kann, sondern Caspase-8 in einem kooperativen, hierarchischen Prozess benötigt, um zum DISC rekrutiert zu werden (Hughes et al., 2016). Dem Modell widerspricht eine Veröffentlichung von Majkut et al. aus dem Jahr 2014, in der die Affinität von c-FLIP und Caspase-8 zum DED von FADD untersucht wird. Dort wird gezeigt, dass c-FLIP vor allem an die $\alpha 1/\alpha 2$ Oberfläche rekrutiert wird, während Caspase-8 vor allem an die $\alpha 2/\alpha 5$ Oberfläche von FADD bindet (Majkut et al., 2014).

Ein anderes Modell von Fu et al. aus dem Jahr 2016 geht auf Kryo-Elektronenmikroskopieaufnahmen zurück. Darin lagern sich die Caspase-8 bzw. c-FLIP Moleküle durch ihre tandem-DED (DED1 und DED2)-Domänen zu Filamenten zusammen. Laut diesem Modell hat die Konzentration von c-FLIP einen entscheidenden Einfluss, so dass sich bei geringen c-FLIP Konzentrationen noch genug Caspase-8 Homodimere der Caspasedomänen aneinander lagern können, um eine effiziente Caspase-8 Aktivierung zu starten. Bei höheren c-FLIP Konzentrationen sind die Caspasedomänen der Caspase-8 Moleküle so weit voneinander entfernt, dass keine autokatalytische Spaltung stattfinden kann. In Abb. 1.7 sind das „Filament“-Modell und das „Ketten“-Modell dargestellt.

1 Einleitung

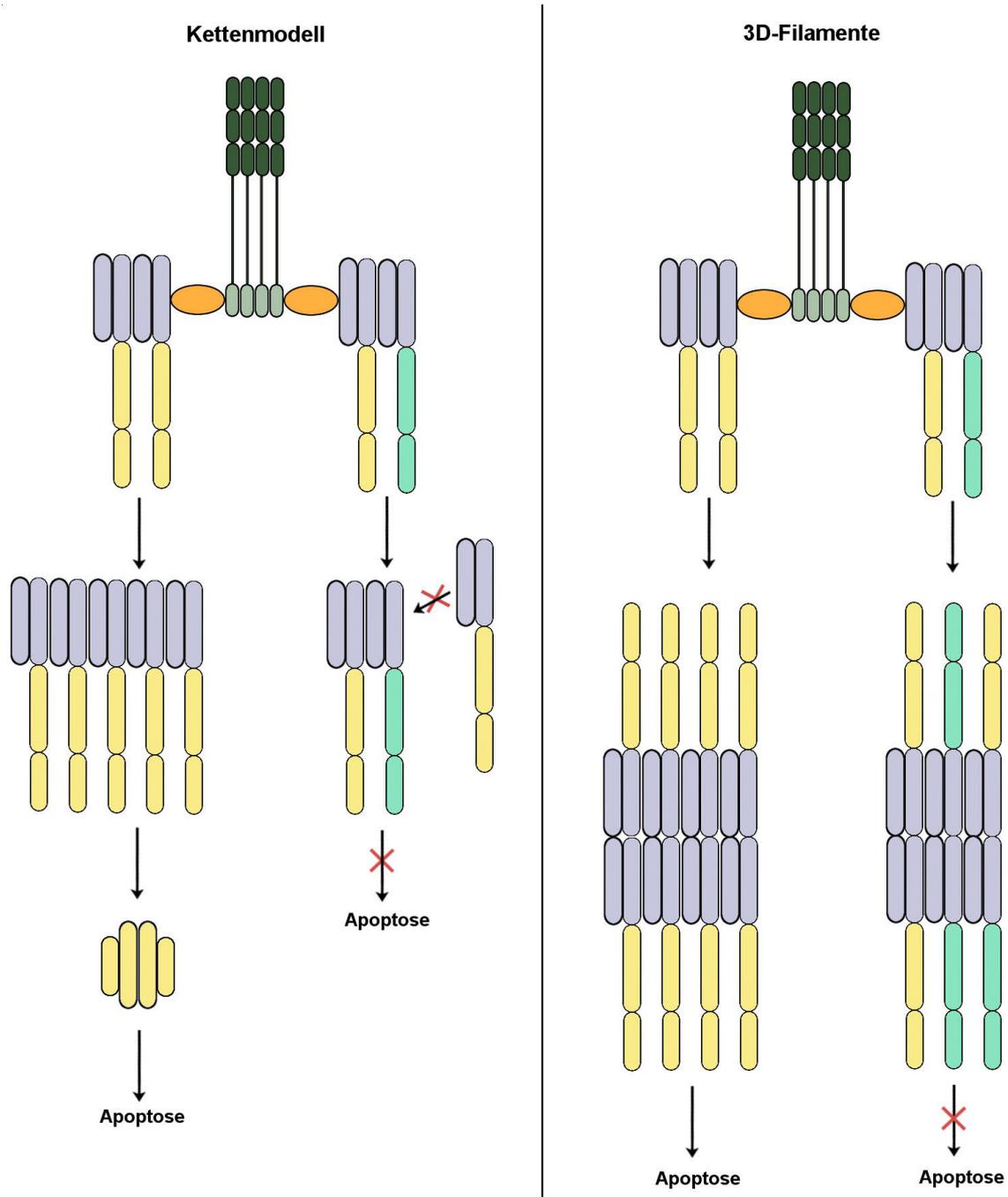


Abbildung 1.7: Verschiedene Modelle zur Wirkung von c-FLIP im DISC wurden entwickelt. In Modell I ist das sogenannte „Ketten“-Modell dargestellt. Die Bindung von c-FLIP an Caspase-8-Moleküle führt hier zum Kettenabbruch und somit wird die Aktivierung von Caspase-8 verhindert. Im „Filament“-Modell bilden sich 3-dimensionale Filamente, in denen sowohl Caspase-8 als auch c-FLIP eingelagert werden. Wird die räumliche Entfernung zwischen den Caspase-8 Molekülen zu groß, kann keine Aktivierung mehr stattfinden. Bei geringer c-FLIP-Konzentration ist dagegen eine Caspase-8 Aktivierung noch möglich (modifiziert nach Hughes et al., 2016; Fu et al., 2016).

1.2.3 Krankheitsbilder bei deregulierter extrinsischer Apoptose

Autoimmunerkrankungen

Mutationen im extrinsischen Apoptosesignalweg sind beim Menschen mit einer Krankheit namens ALPS verknüpft (Bidere et al., 2006). Diese Patienten können verschiedene Autoimmunreaktionen zeigen und akkumulieren eine unübliche Zellpopulation im Blutkreislauf. Diese besteht aus $CD3^+CD4^-CD8^-$ (doppelt negative (DN)) T Zellen (Fisher et al., 1995; Straus et al., 2001), die mit B220 einen B-Zell Marker exprimieren (Coffman und Weissman, 1981). Die Zellen unterscheiden sich auch in ihrem Zytokinprofil von herkömmlichen T-Zellen. So wurden erhöhte Level von IL-10, IL-4 und IL-5 aber niedrigere Level von IL-2 und IFN- γ festgestellt, die charakteristisch für Typ 2 Helfer-T-Zellen (Th2) sind. Diese Zellen könnten für die erhöhte Autoantikörperproduktion von ALPS-Patienten verantwortlich sein (Fuss et al., 1997). In der Maus ist eine äquivalente Erkrankung bekannt, die bei der Mutation der Gene für CD95 bzw. CD95L (*lpr*- bzw. *gld*-Mäuse) zu einer Lymphoproliferation und systemischen Autoimmunerkrankung führt (Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992).

Zudem wurde gezeigt, dass Mäuse, die keinen CD95 Rezeptor auf dendritischen Zellen oder B-Zellen exprimieren, eine systemische Autoimmunkrankheit entwickeln (Stranges et al., 2007). Mäuse mit T-Zellen ohne CD95 Rezeptor entwickeln dagegen eine Lymphopenie und Lungenfibrose (Hao et al., 2004).

Tumorbildung

Es gibt mehrere Kennzeichen von bösartigen Tumorzellen. Dazu gehören die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, die Resistenz gegenüber inhibitorischen Signalen, Resistenz gegenüber Apoptosesignalen, unlimitierte Proliferationskapazität, die Sicherstellung der Blutversorgung, Gewebeanvasion sowie Metastasenbildung (Hanahan und Weinberg, 2000). Später kamen noch ein deregulierter Metabolismus, Tarnung vor dem Immunsystem, Instabilität des Genoms und Entzündungsinitiierung als wichtige Kennzeichen von Krebszellen hinzu (Hanahan und Weinberg, 2000). Mehrere dieser Kennzeichen haben direkt oder indirekt mit deregulierter Apoptose zu tun. Defekte in der Apoptose können zu unkontrollierter Proliferation von Zellen und somit zur Tumorbildung führen (Igney und Krammer, 2002), zudem spielen auch Tregs eine entscheidende Rolle in der Tumorbildung und der Tarnung vor dem Immunsystem, diese wiederum sind abhängig von c-FLIP (Plaza-Sirvent et al., 2017).

Die Stimulation von Todesrezeptoren spezifisch in Tumorzellen ist ein vielversprechender Ansatz in der Therapie. Es wurde gezeigt, dass die Stimulierung von TRAIL, im Gegensatz zur Stimulierung von CD95 und TNF, spezifisch Tumorzellen zur Apoptose bringt (Wajant et al., 2013; Walczak et al., 1999). Trotzdem scheinen einige Tumorzelllinien gegen diese Form der Apoptoseinduktion resistent zu sein (Voelkel-Johnson, 2011). Passend zu diesen Ergebnissen wurde in einigen Tumorzellen gezeigt, dass c-FLIP die Zellen vor Todesrezeptor-vermittelter Apoptose schützt, etwa in Urothelkarzinomen (Ewald et al., 2011), Melanomen (Irmeler et al., 1997; Griffith et al., 1998) oder im Hodgkin-Lymphom (Mathas et al., 2004; Dutton et al., 2004). Lübke zeigt sogar, dass Renalkarzinomzellen auf FLIP angewiesen sind und bei dem Verlust von allen FLIP Isoformen spontan Apoptose begehen (Lübke, 2016).

1 Einleitung

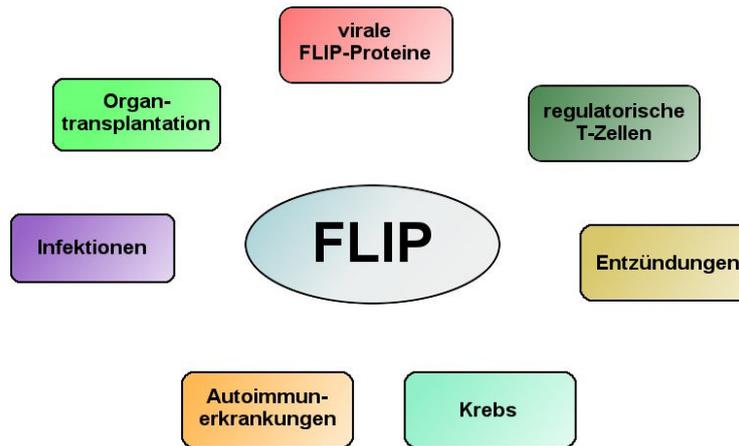


Abbildung 1.8: Einfluss von FLIP Proteinen auf das Immunsystem. Sowohl virale als auch zelluläre FLIP Proteine wirken auf das Immunsystem. Ein vielfältiger Einfluss von FLIP auf verschiedenste Aspekte des Immunsystems ist bekannt, sowohl auf verschiedene Krankheiten als auch auf Regulationsmechanismen wie Tregs.

Der CD95-Rezeptorsignalweg ist auch für eine anti-apoptotische Wirkung bekannt, bei der NF- κ B aktiviert wird. Dies ist vorteilhaft für Tumorzellen, da mit diesem Signalweg das Tumorzellwachstum unterstützt wird, zudem stimuliert der CD95-Signalweg die Invasivität des Tumors (Chen et al., 2010; Barnhart et al., 2004).

c-FLIP als Ziel für Arzneimittel und bisher bekannte Inhibitoren

Da Apoptose ein elementarer Mechanismus und die Regulierung von Apoptose wichtig für das Überleben des gesamten Organismus ist, gibt es immer wieder Überlegungen, den Apoptosesignalweg zu manipulieren, um Erkrankungen zu heilen. Gleich mehrere Reviews thematisieren die Eignung von c-FLIP als Ziel für Arzneimittel gegen Krebs (Shirley und Micheau, 2013; Fulda, 2013; Humphreys et al., 2018). Dabei geht es vor allem darum, dass die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Apoptosesignalen gesenkt wird und so die entarteten Zellen entweder vom Immunsystem selbst erkannt und eliminiert werden können oder ein besseres Ziel für Chemotherapeutika und Bestrahlung sind (Humphreys et al., 2018). Bisher sind nur Wege bekannt, die c-FLIP indirekt beeinflussen. Dazu zählen Cisplatin und Gemcitabin als DNA-schädigende Substanzen (Abedini et al., 2008; Ding et al., 2011), Etoposid als Topoisomerase II Inhibitor (Verbrugge et al., 2010), Vorinostat als Histondeacetylase Inhibitor (Crawford et al., 2013) und 5-Fluorouracil als Thymidylatsynthase Inhibitor (Iwase et al., 2003). Auch andere Inhibitoren wie PIK75 als Phosphoinositid-3-Kinasen Inhibitor, Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase 9 oder der Calcium/ Calmodulin-abhängigen Kinase II wirken sich negativ auf die c-FLIP Expression aus (Cornforth et al., 2008; Lemke et al., 2014; Yang et al., 2003). Der Nachteil an indirekt wirksamen Substanzen ist einerseits, dass die Gefahr von Nebenwirkungen sehr groß ist. So haben DNA-schädigende Agenzien potentiell Auswirkungen auf alle Gene und sind auch nicht Tumorzell-spezifisch. Andererseits können sich recht schnell Resistenzen bilden. Beispielsweise ist bekannt, dass bei der Cisplatin-Resistenz aktives Akt1 die Zusammenlagerung von p53/c-FLIP und ITCH verhindert und somit die Ubiquitinylierung und den darauf folgenden Abbau von c-FLIP unterbindet (Abedini et al., 2010).

Es gibt auch Versuche, c-FLIP direkt zu beeinflussen. So zeigen Logan et al., dass Phosphorothioat-Oligonukleotide, die spezifisch für c-FLIP sind, die c-FLIP Expression verringern. Damit konnte die Arbeitsgruppe sowohl *non-small cell lung cancer* (NSCLC) Zellen als auch Zellen des kolorektalen Karzinoms und Prostatakrebszellen zur Apoptose sensitiveren. Auch in einem Mausmodell konnte die Wirkung der anti-c-FLIP Oligonukleotide im NSCLC-Modell nachgewiesen werden. In dieser Arbeitsgruppe wurden auch Peptide entwickelt, welche die Interaktion zwischen c-FLIP und Atg3 spezifisch inhibieren und somit das Zellwachstum hemmen und Autophagie induzieren (Lee et al., 2010). In diesem Zusammenhang hat ein Konsortium ein medizinisch-chemisches Screening mit kleinen Molekülen durchgeführt. Mit Hilfe eines biochemischen Ansatzes sollen Substanzen gefunden werden, die spezifisch die Interaktion zwischen FADD und c-FLIP verhindern ohne die Rekrutierung von Caspase-8 zum DISC zu stören. Anscheinend wurden Substanzen gefunden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Effekt gezeigt haben (Majkut et al., 2017).

1.3 Naturstoffe als Quelle neuartiger Wirkstoffe

Ziel dieser Arbeit ist es, Substanzen zu finden, die c-FLIP modulieren. Die schon gezeigten Ansätze mit Oligonukleotiden oder Peptiden sind noch keine Option für Medikamente, da es verschiedene Hindernisse gibt, etwa den Transport an den Wirkort, die Spezifität und auch den Weg bis zur Zulassung als Medikament (Shirley und Micheau, 2013). Am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung gibt es eine Wirkstoffbibliothek von mikrobiellen Naturstoffen aus Myxobakterien. Die dort vorhandenen Substanzen weisen einzigartige Strukturen auf und sind daher eine große Hoffnung für neuartige Wirkstoffe (Landwehr et al., 2016). Natürliche Wirkstoffe sind schon seit Jahrzehnten eine reiche Quelle an neuen Medikamenten, von Penicillinen angefangen (Fleming, 1929) über Paclitaxel (Wani et al., 1971) oder Rapamycin (Sehgal et al., 1975) bis zum Nobelpreis 2015 für die Entdeckung von Avermectinen und Artemisinin (Chen, 2016). Die Zeit der 1950er und 1960er Jahre, als so viele neue Antibiotika aus Naturstoffen isoliert und weiterentwickelt wurden, wurde auch das „goldene Zeitalter“ der Wirkstoffforschung aus Naturstoffen genannt. Shen sagt ein zweites goldenes Zeitalter der Wirkstoffentwicklung aus Naturstoffen voraus, da der Nobelpreis für die Avermectinen aus einer intensiven Kollaboration von Wissenschaft und Industrie hervorgegangen ist. Dabei haben sich die verhältnismäßig deutlich kleineren Naturstoffbibliotheken gegen die zahlenmäßig viel größeren chemischen Bibliotheken kleiner Moleküle durchgesetzt (Shen, 2015). Zudem bieten die Naturstoffe den Vorteil, dass durch neue Methoden wie *Genome mining* oder Metagenomics neue Potentiale der Naturstoffe erst noch entdeckt werden können (Charlop-Powers et al., 2014).

1.3.1 Myxobakterien

Myxobakterien sind Gram-negative, aerobe und vorwiegend im Boden vorkommende Proteobakterien des δ -Zweigs. Sie wurden bereits 1892 beschrieben, wobei Thaxter auf der Suche nach neuen Pilzarten war (Thaxter, 1892). Genauer untersucht wurden sie allerdings erst in den 60er Jahren von Dworkin vor allem wegen ihrer auffälligen Fruchtkörper (Dworkin, 1966). Die unter dem Mikroskop unbeweglichen Stäbchenbakterien haben eine Breite von etwa 0,7 bis 1 μm und eine Länge zwischen 3 und 10 μm (Reichenbach und Höfle, 1993). Sie wurden

1 Einleitung

lange Zeit nur sehr wenig erforscht, da es nur sehr mühsam gelang, sie in Dispersionskultur wachsen zu lassen (Dworkin, 1966). Nach der genaueren Charakterisierung wurden sie in allen Klimazonen auf allen Kontinenten gefunden, selbst salzunempfindliche Myxobakterien wurden aus dem marinen Umfeld isoliert (Reichenbach, 2001). Myxobakterien sind zu einem sehr komplexen, sozialen Lebenszyklus fähig (Fink und Zissler, 1989), für den ein komplexes interzelluläres Kommunikationssystem notwendig ist (Reichenbach, 1999). Sie bewegen sich gleitend in charakteristischen, filmähnlichen Schwärmen über festes Medium (Spormann, 1999). In ihrem Lebenszyklus benötigen Myxobakterien zwei Arten der Fortbewegung. Eine Art der Fortbewegung wird auch „*A-motility*“ (Spormann, 1999) genannt und dient zum Ausschwärmen einzelner Myxobakterien in einer „abenteuerlichen“ Art der Fortbewegung. Die andere Art der Fortbewegung wird als „soziale“ Fortbewegung („*S-motility*“) (Spormann, 1999) bezeichnet und kennzeichnet die gemeinsame Bewegung im Schwarm. Dabei können sie sich zu Fruchtkörpern zusammenlagern, die mehrere Millimeter hoch sind und aus mehreren hunderttausenden Zellen bestehen (Spormann, 1999). Diese häufig leuchtend gelb, orange, rot, braun oder schwarz gefärbten Fruchtkörper sind eine Strategie beim Entzug von Nährstoffen sogenannte Myxosporen zu bilden, die Trockenheit und Nährstoffknappheit gut überstehen können (Reichenbach, 2001).

1.3.2 Chemisch neuartige Strukturen

Myxobakterien können sich durch das Gleiten über Untergrund nur sehr langsam fortbewegen. Eine Theorie ist, dass sie ihre biologische Nische durch die Abgabe von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten an die Umgebung schützen, die Konkurrenzorganismen abtöten (Weissman und Müller, 2009). Diese Wirkstoffe sind es auch, die das Interesse der Biotechnologie und Wirkstoffforschung an diesen Bakterien geweckt haben. Unter den Produzenten der meisten entdeckten wichtigen Wirkstoffe sind nur einige Bakteriengattungen wie Streptomyces, Actinomyces sowie Vertreter der Gattungen *Bacillus* und *Pseudomonas* (Reichenbach, 2001). Obwohl recht wenige Bakteriengattungen Sekundärmetabolite produzieren, ist das Wirkspektrum der entwickelten Medikamente sehr weit und reicht von Antimalaria- und Diabetesmedikamenten über Blutdruck- und Cholesterin-senkende Wirkstoffe bis hin zu antibakteriell, antiviralen und Antitumorwirkstoffen (Reichenbach, 2001). Myxobakterien haben aus mehreren Gründen eine herausragende Stellung innerhalb der wirkstoffproduzierenden Bakterien inne. Sie wirken selbst nicht als Pathogene gegen höhere Tiere oder den Menschen (Reichenbach und Höfle, 1993). Das macht sie zu idealen Produzentenstämmen in der Biotechnologie, da ihre Kultivierung sicher ist. Zum anderen produzieren Myxobakterien eine enorme Vielfalt an Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen, die an verschiedenen Angriffspunkten wirken können und so neue Wirkweisen aufdecken können. Diese Vielfalt ist nach genomischen Analysen noch lange nicht ausgeschöpft. Das Genom von So ce65 als typischem Vertreter der Myxobakterien ist 13 Mbp groß und verfügt über 9367 proteinkodierende Sequenzen. Davon konnten über 3000 Genen keine Funktion zugeordnet werden und sie haben auch keine hohe Ähnlichkeit mit anderen proteincodierenden Sequenzen in Datenbanken. Somit haben Myxobakterien das Potential, je nach Umgebung weitere neuartige Substanzen zu produzieren, die noch unbekannt sind (Schneiker et al., 2007). Ein Beispiel für das enorme Substanzspektrum von Myxobakterien ist, dass alleine über 20 verschiedene und einzigartige Substanzen aus ihnen isoliert wurden, die die mitochondrielle Atmungskette inhibieren (Reichenbach, 2001).

1.3.3 Myxobakterielle Substanzen als immunologische Modulatoren

Abgesehen von den bekannten antibakteriellen und antiviralen Wirkstoffen gibt es auch myxobakterielle Substanzen, die das Immunsystem modulieren. Dazu zählt Soraphen A, das als Acetyl-CoA-Carboxylase-1 (ACC-1)-Inhibitor bekannt ist. Diese Wirkung wurde in einer genomischen Analyse festgestellt, als Soraphen A-resistente *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme untersucht wurden (Vahlensieck et al., 1994). Genauer wurde Soraphen A dann von Berod et al. charakterisiert. Dabei wird die Rolle von ACC-1 für die Entwicklung von Th17-Zellen beschrieben (Berod et al., 2014). Wird die ACC-1 blockiert, zum Beispiel durch Soraphen, so verschiebt sich die Population von inflammatorischen Th17-Zellen hin zu immunsupprimierenden Tregs. Dies gibt einen Einblick in die metabolische Regulierung der Entwicklung von Immunzellen und könnte als Behandlungsansatz für verschiedene entzündliche und Autoimmunerkrankungen dienen (Castro et al., 2015).

Ein anderes Beispiel ist Spirangien A und dessen chemisches Derivat Spirangien M522, die bei einem Screening als IL-8 inhibierende Substanzen entdeckt wurden (Reboll et al., 2012). IL-8 besitzt als Chemokine eine Rolle in entzündlichen Erkrankungen, im Tumorwachstum und bei der Angiogenese. Die beiden untersuchten Spirangien konnten die Induktion der endogenen IL-8 Transkription wirksam unterdrücken und inhibierten ebenso die Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α . Somit konnten die beiden Substanzen auch die Aktivierung des NF- κ B Signalweges beeinflussen.

Eine direkte Wirkung von myxobakteriellen Wirkstoffen in einem Krankheitsmodell zeigen Kim et al. Vier von 288 getesteten Substanzen zeigen eine Wirkung auf Zellen eines Patienten mit Gaucher-Syndrom. Bei diesem erzeugt die Akkumulierung von fehlerhaft gefalteten Glucocerebrosidaseenzym im endoplasmatischen Retikulum (ER) einen ER-Stress, der die Aktivierung von Bax und damit Apoptose auslöst (Ron und Horowitz, 2005; Wei et al., 2008; Zong et al., 2003). In Gegenwart der vier „Hit“ Substanzen war die Bax-Expression vermindert, was zu einer verminderten Apoptose und somit zu einer erhöhten Überlebensrate der Zellen des Gaucher-Syndrom Patienten geführt hat (Kim et al., 2012).

Auch in einem Mausmodell von Parkinson wurden vier myxobakterielle Substanzen entdeckt, die die Zellviabilität erhöht haben und die Zellregeneration nach akuten Läsionen unterstützt haben (Kim et al., 2013).

1.3.4 Argyrine und ihre chemischen Derivate

2002 wurden die Argyrine als zyklische Peptide, die von *Archangium gephyra* produziert werden, beschrieben (Sasse et al., 2002). Schon in dieser Veröffentlichung werden sie als Immunmodulatoren beschrieben, da sie die T-Zell-unabhängige Antikörperproduktion von B-Zellen inhibieren. Argyrine zeigen auch eine leichte antimikrobielle und antifungische Aktivität, die bei *Pseudomonas aruginosa* durch eine Mutation im Elongationsfaktor G aufgehoben werden kann (Bielecki et al., 2012). Argyrin A wurde auch als „Hit“ in einem Screening nach p27^{kip1} stabilisierenden Wirkstoffen gefunden (Nickeleit et al., 2008). Dabei wurde die Wirkung von Argyrin A als Inhibition der katalytischen Aktivität des S20 Proteasoms beschrieben, das zu einem verminderten Abbau des Cyklin Kinase Inhibitors p27^{kip1} Proteins führt. In Folge der Stabilisierung von p27^{kip1} haben Nickeleit et al. drei Mechanismen identifiziert, aufgrund deren Argyrin A als Antitumorwirkstoff im Darmkrebsmodell *in vivo* wirkt (Nickeleit

1 Einleitung

et al., 2008). Der erste Mechanismus dabei ist die p27^{kip1}-induzierte Apoptoseauslösung in Tumorzellen, der zweite Mechanismus zielt auf die Verhinderung der Neubildung von Blutgefäßen und der dritte Mechanismus ist die Zerstörung von tumorversorgenden Blutgefäßen. All diese Mechanismen sind im beschriebenen Modell p27^{kip1}-abhängig.

Von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Kalesse an der Leibniz Universität Hannover und dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung wurden chemische Derivate, vom Grundgerüst der Argyrine ausgehend, hergestellt. Diese haben teilweise durch eine β -(1-azulenyl)-l Alanin-Gruppe (AzuAla) eine tiefblaue Farbe (Stempel et al., 2018). So wurden Argyrin A und Argyrin C sowie Baceridin (ebenso eine als Proteasom-Inhibitor bekannte Substanz (Niggemann et al., 2014)) mit der AzuAla-Gruppe versehen. Die Strukturen der fünf Substanzen sind in Abb. 1.9 dargestellt.

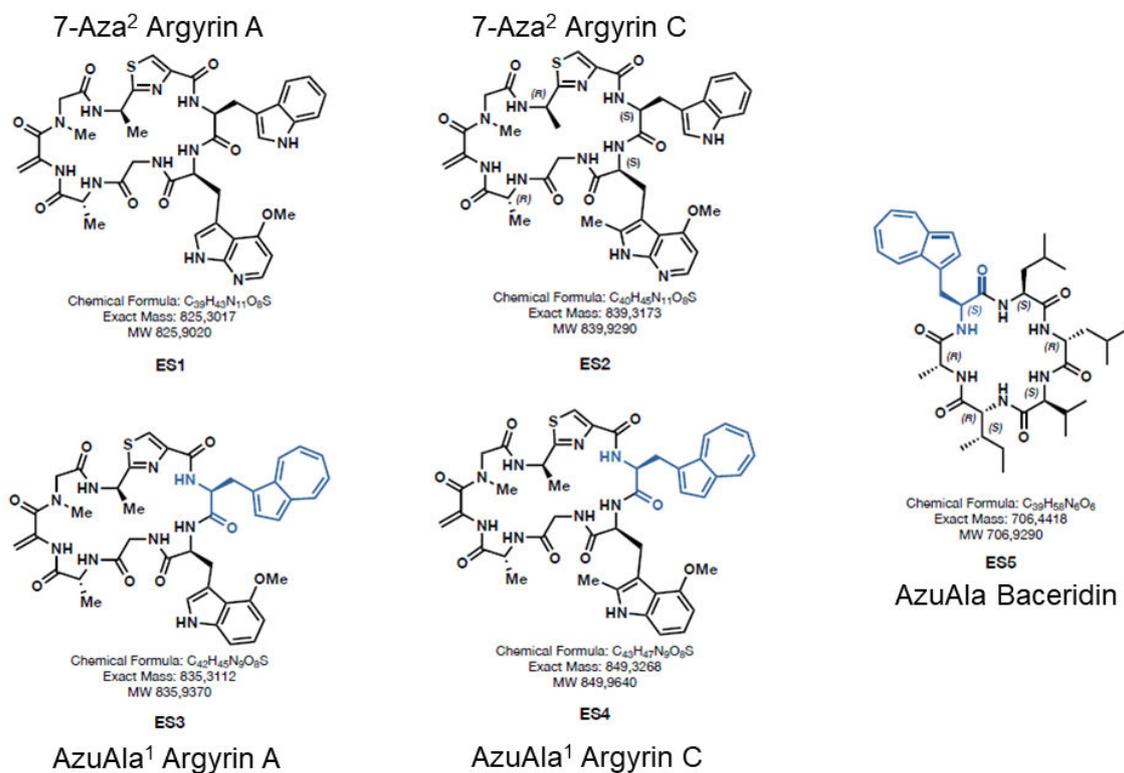


Abbildung 1.9: Struktur von verschiedenen Derivaten von Argyrin A, Argyrin C und Baceridin. Grafik zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Markus Kalesse, Hannover.

1.3.5 Aurachine und ihre natürlichen Derivate

Aurachine sind als Atmungsketteninhibitoren bekannt, die eine Wirkung auf spezifische Cytochromkomplexe haben (Li et al., 2013). Nachdem zuerst die Aurachine A-D entdeckt wurden (Kunze et al., 1987), sind bis heute die natürlichen Derivate Aurachin A-R bekannt (Höfle und Kunze, 2008; Höfle und Irschik, 2008; Nachtigall et al., 2010). Alle diese Derivate haben einen Quinolon oder ein Quinolin-Kern mit einer Farnesylkette an Position C3 oder C4 gemeinsam (Li et al., 2013). Insbesondere die antibiotische Wirkung der Aurachine

1.3 Naturstoffe als Quelle neuartiger Wirkstoffe

stand bisher im Fokus der Forschung, da sie das Photosystem II und den Cytochrom *bf*-Komplex in photoaktiven Mikroorganismen und die Quinol-Oxidationsstelle der bakteriellen Cytochrome *bo* und *bd* inhibieren können (Oettmeier et al., 1990; Meunier et al., 1995). Aurachine wirken nicht toxisch auf Hefen oder Pilze, aber auf einige Zelllinien wie die humane Darmkrebszelllinie HCT-116, die Leukämiezelllinie K562 oder U2 OS Osteosarkomzellen (Li et al., 2013). Da das intrinsische Membranpotential durch Aurachine abnimmt, wird als Ursache der toxischen Wirkung die Induktion der intrinsischen Apoptose angenommen (Li et al., 2013). Ausgewählte Strukturen von Aurachin Derivaten sind in Abb. 1.10 dargestellt.

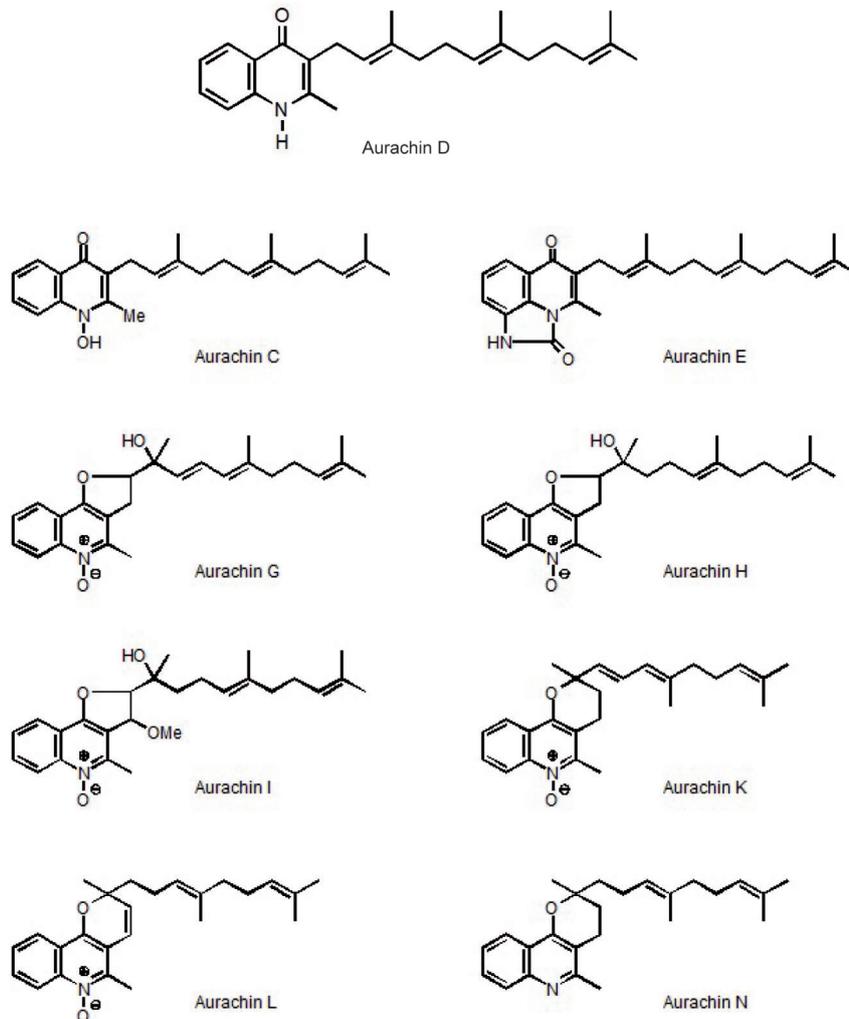


Abbildung 1.10: Strukturen von Aurachin D und weiteren natürlich vorkommenden Aurachin-Derivaten. Alle Aurachine haben einen Quinolon- oder Quinolin-Kern gemeinsam, zudem besitzen sie eine Farnesylkette. Strukturen sind modifiziert nach *Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien und anderen Mikroorganismen* (1996) dargestellt.

2 Verwendete Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Merck (inklusive Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.2 Verwendete Puffer

Alle Puffer wurden in Reinstwasser (MilliQ®), Merck, Darmstadt, Deutschland) angesetzt.

2.2.1 Puffer für den Western Blot

Für den Western Blot wurden folgende Puffer verwendet:

DISC Lysepuffer	30 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 % v/v Glycerin, 1 % v/v Triton X-100, 2mM EDTA, 10 mM NaF
TPNE Lysepuffer	PBS ad 300 mM NaCl, 1 % v/v Triton X-100, 1 mM EDTA, pH 7,4
TBS-T	137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 24,76 mM Tris, pH 7,4
6x Reduzierungspuffer (RSB)	150 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4,65% DTT, 6% SDS, 0,03 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin
Blockierungspuffer	5 % w/v fettfreie Trockenmilch, 0,2 % v/v Tween® -20 in TBS
Laufpuffer	25 mM Tris, pH 8,0, 192 mM Glycin, 1 % v/v SDS
Transferpuffer TBS	25 mM Tris, pH 8,0, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 24,76 mM Tris, pH 7,4

2.2.2 Puffer für die Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden folgende Puffer verwendet:

Nicoletti-Puffer	0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % Natriumcitrat, 50 µg/mL Propidiumiodid
10x Annexin V Bindungspuffer	0,1 mM HEPES/NaOH, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl ₂ , pH 7,4
FACS Puffer	2 % w/v BSA, 0,01 % w/v Natriumazid in PBS
ACK Lysepuffer	1,5 M Ammoniumchlorid, 100 mM Kaliumhydrogencarbonat, 100 mM Dinatrium-EDTA, pH 7,2

2.3 Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zelllinie	Kurzbezeichnung	Referenz	Zelltyp	Genotyp
HT 1080		1	Fibrosarcom	
HT 1080 e.v.	e.v.	2		Leervektor
HT 1080 c-FLIP _L	c-FLIP _L	2		c-FLIP _L überexprimiert
HT 1080 c-FLIP _S	c-FLIP _S	3		c-FLIP _S überexprimiert
HT 1080 c-FLIP _{LMut}	c-FLIP _{LMut}	2		c-FLIP _{LMut} überexprimiert
HT 1080 c-FLIP _{SMut}	c-FLIP _{SMut}	3		c-FLIP _{SMut} überexprimiert
Jurkat		4	T-Zellen	
Jurkat E6.1	WT	5		
Jurkat FADD KO	FADD KO	5		FADD Knockout
Jurkat Caspase-8 KO	C-8 KO	6		Caspase-8 Knockout
Jurkat JMR	JMR	7		Caspase-9 Knockout
Jurkat F9	F9	7		Caspase-9 rekonstituiert
Renal cell carcinoma	clearCa-4	8	Nierenkarzinom	

¹ Rasheed et al., 1974

² Misterek, 2012

³ Tafrishi, unpublizierte Daten

⁴ Schneider et al., 1977

⁵ Juo et al., 1999

⁶ Juo et al., 1998

⁷ Samraj et al., 2006

⁸ Ramp et al., 2003

2.4 Verwendete Mauslinien

In dieser Arbeit wurden Mäuse der Mauslinie $Foxp3^{tm1(CD2/CD52)Shori}$ verwendet, die einen C57BL/6 Hintergrund aufweisen (Komatsu et al., 2009).

2.5 Verwendete Antikörper

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

2.5.1 Primärantikörper für Western Blot

Als Primärantikörper wurden folgende Antikörper in dieser Arbeit verwendet:

Spezifität	Isotyp	Katalognr./ Klon	Hersteller
β-Actin	Maus IgG2a	A2228	Sigma Aldrich
aktive Caspase-3	Kaninchen IgG	9661	CST
aktive Caspase-8	Kaninchen IgG	9496	CST
Caspase-3	Ziege IgG	AF-605	R&D
Caspase-8	Maus IgG2b	Klon 12F5	Prof. Klaus Schulze-Osthoff (Tübingen)
c-FLIP	Maus IgG1	MAB8430	R&D
c-FLIP	Kaninchen monoklonal	AF821	R&D
FADD	Kaninchen IgG	TA332936	Origene
GAPDH	Maus IgG2b	60004-1-IG	Proteintech
PARP	Maus IgG1	556362	BD Biosciences
Tubulin	Maus IgG1	T9026	Sigma

2.5.2 Sekundärantikörper für Western Blot

Zur Detektion des Signals wurden folgende Sekundärantikörper im Western Blot eingesetzt:

Spezifität	Herkunftsorganismus	Katalognr.	Hersteller
Maus IgG	Ziege	115-035	Dianova
Maus IgG1	Ziege	1070-05	Southern Biotechnology
Maus IgG2a	Ziege	1080-05	Southern Biotechnology
Maus IgG2b	Ziege	1090-05	Southern Biotechnology
Kaninchen IgG	Ziege	4030-05	Southern Biotechnology
Ziege IgG	Kaninchen	6164-05	Southern Biotechnology

2.5.3 Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Folgende Antikörper und Farbstoffe wurden in dieser Arbeit für die Durchflusszytometrie verwendet:

Name/Spezifität	gekoppelt an	Katalognr./Klon	Hersteller
Annexin V	FITC	640906	Biolegend
7AAD		BML-AP400	Enzo
Caspase-3/7 Green Fluorescent dye		C10423	Thermo
CD95		Klon 2R2	Klaus Schulze-Osthoff
TRAILR1	PE	Klon	Biolegend
TRAILR2	PE	Klon	Biolegend
TNFR1		Klon H398	Prof. Harald Wajant, Würzburg
Lebend/Totfärbung		L23105	Thermo
hCD2	APC	300214	Biolegend
mCD4	Pacific Blue	100428	Biolegend
anti-Maus	PE	115-116-146	Jackson ImmunoResearch

2.6 Verwendete Methoden

2.6.1 Zellkultur

Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders benannt, von Gibco/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Die HT 1080 und clearCa-4 Zellen wurden in DMEM Medium, supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) und 1 % Penicillin/Streptavidin (Gibco), kultiviert. Jurkat Zellen, humane PBMCs und primäre murine T-Zellen wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10 % FKS kultiviert. Gelagert wurden die Zellen über flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren wurde ein Zellpellet aus etwa 5×10^6 Zellen in 5 ml FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und je 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox (Nalgene) über Nacht bei -80° Celsius heruntergekühlt und dann in der Gasphase über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen in 4 ml warmen Medium gewaschen und dann in 10 ml Medium in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche kultiviert.

2.6.2 Mycoplasmentest

Die verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontaminationen durch Mycoplasmen kontrolliert. Dazu wurde 1 ml Zellkulturüberstand für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Röhrchen gegeben und für 10 min bei 20000 g

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen, bevor es in 100 μ l PBS aufgenommen wurde. Es folgt eine Inkubation bei 95° C für 15 min und eine kurze Zentrifugation. Von der DNA wird 1 μ l mit 25 μ l Mastermix versetzt und eine PCR durchgeführt.

Verwendeter Mastermix:

Mastermix	Menge [μ l]
Taq Polymerase (Kapa 2G HotStart Mix)	12,5 μ l
Primer	0,5 μ l je Primer
Interne Kontrolle	1 μ l
Wasser	5,5 μ l

Verwendete Primer:

Primer	Sequenz
Myco1 fwd	CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC
Myco2 fwd	CGCCTGAGTAGTACGTACGC
Myco3 fwd	TGCCTGGGTAGTACATTCGC
Myco4 fwd	TGCCTGAGTAGTACATTCGC
Myco5 fwd	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC
Myco6 fwd	CACCTGAGTAGTATGCTCGC
Myco7 fwd	CGCCTGGGTAGTACATTCGC
Myco8 rev	GCGGTGTGTACAAGACCCGA
Myco9 rev	GCGGTGTGTACAAAACCCGA
Myco10 rev	GCGGTGTGTACAAGACCCGA

PCR-Programm:

95° C für 7 min
 65° C für 2 min
 72° C für 10 min

32 Zyklen: 95° C für 10 sec
 65° C für 20 sec
 72° C für 30 sec

72° C für 5 min
 4° C ohne Zeitlimit

2.6.3 Testen der Substanzen und Stimulierung mit CD95L

Bis auf die Kinetiken wurden die verschiedenen Tests der Substanzen nach dem gleichen zeitlichen Schema durchgeführt. Eine Darstellung dieses Ablaufs ist in Abb. 2.1 zu sehen. Etwa einen Tag vor dem Test werden (wenn nicht anders angegeben) 10^5 Zellen/ml ausgesät. Zum Zeitpunkt „0 h“ werden die Substanzen (bzw. DMSO als Lösemittelkontrolle) zu den Zellen gegeben und nach 2 h wird bei einem Teil der Zellen eine zusätzlichen 100 ng/ml CD95L-Stimulation und teilweise andere Kontroll-Stimulationen mit 1 μ M Staurosporin (STS)

2 Verwendete Materialien und Methoden

als Apoptosestimulanz durchgeführt. 18 h nach Substanzzugabe wurden die jeweiligen Tests durchgeführt.

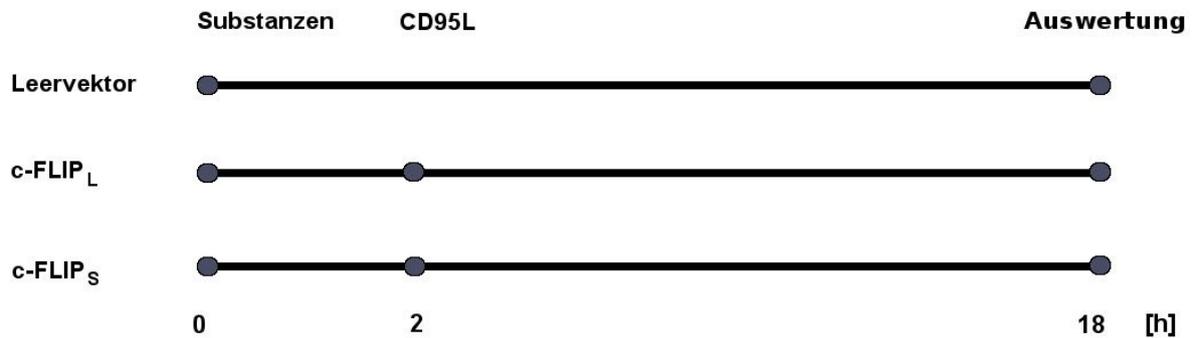


Abbildung 2.1: Schema des zeitlichen Ablaufs der meisten Substanztests. Einen Tag vor dem Test wurden die Zellen ausgesät. Zum Zeitpunkt „0 h“ startet die Substanzzugabe und die Zugabe von DMSO als Lösemittelkontrolle. Die CD95L-Stimulation und die Zugabe weiterer Kontrollsubstanzen wie STS starten nach 2 h. Nach 18 h wurde der jeweilige Test durchgeführt.

2.6.4 Resazurin Test

Für den Resazurin Test wurde eine Stocklösung mit 0,2 mg/ml Resazurin in PBS angesetzt und diese Lösung wurde sterilfiltriert. Adhärenente Zellen wurden mit PBS gewaschen und das frische Medium wurde mit 10 % Resazurin-Stocklösung versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde für 3 Stunden bei 37° Celsius im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz (Exzitation/Emission 540/590 nm) im Tecan 200 (Männedorf, Schweiz) Lesegerät gemessen.

2.6.5 Mikroskopie von Zellen

Für die morphologische Auswertung der Apoptose-induktion wurden 48-Loch Platten verwendet und die Zellen wurden wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben behandelt. Die Auswertung der Morphologie fand mit einem Nikon Eclipse TE300 microscope (Nikon instruments, Melville, USA) Mikroskop statt. Mit einer Nikon DS 2MBWC Kamera wurden Fotos gemacht, die mit der NIS Elements Software (Nikon instruments, Melville, USA) ausgewertet wurden.

2.6.6 Quantitative PCR

Aus Zellpellets wurde mit dem Quiagen RNeasy Plus Mini Kit RNA isoliert. Bei Bedarf wurde eine DNase Behandlung mit dem Thermo Fisher DNA removal Kit nach Anleitung durchgeführt. Die nachfolgende cDNA Synthese wurde mit dem Thermo First Strand cDNA Synthesis Kit nach Anleitung ausgeführt. Die cDNA wurde 1:10 in Wasser verdünnt für die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) eingesetzt. Der Reaktionsmix für die qPCR bestand aus 5 µl der verdünnten cDNA, 10 µl Sybr Green Mastermix (Roche, Mannheim, Deutschland) und 5 µl Primer (100 pmol/µl).

Es wurden folgende Primer gegen humanes FLIP verwendet:

Gen	Sequenz
FLIP _L vorwärts	cagctcaccatccctgtacc
FLIP _L rückwärts	caggagtggcgcttttctt
FLIP _S vorwärts	aggaatggtctccaagcagca
FLIP _S rückwärts	atcaggacaatgggcataggg
FLIP _{total} vorwärts	ctcaggaaccctcacctgt
FLIP _{total} rückwärts	cagatttatccaaatcctcacca

Für die qPCR wurde folgendes Programm im Roche Thermocycler verwendet:

Vorinkubation:

95° für 10min

Amplifikation:

45 Zyklen mit je

95° für 10 Sekunden

60° für 10 Sekunden

72° für 10 Sekunden

Abstoppen:

95° für 10 Sekunden

65° für 60 Sekunden

97° für 1 Sekunde

Kühlphase:

37° für 30 Sekunden

2.6.7 Western Blot

Ernten der Zellen

Zum Ernten der Zellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/ EDTA-Lösung (Gibco) von der Kulturgefäßoberfläche gelöst. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und das Zellpellet für die Lyse genutzt.

Lyse der Zellen

Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (DISC- oder TPNE Puffer) resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei 4° Celsius. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt und für die Proteinbestimmung verwendet.

2 Verwendete Materialien und Methoden

Quantitative Proteinbestimmung

Der Proteingehalt des Überstandes wurde mittels photometrischer Analyse ermittelt. Dazu wurde der BCA Assay (Thermo, Waltham, USA) verwendet, der nach Anleitung durchgeführt wurde.

SDS-Gel

40 µg Proteinlysate wurden im Verhältnis Lysat:Reduzierungspuffer 1:6 mit RSB-Reduzierungspuffer versetzt und auf ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das SDS-Gel wurde bei 80 V für 120 min in einer Gelkammer (Biorad, Hercules, USA) laufen gelassen.

Das 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel wurde in folgender Zusammensetzung hergestellt:

Sammelgel:

Chemikalie	Menge [ml]
Wasser	2,08
30 % Acrylamid-Mix	0,5
1 M Tris (pH 6,8) + SDS	0,375
10 % APS	0,03
TEMED	0,003

Trenngel:

Chemikalie	Menge [ml]
Wasser	3,4
30 % Acrylamid-Mix	4,0
1,5 M Tris (pH 8,8) + SDS	2,5
10 % APS	0,1
TEMED	0,004

Transfer

Der Transfer auf die PVDF Membran (Thermo, Waltham, USA) fand bei kleinen Gelen (bis 15 Taschen) als Tank-Blot in einer Biorad (Hercules, USA) Kammer bei 100 V für 105 min statt, bei großen Gelen wurde ein *semi-dry* Verfahren in einer Peqlab (Erlangen, Deutschland) Transferkammer bei 0,35 A und 70 V für 105 min angewendet.

Analyse der Membran

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h in 5 % Blockierungslösung geblockt und dann über Nacht bei 4° Celsius in Erstantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4 mal für je 10 min in Waschpuffer (TBS-T) gewaschen. Die Membran wurde danach mit dem Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Es folgten weitere 6 Waschstreps a 10 min. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit ECL select (GE Healthcare). Das Chemilumineszenzsignal wurde entweder mittels der Fusion FX7 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) Kamera oder einer Agfa (Mortsel, Belgien) Curix 60

Entwicklermaschine ermittelt.

Die Membran wurde anschließend mit Reblot mild (Merck, Darmstadt, Deutschland) gestriipt und nach einer erneuten Blockierung für 1 h mit Blockierungspuffer mit einem anderen Erstantikörper inkubiert.

2.6.8 Durchflusszytometrie

Bei allen durchflusszytometrischen Versuchen wurden die Zellen in FACS Röhrchen geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Pro Waschschrift wurde der jeweilige Puffer auf die Zellen gegeben und diese bei 5 min für 1500 rpm bei 4° zentrifugiert. Die Zellen wurden durchgängig bei 4° Celsius behandelt. Die Messungen fanden am FACS Canto (BD, Franklin Lakes, USA) statt.

Annexin V/7AAD Test

Für den Annexin V/7-Aminoactinomycin (7AAD) Test wurden die gewaschenen Zellen zusätzlich zwei Mal mit FACS Puffer gewaschen. Anschließend wurden das Zellpellet in 100 µl Annexin V/7AAD Antikörperlösung in Annexin V-Bindungspuffer (1:100 Annexin V, 1:100 einer 0,1 mg/ml 7AAD-Lösung in PBS) für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Annexin V-Bindungspuffer zugegeben und die Proben im FITC und PE Kanal vermessen.

Caspase-3/7 Test

Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher, Waltham, USA) gefärbt. In dieser Reagenz ist ein Farbstoff, dessen Fluoreszenz-Emission erst nach Bindung an DNA bei 530 nm messbar ist, an die Peptid-Sequenz DEVD gekoppelt. DEVD wird vor allem von Caspase-3 und Caspase-7 gespalten. Durch die Spaltung des Peptids kann der Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA interagieren und ist nun im grünen Farbspektrum messbar. Nach 10 min Inkubation wurde die Messung im FITC Kanal durchgeführt.

Nicoletti Test

Zur Bestimmung der subG1 Fraktion wurde der Nicoletti Test verwendet. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 250 µl Nicoletti-Puffer für 2 h inkubiert und dann im PE Kanal vermessen.

2.6.9 Rezeptorfärbung

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann mit einer 5 mM EDTA-Lösung in PBS von der Zellkulturschale gelöst und in ein FACS-Röhrchen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem Erstantikörper gegen CD95, TRAILR1, TRAILR2 und TNFR1 inkubiert. Nach 20 min bei 4° Celsius wurden die Zellen erneut zwei Mal mit FACS Puffer gewaschen. Bei nicht-PE konjugierten Erstantikörpern wurde ein anti-Maus-PE-Antikörper als Zweitantikörper verwendet, um das Erstantikörpersignal auswerten zu können. Dieser wurde ebenfalls für 20 min bei 4° Celsius inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS Puffer wurden die Proben im PE-Kanal mit dem FACSCanto (BD, San Jose, USA) vermessen.

2.6.10 Gewinnung und Vitalitätsbestimmung muriner T-Zellen

Es wurden Mäuse mit einem *Knock-in* des Gens für den humanen CD2 Rezeptor in Abhängigkeit zum FoxP3 Promotor verwendet. Diese Mäuse exprimieren ausschließlich auf Tregs humanes CD2 und sind damit mittels Immunofärbungen nachweisbar. Für die Analyse wurden diesen Mäusen die peripheren Lymphknoten entfernt. Diese wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 100 µm Zellsieb (Thermo, Darmstadt, Deutschland) zerkleinert. Dabei wurde 3 Mal je 2 ml PBS zugegeben und die Zellsuspension wurde in einem Falcon Röhrchen gesammelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm wurde eine ACK Lyse mit 1 ml ACK Puffer für 1 min durchgeführt und die Lyse mit 9 ml PBS gestoppt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml PBS aufgenommen und mit einer Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gezählt. Pro Probe wurden 2×10^5 Zellen in eine 96-Loch Platte ausgesät und mit der jeweiligen Substanz behandelt. Zusätzlich wurden Proben mit anti-CD28 (2 µg/ml), anti-CD3 (2 µg/ml, vorherige Kopplung an die Zellkulturplatte über Nacht) oder IL-2 (15ng/ml) stimuliert. Nach 8 h Inkubation wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und nach einem Waschschrift mit PBS mit 100 µl Lebend/Totfärbung für 30 min inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit PBS wurden die Zellen mit 100 µl hCD2 (1:1000) und CD4 (1:200) Antikörpern für 30 min versetzt. Nach zwei erneuten Waschschriften wurden die Zellen in Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher, Waltham, USA) aufgenommen und nach 10 min Inkubationszeit auf Eis vermessen.

2.6.11 Toxizitätsbestimmung mittels humaner PBMCs

Humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus Spenderblut gewonnen. 15 ml Ficoll in einem 50 ml Röhrchen wurden vorsichtig mit 35 ml Blut überschichtet und für 30 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der PBMC-Ring vorsichtig abpipettiert und 3 Mal mit RPMI (ohne Zusätze) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die PBMCs in 5 ml RPMI Medium (mit Zusätzen) aufgenommen und gezählt. 2×10^5 Zellen wurden in 96-Loch Platten ausplattiert und mit den Substanzen behandelt. Eine Stimulierung erfolgte mittels 100 ng/ml LPS bzw. 5 µg/ml PHA. Die Auswertung erfolgte mittels Caspase-3/7 Test oder mittels des Resazurin Tests.

2.7 Rechnerische Auswertung

2.7.1 Sensitivierungskapazität

Die Sensitivierungskapazität von Substanzen wurde über folgende Formel berechnet. Dabei bedeutet „stimuliert“ die Stimulation des extrinsischen Apoptosesignalweges durch CD95L.

$$\frac{c\text{-FLIP}_L \text{ stimuliert mit Substanz}}{c\text{-FLIP}_L \text{ stimuliert ohne Substanz}} \times 100$$

2.7.2 Spezifische Apoptoserate

Um die Apoptoserate verschiedener Experimente vergleichen zu können, wurde die spontane Apoptose einbezogen und die spezifische Apoptoserate gebildet. Die spezifische Apoptoserate wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{experimentelle Apoptose (\%)} - \text{spontane Apoptose (\%)}}{100 - \text{spontane Apoptose (\%)}} \times 100$$

2.7.3 Bewertung des Screenings mittels Z'-Faktor

Die Qualität eines Screenings kann mittels des sogenannten Z'-Faktors beurteilt werden (Zhang et al., 1999). Dieser wird wie folgt ermittelt:

$$1 - \frac{3 \times \text{Standardabweichung Positivkontrolle} + 3 \times \text{Standardabweichung Negativkontrolle}}{\text{Mittelwert Positivkontrolle} - \text{Mittelwert Negativkontrolle}}$$

Der Z'-Faktor wird mit Hilfe der Kontrollen ermittelt und kann einen Wert bis 1 annehmen. Dabei kann laut Zhang et al. eine Bewertung des Assays anhand des Wertes des Z'-Faktors vorgenommen werden. Der Assay ist umso besser, je näher der Wert an 1 ist. Eine genaue Einordnung ist nur mit dem Z-Faktor möglich, für den aber ein Wert für die Standardabweichung der Proben notwendig ist. Dieser Parameter ist hier nicht vorhanden, da das Screening in dieser Form nur einmal durchgeführt wurde. Beim Z-Faktor gilt ein Wert von 1 als idealer Assay (Standardabweichung ist Null oder eine unendliche Probenzahl) und ein Wert zwischen 0,5 und 1 als exzellenter Assay. Ein Wert zwischen 0 und 0,5 zeigt einen Assay, der als Doppelbestimmung durchgeführt werden sollte und ein Wert von 0 als unsicherer Assay, der maximal als „Ja/Nein“-Test dienen kann. Bei Z-Faktoren unter 0 ist ein Screening nicht möglich.

2.7.4 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt. Die Standardabweichung P wurde in Abbildungen als * dargestellt. P-Werte kleiner als 0,0332 wurden mit einem Stern dargestellt und p-Werte kleiner als 0,0021 mit zwei Sternen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der verwendeten Zellen

Zunächst wurden die für das Screening verwendeten Zellen charakterisiert. Somit sollte sichergestellt werden, dass die Transfektion der HT 1080 Zellen mit c-FLIP_L bzw. c-FLIP_S erfolgreich war. Dabei ist zu sehen, dass nur das transfizierte Protein überexprimiert wird, die Expression anderer Apoptose-relevanter Proteine sich jedoch nicht geändert hat. Wie in Abb. 3.1 A zu sehen ist, exprimieren c-FLIP_L- und c-FLIP_S-Zellen sowie die jeweilige DED-mutierte Form das jeweilige c-FLIP Protein.

Mittels Rezeptorfärbung wurde die Expression verschiedener Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Rezeptorfamilie untersucht (Abb. 3.1 B). Die Sensitivierung bzw. Resistenz gegenüber extrinsischer Apoptose könnte durch eine unterschiedliche Expression der Todesrezeptoren beeinflusst werden. Alle untersuchten Zelllinien exprimieren die Rezeptoren der TNFR-Familie ähnlich stark. Dabei ist zu beobachten, dass keine der HT 1080 Zelllinien TRAILR1 (DR4) exprimieren. Bei keiner der transfizierten Zelllinien hat sich durch die Transfektion die Expression der Todesrezeptoren geändert.

Außer der reinen Expression wurden die verwendeten Zelllinien auch funktionell charakterisiert. Dazu wurden sie über verschiedene Zeiträume mit dem Todesliganden CD95L stimuliert und per Western Blot wurde die Expression und Spaltung verschiedener Proteine dokumentiert. Die Zelllinien, die funktionales c-FLIP exprimieren (c-FLIP_L und c-FLIP_S), sind resistent gegen die Induktion der Apoptose durch CD95L. Es ist keine Spaltung der Caspasen zu erkennen und auch das c-FLIP Level bleibt konstant. Im Gegensatz dazu ist bei den Leervektor HT1080-Zellen eine Induktion der Apoptose durch die Aktivierung der Caspasen zu erkennen. Mit fortschreitender Apoptose werden auch c-FLIP und andere Proteine gespalten und abgebaut.

Bei den c-FLIP_{LMut} und c-FLIP_{SMut} Zellen ist die DED Einheit des c-FLIP mutiert. Wie in Abb. 3.1 C sichtbar, führt dies zu einer Aufhebung der Resistenz gegenüber CD95L-induzierter Apoptosestimulation. So findet trotz der Expression von c-FLIP Protein eine Spaltung von Caspasen statt.

3.2 Vorbereitung auf das Screening der Naturstoffe

Für das Screening der Naturstoffe auf eine c-FLIP modulierende Wirkung wurde ein Viabilitätsassay, der sogenannte Resazurintest, gewählt. Dabei wird die Fluoreszenz gemessen, die durch Reduktion des nicht-fluoreszierenden Farbstoffes Resazurin in das fluoreszierende Resorufin entsteht. Diese Reduktion findet vor allem in den Mitochondrien lebender Zellen statt und ermöglicht auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen. Vor der Durchführung des Screenings wurden verschiedene Parameter des Tests optimiert. Der Resazurintest wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt, wobei verschiedene Parameter verändert wurden. Die Untersuchung benachbarter Vertiefungen zeigt, dass die Fluoreszenz aus einer Vertiefung der 96-Loch Platte mit Zellen nicht in benachbarte Vertiefungen (ohne Zellen) abstrahlt (Abb. 3.2 A). Ein Waschschrift vor dem

3 Ergebnisse

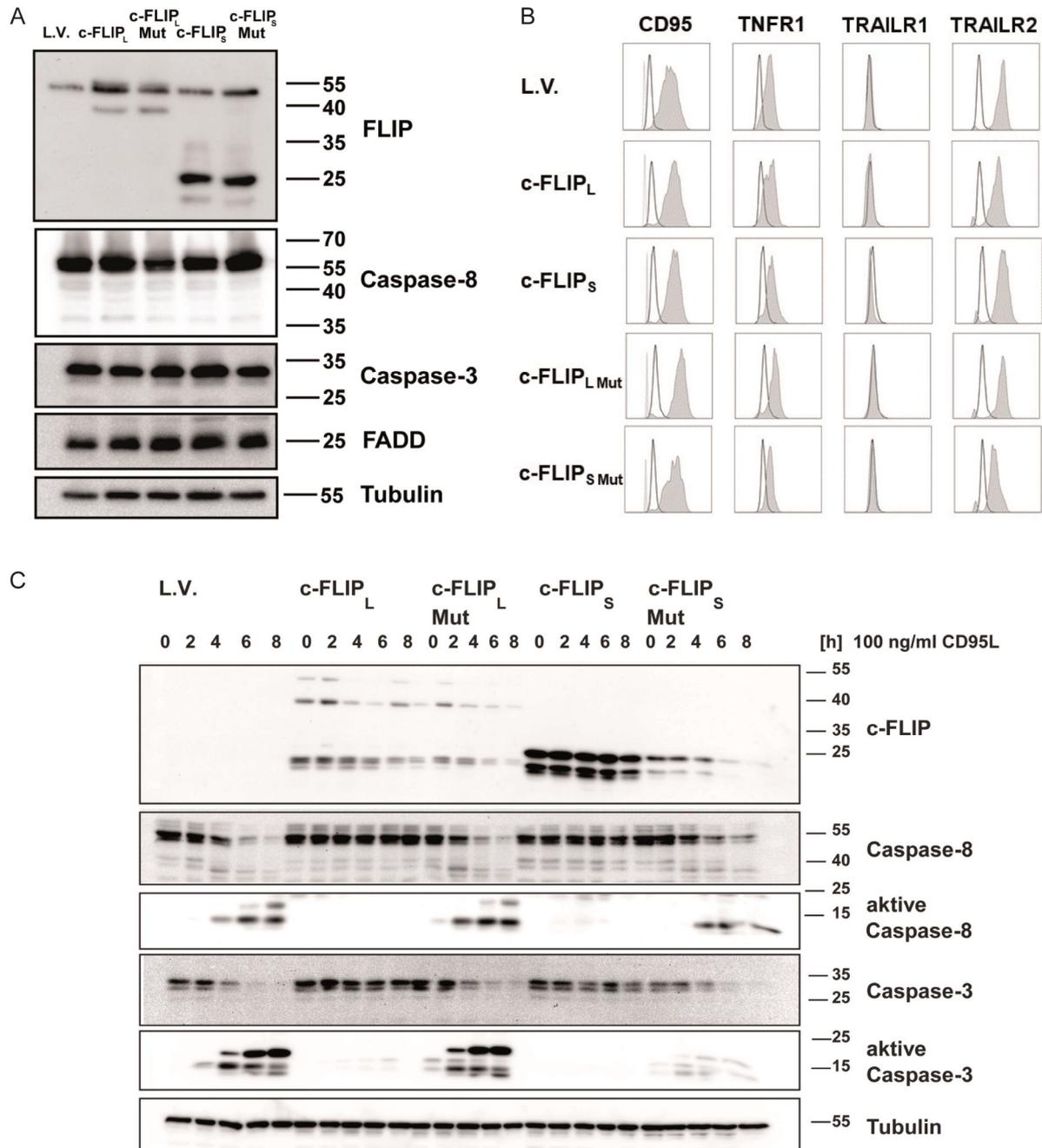


Abbildung 3.1: Charakterisierung der HT 1080 Zellen. Die mit verschiedenen c-FLIP-Isoformen transfizierten HT 1080 Zellen weisen im Western Blot einen ähnlichen Gehalt an Caspase-8, Caspase-3 und FADD auf (A). Die Transfektion von c-FLIP hat keine Auswirkungen auf die Expression von Todesrezeptoren, wie mittels Rezeptorfärbung durch FACS-Analyse gezeigt wurde (B). In einer Kinetik wurden HT 1080-Zellen für verschiedene Zeiten mit 100 ng/ml CD95L stimuliert. Die c-FLIP transfizierten Zellen sind resistent gegen CD95L-induzierte Apoptose, da keine Caspasen aktiviert werden (C). Nach Einfügen einer Mutation in der DED-Domäne reagieren die Zellen wieder sensitiv auf CD95L-Stimulation und Caspasen werden aktiviert.

3.2 Vorbereitung auf das Screening der Naturstoffe

Zufügen des Resazurins erhöht deutlich die Sensitivität des Testes, da das Hintergrundsignal bei apoptotischen Zellen minimiert wird (Abb. 3.2 D). Weiterhin unterscheidet sich das Signal von speziellen Fluoreszenzplatten und herkömmlichen transparenten Zellkulturplatten nicht (Abb. 3.2 B und C).

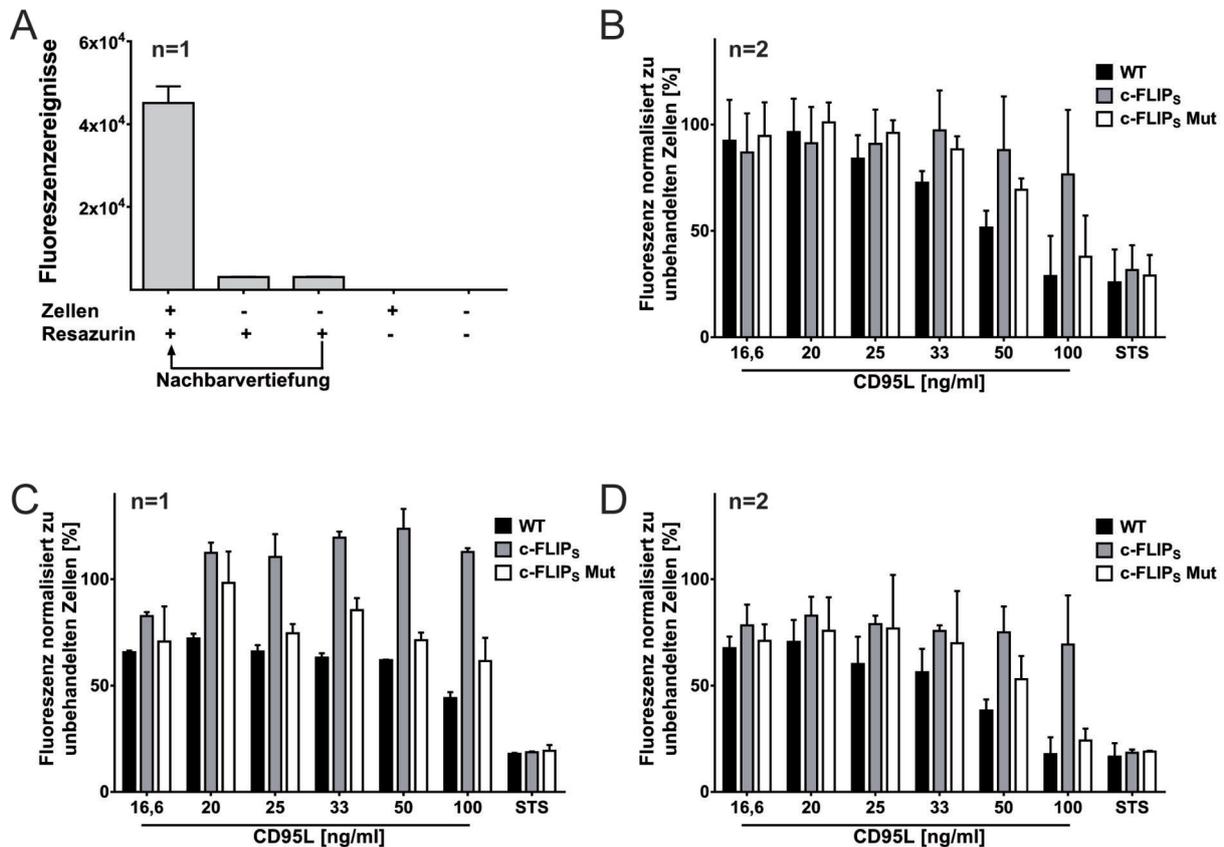


Abbildung 3.2: Optimierung von Parametern des Resazurintests mit HT 1080 Zellen als Vorbereitung des Naturstoffscreenings. Es findet keine messbare Abstrahlung von Fluoreszenz aus einer Vertiefung in eine benachbarte Vertiefung einer transparenten Platte statt (A). Nach Stimulation von 10^5 HT 1080 Zellen/ml mit der angegebenen Konzentration CD95L für 16 h mit anschließendem Resazurintest unterscheiden sich schwarze (B) und transparente (C) Platten nicht in der gemessenen Fluoreszenz. Erst die Einführung eines zusätzlichen Waschschritts vor Resazurinzugabe kann eine deutliche Verringerung des Hintergrundsignals bei WT und c-FLIP_SMut-Zellen bewirken (D).

Die ausplattierte Zellzahl hat in dem untersuchten Rahmen von 5×10^4 bis 1×10^6 Zellen/ml keinen messbaren Einfluss auf die normalisierte Fluoreszenz, was für die Robustheit dieses Verfahrens spricht (Abb. 3.3 A-C). Da HT 1080 eine sehr schnell wachsende Zelllinie ist und daher bei höheren Zellzahlen die Gefahr des Überwachsens besteht, wurden 10^5 Zellen/ml als Standardkonzentration gewählt. Da die Naturstoffe nur in geringen Mengen verfügbar sind, war es wichtig, den Test mit möglichst kleinem Volumen durchzuführen, um die eingesetzten Substanzmengen gering zu halten. Dafür wurden sogenannte *half-area* Platten verwendet, die 96 Vertiefungen haben, aber mit $0,16 \text{ cm}^2$ nur die halbe Grundfläche der Standard-96-Loch Platten. Diese Platten zeigten jedoch eine recht hohe Varianz in der Fluoreszenz (Abb. 3.4 D), weshalb Standard-96-Loch Platten für das Screening und die weiteren Versuche verwendet wurden.

Die optimale Zeit zum Messen der Fluoreszenz beträgt etwa 3 Stunden nach Zufügen der Resazurin-Lösung zum Medium, danach ändert sich sowohl die Fluoreszenzstärke (Abb.

3 Ergebnisse

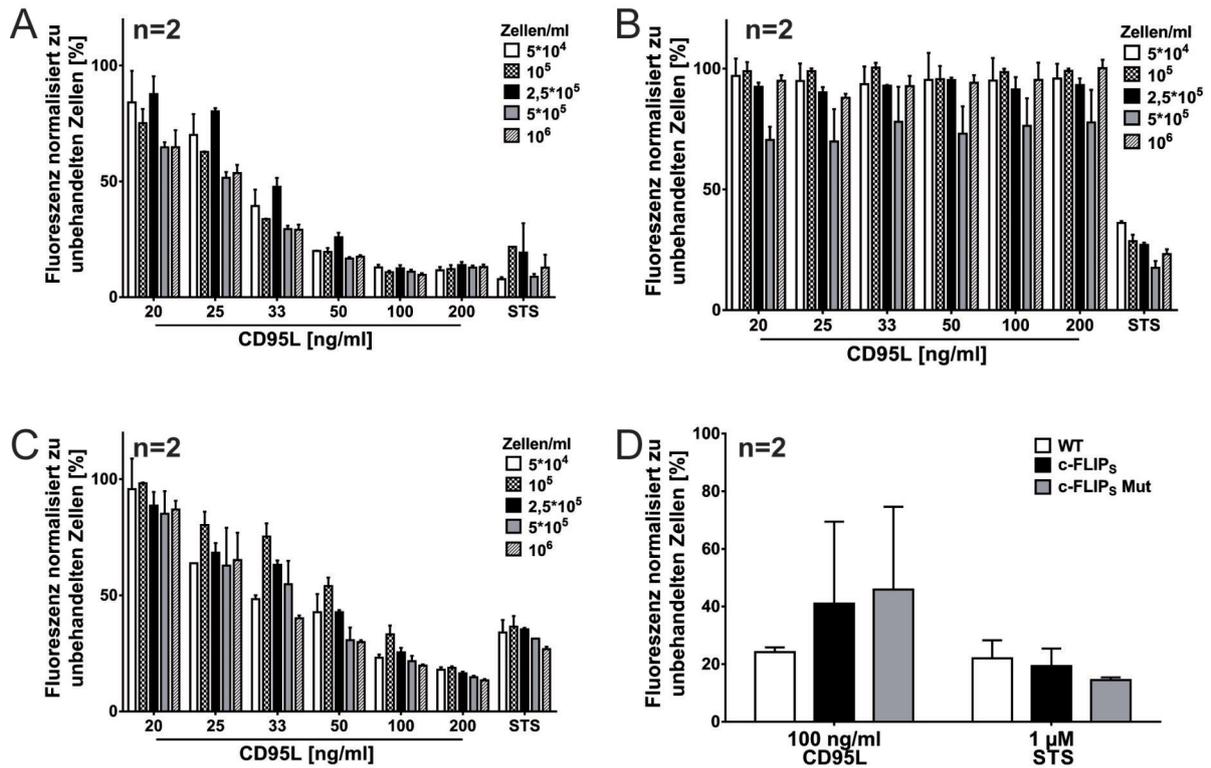


Abbildung 3.3: Verbesserung des Resazurintests als Vorbereitung auf das Naturstoffscreening. In transparente Platten wurden verschiedene Zellzahlen HT 1080-Zellen ausgesät (Leervektorzellen (A), *c*-FLIP_L-Zellen (B) und *c*-FLIP_LMut-Zellen (C)). Die Zellen wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen CD95L stimuliert. Danach wurde ein Resazurintest durchgeführt und die Fluoreszenz gemessen (A-C). Die getestete Zellzahl hat keinen Effekt auf die relative Fluoreszenz. $5 \cdot 10^4$ HT 1080 Zellen/ml wurden auch in *halfarea*-Platten ausplattiert und mit 100 ng/ml CD95L für 16 h oder 1 μ M STS stimuliert. Dies führt zu einer hohen Varianz in der gemessenen Fluoreszenz der mit CD95L stimulierten Zellen (D).

3.2 Vorbereitung auf das Screening der Naturstoffe

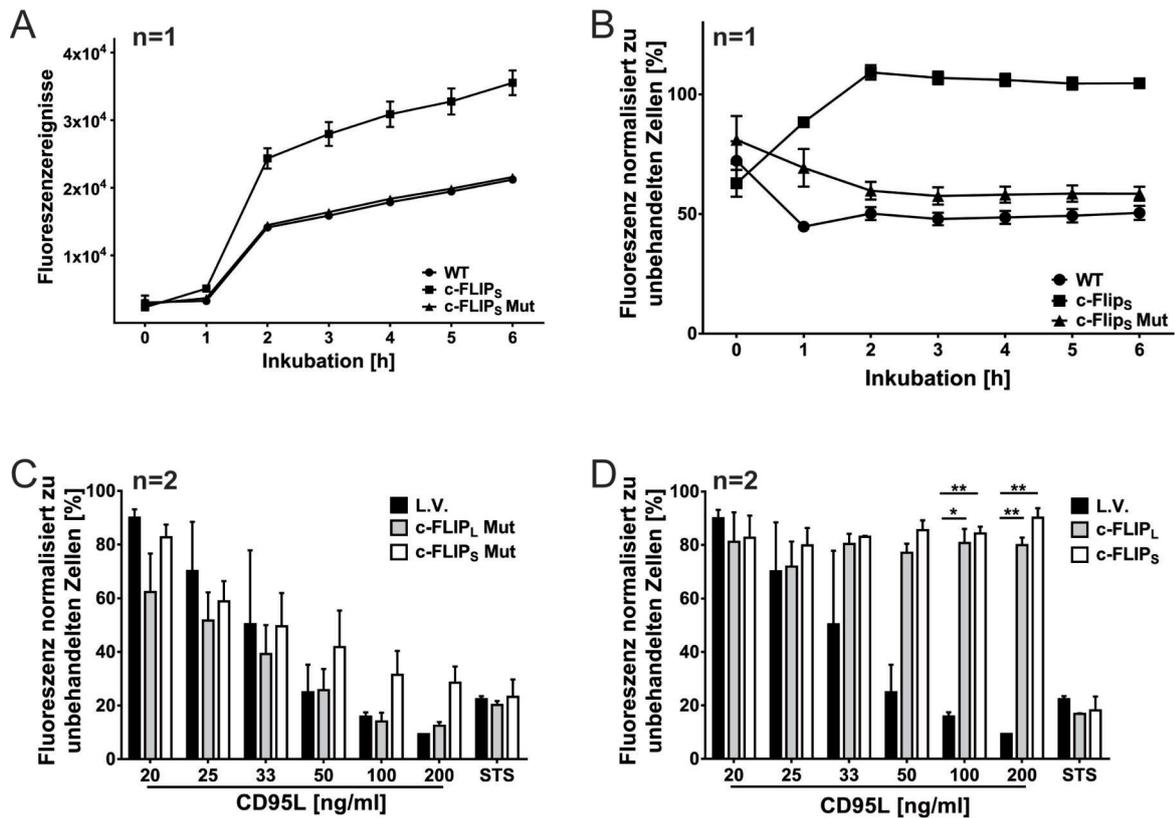


Abbildung 3.4: Weitere Optimierung des Resazurintests. HT 1080-Zellen wurden für 16 h mit 100 ng/ml CD95L stimuliert. Im Resazurintest wurde jede Stunde die Fluoreszenz gemessen. Ein beispielhaftes Experiment ist in (A) und (B) abgebildet. Zwei Stunden nach Resazurinzugabe findet ein Anstieg der Fluoreszenz statt (A), der linear verläuft. Nach diesem Zeitraum ist auch eine stabile Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen in einer prozentualen Auswertung möglich (B). In dem optimierten Assay (C und D) wurden 10^5 Zellen/ml in transparente Platten ausgesät und nach einem Waschschrift vor Resazurin-Zugabe nach 3 h Inkubation vermessen (statistische Signifikanzen: $p < 0,0332$ *, $p < 0,0021$ **).

3 Ergebnisse

3.4 A) als auch der prozentuale Unterschied zwischen apoptotischen und vitalen Zellen (normalisiert zu unbehandelten Zellen nach 3 Stunden, 3.4 B) nicht mehr. Dabei beträgt der Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen in diesem Fall etwa 50%.

In Abb. 3.4 C und D sind optimierte Resazurin Assays dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Leervektordaten in beiden Abbildungen dargestellt. In Abb. 3.3 C ist zu erkennen, dass die c-FLIP_{LMut}-Zellen genauso sensitiv wie die Leervektorzellen sind, die c-FLIP_{SMut}-Zellen dagegen noch eine gewisse Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion besitzen. Die c-FLIP_L- und c-FLIP_S-Zellen sind dagegen zu circa 80-90 % vor induzierter Apoptose geschützt. Die Protektion hielt auch bis zur höchsten verwendeten CD95L-Konzentration von 200 ng/ml an. Ein Faktor, mit dem die Zuverlässigkeit von Screenings getestet wird, ist der sogenannte Z'-Faktor. Dieser lag bei allen Platten von Abb. 3.3 E und F bei über 0,7. Tests mit z-Faktoren zwischen 0,5 und 1 werden als sehr zuverlässige Assays betrachtet (Zhang et al., 1999).

3.3 Testscreening mit kommerziell erhältlichen Substanzen

Der Screeningablauf wurde mit Substanzen getestet, die kommerziell erhältlich sind. Somit ließ sich zum einen der Ablauf und die Handhabung testen, zum anderen konnte, anhand der bekannten Eigenschaften der getesteten Substanzen, die Screeningmethode selbst beurteilt werden. Das Ergebnis des ersten Testscreenings ist in Abb. 3.5 dargestellt. Da einige Substanzen mehrfach auf der Testplatte vorhanden waren, ist bei diesen Substanzen ein Fehlerbalken eingezeichnet. Die Sensitivierungskapazität gibt an, um wie viel Prozent die Substanz die c-FLIP_S-Zellen für CD95L-induzierte Apoptose sensitiviert. Als Vergleichswert wurden die CD95L-behandelten c-FLIP_S-Zellen verwendet.

Da auch eine toxische Wirkung der Substanzen für den Zelltod verantwortlich sein kann, wurde die Viabilität von Leervektorzellen nach Substanzbehandlung bestimmt. Substanzen, welche die Viabilität der Leervektorzellen um mehr als 20 % senken, wurden rot markiert. Alle Substanzen, die die Viabilität von c-FLIP_L-Zellen um mehr als 50 % reduzieren, zeigen auch ohne Apoptosestimulation eine toxische Wirkung. Dabei sind die meisten dieser Substanzen auch als toxisch bekannt, wie zum Beispiel Bay 11-7085 oder das Zytostatikum Cisplatin. Dies zeigt, dass das Testscreening erfolgreich verlaufen ist und der Resazurin Test für das Naturstoffscreening optimiert werden konnte.

3.4 Screening einer Naturstoffbibliothek aus myxobakteriellen Substanzen

Die Naturstoffbibliothek aus myxobakteriellen Substanzen, die am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung verfügbar ist, ist eine einzigartige Sammlung aus chemisch komplexen Naturstoffen, die überwiegend noch nicht eingehend untersucht worden sind. Diese etwa 300 Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, c-FLIP_L-Zellen auf CD95L-Stimulation zu sensitivieren. Dazu wurde der vorher optimierte Resazurintest verwendet

3.4 Screening einer Naturstoffbibliothek aus mykobakteriellen Substanzen

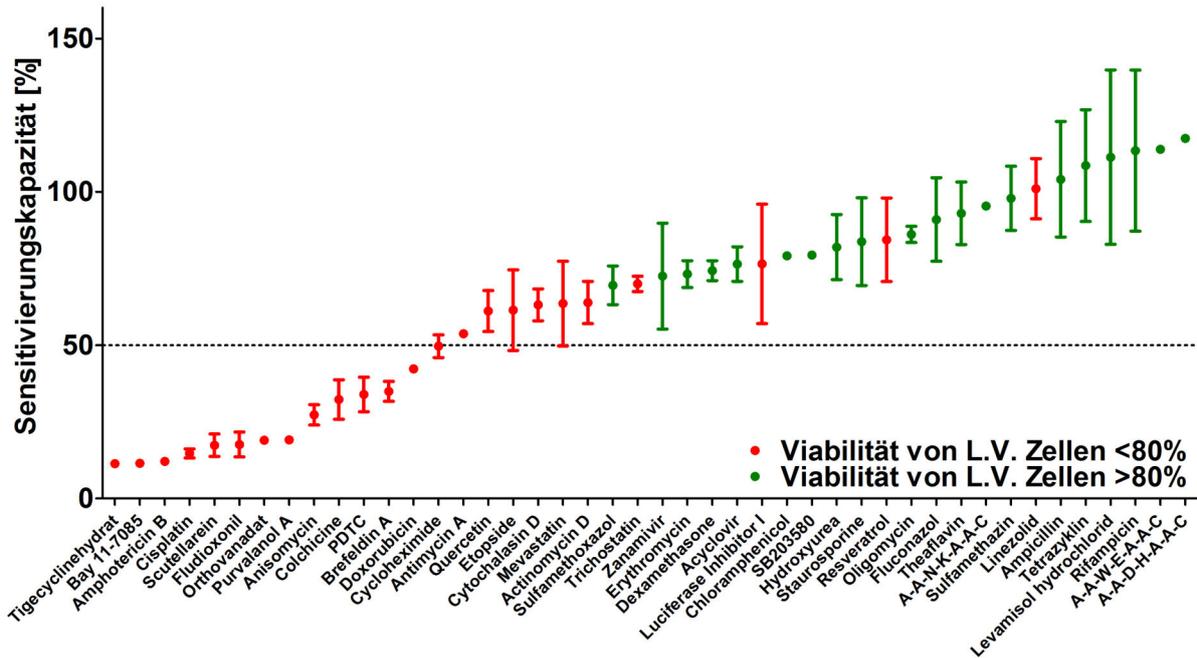


Abbildung 3.5: Test des Screeningverfahrens mit kommerziell erhältlichen Substanzen. Der Test wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt und mittels Resazurintest ausgewertet. Als Viabilitätskontrolle dienten für 18 h mit der jeweiligen Substanz behandelte Leervektorzellen in Relation zu DMSO-behandelten Leervektorzellen. Es wurden keine Substanzen gefunden, die c-FLIP_L-Zellen sensitivieren, aber nicht toxisch auf Leervektorzellen wirken.

und die Substanzen auf Leervektor und c-FLIP_L-Zellen (mit und ohne CD95L-Stimulation) getestet. Die Sensitivierungskapazität der Substanzen wurde bestimmt, indem die Viabilität der Zellen nach Substanzbehandlung von c-FLIP_L-Zellen mit CD95L-Stimulation mit CD95L-stimulierten c-FLIP_L-Zellen ohne Substanzbehandlung verglichen wurden (siehe Abschnitt 2.7.1). Da unbehandelte c-FLIP_L-Zellen resistent gegen CD95L-Stimulation sind, kann so die Auswirkung der Substanzen auf die Apoptose-Sensitivität von c-FLIP_L-Zellen untersucht werden. Eine Sensitivierungskapazität von 100 % bedeutet hier, dass die Zellen nach Substanzbehandlung durch CD95L nicht in die Apoptose getrieben werden und die Zellen genauso resistent gegenüber CD95L sind wie ohne Substanzbehandlung. Eine Sensitivierungskapazität von 50 % zeigt an, dass die Viabilität der Zellen nach der Behandlung mit der jeweiligen Substanz und zusätzlicher CD95L-Stimulation, im Vergleich zur CD95L-Stimulation alleine, um die Hälfte verringert ist. In Abb. 3.6 wurden die Substanzen nach ihrer Sensitivierungskapazität geordnet aufgetragen. Auch hier wurde die Toxizität auf Leervektorzellen getestet und Substanzen, die weniger als 20 % Toxizität gegen die Leervektorzellen zeigen, sind grün eingefärbt. Gleichzeitig wurde ein Schwellenwert für die Sensitivierungskapazität von 50 % gewählt. Innerhalb dieses Schwellenwertes finden sich 13 Substanzen, die nicht toxisch auf Leervektorzellen wirken, dafür aber die Resistenz von c-FLIP_L-Zellen gegen CD95L-Stimulation verringern. Diese Substanzen sind potentielle FLIP-Inhibitoren. Von diesen Substanzen waren elf in einer zum Testen geeigneten Menge verfügbar und wurden weiter untersucht. Diese elf Substanzen sind Argyrin C, Aurachin D, HZI 15, Jerangolid H, Ambruticin VS-1, Angiolam A, Myxovalargin A, Ripostatin A, Sorangiolid A, Maltepolid A und Myxothiazol A. Die Strukturen der Substanzen sind in Abb. 4.1 dargestellt. Auf das Zeigen der Struktur von HZI 15 wird in dieser Arbeit verzichtet, da

3 Ergebnisse

diese Substanz eine starke Wirkung gezeigt hat und daher für eine mögliche Patentierung geschützt werden soll.

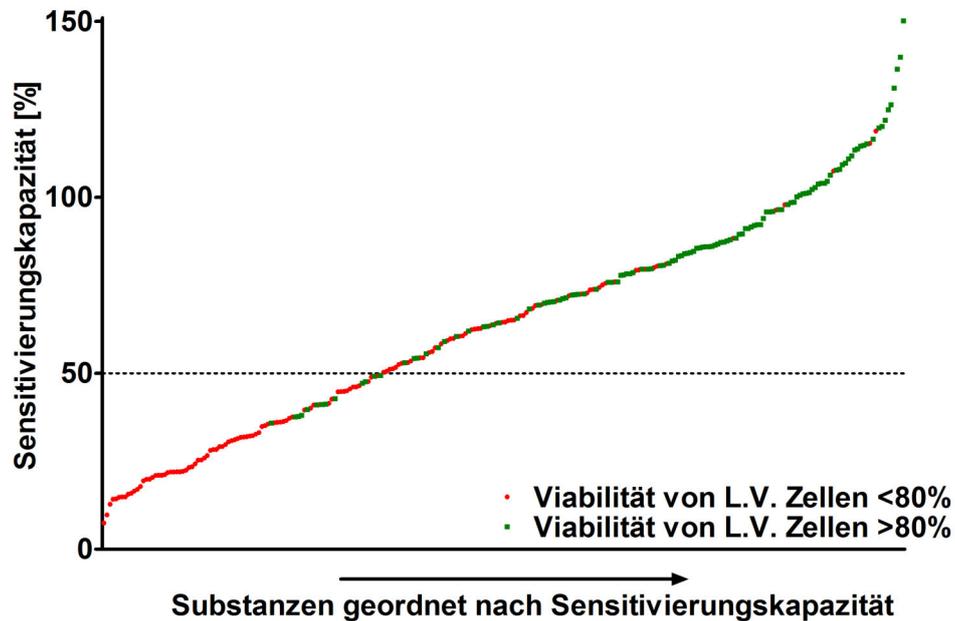


Abbildung 3.6: Screening einer Bibliothek mit aus Myxobakterien gewonnenen Substanzen. Substanzkonzentrationen von 20 μM der Substanzen wurden für das Screening eingesetzt. Das Screening wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt und mittels Resazurintest ausgewertet. Als Viabilitätskontrolle wurden Leervektorzellen für 18 h mit den Substanzen behandelt. Die Viabilität wurde als prozentualer Vergleich zu DMSO-behandelten Leervektorzellen ermittelt. Die Substanzen sind nach Sensitivierungskapazität (siehe Abschnitt 2.7.1) aufgeführt. Grüne Punkte unterhalb der 50 %-Markierung sind „Hits“, da sie c-FLIP_L-Zellen auf CD95L-Stimulation sensitivieren aber nicht toxisch auf Leervektorzellen wirken. Es wurden 13 „Hits“ gefunden.

3.5 Verifizierung der Wirkung der ausgewählten „Hits“

Zur Verifizierung der elf ausgewählten Substanzen wurde zunächst der Resazurin-Test mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz durchgeführt. In Abb. 3.7 sind die Ergebnisse der Resazurin-Tests der verschiedenen Substanzen dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Kontrollen bei jeder Einzelabbildung zusätzlich dargestellt. Am stärksten ist der sensitivierende Effekt bei der Substanz HZI 15 erkennbar. Hier ist bis zu einer Konzentration von 0,25 μM eine Apoptoseinduktion durch Substanz HZI 15 zu sehen. In höheren Konzentrationen ab etwa 10 μM ist eine generelle Toxizität sichtbar. Argyrin C scheint bei 25 μM toxisch zu werden, allerdings ist bei diesem Nachtest auch nur bei dieser Konzentration eine Sensitivierung sichtbar. Aurachin D zeigt eine moderate Toxizität, bei 10 und 25 μM ist eine Sensitivierung erkennbar. Bei den Substanzen Jerangolid A, Ambruticin VS-1, Angiolam A, Sorangolid A, und Maltepolid A sind keine Unterschiede zwischen den mit dem Todesliganden stimulierten und den nicht-stimulierten Zellen zu erkennen. Hier führt also die Behandlung mit den Substanzen nicht zu einer Sensitivierung der Zellen, die mit diesem Experiment messbar ist.

3.5 Verifizierung der Wirkung der ausgewählten „Hits“

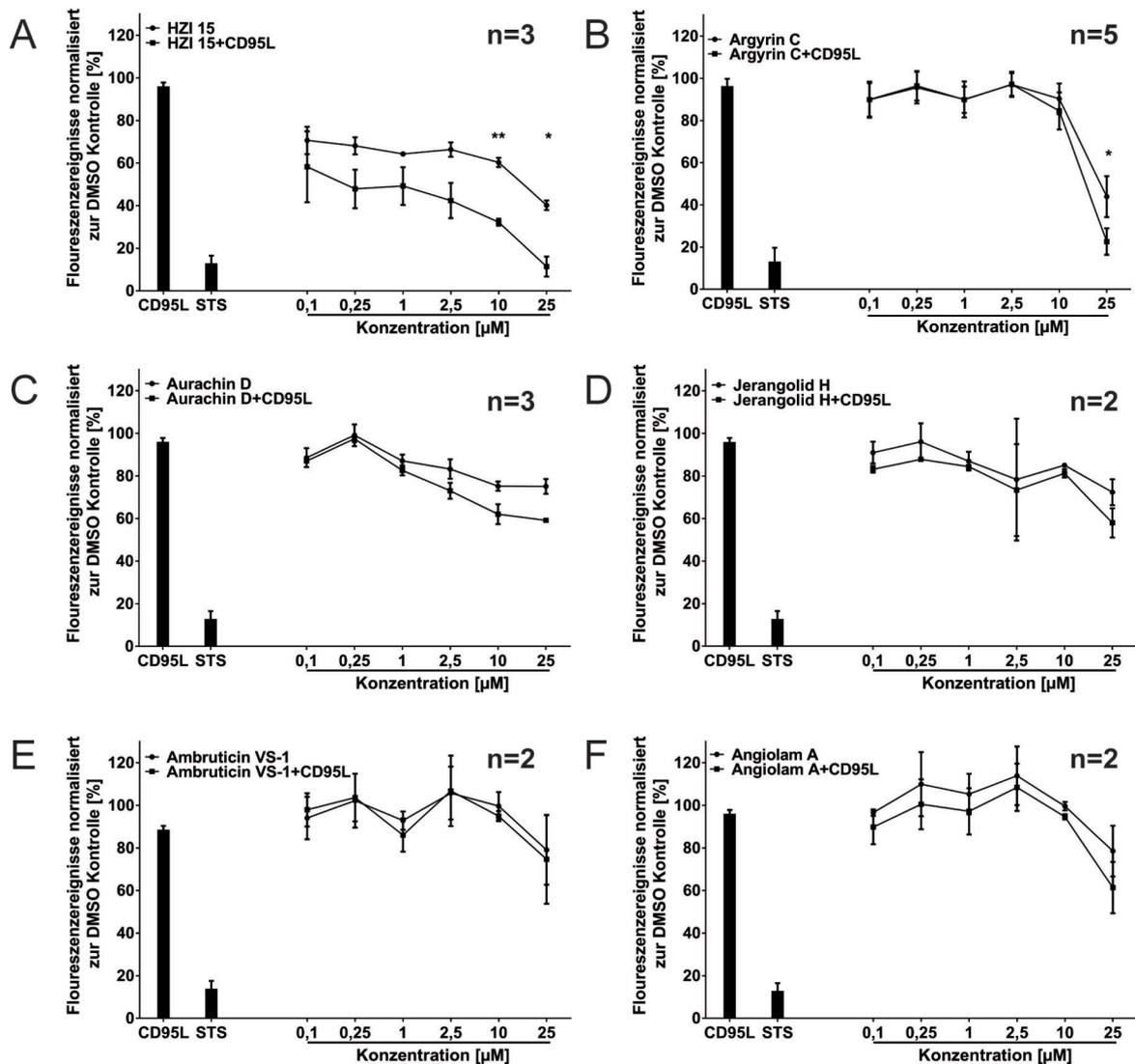


Abbildung 3.7: Verifizierung der als „Hits“ klassifizierten Substanzen. Die beim Screening als potentielle c-FLIP-Inhibitoren klassifizierten Substanzen HZI 15, Argyrin C, Aurachin D, Jerangolid H, Ambruticin VS-1 und Angiolam A wurden im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25 µM auf c-FLIP_L-Zellen wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben gegeben und anschließend im Resazurintest erneut getestet. Als Kontrollen wurde 1 µM STS (Apoptoseauslöser als Positivkontrolle) und 100 ng/ml CD95L (Bestätigung der CD95L-Resistenz der c-FLIP-transfizierten Zellen) für 16 h eingesetzt. Die statistischen Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: p<0,0332 *, p<0,0021 **.

3 Ergebnisse

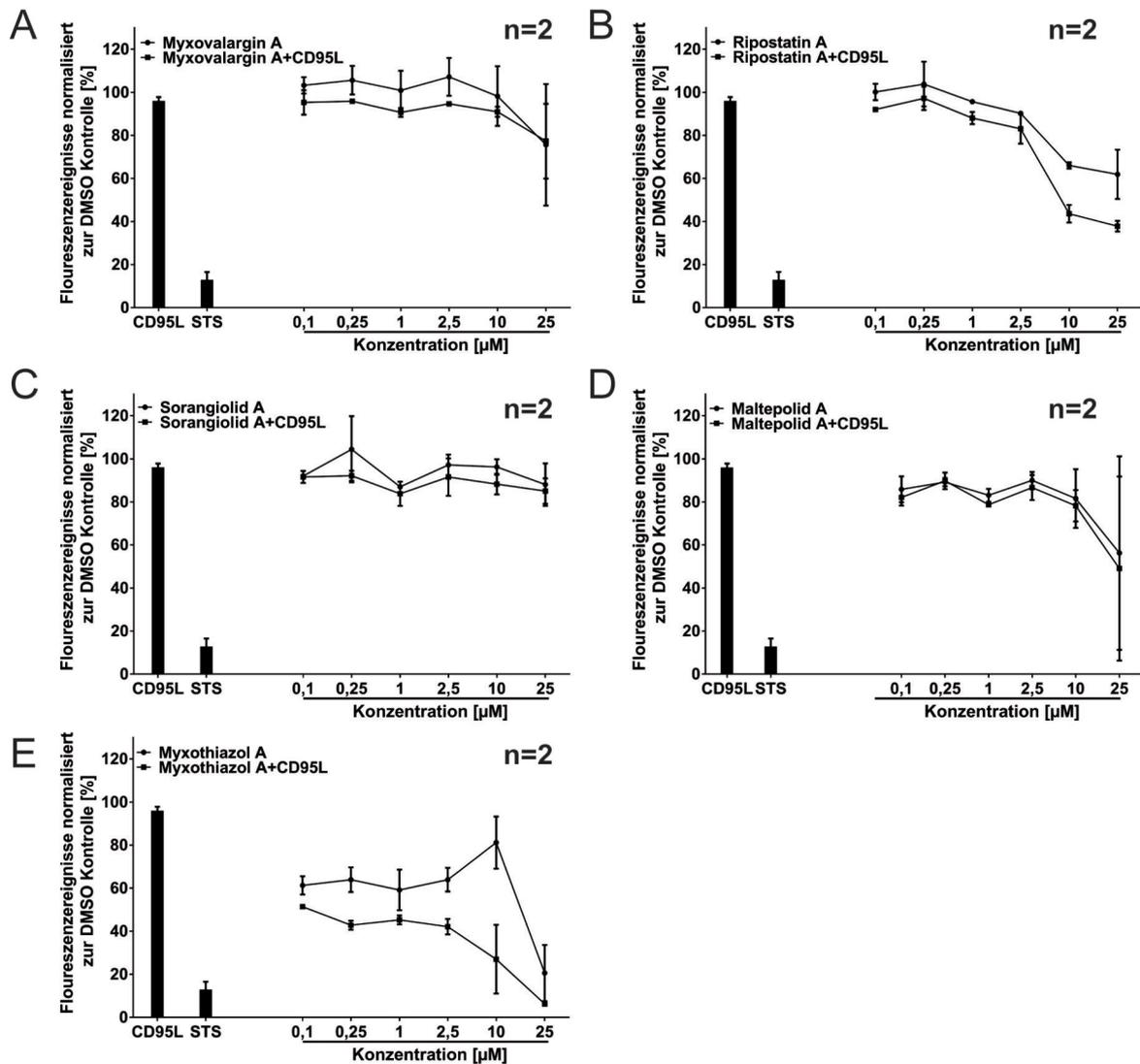


Abbildung 3.8: Weitergehende Verifizierung der als „Hits“ klassifizierten Substanzen. Die als potentielle c-FLIP-Inhibitoren definierten Substanzen Myxovalargin A, Ripostatin A, Sorangiolid A, Maltepolid A und Myxothiazol A wurden im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25 µM wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben gegen c-FLIP_L-Zellen eingesetzt und anschließend im Resazurintest getestet. Als Kontrollen wurde 1 µM STS (Apoptoseauslöser als Positivkontrolle) und 100 ng/ml CD95L (Bestätigung der CD95L-Resistenz der c-FLIP-transfizierten Zellen) für 16 h eingesetzt. Die gefundenen Abweichungen sind statistisch nicht signifikant.

3.6 Abgrenzung von Apoptose-Stimulation gegenüber anderen Formen des Zelltods

Nach der Behandlung mit Myxovalargin A ist bei geringeren Konzentrationen von 0,1 bis 2,5 μM ein Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen zu erkennen, allerdings befindet sich das Level der stimulierten Fluoreszenzereignisse etwa auf dem Level der CD95L-Kontrolle, sodass eine Sensitivierung der Zellen nicht festgestellt werden kann. Ripostatin A zeigt eine deutliche Differenz zwischen CD95L-stimulierten und CD95L-unstimulierten Zellen bei 10 und 25 μM . Dabei nimmt die generelle Toxizität von Ripostatin A alleine stark zu. Bei Myxothiazol A ist generell eine Sensitivierung zu erkennen. Bei 10 μM ist eine größere Differenz zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen sichtbar, wobei hier auch die statistischen Differenzen am größten sind. Bei 25 μM scheint Myxothiazol A toxisch zu wirken.

3.6 Abgrenzung von Apoptose-Stimulation gegenüber anderen Formen des Zelltods

Der bisher verwendete Resazurin-Test ist ein Viabilitätsassay und gibt nur indirekt Auskunft über die Apoptoserate von Zellen. Um zu verifizieren, dass tatsächlich Apoptose durch die Substanzen stimuliert wird, wurden Apoptosetests wie der Nicoletti-Test, der Caspase-3/7-Test oder der Annexin V/7AAD-Test durchgeführt.

3.6.1 Verifizierung der Aktivierung von Caspasen

Apoptose wird unter anderem dadurch charakterisiert, dass Caspasen aktiviert werden. Die Messung der Aktivierung der ausführenden Caspasen -3 und -7 dient hier dazu, zwischen Apoptose und anderen Formen des Zelltodes unterscheiden zu können. In Abb. 3.9 ist für die Leervektorzellen (A), c-FLIP_L- (B) und c-FLIP_S-Zellen (C) die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nach Behandlung mit den jeweiligen Substanzen dargestellt. Bei den Leervektorzellen (A) wurden die Substanzen ohne zusätzliche Stimulation auf die Zellen gegeben. Hier ist zu sehen, wenn eine Substanz direkt Apoptose auslöst. In diesem Fall löst nur Myxothiazol A eine deutliche Aktivierung der Caspasen bei über 30 % der Zellen aus. Argyrin C, Angiolam A, Aurachin D und Ripostatin A zeigen eine milde Aktivierung der Caspasen von etwa 10 %, alle anderen Substanzen zeigen keine erhöhte Caspasen-Aktivierung im Vergleich zur DMSO Kontrolle.

Bei den c-FLIP_L-Zellen wurden einerseits die Substanzen alleine auf die Zellen gegeben, andererseits wurden aber auch die substanzbehandelten Zellen wie beim Screening mit CD95L stimuliert. Hier ist ersichtlich, dass die meisten Substanzen die Zellen für die Apoptosestimulation mit CD95L sensitivieren, da die Caspase-3/7 Aktivierung bei der Kombination von Substanz und CD95L bei fast allen Substanzen eindeutig erhöht ist. Eine Ausnahme ist Sorangiolid A, hier ist keine erhöhte Caspase-3/7 Aktivität feststellbar. Bei Ambruticin-VS1, Maltepolid A und Myxovalargin A ist nur eine geringe Caspasen-Aktivierung von unter 10 % zu erkennen. Myxothiazol A induziert wie auch bei den Leervektorzellen zu ca. 60 % die Caspasen in den c-FLIP_L-Zellen. Trotzdem ist eine zusätzliche Aktivierung nach CD95L-Zugabe erkennbar, was für eine zusätzliche Sensitivierung der Zellen auf Apoptosestimulation spricht. Bei diesem Versuch zeigt Argyrin C die höchste Sensitivierungswirkung für CD95L-Stimulation, bei einer nur moderaten Aktivierung der Caspasen durch Argyrin C

3 Ergebnisse

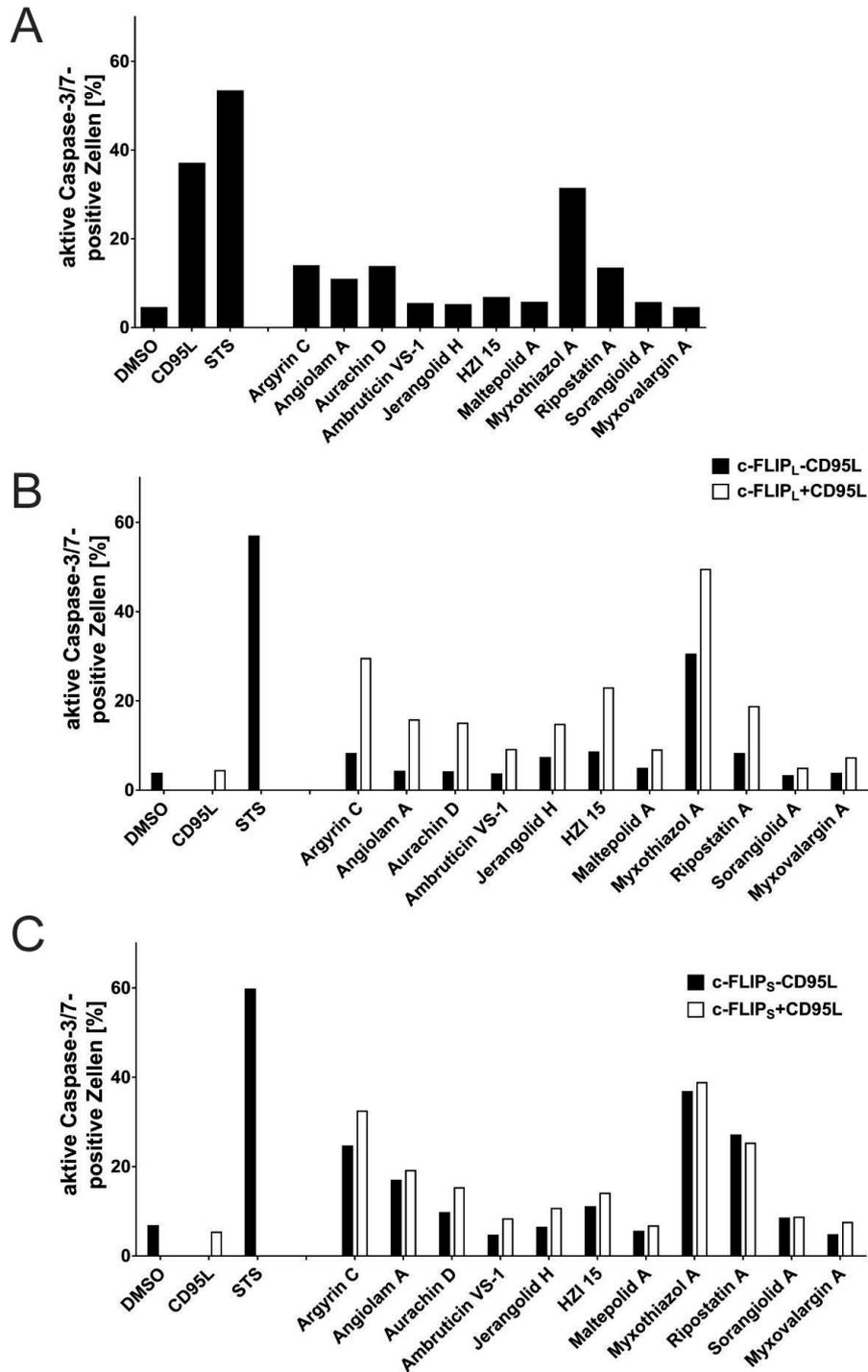


Abbildung 3.9: Bestätigung der Apoptoseinduktion durch Caspase-3/7-Test. Die Auswertung erfolgt mittels Durchflusszytometrie (n=1). Es wurde eine Stimulation wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Substanzen wurden auf Leervektorzellen (A), FLIP_L (B) oder c-FLIP_S (C) getestet. HZI 15, Myxothiazol und Ripostatin wurden mit 5 µM getestet, alle anderen Substanzen mit 25 µM.

3.6 Abgrenzung von Apoptose-Stimulation gegenüber anderen Formen des Zelltods

alleine. Da die Isoformen c-FLIP_L und c-FLIP_S sich strukturell dahingehend unterscheiden, dass c-FLIP_S eine verkürzte C-terminale Domäne aufweist, kann der Unterschied in der Wirkweise der Substanzen auf die verschiedenen Isoformen von c-FLIP einen Hinweis auf den Wirkort geben. Daher wurde die Aktivierung der Caspasen auch für c-FLIP_S-Zellen untersucht. Das Vorgehen war dabei identisch wie bei den c-FLIP_L-Zellen. Bei diesen Zellen wurde eine deutliche Caspasen-Aktivierung durch Argyrin C, Angiolam A, Myxothiazol A und Ripostatin A beobachtet. Allerdings wurde diese Aktivierung durch Zugabe von CD95L nur bei Argyrin C etwas verstärkt, bei den anderen Substanzen ist dieser Effekt kaum oder gar nicht sichtbar.

3.6.2 Apoptosenachweis durch Messung der DNA-Fragmentierung

Ein weiterer Schlüsselvorgang während der Apoptose ist die DNA-Fragmentierung. Diese kann man mittels des Nicoletti-Tests messen und die sub-G1 Fraktion gibt Aufschluss über den Anteil apoptotischer Zellen. In Abb. 3.10 ist die sub-G1 Fraktion als prozentuale DNA-Fragmentierung für sieben der elf Substanzen aufgetragen. Es ist erkennbar, dass Argyrin C ohne CD95L-Stimulation nur moderate DNA-Fragmentierung in den Zellen hervorruft. Mit CD95L-Stimulation ist dagegen in den c-FLIP_L-Zellen eine deutliche Zunahme der DNA-Fragmentierung zu erkennen. In den Aurachin D behandelten Zellen ist auch ohne Apoptosestimulanz in den c-FLIP_L-Zellen eine erhöhte DNA-Fragmentierung sichtbar; nach CD95L Stimulation ist diese aber ausgeprägter. HZI 15 löst auch ohne Apoptosestimulanz in Leervektorzellen DNA-Fragmentierung aus, erstaunlicherweise ist dieser Effekt bei FLIP-überexprimierenden Zellen nicht nachweisbar. Dafür werden die c-FLIP_L-Zellen durch HZI 15 deutlich gegenüber Apoptose sensitiviert. In Abb. 3.10 ist zu sehen, dass Angiolam A und Jerangolid H bei Leervektorzellen zur DNA-Fragmentierung führen, bei c-FLIP_L-Zellen allerdings nur mit zusätzlicher Stimulation durch CD95L. Bei Maltepolid A ist nur bei c-FLIP_L-Zellen mit CD95L Stimulation eine DNA-Fragmentierung sichtbar. Ambruticin A führt zu keiner DNA-Fragmentierung.

3.6.3 Bestätigung der Apoptose-Stimulation durch Annexin V/7AAD-Test

Als eine andere anerkannte Methode zur Unterscheidung von frühapoptotischen versus spätapoptotischen Zellen oder anderen Formen des Zelltodes dient der Annexin V/7AAD-Test. Frühapoptotische Zellen sind Annexin V positiv, da Annexin V an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran bindet. Allerdings sind frühapoptotische Zellen noch nicht permeabel für den Farbstoff 7AAD, der dann spätapoptotische oder nekrotische Zellen anfärbt.

In Abb. 3.11 und Abb. 3.12 sind die Punktauftragungen von Leervektor- und c-FLIP_L-Zellen, die mit den jeweiligen Substanzen behandelt wurden, dargestellt. Als Kontrollen sind Punktauftragungen von c-FLIP_L-Zellen mit verschiedenen Substanzen aufgetragen. DMSO wurde als Lösemittelkontrolle verwendet, CD95L als Kontrolle, dass Leervektorzellen sensitiv auf diesen Stimulus sind, c-FLIP-transfizierte Zellen jedoch resistent auf diesen Stimulus reagieren und STS wurde als Negativkontrolle verwendet, da STS Apoptose über den intrinsischen Apoptosesignalweg, also unabhängig von CD95L, auslöst. Hier ist erkennbar, dass bei

3 Ergebnisse

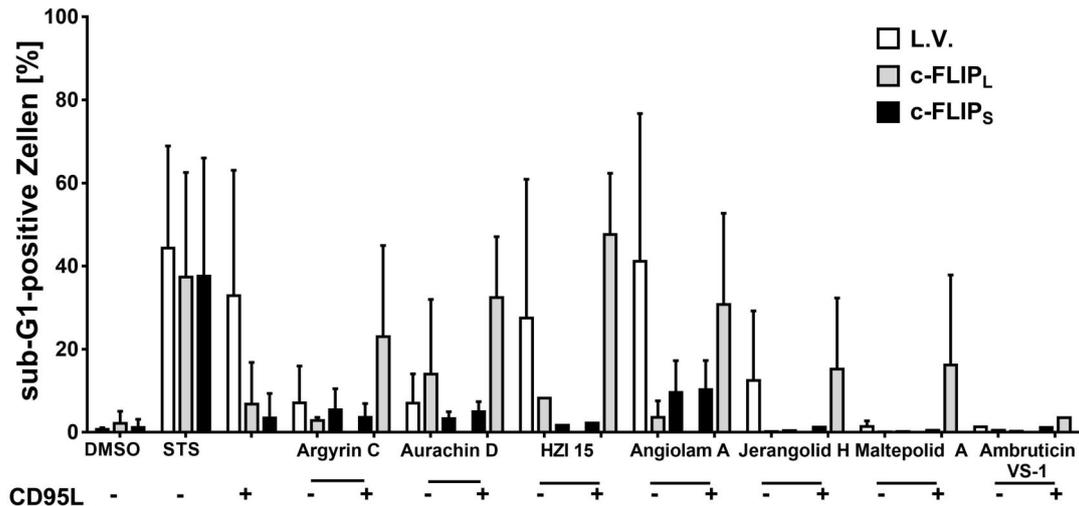


Abbildung 3.10: Nachweis der Apoptoseinduktion durch Nicoletti-Test. Die Substanzen wurden wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben mit mindestens zwei Wiederholungen (n mindestens 2) getestet. Die Zellen wurden mit einer Substanzkonzentration von 25 μM (5 μM bei HZI 15) behandelt und die DNA-Fragmentierung wurde mit und ohne CD95L-Stimulation (100 ng/ml für 16 h) auf Leervektorzellen, c-FLIP_L- und c-FLIP_S-Zellen getestet. Als Apoptosekontrolle diente 1 μM STS für 16 h.

DMSO-behandelten Zellen die Hauptpopulation im unteren linken Quadranten zu finden ist, da die Zellen vital sind und somit nicht angefärbt wurden. Auch mit CD95L-Stimulation ist der Großteil der Zellen vital, da c-FLIP_L-Zellen gegen CD95L-Stimulation resistent sind. Mit STS wird hingegen Apoptose in den Zellen ausgelöst, daher ist die Population nach rechts verschoben. Hier werden Annexin V-positive Zellen angezeigt, die Zellen exponieren also Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche. Ein Teil der Zellen wurde ebenso mit 7AAD angefärbt, diese Zellen befinden sich im oberen rechten Quadranten. Diese doppelt-positive Zellpopulation ist spätapoptotisch oder nekrotisch.

Die elf ausgewählten Substanzen wurden auf Leervektorzellen getestet, um festzustellen, ob die Substanzen alleine Apoptose in den Zellen auslösen können. In Abb. 3.11 findet bei fast allen Substanzen eine leichte Apoptoseinduktion der Leervektorzellen statt. Eine deutlichere Induktion ist nur bei Aurachin D erkennbar. Die wenigste Apoptoseinduktion wird durch Angiolam A hervorgerufen. Werden die c-FLIP_L-Zellen mit den Substanzen alleine getestet, so ist keine Apoptoseinduktion sichtbar. Ein Effekt ist erst dann zu erkennen, wenn zusätzlich eine Stimulation mit CD95L erfolgt. Dann findet bei allen getesteten Substanzen eine deutliche Apoptoseinduktion und Verschiebung der Zellpopulation zur Annexin V-positiven Seite statt. Die stärkste Apoptoseinduktion findet bei Argyrin C und HZI 15 statt, bei denen eine CD95L-Stimulation dazu führt, dass unter 10 % der Zellen vital sind. Eine ebenfalls deutliche Apoptoseinduktion ist bei Aurachin D zu erkennen, hier sind unter 20 % der Zellen vital. Mit etwa 35 % ungefärbten Zellen ist bei Angiolam A ein mittelstarker Effekt erkennbar. Einen milderen Effekt zeigt nur Ambruticin VS-1 mit einer Verringerung der Viabilität um etwa 20 %.

In Abb. 3.12 ist der zweite Teil der untersuchten Substanzen im Annexin V/7AAD Test abgebildet. Myxothiazol A hat auf Leervektorzellen eine starke apoptotische Wirkung. Alle anderen Substanzen haben keine oder nur eine sehr milde (Ripostatin A) apoptoseauslösende Wirkung auf die Leervektorzellen. Auch wenn die Substanzen auf c-FLIP_L-Zellen gegeben werden, hat dies nur bei Myxothiazol A eine starke Auswirkung auf die Apoptoseindukti-

3.6 Abgrenzung von Apoptose-Stimulation gegenüber anderen Formen des Zelltods

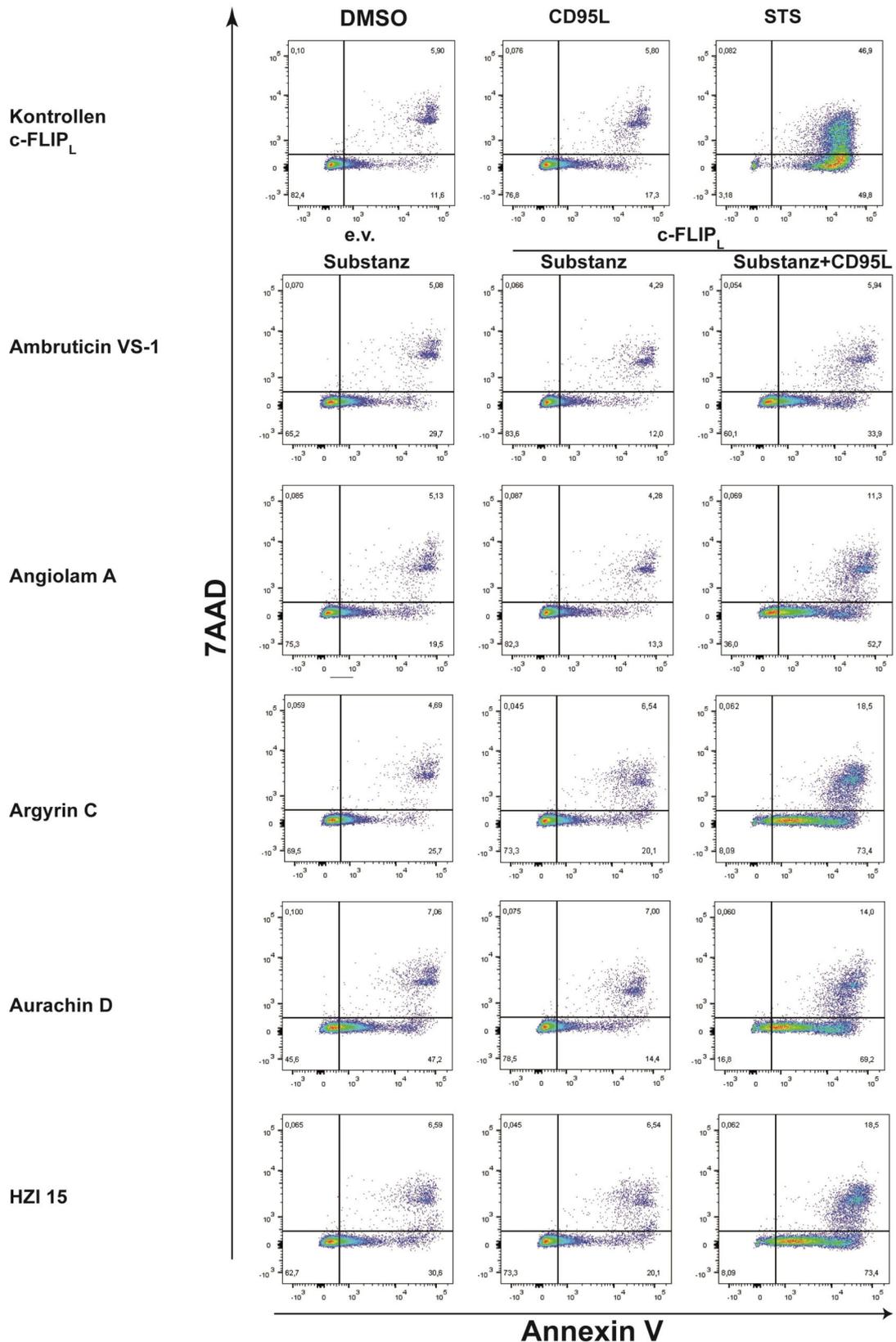


Abbildung 3.11: Annexin V/7AAD-Test zum Nachweis von Apoptose. Der Apoptosenachweis per Annexin V/7AAD-Test wurde mit Leervektor und c-FLIP_L-Zellen durchgeführt. 25 μ M Substanz (0,01 μ M bei HZI 15) wurden verwendet und die c-FLIP_L-Zellen wurden entweder mit oder ohne CD95L-Stimulation (100 ng/ml für 16 h) wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben getestet. Als Kontrollen sind c-FLIP_L-Zellen mit DMSO (1:100), CD95L (100 ng/ml für 16 h) und STS (1 μ M für 16 h) behandelt worden.

3 Ergebnisse

on. Die Zahl der lebenden Zellen ist bei c-FLIP_L-Zellen etwa doppelt so hoch wie bei den Leervektorzellen, die mit Myxothiazol A behandelt wurden. Auch bei Jerangolid H ist die Zunahme der frühapoptotischen Zellpopulation erkennbar. Werden die Substanzen und CD95L-Stimulation kombiniert, so ist in allen Fällen eine Zunahme der frühapoptotischen Zellpopulationen zu erkennen. Bei Myxothiazol A ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt, dafür nimmt die spätapoptotische Zellpopulation deutlich zu. Am schwächsten sensitivieren Maltepolid A und Sorangolid A, mit denen die frühapoptotische Population nicht über 30 % beträgt. Eine mittlere Sensitivierung ist bei Jerangolid H und Myxovalargin A erkennbar, bei denen die frühapoptotische Population zwischen 30 und 50 % ausmachen. Myxothiazol A fällt zwar auch in diese Kategorie, allerdings sind hier nur weniger als 10 % der Zellen vital und der Unterschied zu den nur mit Myxothiazol A behandelten Zellen ist nicht so stark ausgeprägt wie bei Jerangolid H und Myxovalargin A. Eine starke Sensitivierung wird in diesem Experiment durch Ripostatin A hervorgerufen, hier befinden sich über 60 % der Zellen in der frühapoptotischen Phase.

Annexin V/7AAD Tests wurden mit ausgewählten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen von 0,1 bis 25 µM (bzw. von 0,01 µM bei HZI 15 und Ripostatin A) durchgeführt und der Anteil an lebenden Zellen wurde quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 aufgeführt. Bei Angiolam A (Abb. 3.13 A) ist zu sehen, dass nur bei 25 µM eine deutliche Sensitivierung in Kombination mit CD95L erkennbar ist. Bei den anderen Konzentrationen ist zwar eine Verringerung der vitalen Population mit zusätzlicher CD95L-Stimulation im Vergleich zu nur mit Angiolam A behandelten Zellen sichtbar, diese liegt allerdings im Bereich der Fehlertoleranz der CD95L-behandelten Kontrolle (Abb. 3.13 G).

Auch mit Argyrin C (Abb. 3.13 B) findet die stärkste Sensitivierung der c-FLIP_L-Zellen bei 25 µM mit CD95L-Stimulation statt. Hier ist allerdings auch eine leichte Abnahme der Viabilität ohne CD95L-Stimulation zu erkennen. Insgesamt ist hier die Varianz geringer als bei den meisten anderen untersuchten Substanzen, sodass auch bei 10 µM eine Tendenz zur Sensitivierung zu erkennen ist. Aurachin D zeigt bei 25 und 10 µM eine deutliche Sensitivierung der c-FLIP_L-Zellen (Abb. 3.13 C). Mit CD95L-Stimulation sind nur etwa 50 % der Zellen nicht-apoptotisch. Bei geringeren Konzentrationen ist kein sensitivierender Effekt mehr erkennbar. HZI 15 zeigt im Annexin V/7AAD Test mit CD95L-Stimulation einen untypischen Kurvenverlauf mit vielen apoptotischen Zellen sowohl bei hohen als auch bei geringen Konzentrationen (Abb. 3.13 D). Bei Konzentrationen von 25 und 10 µM ist auch eine toxische Wirkung zu sehen, da die Viabilität der nicht-CD95L-stimulierten Zellen bei diesen Konzentrationen deutlich abnimmt. Diese toxische Wirkung ist bei geringeren Konzentrationen nicht festzustellen. Trotzdem sensitivieren alle getesteten Konzentrationen auf CD95L-induzierte Apoptose. Dieser Effekt ist bei den toxischen Konzentrationen von 25 und 10 µM sehr stark ausgeprägt, hier sind nur noch unter 30 % der Zellen vital. Zwischen 2,5 und 0,1 µM ist die Viabilität der CD95L-stimulierten Zellen recht stabil bei etwa 40 %. Bei geringen Konzentrationen von 25 und 10 nM sensitiviert HZI 15 c-FLIP_L-Zellen wieder stärker auf die CD95L-induzierte Apoptose, sodass nur noch 20-30 % der Zellen ungefärbt, also nicht-apoptotisch, sind. Myxovalargin A zeigt als einzige näher untersuchte Substanz bei keiner Konzentration einen ausgeprägten Effekt auf die Viabilität der Zellen, weder mit noch ohne CD95L-Stimulation (Abb. 3.13 E). Bei Ripostatin A ist der Effekt auf die Zellen etwas unklar (Abb. 3.13 F), da die Varianz der einzelnen Experimente sehr hoch ist. Bei 25 und 20 µM ist eine Toxizität der nicht-CD95L-behandelten Zellen zu erkennen, in diesen Bereich fällt auch die größte Wirkung von Ripostatin A als sensitivierende Substanz mit CD95L-Stimulation. Bei geringeren Konzentrationen ab ca. 0,25 µM zeigt Ripostatin A keinen

3.6 Abgrenzung von Apoptose-Stimulation gegenüber anderen Formen des Zelltods

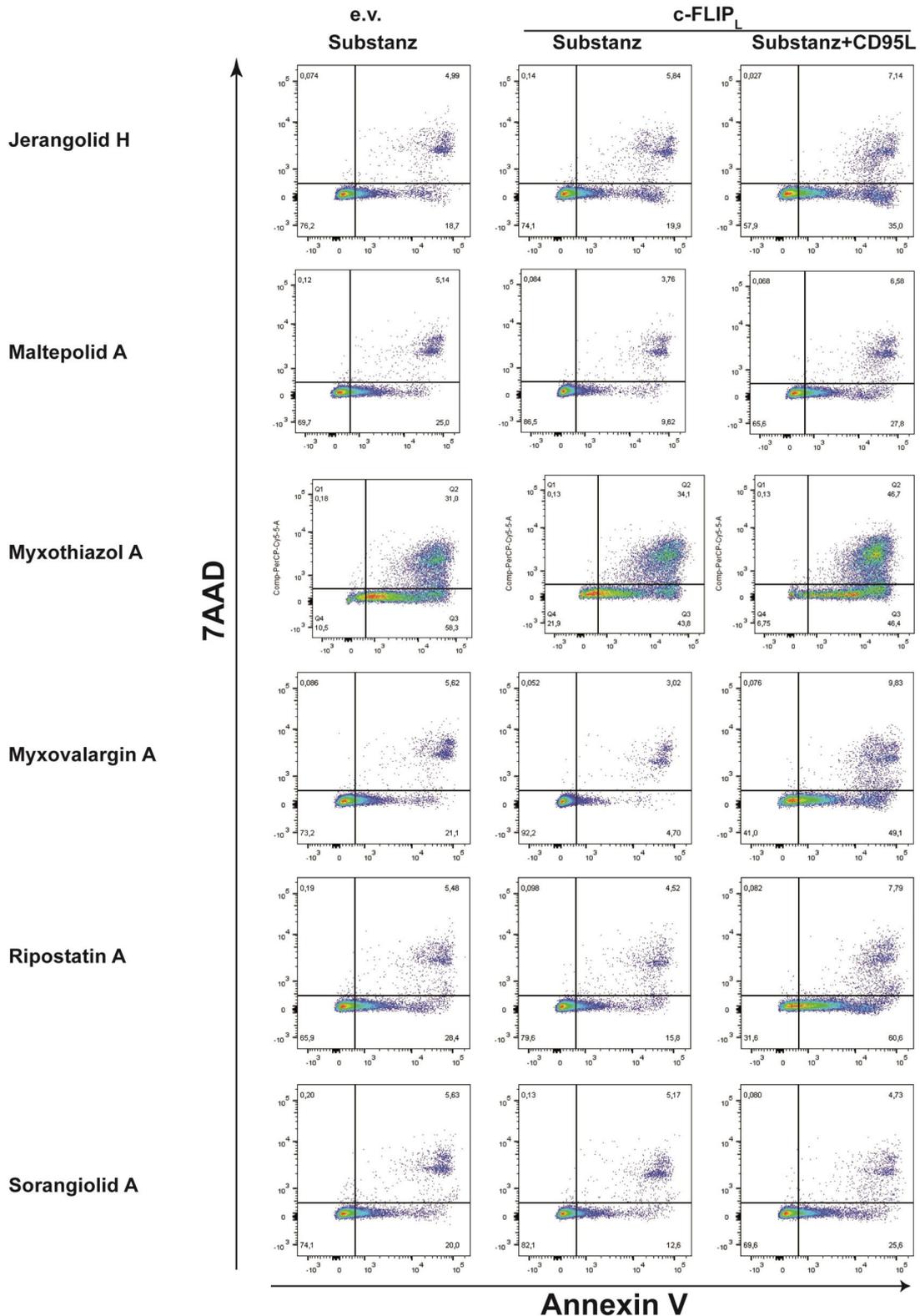


Abbildung 3.12: Annexin V/7AAD-Test zeigt Sensitivierung der c-FLIP_L-Zellen auf Apoptose-Stimulation. Die Substanzen Jerangolid H, Maltepolid A, Myxothiazol A, Myxovalargin A, Ripostatin A und Sorangiolid A wurden im Annexin V/7AAD-Test auf Leervektorzellen und c-FLIP_L-Zellen getestet. Die Behandlung der Zellen mit den Substanzen und CD95L (100 ng/ml für 16 h) wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt. Myxothiazol A und Ripostatin A wurden mit einer Konzentration von 5 μ M getestet, alle anderen Substanzen mit 25 μ M. Die Kontrollen zu diesem Versuch sind in Abb. 3.11 zu sehen.

3 Ergebnisse

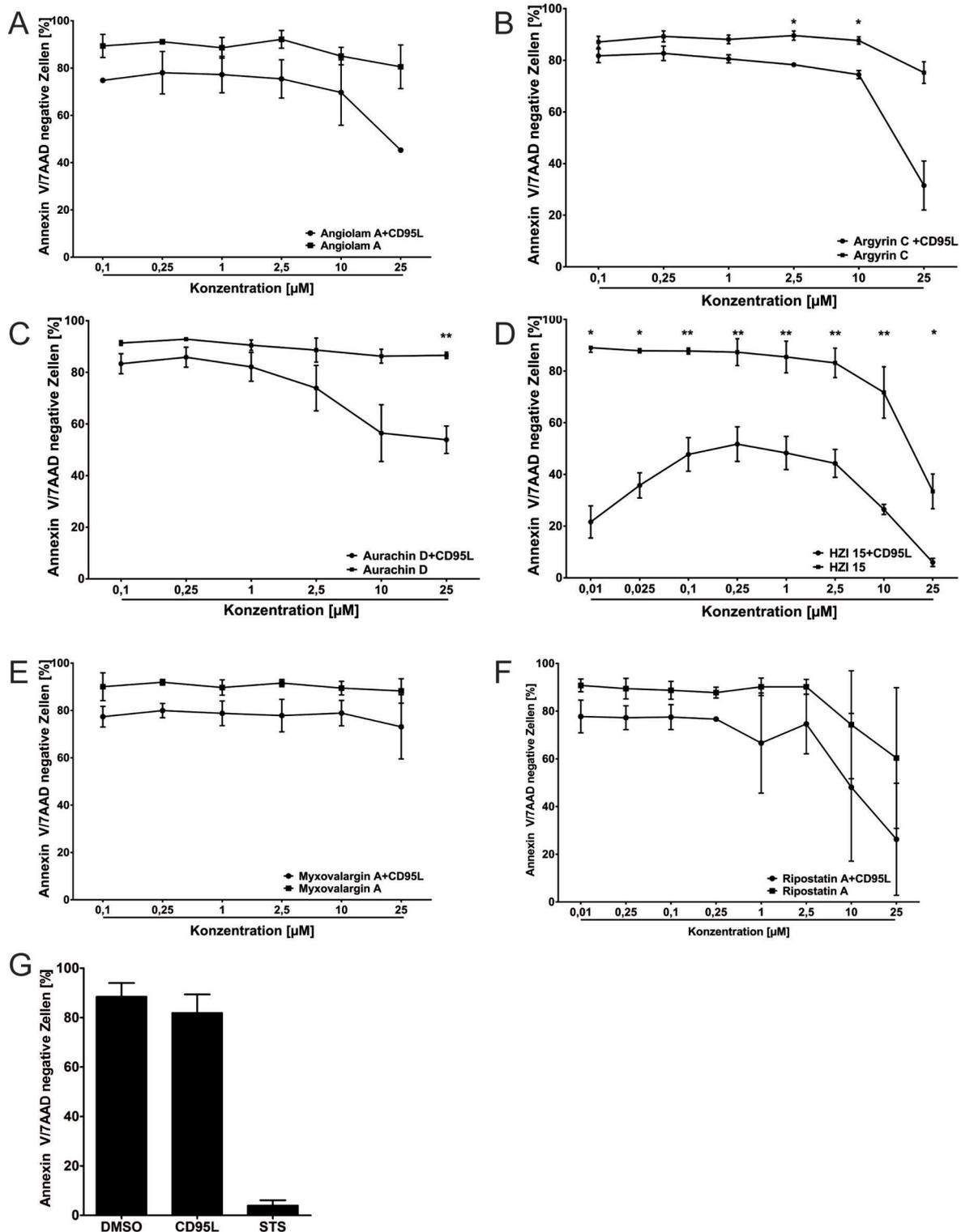


Abbildung 3.13: Quantifizierung der im Annexin V/7AAD-Test bestimmten Apoptoserate. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben behandelt. Dabei wurden die Substanzen Angiolam A (A), Argyrin C (B), Aurachin D (C), HZI 15 (D), Myxovalargin A (E) und Ripostatin A (F) über den Konzentrationsbereich von 25 µM bis 0,1 µM per Annexin V/7AAD-Test analysiert, um die apoptoseinduzierende Wirkung zu charakterisieren. Aufgetragen sind Annexin V/7AAD negative c-FLIP_L-Zellen nach Behandlung mit den Substanzen mit oder ohne CD95L-Stimulation (100 ng/ml). Die Kontrollen (1:100 DMSO, 100 ng/ml CD95L und 1 µM STS) sind ebenso mit c-FLIP_L-Zellen durchgeführt worden (G). Es sind die Mittelwerte aus mindestens n=2 Wiederholungen dargestellt. Die statistische Signifikanz ist durch p<0,0332 * und p<0,0021 ** ausgedrückt.

Effekt mehr.

3.6.4 Morphologische Auswirkungen der Substanzbehandlungen

Die Apoptose weist distinkte morphologische Charakteristika, wie die Kondensierung des Nukleus, das Abrunden der Zelle und das Abspalten von apoptotischen Körperchen, auf. Anhand dieser Merkmale kann mikroskopisch festgestellt werden, ob die Substanzen apoptotisch oder an einer anderen Form des Zelltodes sterben. In Abb. 3.14 sind mikroskopische Aufnahmen von c-FLIP_L-Zellen nach 18 h Behandlung mit ausgewählten Substanzen und zusätzlicher Stimulation mit CD95L für 16 h dargestellt. Argyrin C zeigt mit CD95L-Stimulierung eindeutig eine apoptotische Wirkung auf die Zellen. Es sind nur noch wenige morphologisch vitale Zellen sichtbar; die meisten Zellen sind abgerundet und es sind viele Membranvesikel und apoptotische Körperchen erkennbar. Einzelne eindeutig apoptotische Zellen sind zu sehen. Auch ohne CD95L-Stimulation hat Argyrin C eine leichte Wirkung auf die Zellen. So sind in der mikroskopischen Aufnahme auch einzelne apoptotische Zellen bei der Argyrin C-behandelten Probe ohne zusätzliche CD95L-Stimulation zu sehen. Zudem sind einige abgerundete aber angeschwollene Zellen sichtbar. Die meisten Zellen behalten jedoch ihre normale Morphologie.

Die Behandlung mit Aurachin D und CD95L hat weniger Auswirkungen auf die Zellen im Vergleich zu Argyrin C, da mehr Zellen ihre flache, ausgestreckte Morphologie behalten. Allerdings sind auch hier apoptotische Körperchen zu sehen und die Zellen sind abgerundet. Aurachin D alleine hat keine mikroskopisch sichtbaren Auswirkungen auf die Zellen, sie bleiben flach und an dem Zellkulturgefäß angeheftet.

Auch die Behandlung mit HZI 15 hat im Zusammenspiel mit der CD95L-Stimulation eine apoptotische Morphologie der Zellen zur Folge. Im Vergleich zur Quantifizierung apoptotischer Zellen in der Annexin V/7AAD-Färbung (Abb. 3.13) sind hier wenige apoptotische Zellen sichtbar. Die Membranvesikel sind gut erkennbar und ein eindeutiges Zeichen für die Apoptose der Zellen. Einzelne Zellen sehen auch größer und angeschwollen aus im Vergleich zu den umgebenden Zellen. Die Zugabe von HZI 15 ohne zusätzliche Stimulation mit CD95L führt zu keiner morphologischen Veränderung der Zellen. Einige Zellen weisen eine größere und rundere Form als die umgebenden Zellen auf.

Zellen, die mit Ambruticin VS-1 behandelt wurden, zeigen nach zusätzlicher Stimulation mit CD95L vereinzelt die morphologischen Merkmale der Apoptose. Auf der Aufnahme sind die apoptotischen Körperchen nur in der direkten Umgebung der apoptotischen Zellen zu sehen, was dafür spricht, dass nur einzelne Zellen Apoptose begehen. Zellen, die nicht zusätzlich mit CD95L stimuliert werden, zeigen mit Ambruticin VS-1 auch vereinzelt Apoptose, jedoch deutlich weniger als mit zusätzlicher CD95L-Stimulation.

3.7 Charakterisierung von Argyrin C

Anhand der Apoptoseassays wurden drei Substanzen ausgewählt, die den stärksten sensitivierenden Effekt auf c-FLIP_L-Zellen gezeigt haben. Argyrin C hat einen starken Effekt beim Caspase-3/7-Test, beim Nicoletti-Test und beim Annexin V/7AAD-Test gezeigt und wurde daher für weitere Untersuchungen ausgewählt.

3 Ergebnisse

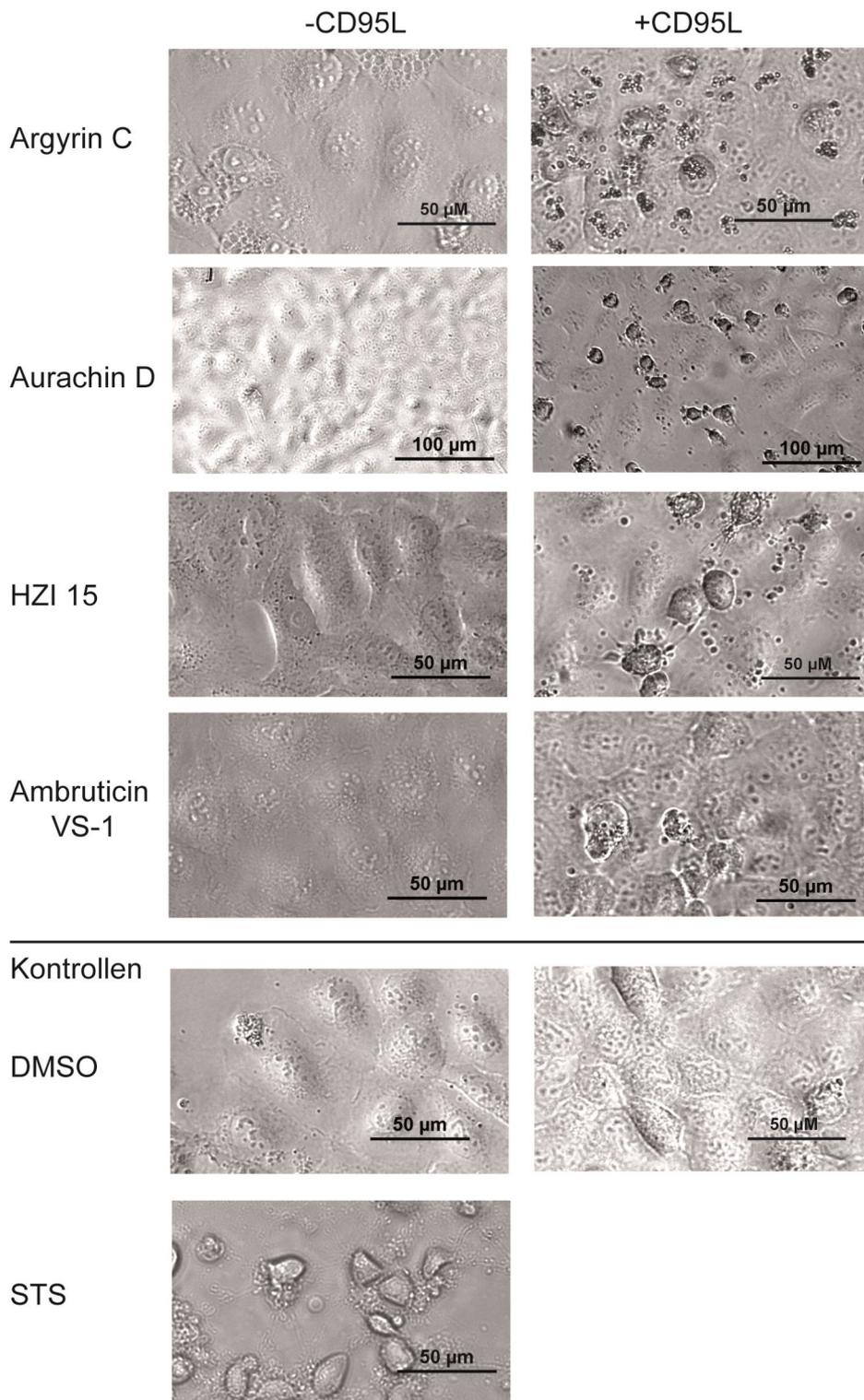


Abbildung 3.14: Mikroskopische Aufnahmen von substanzbehandelten c-FLIP_L-Zellen. Die Zellen wurden 18 h mit den Substanzen (25 μM Argyrin C, Aurachin D und Ambruticin VS-1, 5 μM HZI 15) behandelt. Die entsprechend beschrifteten Proben wurden zusätzlich für 16 h mit CD95L (100 ng/ml) stimuliert. Ohne zusätzliche CD95L Stimulation sind vorwiegend adhärenente Zellen sichtbar, während eine Kombination aus der jeweiligen Substanz und CD95L zu morphologisch apoptotischen Zellen führt. Bei den mit DMSO (1:100) behandelten Zellen ist sowohl mit als auch ohne CD95L-Stimulation keine Apoptose der Zellen sichtbar. 1 μM STS führt zu einer eindeutigen apoptotischen Morphologie der Zellen mit abgerundeten Zellen und apoptotischen Körperchen.

3.7.1 Kinetiken der Argyrin C-Wirkung

Der zeitliche Verlauf der Argyrin C-Wirkung und die Toxizität wurde mittels Caspase-3/7-Test und mittels Resazurin-Test festgestellt. Bei einem Caspase-3/7-Test mit c-FLIP_L-Zellen über drei verschiedene Zeiträume zeigt sich, dass ohne CD95L in ca. 10 % der Zellen die Caspasen aktiviert werden. Diese Anzahl steigt auch nach 26 h nicht auf einen höheren Wert als nach 18 h. Mit Zugabe des Apoptosestimulanz CD95L steigt die Caspase-Aktivierung mit der Zeit von etwa 20 % auf ca. 40 % an. Es findet also durch Argyrin C eine Sensitivierung von c-FLIP_L-Zellen auf CD95L-induzierte Apoptose statt, die mit der Dauer der Argyrin C-Inkubation zunimmt.

Argyrin C wurde auf seine Langzeitwirkung auf Leervektorzellen hin untersucht. Bei einer Kinetik über 53 h zeigt sich nur bei der Konzentration von 25 µM eine toxische Wirkung auf Leervektorzellen (Abb. 3.15 A). Alle anderen Konzentrationen wirken nicht toxisch auf diese Zellen.

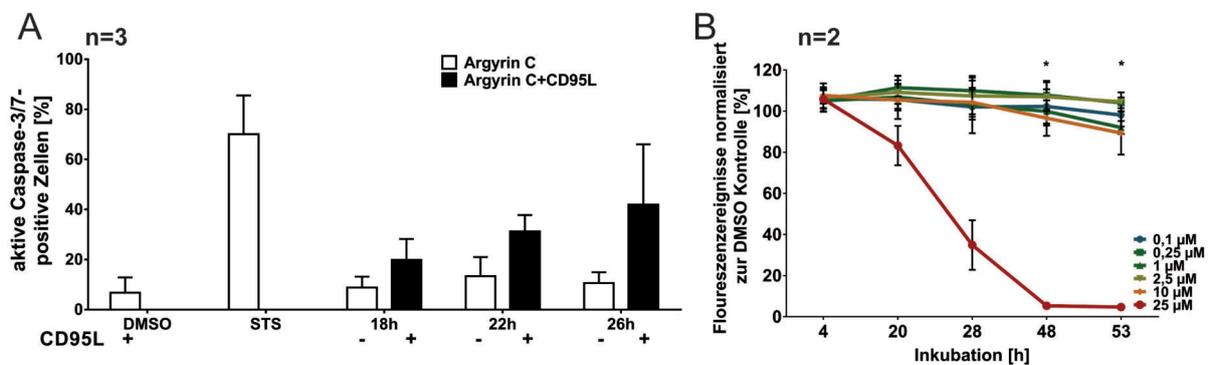


Abbildung 3.15: Argyrin C wirkt in hoher Konzentration bei längerer Inkubationszeit toxisch. Argyrin C wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben getestet und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten per Durchflusszytometrie mit dem Caspase-3/7-Test analysiert. Als Kontrolle wurde DMSO 1:100 für 26 h und 1 µM STS für 16 h verwendet. Die Aktivität der Caspasen-3/7 steigt bei 25 µM Argyrin C auf c-FLIP_L-Zellen über 18, 22 und 26 h Inkubation nur in Verbindung mit einer CD95L-Stimulation (jeweils 16 h Stimulation mit 100 ng/ml) an (A). Bei Leervektorzellen (B) zeigt Argyrin C im Resazurintest in der Konzentration von 25 µM eine Toxizität, bei anderen Konzentrationen nicht. Dabei wurde Argyrin C in verschiedenen Konzentrationen auf Leervektorzellen gegeben und nach verschiedenen Inkubationszeiten im Resazurintest analysiert. Eine statistische Signifikanz ergibt sich beim Vergleich von 25 µM mit 0,1 µM. Dabei entspricht ein Stern (*) $p < 0,0332$.

3.7.2 Wirkung von Argyrin C auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen

Da das Screening mit c-FLIP_L-überexprimierenden Zellen durchgeführt wurde, sollten die Substanzen die Apoptose-inhibierende Wirkung von FLIP aufheben oder schwächen. Auf welcher Wirkungsweise genau der Apoptose-stimulierende Effekt der Substanzen beruht, lässt sich mit Viabilitäts- oder Apoptosetests nicht bestimmen. Jurkats mit FADD- bzw. Caspase-8-Defizienz sind defekt im extrinsischen Apoptosesignalweg. Stimulation mit CD95L löst bei diesen Zellen keinen Zelltod aus. Wenn die Substanzen direkt auf c-FLIP oder einen anderen Bestandteil des extrinsischen Apoptosesignalweges wirken, dann muss dieser Signalweg funktional sein, damit die Substanzen einen Effekt zeigen. In Abb. 3.16 A ist die Wirkung von Argyrin C auf FADD- und Caspase-8-defizienten Jurkats im Vergleich zu der

3 Ergebnisse

parentalen Zelllinie A3 dargestellt. Bei der mit CD95L-stimulierten Kontrolle ist zu sehen, dass die FADD- und Caspase-8-defiziente Zellen wie erwartet resistent gegen den Stimulus sind. Auch bei Zugabe von Argyrin ändert sich, ob mit oder ohne CD95L-Stimulation, nichts an der Viabilität der Zellen, sodass für die Wirkung von Argyrin C der extrinsische Signalweg funktionell sein muss.

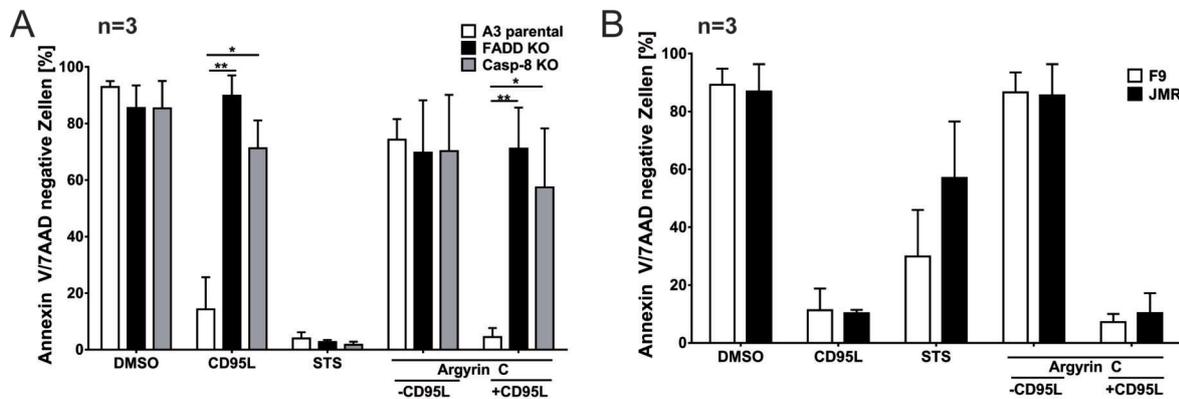


Abbildung 3.16: Wirkung von Argyrin C auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen. Jurkats mit stabilen Knockouts im intrinsischen (A) oder extrinsischen (B) Apoptosesignalweg wurden mit 25 μ M Argyrin C für 18 h behandelt (siehe Schema in Abschnitt 2.6.3). Eine zusätzliche Stimulation bzw. Kontrolle mit CD95L erfolgte für 16 h mit 100 ng/ml. Als Apoptosekontrolle diente 1 μ M STS für 16 h. Die Apoptoseinduktion in den T-Zelllinien wurde per Annexin V/7AAD-Test bestimmt. FADD- und Caspase-8-defiziente Zellen sind resistent gegen CD95L-Stimulation ($p < 0,0332$ *, $p < 0,0021$ **). Sie können durch Argyrin C nicht für die CD95L-Stimulation sensitiviert werden.

Um festzustellen, ob Argyrin C auch den intrinsischen Signalweg beeinflusst, wurden Caspase-9-defiziente Jurkats (JMR) und Caspase-9-rekonstituierte Jurkats (F9) verwendet (Abb. 3.16 B). Hier ist kein Unterschied zwischen den Caspase-9-defizienten und den Caspase-9-rekonstituierten Zellen erkennbar. Argyrin C hat also keinen Einfluss auf den intrinsischen Apoptosesignalweg.

3.7.3 Toxizitätsuntersuchung von Argyrin C auf humanen PBMCs

Indem Argyrin C auf menschlichen Blutzellen getestet wurde, wurde die Wirkung der jeweiligen Naturstoffe auf primäre Zellen analysiert. Dies ist ein erster Schritt zu klinischen Tests, da so die Toxizität der Stoffe besser eingeschätzt werden kann. Humane PBMCs wurden isoliert und mit Argyrin C versetzt. Toxizitätstests wurden entweder mittels Resazurin-Test nach 24, 48 und 72 h (Abb. 3.17 A-D) oder mittels Annexin V/7AAD-Test nach 4, 18 und 24 h (Abb. 3.17 E) durchgeführt. In Abb. 3.17 A sind die Kontrollen der Resazurin-Tests dargestellt. Bei Zellen, die mit DMSO oder STS behandelt wurden, nimmt die Viabilität ab. Durch Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) (Aktivierung insbesondere von T-Zellen) und LPS (Aktivierung insbesondere von Monozyten) wird die Proliferation und der Metabolismus der Blutzellen angeregt, wodurch eine höhere Viabilität im Resazurin-Test angezeigt wird. Es wurden drei Konzentrationen von Argyrin C getestet: 25, 10 und 5 μ M. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verringert Argyrin C nicht die Viabilität der Zellen. Die Konzentration von 5 μ M scheint einen aktivierenden bzw. protektiven Effekt zu haben (Abb. 3.17 B). Bei einer LPS-Stimulation sieht man einen konzentrationsabhängigen Effekt. Höhere Konzentrationen wirken etwas toxisch bzw. der Aktivierung der Zellen entgegen, die Viabilität liegt trotzdem noch etwa auf

dem Level von nur mit DMSO behandelten Zellen. Bei der Stimulation mit PHA ergibt sich ein leicht anderes Bild. Hier scheinen die mit 10 und 25 μM Argyrin C behandelten Zellen an Viabilität zu verlieren, die mit 5 μM behandelten Zellen sind fast so vital wie die DMSO- und PHA-Kontrolle. Insgesamt ist durch Argyrin C im Zeitraum bis 72 h keine gesteigerte Toxizität im Vergleich zu Kontrollzellen zu erkennen.

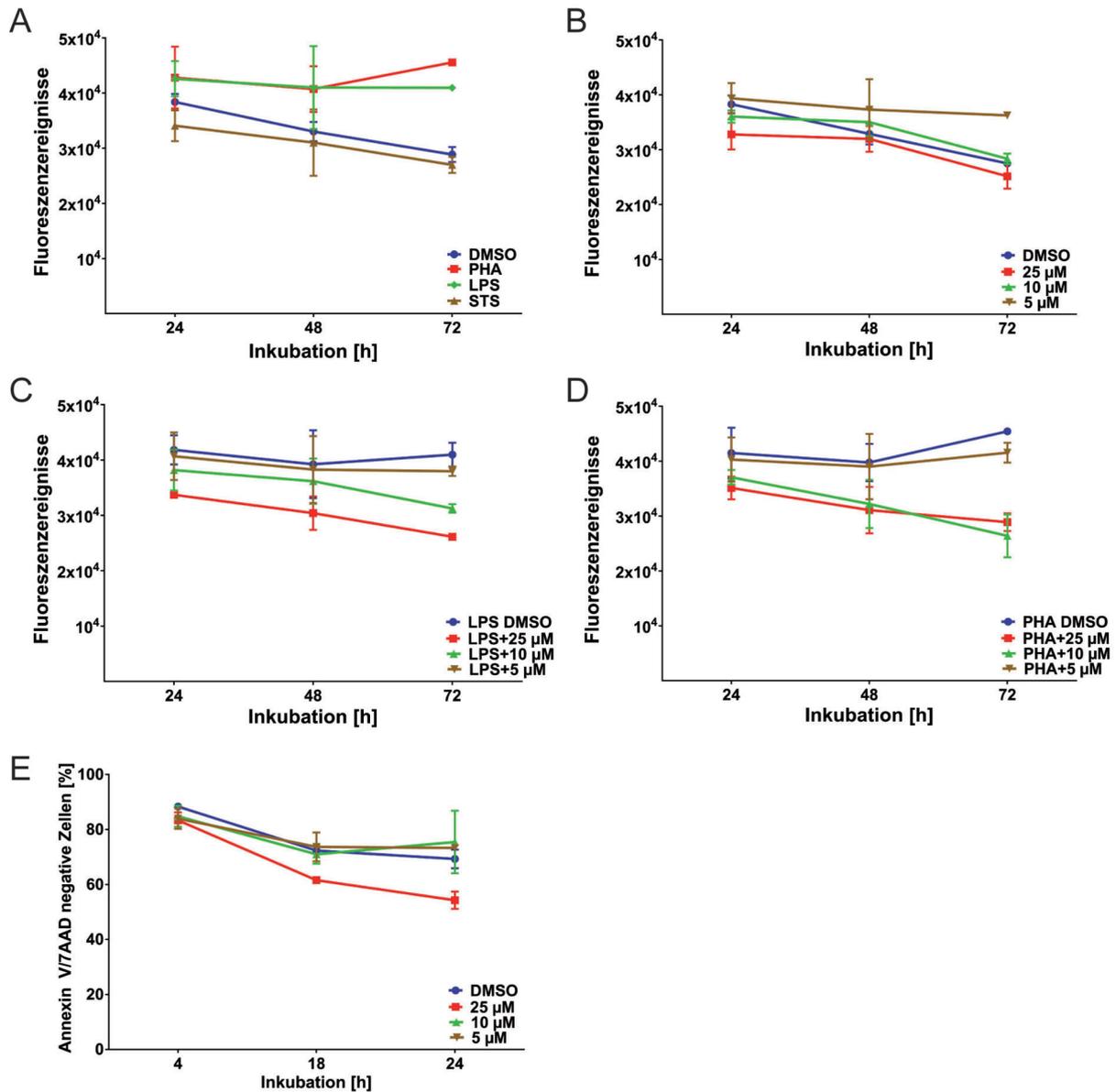


Abbildung 3.17: Argyrin C wirkt kaum toxisch auf humane PBMCs. Die Kontrollen mit Lösemittel (DMSO, 1:100), den Stimulantien PHA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und LPS (100 ng/ml) sowie STS (1 μM) als Negativkontrolle sind unter (A) dargestellt. Es wurden native PBMCs (B), mit LPS (C) und mit PHA (D) stimulierte PBMCs untersucht. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Resazurin-Tests durchgeführt. Die Kurzzeittoxizität von Argyrin C auf PBMCs wurde mittels Durchflusszytometrie im Annexin V/7AAD-Tests ermittelt (E). Es sind Mittelwerte aus $n=2$ Experimenten dargestellt.

In einem kürzeren Zeitverlauf bis 24 h ist die Messung mittels Resazurin-Test nicht vorteilhaft, da erst eine starke Schädigung der Zellen zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität und damit zu einem messbaren Ergebnis führt. Daher wurde in diesem Zeitrahmen mittels Annexin V/7AAD-Test die Toxizität von Argyrin C auf PBMCs gemessen (Abb. 3.17 E). Hier

3 Ergebnisse

ist zu erkennen, dass nur die Argyrin C Konzentration von 25 μM zu einer leichten Reduktion der Viabilität führt, alle anderen Konzentrationen haben keine messbaren toxischen Auswirkungen auf diese Zellen.

3.7.4 Effekt von Argyrin C auf murine T-Zellen

Da c-FLIP essentiell für das Überleben von Tregs ist (Zhang und He, 2005; Plaza-Sirvent et al., 2017), wurde die Wirkung von Argyrin C auf murine T-Zellen untersucht. Die verwendeten Mäuse exprimieren auf Tregs humanes CD2 (Komatsu et al., 2009; Kendal et al., 2011), daher konnten Tregs von anderen CD4-exprimierenden Zellen unterschieden werden. Die übrigen CD4-exprimierenden Zellen werden hier als Tcons bezeichnet. Argyrin C selbst erhöht in keiner Konzentration signifikant die spezifische Apoptoserate bei Tcons (Abb. 3.18 A) oder Tregs (Abb. 3.18 C). Wenn die Zellen zusätzlich mit CD95L stimuliert werden, erhöht sich sowohl bei Tcons (Abb. 3.18 B) als auch bei Tregs (Abb. 3.18 D) die spezifische Apoptoserate unabhängig davon, ob Argyrin C zugegeben wurde. CD28- und CD3-Stimulation kann die Apoptose von Tcons unterbinden, da die Zellen aktiviert werden. Argyrin C führt in diesem Zusammenhang allerdings zu einer konzentrationsabhängig erhöhten Apoptoserate (Abb. 3.18 B). Diese Apoptose kann durch zusätzliche Zugabe von IL-2 unterbunden und die Zellen vor Apoptose geschützt werden. Dieser Effekt ist bei Tregs etwas anders ausgeprägt (Abb. 3.18 D). Hier verringern CD28- und CD3-Zugabe zwar die Apoptoserate im Vergleich zur CD95L-Stimulation, sie liegt aber immer noch auf dem Level der DMSO Kontrolle. Mit Argyrin C-Behandlung ändert sich die spezifische Apoptoserate nicht wesentlich. Durch Zugabe von IL-2 verringert sich die spezifische Apoptoserate im Vergleich zur reinen CD28- und CD3-Stimulation um etwa 10 %. Durch Zugabe von Argyrin kann die spezifische Apoptoserate allerdings auf etwa 10 % gesenkt werden; in diesem Stimulationsumfeld wirkt Argyrin C Apoptose-hemmend.

3.7.5 Argyrin C sensitiviert clearCa-4 Zellen

Lübke beschreibt, dass clearCa-4 Zellen spontan Apoptose begehen, wenn c-FLIP transient ausgeschaltet wird (Lübke, 2016). Da Argyrin C als möglicher c-FLIP-Inhibitor untersucht wird, wurde getestet, ob sich die Behandlung mit Argyrin C auf die Viabilität von clearCa-4 Zellen auswirkt.

ClearCa-4 Zellen wurden mit Argyrin C behandelt (Abb. 3.19). Argyrin C alleine wirkt in keiner Konzentration toxisch auf clearCa-4 Zellen. Nach Zugabe von CD95L konnte eine Sensitivierung auf den Todesliganden durch Argyrin C in Konzentrationen von 10 und 25 μM beobachtet werden. Die Viabilität sank um fast 50 %. Dabei ist die Sensitivierung bei 25 μM statistisch signifikant.

3.7.6 Argyrin C wirkt auf Protein-, aber nicht auf RNA-Ebene

Da ein spezifischer c-FLIP-Inhibitor gesucht wird, ist es wichtig zu erfahren, mit welchem Mechanismus Argyrin C die c-FLIP-überexprimierenden Zellen auf CD95L-Behandlung sensitiviert. Daher wurden die relativen RNA-Mengen von c-FLIP bei verschiedenen Argyrin

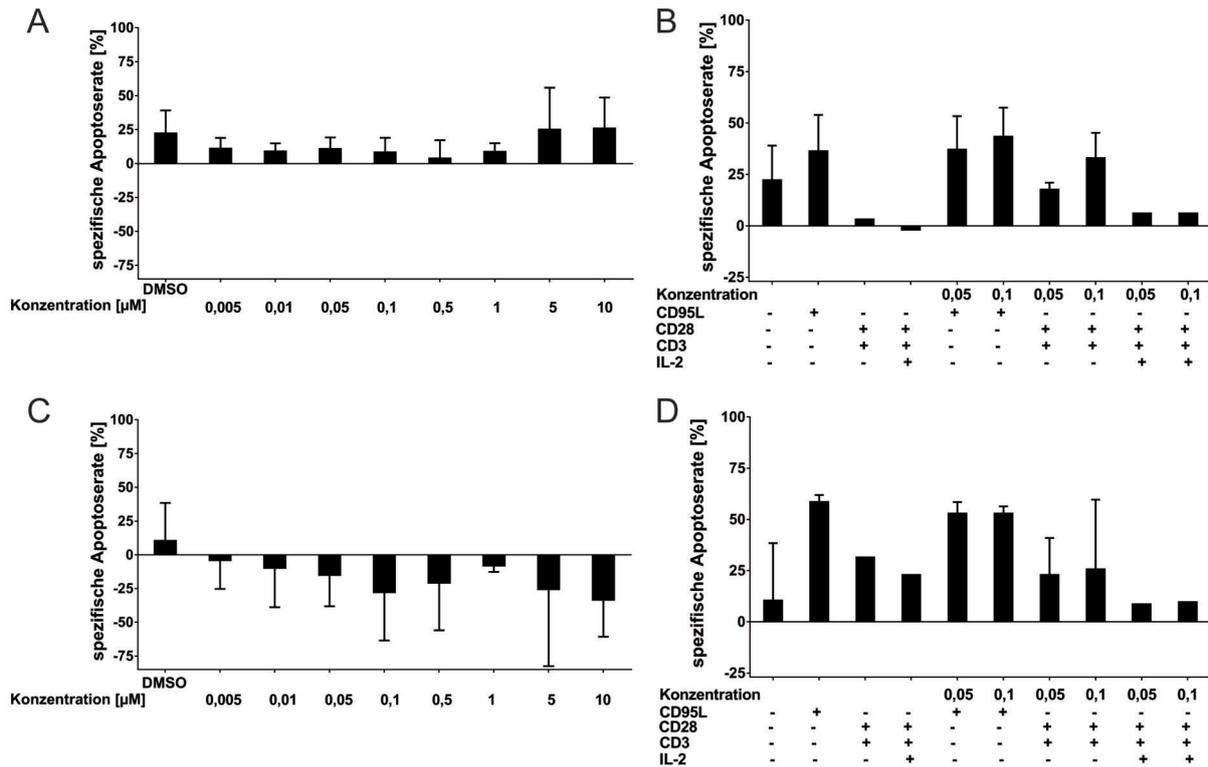


Abbildung 3.18: Argyrin C wirkt nicht toxisch auf murine T-Zellen. Unstimulierte Tcons (A) oder mit verschiedenen Stimulantien behandelte Tcons (B) wurden ebenso wie unstimulierte (C) oder mit verschiedenen Stimulantien behandelte (D) Tregs mit Argyrin C behandelt. Die Apoptose der Zellen wurde nach 8 h Inkubation per Caspase-3/7-Test bestimmt und daraus die spezifische Apoptoserate (siehe Abschnitt 2.7.2) ermittelt. Der Effekt von Argyrin C ohne zusätzliche Stimulantien ist als Mittelwert aus drei Experimenten (n=3) dargestellt (A) und (C). Bei mit 100 ng/ml CD95L, 1:100 DMSO (Negativkontrolle in Panel (B) und (D)), 2 µg/ml CD3 und CD28 bzw. mit 15 ng/ml IL-2 stimulierte Zellen wurden je nach verfügbarer Zellzahl der Mittelwert aus ein bis drei Wiederholungen des Experimentes dargestellt.

3 Ergebnisse

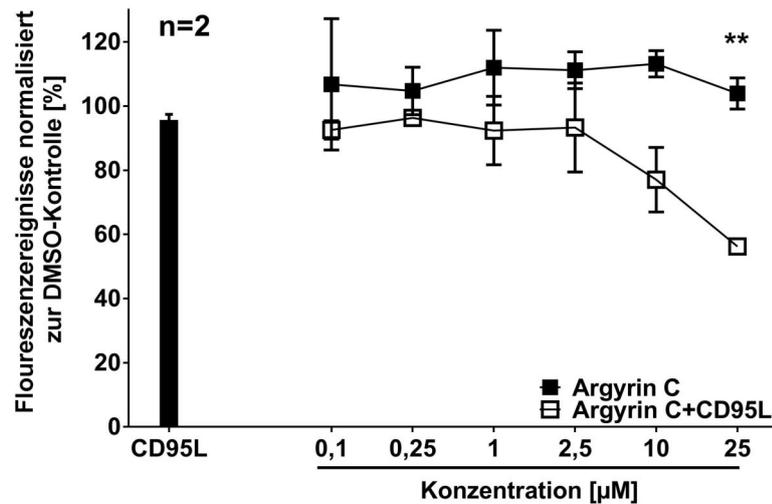


Abbildung 3.19: Argryrin C sensitiviert clearCa-4 auf CD95L-Stimulation. Die Zellen wurden wie unter 2.6.3 beschrieben mit verschiedenen Argryrin C-Konzentrationen mit und ohne zusätzlicher CD95L-Stimulation mit 100 ng/ml für 16 h behandelt. Im Resazurin-Test kann gezeigt werden, dass Argryrin C clearCa-4 Zellen zur CD95L-induzierten Apoptose sensitivieren kann. Die statistische Signifikanz entspricht ** $p < 0,0021$.

C Konzentrationen nach 24, 48 und 71 h Argryrin C Behandlung bestimmt (Abb. 3.20 A). Es wurden die Isoformen FLIP_L und FLIP_S sowie Gesamt-c-FLIP (c-FLIP_{L+S}) getestet. In Abb. 3.20 A ist gezeigt, dass sich das Level von c-FLIP_L erst nach 72 h leicht verringert. Nach 24 h kann etwas weniger c-FLIP_S-RNA als die DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden, nach 48 h und 72 h erhöht sich der c-FLIP_S-RNA-Gehalt sogar. Auch der Gesamt-c-FLIP-RNA-Gehalt wird durch Argryrin C nicht verringert, sondern erhöht sich mit der Behandlungsdauer.

Im Western Blot ist zu erkennen, dass bei c-FLIP_L-überexprimierenden Zellen mit Argryrin C Behandlung c-FLIP_S nicht mehr detektierbar ist, während es bei unbehandelten und mit CD95L-stimulierten Zellen exprimiert wird. Bei der Stimulation mit dem Todesligand zusätzlich zur Argryrin C Behandlung ist eine geringere Expression von c-FLIP_L bzw. eine Spaltung der langen c-FLIP-Isoform erkennbar. Auch wenn mittels anderer Testverfahren schon festgestellt wurde, dass Argryrin C c-FLIP_L-Zellen auf CD95L-induzierte Apoptose sensitiviert, wird hier noch einmal bestätigt, dass wichtige Caspasen aktiviert werden. So ist eindeutig die Aktivierung der für die Induktion des extrinsischen Apoptosessignalwegs wichtigen Caspase-8, als auch die für die Ausführung der Apoptose wichtige Caspase-3 sichtbar. Auch die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), das bei Apoptose gespalten wird, ist erkennbar.

3.7.7 Wirkung von Argryrin-Derivaten auf c-FLIP_L-Zellen

Chemische Derivate von Argryrin wurden von Prof. Dr. Markus Kalesse (Hannover) bereitgestellt (Stempel et al., 2018), um notwendige Strukturen für die Apoptose-induzierende Wirkung erkennen zu können. Die chemischen Argryrin-Derivate sind auch teilweise fluoreszierend, weshalb eine fluorimetrische Auswertung angedacht war, die leider aufgrund der geringen Wirkkonzentrationen nicht durchgeführt werden konnte. So wurden die Derivate

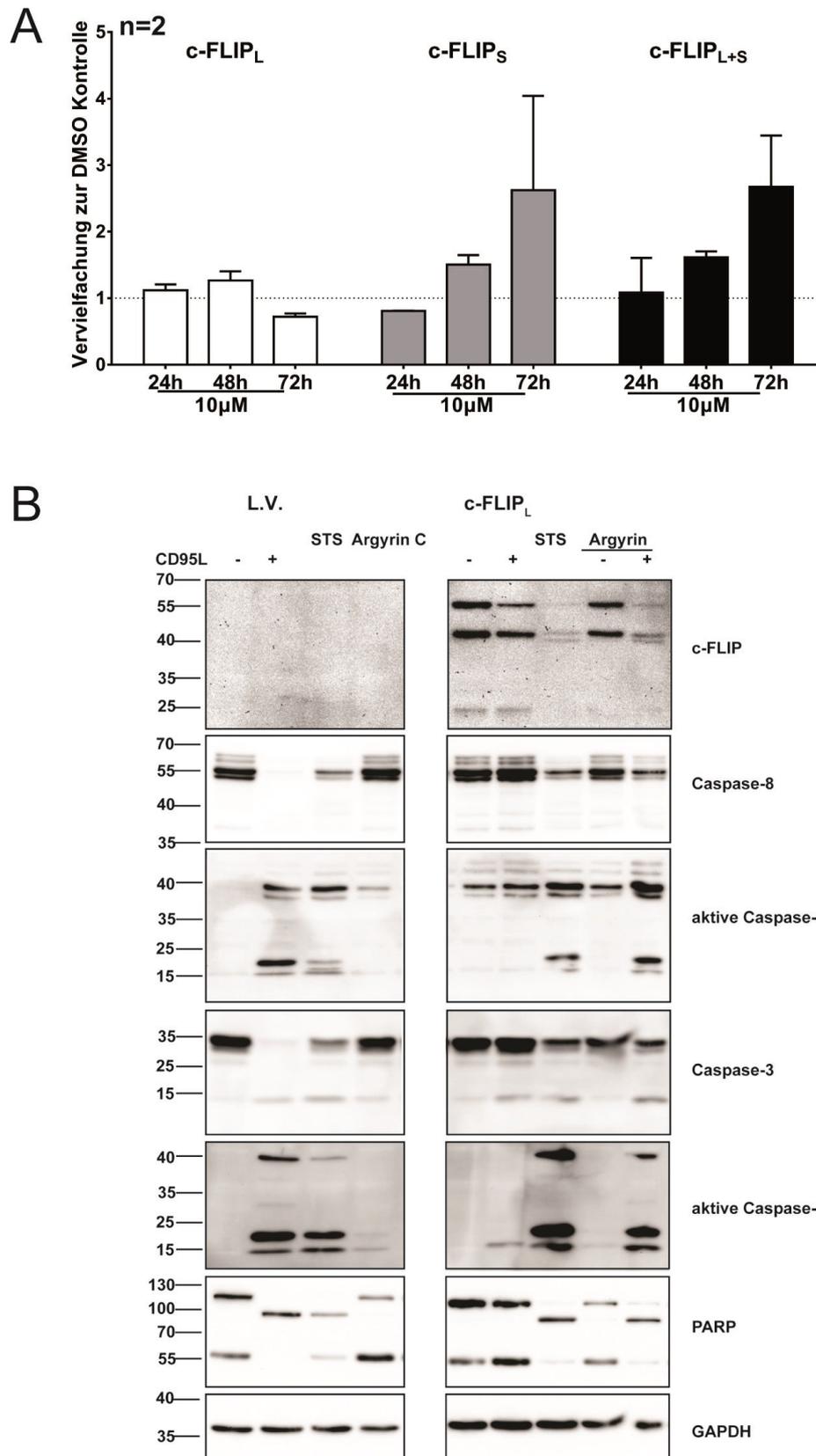


Abbildung 3.20: Argyrin C wirkt auf Protein-, aber nicht auf RNA-Ebene. (A) 10 μ M Argyrin C wurde über verschiedene Zeiträume auf clearCa-4 Zellen gegeben. Die Analyse der jeweiligen Gene erfolgte via qPCR. Im Western Blot (B) wurden Leervektor- und c-FLIP_L-Zellen mit 25 μ M Argyrin C behandelt und die Expression von Proteinen der extrinsischen Apoptose, insbesondere die Aktivierung von Caspasen, wurde analysiert.

3 Ergebnisse

im Resazurin-Test getestet, ob sie eine ähnliche Wirkung wie Argyrin C zeigen. Im Naturstoffscreening wurden neben Argyrin C verschiedene Derivate von Argyrin getestet. Die im Screening getesteten Argyrin-Derivate sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Es ist erkennbar, dass Argyrin A im Screening keinen Effekt gezeigt hat, Argyrin B toxisch auf Leervektorzellen gewirkt hat und Argyrin D ebenfalls weder eine Toxizität noch einen Effekt gezeigt hat. Einzig Argyrin H wirkt nicht toxisch und reduziert dennoch die c-FLIP_L-Sensitivität moderat.

Tabelle 3.1: Ergebnisse von natürlichen Argyrin-Derivaten im Naturstoffscreening. Neben Argyrin C wurden vier weitere Argyrin-Derivate im Naturstoffscreening getestet. Die Sensitivierungskapazität (prozentuale Viabilität von Substanz- und CD95L-behandelten c-FLIP_L-Zellen zur Viabilität von CD95L-stimulierten c-FLIP_L-Zellen, siehe Abschnitt 2.7.1) ist dargestellt.

Spezies	L.V. Viabilität [%]	c-FLIP _L Sensitivierungskapazität [%]
A	81,3	84,7
B	49,6	40,1
C	90,8	35,9
D	103,9	96,5
H	141,1	78,3

Die getesteten Derivate wurden chemisch verändert, indem eine AzuAla-Gruppe oder eine 7Aza-Gruppe zugefügt wurde. In Abb. 3.21 sind die Ergebnisse des Resazurin-Tests mit Argyrin C und den fünf synthetischen Argyrin-Derivaten bei Leervektorzellen dargestellt. Argyrin C zeigt bei 25 µM eine toxische Wirkung, alle anderen Substanzen wirken nicht toxisch. Einzig ES5 zeigt bei 1 µM einen leicht toxischen Effekt auf die Leervektorzellen.

Der Test auf c-FLIP_L-Sensitivierung (siehe Abschnitt 3.4) wurde auch mit den Argyrin-Derivaten auf c-FLIP_L- und c-FLIP_S-Zellen durchgeführt. In Abb. 3.22 sind die Ergebnisse der c-FLIP_L-Zellen dargestellt. Die Kontrollen werden zur besseren Vergleichbarkeit bei jeder Teilgrafik dargestellt. Wie schon beim Leervektor ist keine Toxizität der Argyrin-Derivate auf c-FLIP_L-Zellen zu sehen. Eine zusätzliche Stimulation mit CD95L führt außer bei Argyrin C (25 µM) nur zu sehr moderaten Verlusten in der Viabilität. Ein leichter Effekt ist bei höheren Konzentrationen (10 und 25 µM) bei ES1 zu erkennen. ES5 stellt auch hier wieder eine Ausnahme dar, da es einerseits einen leicht sensitivierenden Effekt ab 1 µM zu haben scheint, andererseits aber auch hier wieder bei 1 µM die geringste Viabilität zeigt.

Bei dem Test mit c-FLIP_S-Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild (Abb. 3.23). Auch hier ist keine Toxizität zu erkennen, bei zusätzlicher Stimulation mit CD95L scheinen jedoch ES1 und ES3 eine moderate sensitivierende Wirkung zu haben. Bei ES5 ist bei 1 µM eine toxische Wirkung ohne sensitivierenden Effekt mit CD95L-Behandlung erkennbar.

3.8 Charakterisierung von Aurachin D

Aurachin D sensitiviert c-FLIP_L-Zellen mit recht geringer Toxizität zur Apoptose und wurde deshalb für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

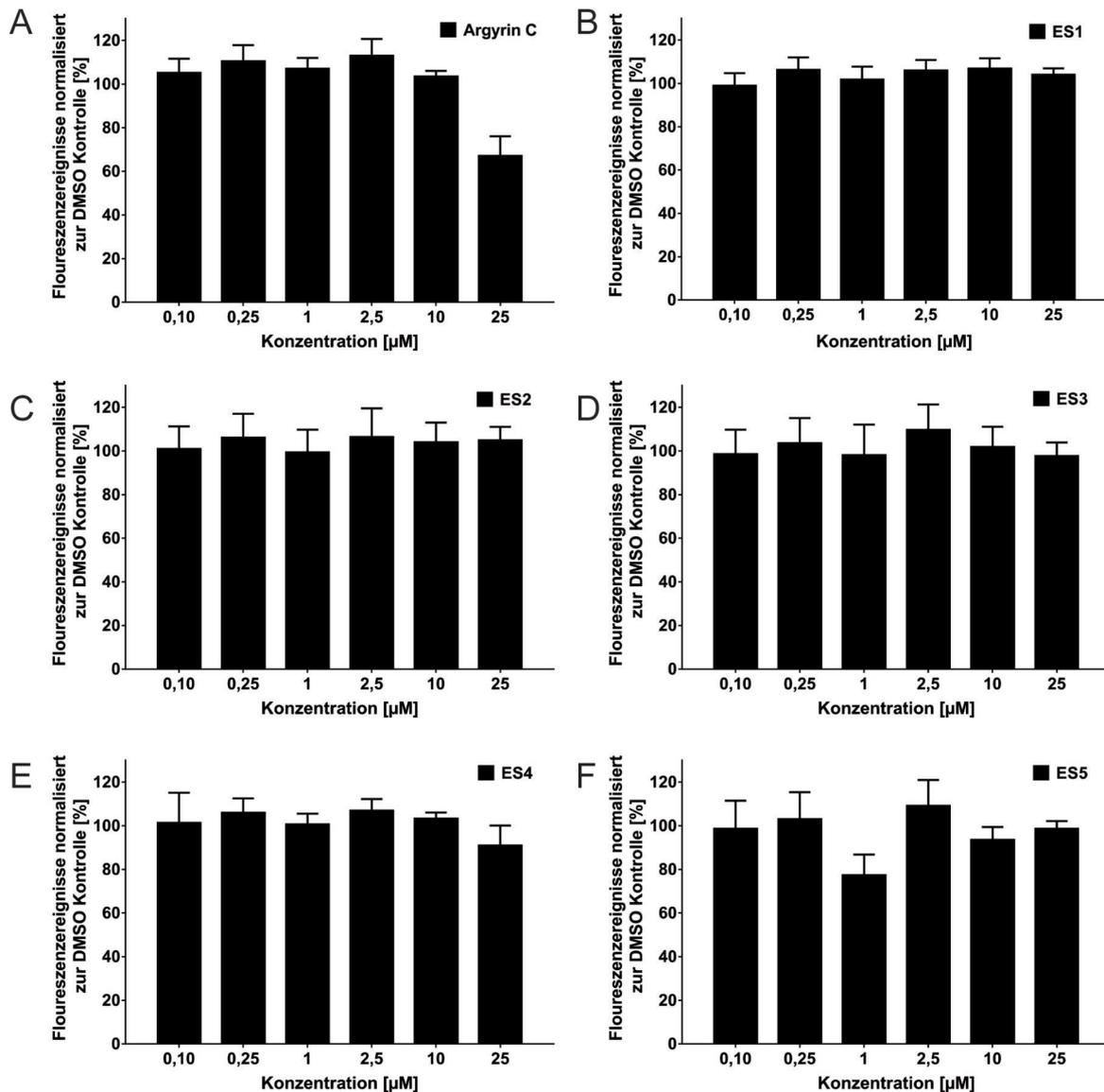


Abbildung 3.21: Toxizitätskontrolle von fünf verschiedenen Argirin-Derivaten auf Leervektorzellen. Die angegebene Konzentration der Argirin-Derivate ES1 (A), ES2 (B), ES3 (C), ES4 (D), ES5 (E) und Argyrin C (F) wurde für 18 h zu Leervektorzellen gegeben und die Viabilität der Zellenn wurde mittels Resazurin-Test im Vergleich zu Argyrin C ermittelt. Es ist der Mittelwert aus n=2 Experimenten dargestellt.

3 Ergebnisse

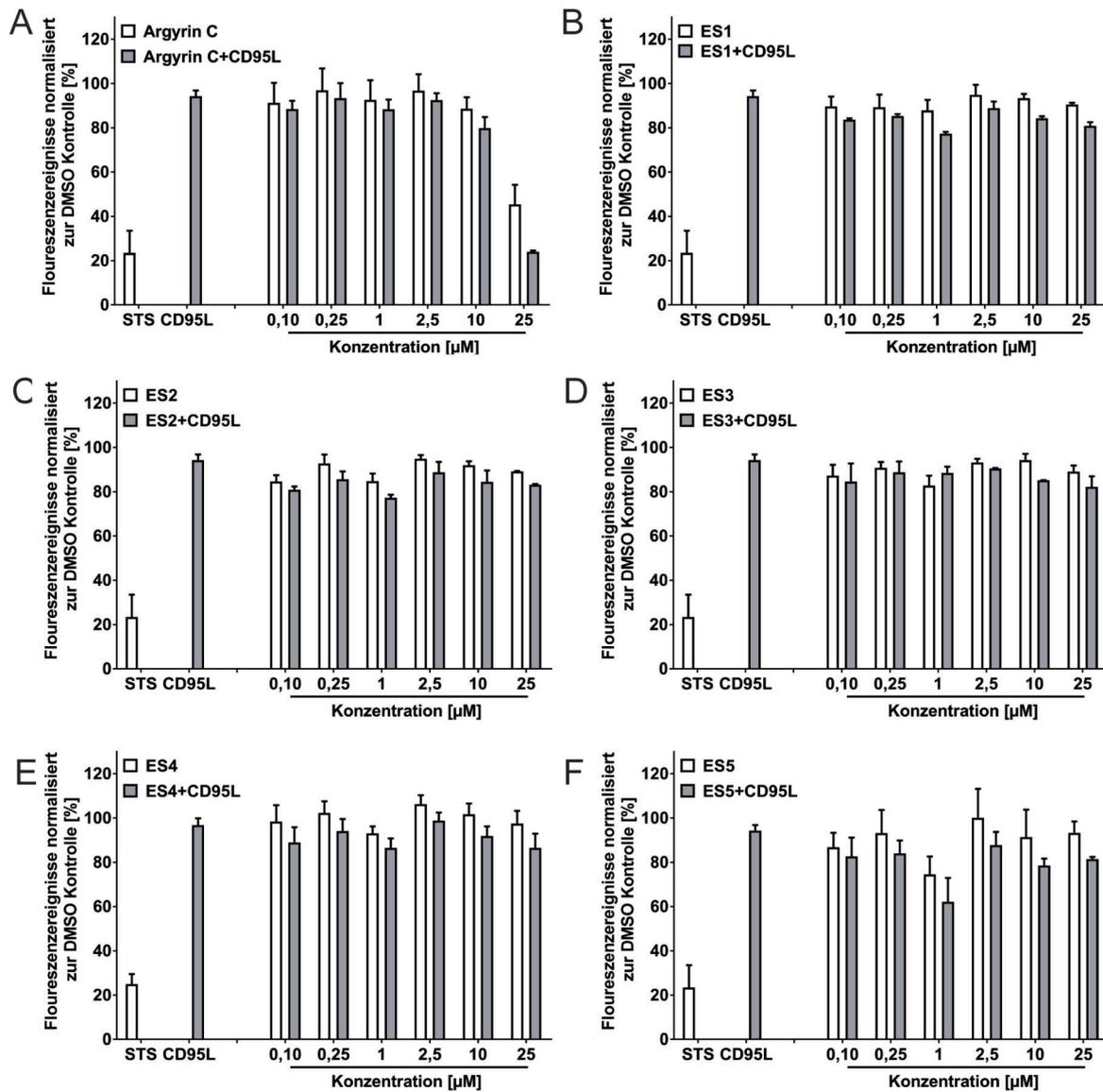


Abbildung 3.22: Argyrin-Derivate können c-FLIP_L-Zellen nicht zur Apoptose sensitivieren. Fünf verschiedene Argyrin-Derivate wurden im Resazurin-Test auf ihre c-FLIP_L-sensitivierende Wirkung im Vergleich zu Argyrin C getestet. Argyrin C (A) und die Derivate ES1 (B), ES2 (C), ES3 (D), ES4 (E) und ES5 (F) wurden wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben auf ihre Apoptose-sensitivierende Wirkung getestet. Als Kontrollen wurden 1 μM STS und 100 ng/ml CD95L für 16 h verwendet. Es ist der Mittelwert aus n=2 Experimenten dargestellt.

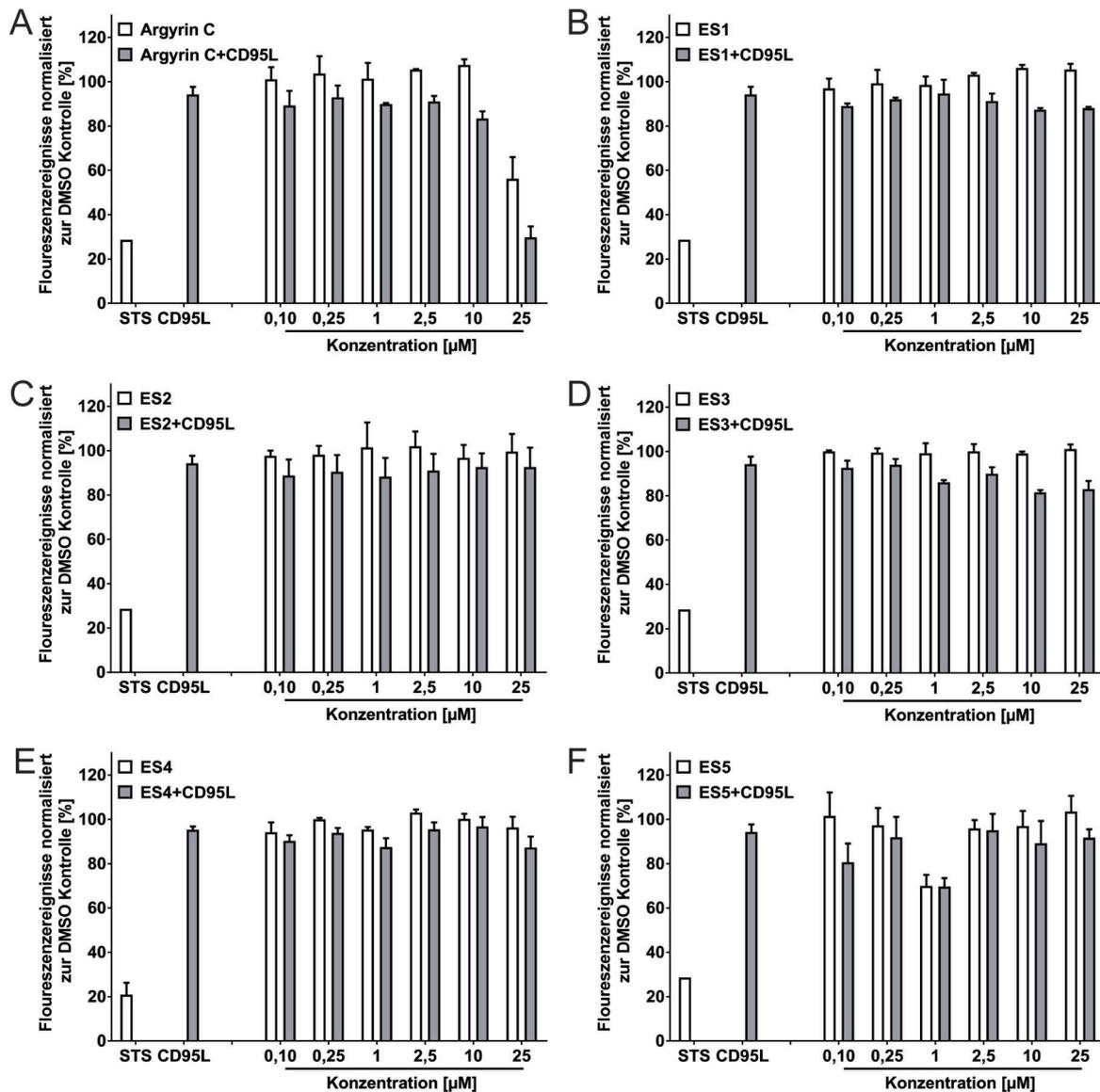
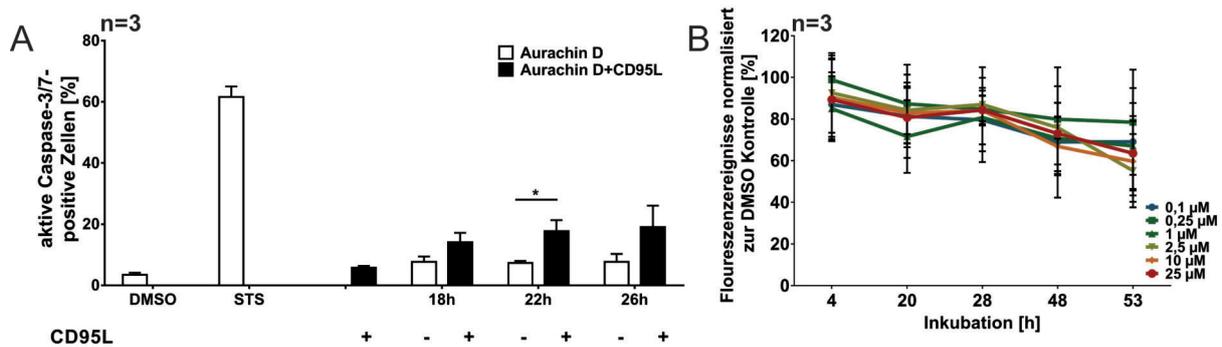


Abbildung 3.23: Argirin Derivate haben keinen sensitivierenden Effekt auf c-FLIP γ -Zellen. Im Resazurin-Test wurden Argirin C (A) sowie die fünf verschiedene Argirin-Derivate ES1 (B), ES2 (C), ES3 (D), ES4 (E) und ES5 (F) auf ihre c-FLIP γ -sensitivierende Wirkung im Vergleich zu Argirin C getestet. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle zur Apoptose wurde STS (1 μ M) und als Negativkontrolle CD95L (100 ng/ml) für 16 h verwendet. Es ist der Mittelwert aus n=2 Experimenten dargestellt.

3 Ergebnisse

3.8.1 Kinetiken der Aurachin D Wirkung

Der Verlauf der Wirkung von Aurachin D wurde mittels Kinetiken festgestellt. Dazu wurden HT 1080 Leervektorzellen und c-FLIP_L-Zellen verwendet. Bei längerer Inkubation von Leervektorzellen mit Aurachin D sinkt die Viabilität beständig leicht ab, bis sie nach 53 h bei allen getesteten Konzentrationen nur noch bei 60-80 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle liegt (Abb. 3.24 B). Dabei sind die Varianzen recht groß, sodass eine eindeutige Aussage zur Toxizität von Aurachin D nicht möglich ist.



Abbildungung 3.24: Aurachin D induziert eine geringe Aktivierung der Caspasen, wirkt aber nach einiger Zeit toxisch auf Leervektorzellen. (A) HT1080 c-FLIP_L-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben mit 25 µM Aurachin D behandelt und mittels Durchflusszytometrie im Caspase-3/7-Test ausgewertet. Dabei fand bei einigen Proben eine zusätzliche Stimulation mit 100 ng/ml für 16 h CD95L statt. Eine Apoptosekontrolle wurde mittels Behandlung mit 1 µM STS für 16 h durchgeführt, die Lösemittelkontrolle mit DMSO 1:100 für 26 h. (B) Die Langzeitwirkung von Aurachin D auf HT 1080 Leervektorzellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen über die Zeiträume 4, 20, 28, 48 und 53 h getestet und im Resazurintest ausgewertet. Die statistische Signifikanz wird als * entspricht $p < 0,0332$ dargestellt.

Bei der Messung mittels Caspase-3/7-Test ist eine insgesamt recht geringe Aktivierung der Caspasen zu beobachten, die mit zunehmender Behandlungsdauer und CD95L-Stimulation leicht zunimmt. Eine Aktivierung von Caspasen ohne CD95L-Stimulation geschieht nur sehr gering (unter 10 %) und erhöht sich auch mit der Stimulierungsdauer nicht (Abb. 3.24 A).

3.8.2 Wirkung von Aurachin D auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen

Zur Verifizierung der Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs durch Aurachin D und CD95L-Behandlung wurden defiziente Zellen des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalwegs verwendet. Caspase-8-defiziente Zellen sind gegen die Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalwegs durch Todesliganden resistent, Caspase-9-defiziente Zellen können den intrinsischen Apoptosesignalweg nicht mehr ausführen. Aurachin D verringert die Viabilität von Caspase-8- oder FADD-defizienten Jurkat Zellen nicht signifikant (Abb. 3.25 A). Diese Zellen werden also durch Aurachin D nicht gegen die CD95L-Stimulation sensitiviert. Insofern scheint der extrinsische Signalweg der Apoptose für die Wirkung von Aurachin D essentiell zu sein. Caspase-8-defiziente Zellen zeigen etwas weniger Viabilität nach CD95L-Stimulation. Da allerdings in humanen Zellen noch Caspase-10 vorhanden ist, das vermutlich die Aufgabe von Caspase-8 zumindest teilweise übernehmen kann (Wang et al., 2001; Kischkel et al., 2001), sind diese Zellen im begrenzten Umfang noch zur Apoptose fähig.

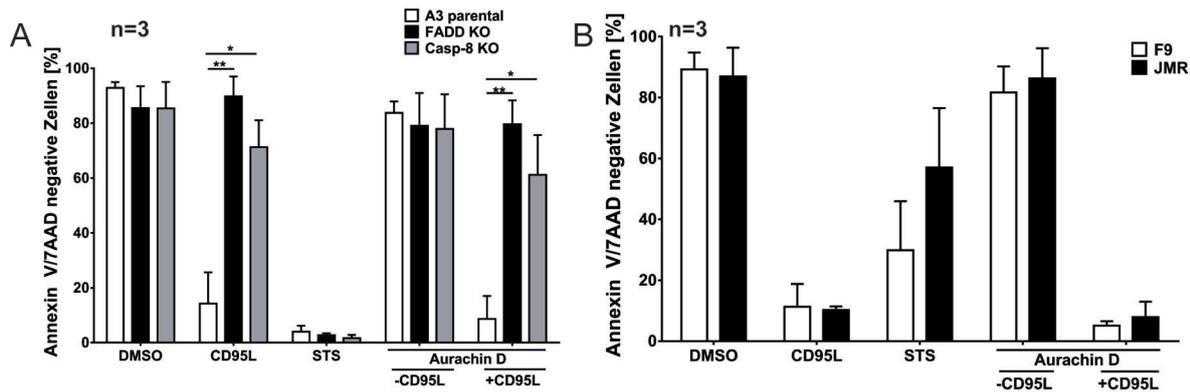


Abbildung 3.25: Wirkung von Aurachin D auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen. T-Zelllinien mit einer Defizienz in Proteinen des extrinsischen Apoptoseweges (A) oder des intrinsischen Apoptoseweges (B) wurden mit DMSO (1:100), 100 ng/ml CD95L, 1 μ M STS sowie 25 μ M Aurachin D (mit und ohne 100 ng/ml CD95L) für 16 h bzw. 18 h behandelt (siehe Abschnitt 2.6.3) und die Zellviabilität wurde per Annexin V/7AAD-Test bestimmt. Die Signifikanz ist als * $p < 0,0332$ und ** $p < 0,0021$ dargestellt.

Bei Caspase-9-defizienten Jurkat Zellen (JMR) ist kein Unterschied zu den Caspase-9-rekonstituierten Jurkat Zellen (F9) zu sehen, also scheint der intrinsische Apoptoseweg keine Rolle im Wirkmechanismus von Aurachin D zu spielen.

3.8.3 Untersuchungen der Toxizität von Aurachin D gegen humane PBMCs

Für eine Weiterentwicklung eines „Hits“ zu einem klinisch erprobten Medikament muss gewährleistet sein, dass die untersuchte Substanz nicht toxisch auf primäre humane Zellen wirkt. Um das zu testen, wurde Aurachin D auf seine Toxizität gegen humane PBMCs getestet.

Humane PBMCs reagieren unstimuliert nicht auf Aurachin D (Abb. 3.26 B). Auch nach Stimulation der Monozyten mit LPS zeigt sich nur ein minimaler Effekt bei einer Aurachin D Konzentration von 10 und 25 μ M (Abb. 3.26 C). Die Stimulation der T-Zellen mittels PHA hat einen stärkeren Effekt; es ist bei einer Konzentration von 5 μ M eine leichte Abnahme der Viabilität bzw. der Proliferation zu sehen. Bei einer Konzentration von 10 und 25 μ M ist dieser Effekt etwas stärker ausgeprägt, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen feststellbar ist (Abb. 3.26 D). In der Kurzzeit-Toxizitätsmessung nach 24 h ist kein toxischer Effekt bei einer Konzentration von 5 μ M zu erkennen, Aurachin D-Konzentrationen von 10 und 25 μ M zeigen einen sehr leichten Effekt auf die Zellen, wobei die maximale Differenz von 25 μ M zur DMSO-Kontrolle ca. 15 % beträgt (Abb. 3.26 E).

3.8.4 Wirkung von Aurachin D auf murine T-Zellen

Die Wirkung von Aurachin D gegen murine T-Zellen wurde getestet, da bekannt ist, dass murine Tregs auf c-FLIP angewiesen sind (Zhang und He, 2005; Plaza-Sirvent et al., 2017). Ein möglicher c-FLIP-Inhibitor würde dementsprechend vermutlich auch einen Einfluss auf

3 Ergebnisse

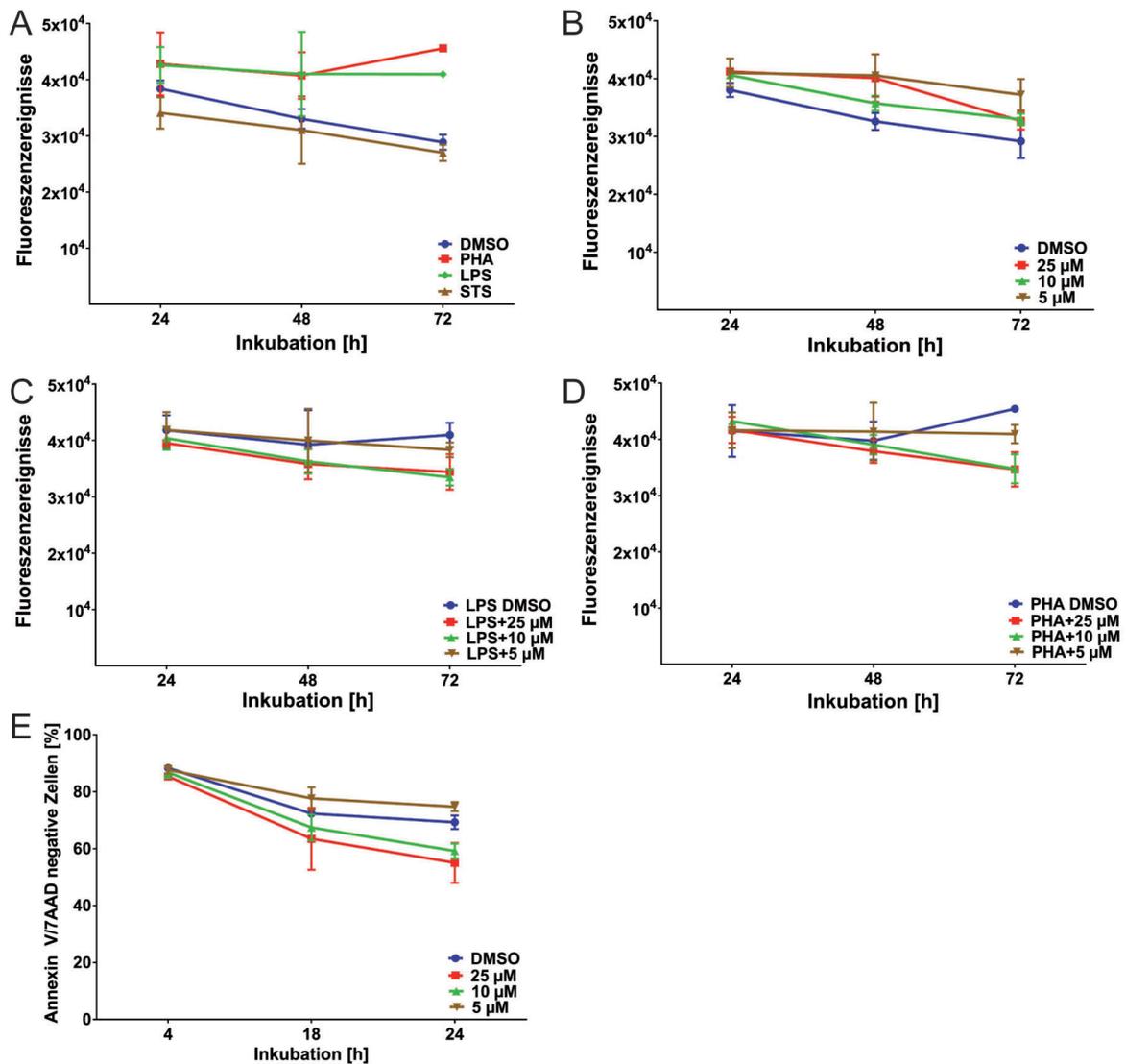


Abbildung 3.26: Untersuchung der Aurachin D-Wirkung auf humane PBMCs. Kontrollen von DMSO (1:100), LPS (100 ng/ml) und PHA (5 µg/ml) sind unter (A) dargestellt. Aurachin D wurde auf unbehandelte (B) bzw. mit LPS- (C) oder mit PHA-stimulierte PBMCs (D) gegeben und nach einem, zwei und drei Tagen wurde mittels Resazurin-Test die Viabilität der Zellen bestimmt. Der kurzzeitigen Effekt von Aurachin D auf PBMCs wurde per Annexin V/7AAD-Test getestet (E). Es sind die Mittelwerte aus n=2 Experimenten dargestellt.

die Viabilität von Tregs haben. Wird Aurachin D auf isolierte murine CD4-positive Zellen gegeben, scheint das in keiner getesteten Konzentration einen Einfluss auf die Apoptoserate der Tcons zu haben (Abb. 3.27 A). Eine Behandlung der Zellen mit Aurachin D zusammen mit CD95L führt bei CD4-positiven Zellen zu einer leichten Erhöhung der spezifischen Apoptoserate, die nicht signifikant im Vergleich zur CD95L-behandelten Kontrolle ist (Abb. 3.27 B). Die Wirkung von Aurachin D auf Treg-Zellen sieht dagegen so aus, als wenn geringe Konzentrationen bis 0,01 μM einen eher protektierenden Effekt haben, Konzentrationen zwischen 0,05 und 1 μM eine Steigerung der spezifischen Apoptoserate verursachen und Konzentrationen von 5 und 10 μM die Zellen wieder leicht vor Apoptose protektieren (Abb. 3.27 C). Da allerdings die Standardabweichung so groß sind, dass sich keine Signifikanz feststellen lässt, ist eine definitive Aussage über eine toxische Wirkung von Aurachin D auf Tregs nicht möglich.

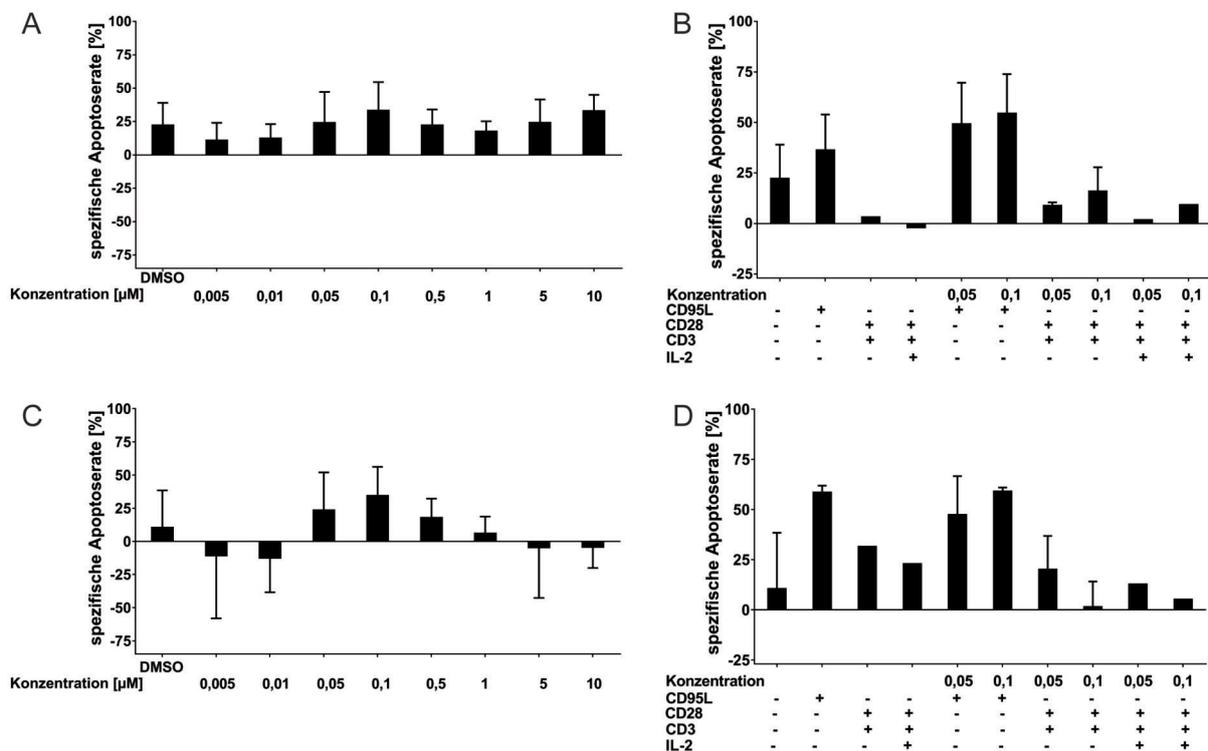


Abbildung 3.27: Aurachin D steigert die spezifische Apoptoserate von murinen T-Zellen nicht signifikant. Aurachin D wurde auf murine T-Zellen gegeben und die Rate apoptotischer Zellen wurde nach 8 h Inkubation mittels Caspase-3/7-Test gemessen. Es wurden unbehandelte Tcons (A), stimulierte Tcons (B), unstimulierte Tregs (C) und stimulierte Tregs (D) untersucht. Dabei ist die Probe ohne Stimulation (Panel (B) und (D)) mit DMSO als Kontrolle behandelt wurden. Die Wirkung von Aurachin D auf Tcons und Tregs ohne zusätzliche Stimulation ((A) und (C)) wurde als Mittelwert aus $n=3$ Experimenten aufgetragen. Kein Wert unterscheidet sich signifikant von der DMSO-Kontrolle. Die Stimulationen (Panel (B) und (D)) mit 100 ng/ml CD95L, 1:100 DMSO (Negativkontrolle in Panel (B) und (D)), 2 $\mu\text{g/ml}$ CD3 und CD28 bzw. mit 15 ng/ml IL-2 konnten abhängig von der zur Verfügung stehenden Zellzahl ein bis dreimal durchgeführt werden. Dementsprechend ist hier auch keine statistische Aussage über die Signifikanz einzelner Werte möglich.

Werden Tregs mit CD28 und CD3 zusammen mit Aurachin D behandelt, scheint dies konzentrationsabhängig die spezifische Apoptoserate der Tregs zu senken (Abb. 3.27 D). Wird zusätzlich IL-2 dazugegeben, verringert dies auch die spezifische Apoptoserate gegenüber den Kontrollzellen. Ein Unterschied zwischen CD28- und CD3- stimulierten und den CD28-, CD3- und IL-2-stimulierten Treg Zellen in Gegenwart von Aurachin D ist nicht zu erkennen.

3.8.5 Einfluss von Aurachin D auf die Resistenz von clearCa-4 Zellen

ClearCa-4 Zellen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber CD95L-Stimulation im Vergleich zu anderen Zelllinien, wie etwa den HT 1080 Wildtyp-Zellen. Sie reagieren allerdings empfindlich auf den Verlust von c-FLIP, indem sie spontan Apoptose begehen (Lübke, 2016). Wird der potentielle FLIP-Inhibitor Aurachin D auf diese Zelllinie gegeben, so ist ab 1 μM zwar eine Abnahme der Viabilität erkennbar, die allerdings nicht signifikant unter die Viabilität der CD95L-Kontrolle fällt (Abb. 3.28).

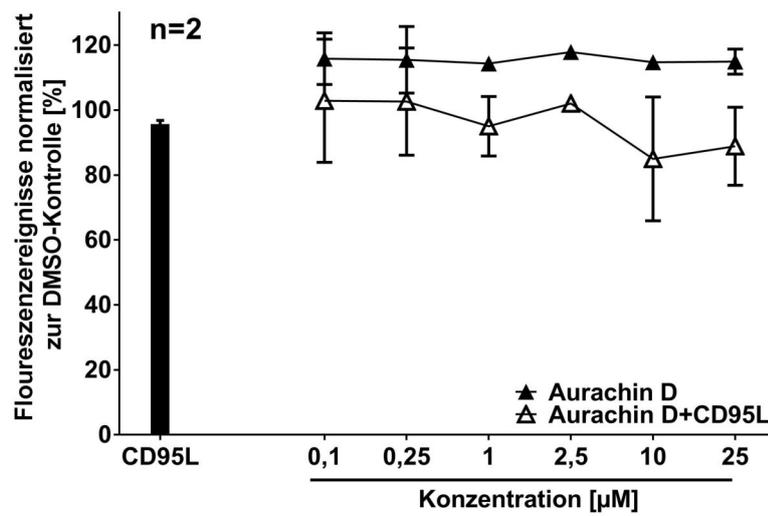


Abbildung 3.28: Wirkung von Aurachin D auf die Sensitivierung von clearCa-4 Zellen. Verschiedene Konzentrationen von Aurachin D wurden für 18 h in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml CD95L (16 h) auf ihre Wirkung auf clearCa-4 Zellen mittels Resazurin Test untersucht. Als Kontrolle diente 100 ng/ml CD95L für 16 h.

3.8.6 Wirkung von Aurachin D auf den c-FLIP-mRNA-Gehalt und die c-FLIP-Expression

Wird der c-FLIP-RNA-Gehalt der Isoformen nach 24, 48 und 72 h Aurachin D-Behandlung untersucht, so ist zu sehen, dass keine der Isoformen einzeln und auch das c-FLIP-RNA-Level insgesamt nicht abnimmt (Abb. 3.29 A). Nach 24 h ist der c-FLIP_L-RNA-Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Zellen stabil, nach 48 h ist er mehr als verdoppelt. Nach 72 h sinkt der c-FLIP_L-Gehalt wieder auf etwa das Maß der DMSO-Kontrolle. Der RNA-Gehalt von c-FLIP_S ist nach 24 h leicht erhöht; dieser Effekt verstärkt sich bei 48 h. Auch hier ist ein Rückgang des c-FLIP_S-Gehaltes nach 72 h auf das Ausgangslevel zu beobachten. Der Gesamt-c-FLIP-Gehalt wurde mittels eines Primerpaares, das c-FLIP_L und c-FLIP_S erkennt, bestimmt. Auch hier steigt der c-FLIP-RNA Gehalt nach 48 h an, bevor er nach 72 h wieder auf das Ausgangsmaß zurückfällt.

Die Kontrollen zum in Abb. 3.29 gezeigten Western Blot sind in Abb. 3.20 B dargestellt. Im Western Blot zeigt sich, dass Aurachin D auch ohne Stimulation leicht den c-FLIP_L-Proteingehalt senkt (Abb. 3.29 B). Aurachin D löst auf Leervektorzellen und unstimulierten

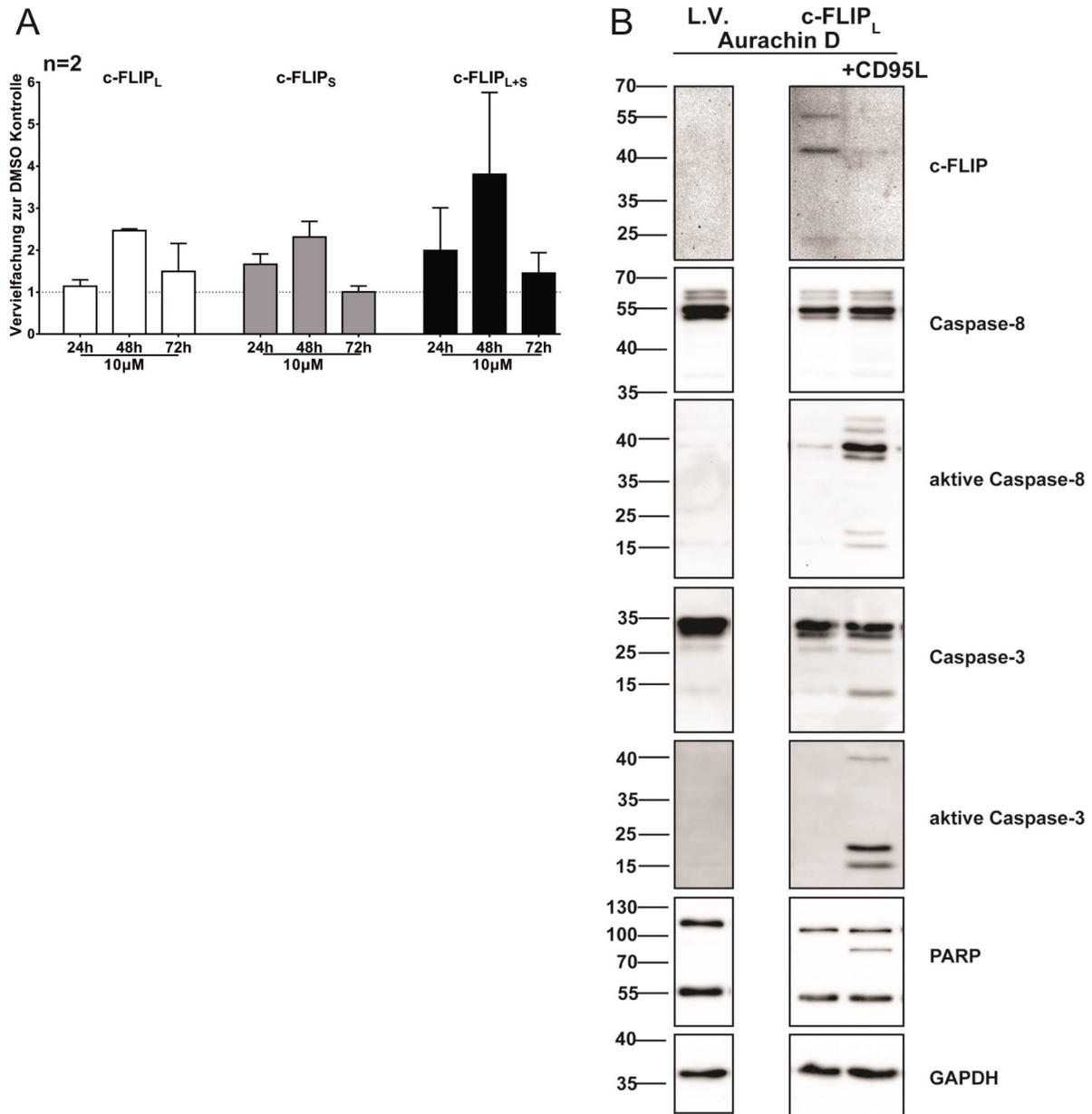


Abbildung 3.29: Aurachin D wirkt nicht auf mRNA-Ebene auf das c-FLIP-Level. Es wurde der Einfluss von 10 μ M Aurachin D auf die gebildete c-FLIP mRNA nach einem, zwei und drei Tagen via qPCR untersucht (A). Im Western Blot (B) wurde die Proteinexpression von c-FLIP und weiteren Proteinen des extrinsischen Signalwegs nach 18 h Aurachin D-Stimulation (25 μ M, mit und ohne zusätzliche CD95L-Stimulation mit 100 ng/ml) untersucht. Dabei wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben vorgegangen und für 16 h mit 100 ng/ml CD95L stimuliert. Die Kontrollen zu diesem Blot sind in Abb. 3.20 B dargestellt.

3 Ergebnisse

c-FLIP_L-Zellen keine Caspasenaktivierung aus. Mit CD95L-Stimulation ist allerdings sowohl eine Aktivierung der Caspasen -3 und -8 als auch eine Spaltung von PARP erkennbar.

3.9 Charakterisierung von HZI 15

HZI 15 hat in den Apoptosetests eine durchgängige Wirkung als sensitivierende Substanz gegen c-FLIP_L-Zellen gezeigt. Dabei hat HZI 15 auch in Konzentrationen ab 10 nM im Annexin V/7AAD-Test einen Effekt gezeigt. Daher wurde diese Substanz für eine weitergehende Charakterisierung ausgewählt.

3.9.1 Kinetiken der HZI 15 Wirkung

Der zeitliche Verlauf der Wirkung von Substanz HZI 15 wurde in zwei Kinetiken getestet. Dabei wurde einerseits die Wirkung auf die Aktivierung von Caspase-3 und -7 in c-FLIP_L-Zellen mittels Durchflusszytometrie als auch die Langzeitwirkung bis 53 h auf Leervektorzellen mittels Resazurintest getestet. HZI 15 aktiviert die ausführenden Caspasen vor allem CD95L-abhängig im Caspase-3/7-Test (Abb. 3.30 A). Dabei steigt der Anteil von Zellen mit aktivierten Caspasen von ca. 25% auf ca. 55 % nach 18 bzw. 26 h an. Ohne CD95L-Stimulation findet nur eine mäßige Aktivierung der Caspasen von etwa 15-20 % statt. In einem Langzeittoxizitätstest wurden verschiedene Konzentrationen von HZI 15 auf Leervektorzellen gegeben und die Vitalität der Zellen nach verschiedenen Zeiträumen bestimmt. Es ist erkennbar, dass HZI 15 auf diese Zellen mit der Zeit eine toxische Wirkung in allen getesteten Konzentrationen zeigt. Die höchste Konzentration von 25 µM zeigt die stärkste Toxizität, die anderen Konzentrationen wirken in etwa gleich vitalitätshemmend. Nach 20 h ist der Effekt noch nicht allzu ausgeprägt und nimmt mit der Zeit zu.

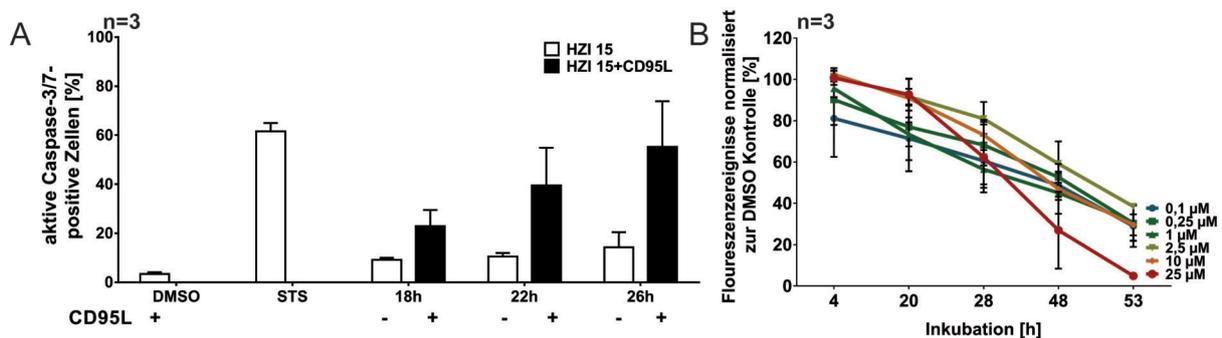


Abbildung 3.30: HZI 15 aktiviert Caspasen nur nach zusätzlicher CD95L-Stimulation, zeigt allerdings im Langzeittest eine toxische Wirkung gegen Leervektorzellen. c-FLIP_L-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben behandelt. Dabei wurden sie für die angegebenen Zeiträume mit 5 µM HZI 15 (in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml CD95L für 16 h) versetzt. Als Kontrollen wurden die Zellen für 26 h mit 1:100 DMSO und für 16 h mit 1 µM STS behandelt. Die Aktivierung von Caspasen wurde mittels Durchflusszytometrie im Caspase-3/7-Test gemessen (A). Die Langzeittoxizität gegen Leervektorzellen wurde bis 53 h mittels Resazurin-Tests bestimmt (B).

3.9.2 Wirkung von HZI 15 auf Apoptose-defiziente Jurkat Zellen

FADD- oder Caspase-8-defiziente Jurkat Zellen können den extrinsischen Signalweg der Apoptose nicht oder nur noch sehr eingeschränkt zum Initiieren von Apoptose nutzen. HZI 15 alleine zeigt auf Apoptose-defizienten Jurkat Zellen keine Toxizität. Mit zusätzlicher CD95L-Stimulation wird keine Apoptose in den Zellen ausgelöst. Für die Sensitivierung der Zellen durch HZI 15 ist also ein funktioneller extrinsische Apoptosesignalweg notwendig (Abb. 3.31 A).

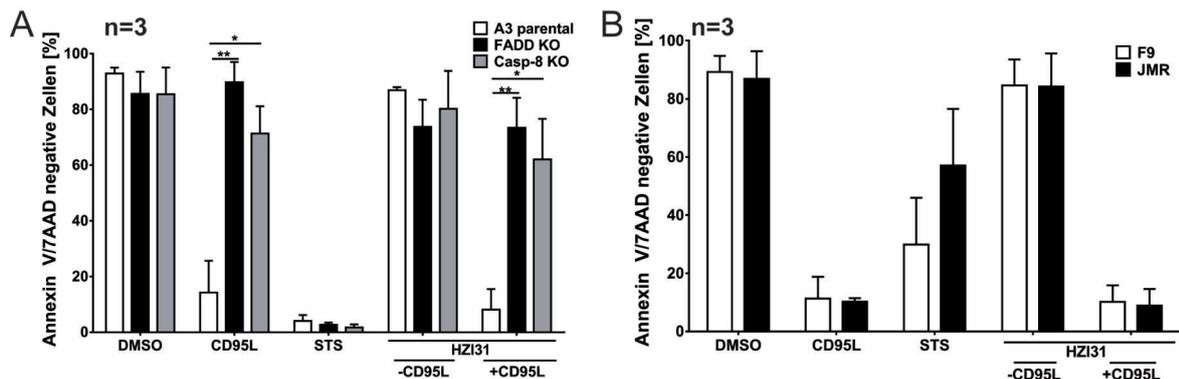


Abbildung 3.31: HZI 15 benötigt einen funktionellen extrinsischen Apoptosesignalweg für die Sensitivierung auf CD95L-Stimulation. Jurkats mit Defizienz im extrinsischen Apoptosesignalweg (A) und Caspase-9 defiziente Jurkats (B) wurden wie unter Abschnitt 2.6.3 beschrieben mit 5 μ M HZI 15, 1 % DMSO als Lösemittelkontrolle (für 18 h), 1 μ M STS (als Negativkontrolle für 16 h) und 100 ng/ml CD95L für 16 h behandelt und auf Apoptose mittels Annexin V/7AAD-Test untersucht.

Auch auf Caspase-9-defiziente Jurkats, bei denen keine intrinsische Apoptose mehr stattfinden kann, hat HZI 15 keinen Einfluss. Die Viabilität ändert sich im Vergleich zu Caspase-9-rekonstituierten Jurkats nicht, wenn HZI 15 alleine oder zusammen mit CD95L auf die Zellen gegeben wird. Daher hat der intrinsische Apoptosesignalweg keinen Einfluss auf die Wirkweise von HZI 15 (Abb. 3.31 B).

3.9.3 Toxizität von HZI 15 auf humane PBMCs

Um festzustellen, ob HZI 15 eine toxische Wirkung auf menschliche Blutzellen besitzt, wurden humane PBMCs isoliert und mit HZI 15 behandelt. In Abb. 3.32 A sind die Kontrollen aufgetragen. DMSO behandelte PBMCs verlieren mit der Zeit ihre Viabilität. Wird eine Stimulation mit PHA oder LPS durchgeführt, werden die Zellen aktiviert und proliferieren. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle haben die Konzentrationen 5, 2,5 und 1 μ M keinen Einfluss auf die Viabilität von PBMCs (Abb. 3.32 B). Hier wurden geringere Konzentrationen als bei den anderen Substanzen gewählt, da HZI 15 bei höheren Konzentrationen Toxizität und bei geringeren Konzentrationen eine c-FLIP_L-sensitivierende Wirkung zeigt.

Werden die Zellen mit LPS stimuliert, so findet mit HZI 15-Behandlung zwar nicht unbedingt eine Proliferation oder metabolische Aktivierung der Zellen statt, eine toxische Wirkung ist allerdings auch nicht zu beobachten, da die Zellen nicht stärker Apoptose begehen als bei der reinen DMSO-Kontrolle. Es ist eine leichte Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten, die allerdings nicht signifikant ist. HZI 15 ist also auch für aktivierte PBMCs, die auf LPS reagieren (vor allem Monozyten) nicht toxisch (Abb. 3.32 C). Werden die T-Zellen mit

3 Ergebnisse

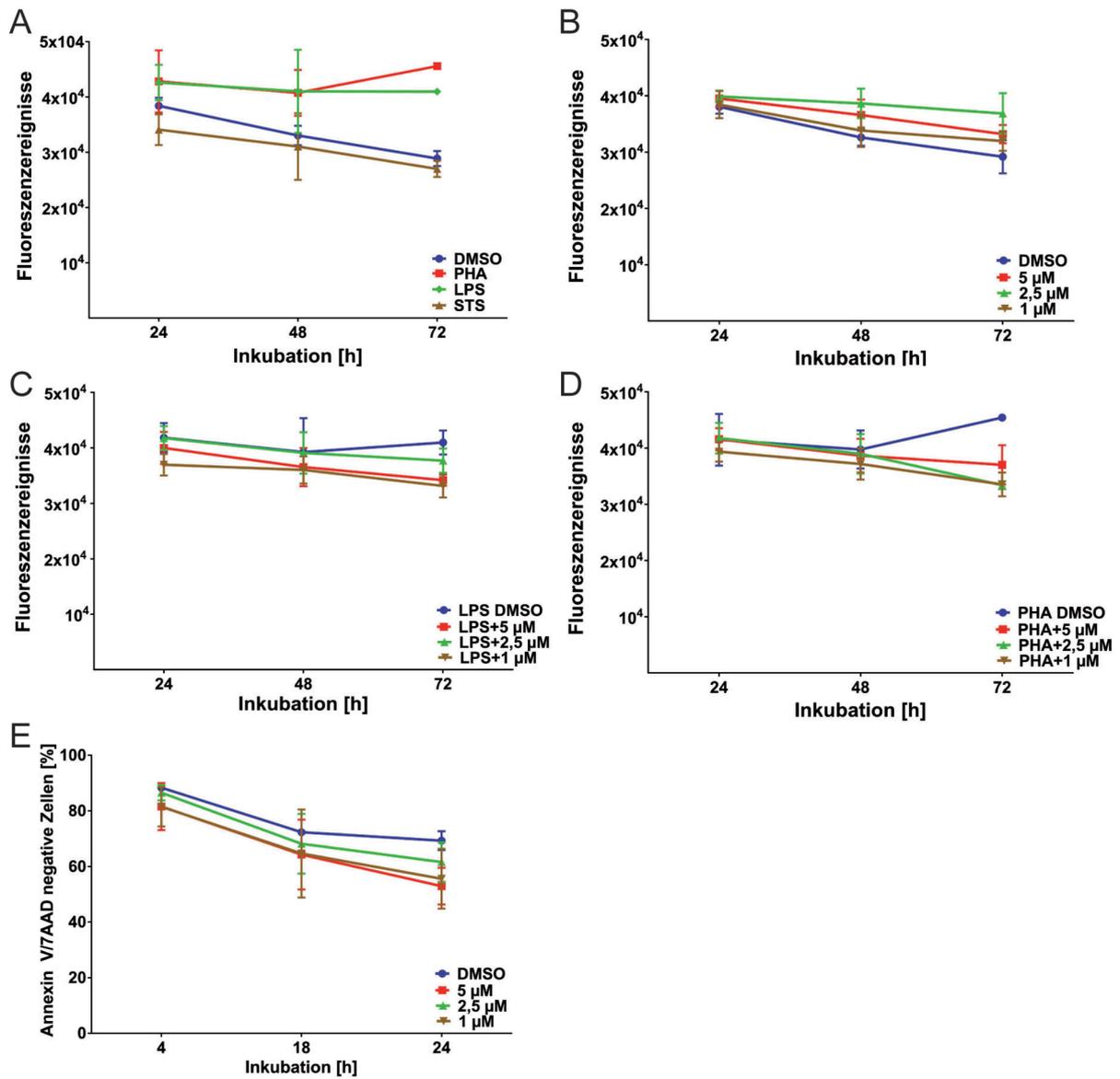


Abbildung 3.32: HZI 15 zeigt keine Toxizität gegen humane PBMCs. Kontrollen der Behandlung mit DMSO (1:100), LPS (100 ng/ml) und PHA (5 μ g/ml) sind unter (A) dargestellt. Die Viabilität von PBMCs wurde nach Zugabe von HZI 15 auf unbehandelte (B) bzw. mit LPS- (C) oder mit PHA- stimulierte PBMCs (D) getestet. Der kurzzeitige Effekt von HZI 15 auf PBMCs wurde per Annexin V/7AAD-Test getestet (E). Es sind die Ergebnisse aus n=2 Experimenten dargestellt.

PHA stimuliert, so hat HZI 15 einen deutlicheren Effekt (Abb. 3.32 D). Die Zellen ohne HZI 15-Behandlung werden stimuliert und zeigen einen gesteigerten Metabolismus. Dieser Effekt kann durch die Aktivierung der Zellen oder durch Proliferation entstehen. HZI 15 unterbindet diesen Effekt, ohne dass eine Toxizität zu sehen ist. Hierbei hat auch die HZI 15-Konzentration kaum einen Effekt. In der Kurzzeittoxizität nach 4, 18 und 24 h zeigt HZI 15 einen moderaten, konzentrationsabhängigen Effekt (Abb. 3.32 E). Dabei ist die Viabilität von etwa 70 % (DMSO-Kontrolle) auf etwa 55 % (5 μ M) gefallen.

3.9.4 Wirkung von HZI 15 auf murine T-Zellen

Da insbesondere Tregs auf c-FLIP angewiesen sind (Zhang und He, 2005; Plaza-Sirvent et al., 2017), wurde die Wirkung von HZI 15 auf murine T-Zellen untersucht. Dabei wurden Zellen aus murinen Lymphknoten isoliert und mit HZI 15 und anderen Stimulantien versetzt. CD4-positive Zellen (ohne Tregs) reagieren ohne zusätzliche Stimulation kaum apoptotisch auf HZI 15, nur in der Konzentration von 10 μ M ist eine höhere spezifische Apoptoserate zu erkennen (Abb. 3.33 A). Dafür kann HZI 15 Tcons auf AICD sensitivieren (Abb. 3.33 B). Hier ist mit CD28 und CD3 Stimulation die Apoptoserate nach Behandlung mit HZI 15 deutlich höher als ohne HZI 15 Behandlung. Eine zusätzliche Stimulation mit IL-2 hat keinen Effekt. Bei den Tregs ist dieser Effekt so nicht zu erkennen, hier scheinen alle Konzentrationen außer 0,5 μ M eher die spezifische Apoptoserate zu senken (Abb. 3.33 C).

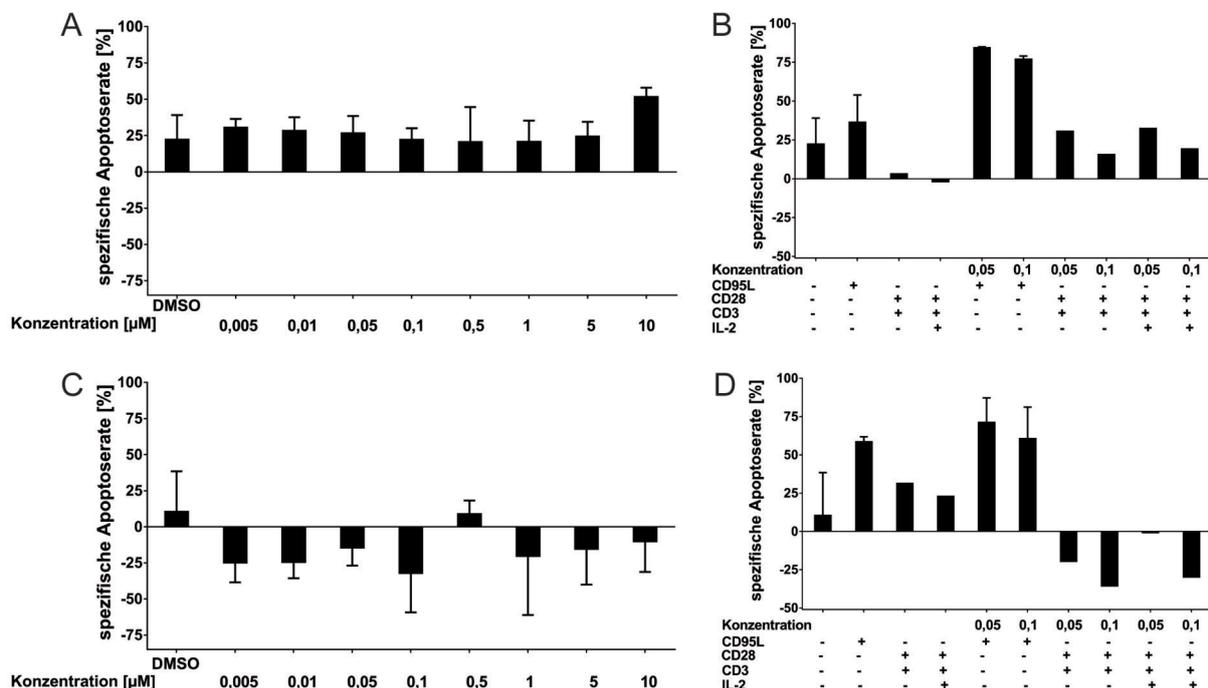


Abbildung 3.33: HZI 15 senkt die spezifische Apoptoserate bei stimulierten Tregs. Die Wirkung von HZI 15 auf murine T-Zellen wurde nach 8 h Inkubation mittels Caspase-3/7-Test analysiert. HZI 15 wurde auf unbehandelte Tcons (A), stimulierte Tcons (B), unstimulierte Tregs (C) und stimulierte Tregs (D) gegeben und die spezifische Apoptoserate wurde ermittelt. Dabei wird die Wirkung von HZI 15 auf unstimulierte T-Zellen (Panel (A) und (C)) als Mittelwert von n=3 Experimenten dargestellt. Mit 100 ng/ml CD95L, 1:100 DMSO (Negativkontrolle in Panel (B) und (D)), 2 μ g/ml CD3 und CD28 bzw. mit 15 ng/ml IL-2 stimulierte Zellen (Panel (B) und (D)) sind als Mittelwerte aus ein bis drei Experimenten dargestellt. Eine statistische Aussage ist hier daher nicht möglich.

3 Ergebnisse

Ebenso kann HZI 15 bei Tregs mit zusätzlicher Stimulation mit CD28 und CD3 die spezifische Apoptoserate konzentrationsabhängig senken (Abb. 3.33 D). Dieser Effekt tritt ebenfalls bei zusätzlicher Stimulation mit IL-2 auf, scheint hier aber erst bei einer Konzentration von 0,1 μM zu wirken.

3.9.5 HZI 15 sensitiviert clearCa-4 Zellen auf die Wirkung von CD95L

HZI 15 hat auf clearCa-4 Zellen eine Apoptose-sensitivierende Wirkung. Wie in Abb. 3.34 dargestellt, sensitivieren Konzentrationen ab ca. 1 μM HZI 15 clearCa-4-Zellen deutlich auf die Wirkung von CD95L. Eine leichte Toxizität von HZI 15 auch ohne CD95L um etwa 10 % ist bei 10 μM erkennbar, hier ist allerdings auch der sensitivierende Effekt am stärksten und fast alle clearCa-4-Zellen sterben ab.

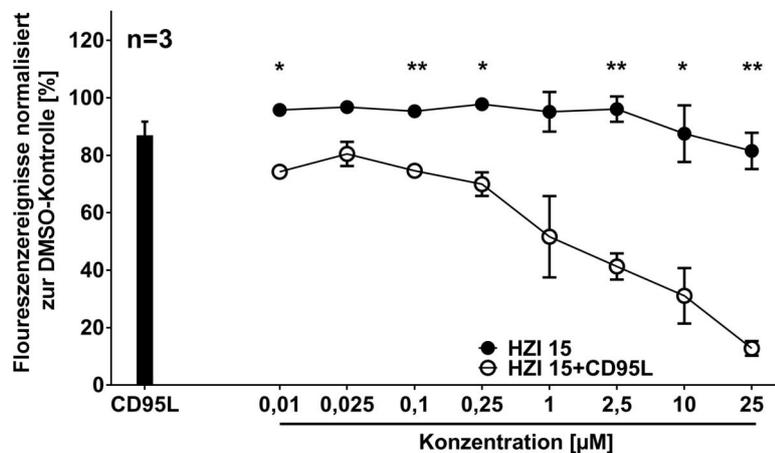


Abbildung 3.34: Sensitivierung von clearCa-4 Zellen auf CD95L-Stimulation durch HZI 15 Behandlung. ClearCa-4 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von HZI 15 in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml CD95L für 18 h wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben behandelt und die Viabilität der Zellen wurde mittels Resazurin-Test bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde aus n=3 Wiederholungen bestimmt, mit * bei $p < 0,0332$ und ** bei $p < 0,0021$.

3.9.6 Effekt von HZI 15 auf die Expression von c-FLIP auf Protein- und mRNA-Ebene

Der Einfluss von HZI 15 auf das c-FLIP-RNA-Level in clearCa-4 Zellen wurde für zwei verschiedene Konzentrationen getestet. Auf das c-FLIP_L-Level haben sowohl 10 μM als auch 25 nM nach 24 und 48 h keinen Einfluss (Abb. 3.35 A). Nach 72 h nimmt der c-FLIP_L-mRNA-Gehalt leicht ab, vor allem bei 10 μM . Der c-FLIP_S-mRNA-Gehalt ist nach 24 h mit 10 μM leicht erhöht, sinkt danach aber auf den Gehalt der DMSO-Kontrolle ab. Bei 25 nM ist sowohl nach 24 als auch nach 48 h der c-FLIP_S-mRNA-Gehalt leicht erhöht und nimmt nach 72 h um etwa die Hälfte ab. Wird der Gesamt-c-FLIP_{L+S}-mRNA-Gehalt betrachtet, so fällt auf, dass sowohl bei 10 μM als auch bei 25 nM mit zunehmender Zeit der mRNA Gehalt sinkt. Nach 24 h Behandlung mit HZI 15 liegt der Gehalt jedoch fast doppelt so hoch wie bei der DMSO-Kontrolle. Nach 48 h liegt der Gehalt bei beiden getesteten Konzentrationen etwa

so hoch wie der Ausgangswert der DMSO-Kontrolle. Erst nach 72 h sinkt der mRNA-Gehalt von c-FLIP_{L+S}.

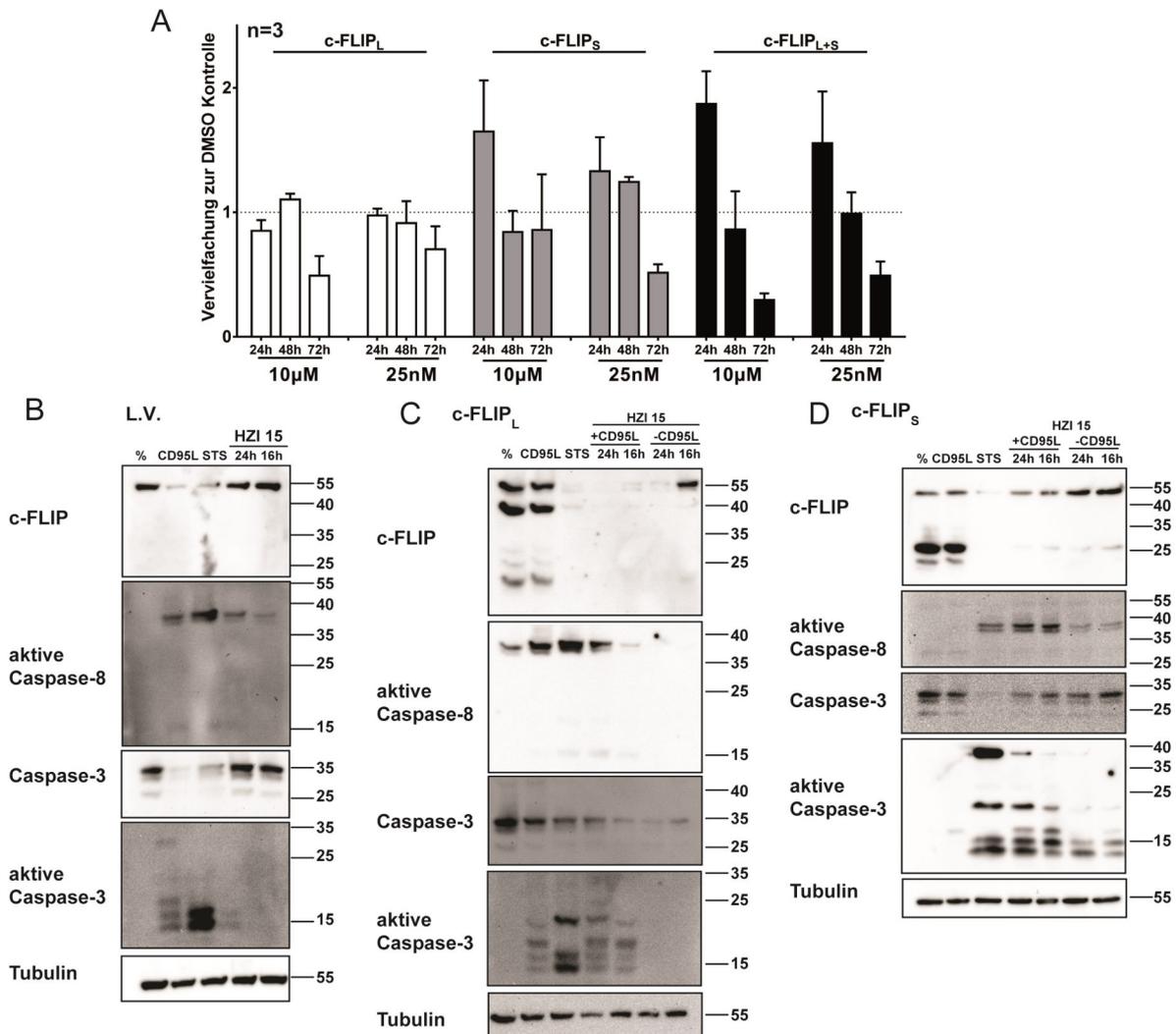


Abbildung 3.35: HZI 15 wirkt auf Protein- aber nicht auf mRNA-Ebene. (A) Verschiedene Konzentrationen HZI 15 wurden über die angegebenen Zeiträume auf clearCa-4 Zellen gegeben und der c-FLIP-mRNA-Gehalt wurde mittels qPCR bestimmt. Im Western Blot (B, C und D) wurden die Proteinlysate von Leervektor (B), c-FLIP_L (C) und c-FLIP_S-Zellen (D) nach Behandlung mit 5 μM HZI 15 für 18 h (siehe Beschreibung des Versuchsablaufs in Abschnitt 2.6.3) auf den Gehalt an c-FLIP und die Aktivierung von Caspasen analysiert. Die Behandlung mit CD95L erfolgte mit 100 ng/ml für 16 h. Die Kontrolle mit STS wurde mit 1 μM für 16 h durchgeführt.

Auf Proteinebene wurde die Wirkung von HZI 15 auf Leervektorzellen, c-FLIP_L- und c-FLIP_S untersucht. Bei den Leervektorzellen ist kein Rückgang der Expression von c-FLIP nach 16 oder 24 h zu erkennen (Abb. 3.35 B). Die Caspase-8 wird durch HZI 15-Behandlung leicht aktiviert, Caspase-3 jedoch nur sehr minimal nach 24 h. Auch PARP wird durch HZI 15 nicht aktiviert. In Leervektorzellen werden also Caspasen durch HZI 15 leicht aktiviert, diese Aktivierung führt jedoch nicht zur Apoptose. Werden c-FLIP_L-Zellen mit HZI 15 behandelt, so zeigt sich ohne CD95L-Stimulation, dass nach 16 h c-FLIP_L noch exprimiert wird, nach 24 h kein c-FLIP_L mehr nachgewiesen werden kann (Abb. 3.35 C). Da zu diesen Zellen nur HZI 15 gegeben wurde, ist HZI 15 für die Abnahme von c-FLIP_L-Protein nach 24 h verantwortlich. Mit zusätzlicher Stimulation durch CD95L ist kein c-FLIP_L mehr nachweisbar.

3 Ergebnisse

Ob dies durch HZI 15 hervorgerufen ist oder durch generelle Abbauprozesse während der Apoptose, lässt sich hier aber nicht bestimmen. Es ist auch zu sehen, dass in den unbehandelten und CD95L-stimulierten Zellen c-FLIP_S und c-FLIP_R schwach sichtbar sind, die in den HZI 15-behandelten Zellen nicht mehr sichtbar sind. HZI 15 scheint also nicht nur eine Wirkung auf c-FLIP_L, sondern auf alle c-FLIP Isoformen zu haben.

Daher wurden auch c-FLIP_S exprimierende HT 1080 Zellen mit HZI 15 behandelt und im Western Blot analysiert (Abb. 3.35 D). Dabei fällt auf, dass c-FLIP_S unabhängig von der CD95L-Stimulation durch HZI 15-Einfluss nicht mehr bzw. nur noch sehr schwach exprimiert wird. Dies führt auch ohne CD95L-Stimulation zu einer schwachen Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3. Wesentlich stärker ausgeprägt ist die Aktivierung der Caspasen bei der Behandlung mit HZI 15 und gleichzeitiger Stimulation mit CD95L. Dies ist besonders im Vergleich zur CD95L-Kontrolle zu betrachten, bei der keine Caspasen-Aktivierung hervorgerufen wird. HZI 15 vermag also die c-FLIP_S-Zellen stark auf die CD95L-induzierte Apoptose zu sensibilisieren.

4 Diskussion

4.0.1 Identifizierung von c-FLIP-modulierenden Substanzen

Das wichtige Apoptose-modulatorische Protein c-FLIP spielt eine Rolle in vielen Krankheiten, z.B. bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen oder bei Tumoren. Daher würden c-FLIP-beeinflussende Medikamente eine breite klinische Anwendung finden. Es ist noch keine Substanz bekannt, die direkt auf c-FLIP wirkt, daher ist das Ziel dieser Arbeit, Wirkstoffe zu finden und zu charakterisieren, die c-FLIP modulieren. Eine Bibliothek von 259 Substanzen aus myxobakteriellen Reinsubstanzen wurde auf ihre c-FLIP-modulierende Wirkung getestet. Die Substanzen dieser Bibliothek sind für ihre ungewöhnlichen und vielfältigen Wirkmechanismen bekannt und die immunmodulatorische Wirkung einer Substanz aus der Bibliothek, Soraphen A, wurde schon genauer charakterisiert (Berod et al., 2014). Für das Screening wurden c-FLIP_L-überexprimierende HT 1080 Zellen in einem Viabilitätsassay verwendet. Es wurden ausschließlich c-FLIP-inhibierende Substanzen gefunden. Die Parameter des Screenings favorisierten destabilisierende Wirkstoffe gegenüber c-FLIP-Stabilisatoren. So war die eingesetzte Konzentration des Todesliganden CD95L dafür optimiert, dass eine möglichst hohe Konzentration eingesetzt wurde, bei der die c-FLIP-überexprimierende Zellen trotzdem überlebten. Dies stellt sicher, dass eine Reduktion von c-FLIP zum Tod der überexprimierenden Zellen führt. Daher ist zum Identifizieren von c-FLIP-stabilisierenden Substanzen ein neues Screening mit anderen Parametern, vor allem der CD95L-Konzentration, notwendig. Dabei müsste das Screening auf die Detektion von Resistenzen gegenüber CD95L optimiert werden. Dafür wäre eine möglichst geringe CD95L-Konzentration nötig, bei der HT 1080-Zellen gerade so Apoptose begehen. Dazu wäre eine Anpassung der Inkubationszeit vorteilhaft, damit sowohl sterische stabilisierende Effekte als auch eine Hochregulierung der c-FLIP-Expression detektiert werden kann.

Von den 259 Substanzen wurden 13 als „Hits“ klassifiziert. Davon konnten elf genauer charakterisiert werden. Die Strukturen von zehn der elf genauer getesteten Substanzen sind in Abb. 4.1 dargestellt. Die drei Wirkstoffe Sorangiolid A, Ripostatin A und Maltepolid A weisen alle einen Makrolidring auf (Irschik et al., 1995b; Irschik et al., 1995a; Irschik et al., 2013). Eine ähnliche Struktur ist bei Angiolam A mit einem Makrolaktamring zu finden (Kunze, 1985). Antibiotika mit Makrolid- und Makrolaktamringen wirken über die Inhibierung der Proteinbiosynthese (Irschik et al., 1995b; Kunze, 1985). Die beiden Substanzen Argyrin C und Myxovalargin A sind Peptide (Sasse et al., 2002; Irschik und Reichenbach, 1985). Dabei besitzt Argyrin C eine Tryptophan-Gruppe, die als „Anker“ in einer lipophilen Umgebung wie etwa der Zellmembran oder einer hydrophoben Tasche (wie sie in c-FLIP eine für die Funktion essentielle Struktur darstellt) dienen könnte. Insgesamt weisen die meisten Strukturen Ketten auf, die Polyketidelemente haben und vermutlich über die Polyketidsynthese hergestellt wurden. Diese lipophilen Seitenketten könnten dazu notwendig sein, dass die Substanzen in die Zelle gelangen oder sich in die Zellmembran einlagern. Zudem sind die meisten Substanzen eher asymmetrisch aufgebaut, mit einem Ringsystem einerseits und der lipophilen Seitenkette andererseits. Eine optimale c-FLIP inhibierende Substanz würde die Interaktion von c-FLIP und Caspase-8 oder FADD direkt am DISC verhindern. Für die Rekrutierung von c-FLIP zum DISC ist der hydrophobe Fleck notwendig (Ueffing et al., 2008a; Majkut et al., 2014). Eine Substanz, die an der hydrophoben Stelle die Interaktion zwischen c-FLIP und dem DISC verhindern soll, sollte also sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften aufweisen. Einige der gefundenen Wirkstoffe, z.B. Argyrin

4 Diskussion

C, Angiolam A, Jerangolid H oder Sorangiolid A erfüllen diese Voraussetzungen. Ob sie jedoch direkt mit dem DISC interagieren, konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Im Annexin V/7AAD-Test konnte gezeigt werden, dass alle Substanzen zusammen mit CD95L Apoptose in HT 1080 Zellen auslösen. Myxothiazol A trat dabei als relativ toxische Substanz zutage, die auch ohne zusätzliche Stimulation Apoptose in den Zellen auslöst. Die einzelnen Apoptosetests wie Resazurintest, Nicoletti-Test, Caspase-3/7-Test und Annexin V/7AAD-Test ergaben relativ heterogene Ergebnisse. Diese könnten sich einerseits mit unterschiedlicher Sensitivität der Nachweise erklären lassen, aber auch damit, dass in unterschiedlichen Apoptosetests unterschiedliche Apoptosestadien untersucht werden.

Der Resazurintest weist zum Beispiel metabolisch inaktive Zellen nach, diese können entweder tot, in einem Ruhestadium oder durch einen Wirkstoff metabolisch gehemmt sein. Apoptotische Zellen sind nicht unbedingt metabolisch inaktiv. Der Resazurintest ist zwar dafür bekannt, dass insbesondere mitochondrielle Aktivität für die Reduzierung von Resazurin verantwortlich ist, da aber auch Mycoplasmen- und andere bakterielle Proliferation mit diesem Test ausgewertet werden kann, können mitochondrielle Proteine nicht die einzige Reduktionsquelle für Resazurin sein. Da eine Mycoplasmeninfektion eine Fehlerquelle für den Resazurintest darstellt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zellen regelmäßig auf Mycoplasmen getestet. Ausschließlich Mycoplasmen-negative Zelllinien wurden für die Versuche verwendet.

Der Nicoletti-Test hat eine hohe Fehlerrate und auch bei den Kontrollen teilweise eine niedrige Apoptoserate angezeigt. Mikroskopisch waren die Zellen jedoch apoptotisch, sodass eine Optimierung dieses Experimentes notwendig ist, um belastbare Schlüsse aus diesem Test ziehen zu können.

Auch beim Caspase-3/7-Test waren teilweise nur sehr niedrige Apoptoseraten messbar. Die Aktivierung von Caspasen ist zwar der bedeutendste Schritt zur Definition von Apoptose, wann jedoch nach Zugabe der Substanzen und der Stimulation von CD95L die Aktivierung der Caspasen am höchsten ist, kann durchaus substanzspezifisch sein. Messungen nach kurzer Inkubationszeit (4-8 h, Ergebnisse nicht dargestellt) haben kaum eine Aktivierung von Caspasen gezeigt, während eine längere Inkubationszeit zu höheren Apoptoseraten geführt hat (sichtbar z.B. in Abb. 3.15).

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte der Annexin V/7AAD-Test höhere Apoptoseraten als der Caspase-3/7-Test. Er scheint also, mit den hier verwendeten Protokollen, sensitiver apoptotische Zellen nachzuweisen. Bei beiden Tests sind aktive Caspasen für ein positives Ergebnis notwendig. Caspasen sind unter anderem auch notwendig, um die Flippasen zu spalten, die Phosphatidylserin (PS) von der äußeren Seite der Zellmembran zur innen Seite der Zellmembran verlagern (Muthusamy et al., 2009). Daher muss eine Aktivierung von Caspasen stattgefunden haben, bevor der Annexin V-Test positiv ausfallen kann.

4.0.2 Argyrin C als c-FLIP-inhibierende Substanz

Argyrin C war die Substanz, die c-FLIP_L-Zellen im Screening am effektivsten auf CD95L-Behandlung sensitiviert hat. Diese Substanz ist aus mehrfacher Hinsicht ein sehr interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen.

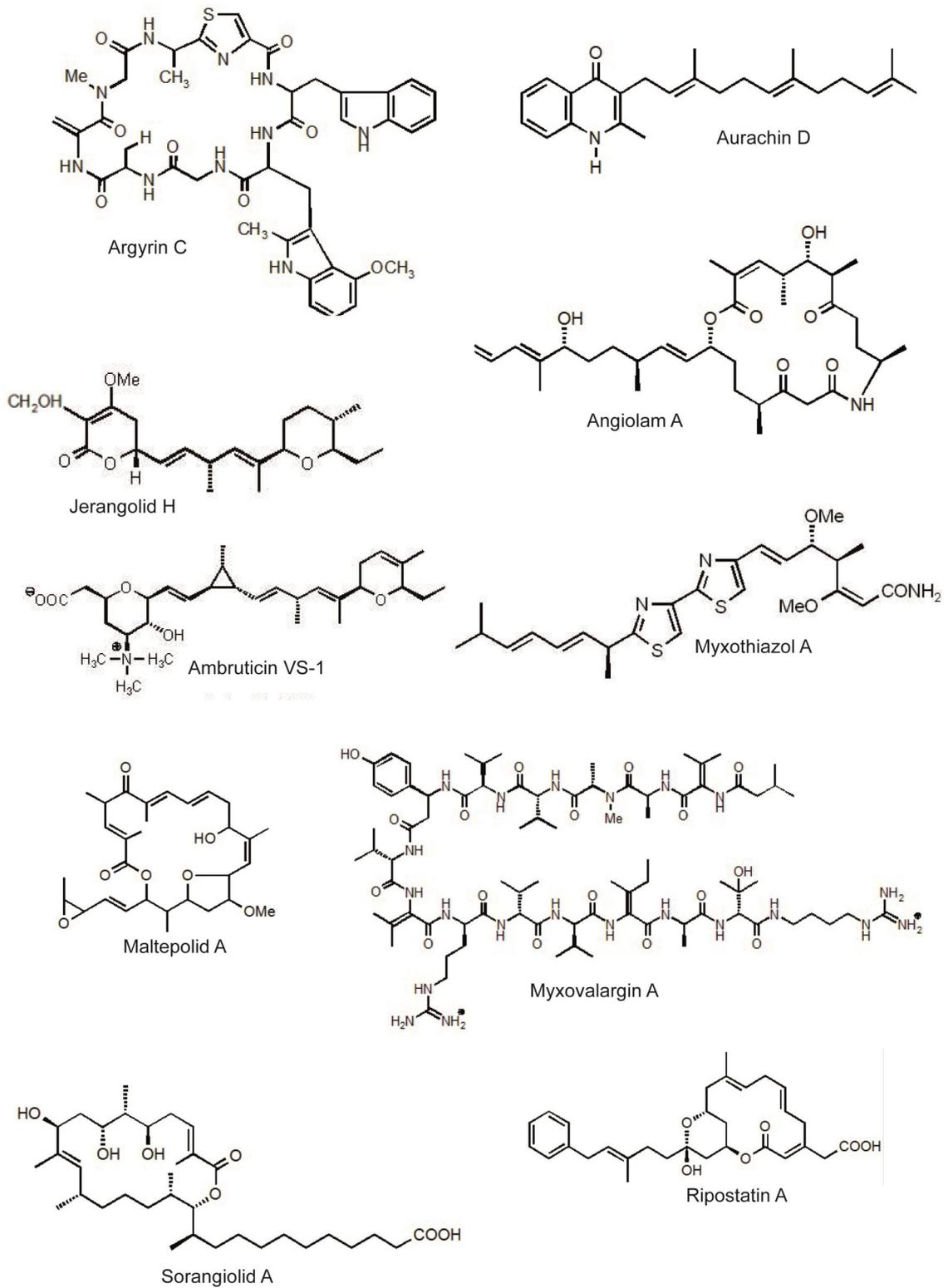


Abbildung 4.1: Darstellung der Strukturen von zehn der elf getesteten Substanzen. HZI 15 wird aus Gründen des Patentschutzes nicht dargestellt. Die Strukturen sind modifiziert nach *Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien und anderen Mikroorganismen* 1996.

4 Diskussion

Argyrine sind eine Gruppe aus bislang acht bekannten Mitgliedern (Argyrin A-H) und bestehen aus zyklischen Peptiden. Sie werden von Stämmen des Myxobakteriums *Archangium* und *Cystobacter* produziert und wurden erstmals von Sasse et al. im Jahr 2002 beschrieben. Argyrine haben eine wachstumsinhibierende Wirkung auf murine L929-Zellen und auch auf humane Zelllinien, wobei die cytotoxische Wirkung stark von der jeweiligen Zelllinie abhängt (Sasse et al., 2002). Sie zeigen eine eher leichte antibakterielle und antifungische Aktivität. Die höchste Sensitivität zeigen zwei *Pseudomonas*-Arten. Hefen konnten mit Argyrinen nicht im Wachstum beeinträchtigt werden und auch filamentöse Pilze zeigen in Gegenwart von Argyrin A-D, wenn überhaupt, nur eine unvollständige Inhibition (Sasse et al., 2002). Schon diese erste Veröffentlichung beschreibt eine immunmodulatorische Wirkung von Argyrinen. Argyrin B zeigt eine starke inhibitorische Aktivität auf die T-Zell-unabhängige Antikörperproduktion muriner B-Zellen (Sasse et al., 2002). Dabei wurden Milzzellen von C57BL/6 nu/nu und C57BL/6 Mäusen entweder mit 2,4,6-Trinitrophenylhapten (TNP)-LPS oder mit 2,4-Dinitrophenyl-Alanylglycylglycyl (DAGG)-Ficoll stimuliert und auf ihre IgM Antikörperproduktion gegen Dinitrophenyl-Ovalbumin untersucht. Argyrin B konnte die B-Zell-unabhängige Antikörperproduktion in Antwort auf TNP-LPS Stimulation deutlicher inhibieren als die Antikörperproduktion nach DAGG-Ficoll Stimulation. Argyrin B zeigt auch eine inhibitorische Wirkung bei der sogenannten Zwei-Wege Reaktion muriner gemischter Lymphozyten (MLR), die ein *in vitro* Modell für alloantigen-gesteuerte T-Zell Aktivierung und Proliferation ist (Meo, 1979). Auch bei menschlichen B-Zellen konnte Argyrin B deutlich die IgG-Antikörperproduktion nach CD40/IL-4 oder *S. aureus* Cowan I-Stimulation hemmen. Argyrin B wurde auch als Substanz im Screening getestet. Da sie allerdings eine Toxizität von etwa 50 % gegen Leervektorzellen gezeigt hat, wurde sie als „zu toxisch“ eingestuft und nicht weiter untersucht. Im Screening konnte aber auch durchaus eine starke Verringerung der Viabilität der c-FLIP_L-Zellen nach Argyrin B-Behandlung und CD95L-Stimulation zu ca. 40 % festgestellt werden. Argyrin C wurde in dieser Arbeit nicht spezifisch auf die Inhibition der Antikörperproduktion von B-Zellen getestet. Bei der Untersuchung anderer Blutzellen wurde kein starker Einfluss auf die Viabilität von humanen PBMCs oder muriner T-Zellen gefunden (siehe Abb. 3.17 und 3.18).

Argyrin A wurde zudem als apoptoseinduzierende Substanz beschrieben, die eine Wirkung auf Krebszelllinien besitzt. Der Mechanismus beruht auf einer Stabilisierung von p27^{kip1}, da die S20-Untereinheit des Proteasoms inhibiert wird (Nickeleit et al., 2008). Die Stabilität von p27^{kip1} hat mehrere Auswirkungen auf die untersuchten Krebszellen gezeigt, wie die Induktion von Apoptose und der Einfluss auf bestehende Blutgefäße und die Verhinderung der Neubildung von Blutgefäßen zum Tumor (Nickeleit et al., 2008).

Das Protein c-FLIP ist sehr schnelllebig und wird durch Ubiquitinylierung im Proteasom abgebaut (Fulda et al., 2000; Schmitz et al., 2004; Poukkula et al., 2005). Somit scheint die proteasominhibierende Wirkung von Argyrinen gegensätzlich zu einer c-FLIP-inhibierenden Wirkung zu sein. Argyrin A wurde im Screening auf eine c-FLIP_L-sensitivierende Wirkung getestet. Es konnte aber außer einer leichten toxischen Wirkung von etwa 20 % auf Leervektorzellen und eine Sensitivierung auf etwa 85 % Viabilität bei c-FLIP_L-Zellen keine Wirkung festgestellt werden.

Die Argyrin C-Behandlung im Western Blot führte zu einer leichten Abnahme der 55 kDa-langen Form von c-FLIP_L (Abb. 3.20 B). Bei zusätzlicher Todesligand-Stimulation ist die c-FLIP_L-Expression stark vermindert. Unterhalb des p43-Fragments ist bei etwa 40 kDa noch ein kleineres c-FLIP Fragment sichtbar, das auch bei der STS-stimulierten Probe zu

sehen ist, nicht jedoch bei CD95L unstimulierten Proben oder bei den anderen Substanz-behandelten Proben. Ob die Abnahme der c-FLIP_L-Expression mit zusätzlicher CD95L-Stimulation die Ursache oder eine Folge von Apoptose ist, ist im Western Blot nicht erkennbar. Die Blockierung des Proteasoms durch Argyrin, wie in anderen Publikationen beschrieben, ist aber anscheinend nicht ausreichend, um den Abbau von c-FLIP zu verhindern.

Eine andere Veröffentlichung zeigt, dass Argyrin F eine apoptoseinduzierende Wirkung auf Bauchspeicheldrüsenkarzinomzellen besitzt (Chen et al., 2017). Es wurde im Mausmodell im Vergleich zum Zytostatikum Gemcitabin getestet und konnte zusammen mit Gemcitabin das Tumorstadium stärker verringern als Gemcitabin allein. Argyrin F konnte die Zellproliferation, Migration, Invasion und Zusammenlagerung von Bauchspeicheldrüsenkarzinomzellen *in vitro* beeinflussen. Zudem führte es zu Apoptose und Seneszenz in den behandelten Zellen und hatte einen Einfluss auf den Übergang der Zellen von der G1- zur S-Phase. Argyrin F war keine Substanz im durchgeführten Screening, daher ist keine Aussage über eine c-FLIP_L-inhibierende Wirkung möglich.

Schon geringfügige strukturelle Unterschiede zwischen den Isoformen von Argyrin haben verschiedene biologische Wirkungen zur Folge, wie die antibakterielle Wirkung über den Elongationsfaktor G von Argyrin B und die proteasominhibitorische Wirkung von Argyrin A zeigt (Stempel et al., 2018). Im Screening wurden verschiedene natürliche Derivate von Argyrin getestet (siehe Tab. 3.1). Dabei zeigte nur Argyrin B eine deutliche Toxizität gegenüber Leervektorzellen. Argyrin B und C zeigten eine deutliche Verringerung der c-FLIP_L-Sensitivität, das heißt, die c-FLIP_L-Zellen waren nach Substanzbehandlung sensitiver gegenüber CD95L-Stimulation. Die anderen Isoformen zeigten keine oder nur eine geringe Sensitivierung von c-FLIP_L Zellen auf CD95L-Stimulation. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die c-FLIP_L-Inhibierung durch Argyrin C sehr strukturspezifisch ist und auch bei eng verwandten Strukturen keine ähnliche Wirkung festzustellen ist.

Verschiedene chemische Derivate der Argyrine standen zur Verfügung. Daher konnten anhand dieser auch strukturelle Informationen über Argyrin C und dessen Wirkweise gewonnen werden. Da die Derivate keine c-FLIP-inhibierende Aktivität mehr besaßen, lässt dies den Schluss zu, dass die veränderten chemischen Gruppen notwendig für die Aktivität sein könnten. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die Azulen-Gruppe die chemischen Eigenschaften der Argyrine derartig verändert hat, dass sie ihre Wirkung verliert. Gründe dafür können sein, dass das Molekül schlechter in die Zelle und damit zu ihrem Wirkort gelangen kann oder dass sich die Löslichkeit in DMSO oder im Medium verschlechtert hat.

Die Azulen-Gruppe besitzt sowohl eine tiefblaue Farbe als auch fluoreszierende Eigenschaften. Leider wurden in den eingesetzten Konzentrationen von max. 25 µM die Substanzen so stark verdünnt, dass keine Blaufärbung oder Fluoreszenz mehr detektierbar war. Da die verwendeten Derivate keine Wirkung auf c-FLIP_L-Zellen mehr gezeigt haben, konnte auch leider keine Immunpräzipitation des DISCs durchgeführt werden. Mit diesem hätte eventuell nachgewiesen werden können, ob Argyrin C direkt am DISC wirkt. Wenn der präzipitierte DISC ebenfalls eine blaue Färbung gehabt hätte, wäre dies ein Hinweis darauf gewesen, dass Argyrin sich im DISC anreichert. Eventuell hätte auch eine durch die Argyrin-Derivate hervorgerufene Fluoreszenz im präzipitierten DISC nachgewiesen werden können. Die eingesetzten Substanzmengen waren auch zu gering, um per Fluoreszenzmikroskop den Wirkort der Argyrin C-Derivate in der Zelle bestimmen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Argyrin A und F in der Literatur als apoptose-auslösende Substanzen gegen Krebszelllinien beschrieben wurden (Nickeleit et al., 2008;

Chen et al., 2017). Dies passt zu der Beobachtung, dass auch Argyrin C in höheren Konzentrationen toxisch auf die humane Fibrosarkomzelllinie HT 1080 wirkt. Ein toxischer Effekt wurde bisher jedoch immer der proteasom-inhibierenden Wirkung auf die S20-Untereinheit zugeschrieben, ein Zusammenhang mit dem extrinsischen Apoptosesignalweg wurde bisher nicht untersucht. Daher erklärt die beschriebene mögliche Wirkweise nicht, dass Argyrin C in Gegenwart von CD95L c-FLIP-überexprimierende Zellen auf Apoptose sensitivieren kann. Im Screening wurde nur bei Argyrin C eine deutliche Apoptosesensitivierung ohne starke toxische Wirkung festgestellt. Interessanterweise wurde schon 2002 eine immunmodulatorische Wirkung von Argyrin B auf B-Zellen beschrieben (Sasse et al., 2002). Es ist bekannt, dass die meisten Immunzellen für ihre Entwicklung und ihr Überleben auf c-FLIP angewiesen sind (Koenig et al., 2014; Kataoka und Tschopp, 2004; Golks et al., 2006; Plaza-Sirvent et al., 2017). Daher wären Untersuchungen, ob eine c-FLIP-Reduzierung für die inhibitorische Wirkung von Argyrin B und C auf andere Immunzellen (wie z.B. B-Zellen) verantwortlich ist, sinnvoll. Ebenso ist eine weitergehende Untersuchung der Wirkung von Argyrin C auf B-Zellen bzw. von Argyrin B auf andere Immunzellen interessant, um die immunmodulatorische Wirkung der Argyrine weiter zu charakterisieren.

4.0.3 Aurachin D als c-FLIP-inhibierende Substanz

Aurachine werden von den Myxobakterien *Stigmatella* oder den Actinobakterien *Rhodococcus* produziert. Sie sind charakterisiert durch einen Quinolon oder einen Quinolin-Kern, mit einer Farnesylkette an der Position C3 oder C4. Sie wurden ursprünglich als Atmungsketteninhibitoren beschrieben, die spezifische Cytochromkomplexe inhibieren können (Li et al., 2013). Sie sind dafür bekannt, dass insbesondere Aurachin C und D in Säugetierzellen die NADH-Oxidation in submitochondriellen Partikeln inhibieren können (Kunze et al., 1987). Dies geschieht durch die Inhibierung der Komplexe I und III in der mitochondrialen Atmungskette (Friedrich et al., 1994). Aurachine sind aber auch für die Inhibierung des Photosystems II und des Cytochrom *bf* Komplexes in photoaktiven Mikroorganismen und der Quinol-Oxidationsstelle der bakteriellen Cytochrome *bo* und *bd* bekannt (Aurachin D inhibiert spezifisch Cytochrom *bd*) (Oettmeier et al., 1990; Meunier et al., 1995). Durch diese Aktivität sind Aurachine bisher vor allem als Antibiotika bekannt, vor allem für Gram-positive Bakterien. Ein Effekt auf Gram-negative Bakterien ist nur für *E. coli* TolC bekannt, der einen Defekt in einer Membranpumpe zum Ausströmen von Substanzen hat (Li et al., 2013). Aurachine haben keinen Effekt auf Hefen oder Pilze, dafür aber auf Parasiten wie *Plasmodium* oder *Trypanosoma* (Li et al., 2013).

Aurachin D gilt mit Aurachin C als eines der am stärksten wirksamen Aurachine. Es wirkt in einigen Zelllinien cytotoxisch, so in der humanen Darmkrebszelllinie HCT-116, in der Leukämiezelllinie K562 sowie in humanen U2 OS Osteosarkomzellen (Li et al., 2013). Als Wirkmechanismus wird die Induktion intrinsischer Apoptose angenommen, da das mitochondrielle Membranpotential abnimmt (Li et al., 2013). Ein chemisches Derivat, das auch toxisch auf die Osteosarkomzellen wirkt, verringert allerdings nicht das mitochondrielle Membranpotential. Bei diesem wird eine vermehrte ROS-Produktion als Ursache für den Zelltod angenommen (Li et al., 2013). Aurachin D ist zusammengefasst in der Literatur als apoptoseauslösende Substanz bekannt, die den intrinsischen Apoptosesignalweg stimuliert. Bei Langzeituntersuchungen wurden auch in dieser Arbeit toxische Effekte von Aurachin D beobachtet, jedoch nicht in den 16 h der typtischen Versuchsanordnung. In

diesem Zeitraum sind jedoch die apoptosesensitivierenden Effekte auf den extrinsischen Signalweg aufgetreten. Es sind verstärkende Zusammenhänge zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Apoptosesignalweg bekannt, sodass eine sensitivierende Wirkung auf den intrinsischen Apoptosesignalweg auch eine Sensitivierung auf den extrinsischen Apoptosesignalweg bedingen könnte. Dagegen spricht allerdings, dass Aurachin D bei Caspase-9-defizienten Zellen keine andere Wirkung zeigt als bei Caspase-9-rekonstituierten Zellen. Dies spricht dafür, dass Aurachin D noch eine andere Wirkweise besitzt, die für die Wirkung auf den extrinsischen Apoptosesignalweg verantwortlich ist. Um dies zu überprüfen, sind Bindungsassays von Aurachin D an c-FLIP oder andere Moleküle des extrinsischen Apoptosesignalwegs notwendig.

4.0.4 HZI 15 als c-FLIP-inhibierende Substanz

Die Substanz HZI 15 zeigt in einigen Assays, insbesondere dem Annexin V/7AAD-Test, interessante Eigenschaften. Die Wirkkonzentration reicht bis zur geringsten getesteten Konzentration von 10 nM und der apoptoseauslösende Effekt ist homogen mit allen getesteten Methoden nachweisbar. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Ascenion GmbH, dem Technologietransferpartner der Helmholtz-Gemeinschaft, beschlossen, dass die Substanz verblindet und keine Struktur veröffentlicht wird, um eine möglichen Patentierung der Substanz durch das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung nicht zu gefährden.

4.0.5 Mögliche Wirkmechanismen der myxobakteriellen Substanzen

Für das Naturstoffscreening wurden HT 1080 Zellen mit einer Überexpression von c-FLIP_L im Vergleich zu Leervektorzellen verwendet. Im Western Blot und per Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass sich diese Zellen sowohl in der Rezeptorexpression als auch in der Expression der Proteine des extrinsischen Apoptosesignalwegs (abgesehen von der c-FLIP-Expression) nicht unterscheiden (siehe Abb. 3.1). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die im Screening als „Hits“ bezeichneten Substanzen einen Einfluss auf c-FLIP_L haben. Auf welcher Ebene die Inhibition von c-FLIP stattfindet, wurde durch verschiedene Experimente untersucht.

Die Versuche mit Jurkat-Zellen mit Defekten im extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweg haben gezeigt, dass alle drei näher charakterisierten Substanzen Argyrin C, Aurachin D und HZI 15 auf den extrinsischen Signalweg der Apoptose für ihre Wirkung angewiesen sind (siehe Abb. 3.16, 3.25, 3.31). Zudem haben die Substanzen auf Jurkats mit einem Defekt im intrinsischen Signalweg nicht anders gewirkt als auf die rekonstituierten Zellen, sodass auch die bisher bekannte Wirkung von Aurachin D als Atmungsketteninhibitor nicht mit der Wirkung als c-FLIP-inhibierende Substanz erklärt werden kann.

Alle drei genauer charakterisierten Substanzen haben den RNA-Gehalt von c-FLIP_L oder c-FLIP_S nach 24 h nicht verringert. Einzig die mit HZI 15 behandelten Proben wiesen nach längeren Inkubationszeiten eine Reduktion des c-FLIP-RNA-Gehalts auf. Eine Verringerung der c-FLIP Expression auf RNA-Ebene ist also nicht der Wirkmechanismus der untersuchten Substanzen.

4 Diskussion

Im Western Blot verringerte sich die c-FLIP_L-Expression nach der Behandlung mit Argyrin C kaum. Bei der Behandlung mit Aurachin D ist eine Verringerung der c-FLIP_L Expression im Vergleich zu unbehandelten c-FLIP_L-Zellen sichtbar. HZI 15 zeigt einen Effekt auf die c-FLIP_L-Expression, da nach 16 h noch c-FLIP_L-Protein nachweisbar ist, nach 24 h jedoch nicht mehr. Nach 16 h HZI 15 Behandlung ist bei c-FLIP_S-überexprimierenden Zellen eine deutliche Reduktion von c-FLIP_S sichtbar. Dabei ist gleichzeitig eine Zunahme von c-FLIP_L sichtbar. Wird eine zusätzliche Stimulation mit CD95L durchgeführt, so nimmt der c-FLIP_L-Gehalt nach Argyrin C- und Aurachin D- und HZI 15-Behandlung deutlich ab, teilweise bis unter die Nachweisgrenze. Da c-FLIP während der Apoptose abgebaut wird (Öztürk et al., 2012), kann die Kausalität nicht geklärt werden, ob die Verringerung von c-FLIP Protein zur Apoptose führt oder ob die Apoptose der Zelle zum Abbau von c-FLIP führt. Die Vermutung, dass der Wirkmechanismus auf Protein-Ebene liegt und entweder mit der Regulierung von c-FLIP oder mit der Protein-Protein-Interaktion am DISC zu tun hat, liegt nahe.

Über die Frage des genauen Wirkmechanismus der drei genauer charakterisierten Substanzen kann also nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit ist, dass der Abbau von c-FLIP beschleunigt wird, indem etwa eine E3-Ubiquitin-Ligase (z.B. Itch) aktiviert wird. Die E3-Ligase Itch ist dafür bekannt, dass sie c-FLIP ubiquitinyliert und so zur Regulation der c-FLIP Expression beiträgt (Chang et al., 2006). Dieser Mechanismus könnte für Aurachin D zutreffen, da hier eine Verringerung der c-FLIP-Expression durch Behandlung mit Aurachin D sichtbar war. Auch die c-FLIP_S-Expression wurde durch HZI 15 verringert, auch hier könnte die Aktivierung einer spezifischen E3-Ligase vorliegen. Dies würde auch den Unterschied zur c-FLIP_L-Expression in c-FLIP_S-Zellen erklären, die nach HZI 15 Behandlung sogar angestiegen ist und erst nach CD95L-Stimulation abnimmt.

Eine andere Möglichkeit der Wirkung von Argyrin C, Aurachin D und HZI 15 ist, dass diese Substanzen direkt auf c-FLIP wirken und bei der Anlagerung an c-FLIP zur Konformationsänderung der c-FLIP-Proteine führen. Eine Misfaltung von Proteinen führt zu deren Ubiquitinierung (Esser et al., 2004). Dies führt dann ebenfalls zum Abbau von c-FLIP und zu einer Sensitivierung der Zellen.

Ob die Substanzen direkt an c-FLIP oder den DISC binden können und so die Protein-Protein-Interaktionen direkt dort modifizieren können, kann durch Experimente wie den *Thermal-Shift-Assay* (direkte Messung, ob Liganden an Proteine binden) oder dem *In-vitro FLICE-assay* (Medema et al., 1997) (indirekte Messung, ob die Aktivierung von Caspase-8 in Gegenwart von c-FLIP und den Substanzen möglich ist) herausgefunden werden. Eine andere Möglichkeit ist die chemische Modifizierung der Substanzen etwa durch Biotinylierung, wodurch dann ein *Pull-Down-Assay* möglich ist.

4.0.6 Schlussbemerkungen

Bei vielen Krankheiten, von Autoimmunkrankheiten über Infektionen, neurodegenerativen Krankheiten bis hin zur Krebsentstehung spielt die Regulation von Apoptose eine entscheidende Rolle. c-FLIP als Apoptoseregulator ist dabei ein entscheidender Faktor, für den jedoch noch keine spezifischen Wirkstoffe gefunden wurden. Eine Inhibierung oder Stabilisierung von c-FLIP würde bei der Feinregulierung einer gestörten Apoptose nützlich sein und somit bei vielen Krankheiten eine Anwendung finden können. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung von c-FLIP-modulierenden Substanzen.

Mit Hilfe einer c-FLIP_L-überexprimierenden Zelllinie wurde ein Screening von myxobakteriellen Substanzen durchgeführt, um c-FLIP_L-destabilisierende Wirkstoffe zu finden. Von elf als „Hits“ ausgewählten Substanzen wurden drei Substanzen näher charakterisiert. In dieser präklinischen Phase der Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Substanzen tatsächlich durch die Auslösung von Apoptose wirken und ihre Toxizität wurde in Kinetiken bewertet. Auch weiterführende Toxizitätsstudien mit murinen T-Zellen und humanen PBMCs wurden durchgeführt. Ein erster Schritt der Mechanismusaufklärung wurde für alle drei Substanzen durchgeführt, da festgestellt wurde, dass sie c-FLIP nicht auf mRNA- sondern auf Proteinebene hemmen. Ob diese Hemmung durch eine direkte Interaktion am DISC, durch die Induktion der Zersetzung von c-FLIP oder einen anderen Mechanismus herbeigeführt wird, ist noch unklar.

Für die Untersuchung von Argyrin C stand die Möglichkeit zur Verfügung, verwandte chemisch synthetisierte Derivate zu testen. Obwohl die eingebrachte Azulengruppe nicht direkt detektiert werden konnte, wurde festgestellt, dass die chemische Veränderung an den eingebrachten Stellen die Toxizität aber auch die apoptoseauslösende Wirkung von Argyrin C komplett verhinderten. Andere chemische Derivate könnten weitere Erkenntnisse zur Wirkung notwendiger Strukturen beisteuern und eventuell die Wirkung verbessern oder die Toxizität verringern. Weitere Untersuchungen zum genauen Wirkmechanismus sind in Vorbereitung, so z.B. Interaktionsstudien der Substanzen mit c-FLIP.

Da das Screening auf c-FLIP-inhibierenden Substanzen sich als belastbar erwiesen hat, wäre auch ein neues Screening auf c-FLIP-stabilisierende Substanzen denkbar.

Verwendete Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
ACC-1	Acetyl-CoA-Carboxylase-1
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
Apaf-1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
ALPS	autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APP	amyloides Vorläuferprotein
AzuAla	β -(1-azulenyl)-l Alanin
BAK	<i>Bcl-2 antagonist/ killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
Caspasen	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen
DAGG	2,4-Dinitrophenyl-Alanylglycylglycyl
DAMP	<i>danger associated molecular pattern</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negative
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FKS	fötales Kälberserum
c-FLIP	zelluläres <i>FLICE-inhibitory protein</i>
v-FLIP	virales <i>FLICE-inhibitory protein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>
mM	Millimolar

Verwendete Abkürzungen

NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIPK	Rezeptor-interagierende Proteinkinase
RSB	Reduzierungspuffer
RT	Raumtemperatur
tBid	trunkiertes Bid
Th2	Typ 2 Helfer-T-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNP	2,4,6-Trinitrophenylhapten
TRADD	Tumornekrosefaktor Rezeptor Typ-I assoziierte Todesdomänenprotein
Tregs	regulatorische T-Zellen
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STS	Staurosporin

Literatur

- Aachoui, Y. et al. (2013). Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. In: *Current Opinion in Microbiology* 16.3, S. 319–326.
- Abedini, M. R. et al. (2008). Cisplatin induces p53-dependent FLICE-like inhibitory protein ubiquitination in ovarian cancer cells. In: *Cancer Research* 68, S. 4511–4517.
- Abedini, M. R. et al. (2010). Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein. In: *Oncogene* 29, S. 11–25.
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. In: *Nature Reviews Immunology* 3, S. 745–756.
- Alderson, M. R. et al. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. In: *The Journal of Experimental Medicine* 181.1, S. 71–77.
- Ashkenazi, A. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. In: *Science* 281, S. 1305–1308.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. In: *Nature Reviews Cancer* 2, S. 420–430.
- Barnhart, B. C. et al. (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. In: *The EMBO Journal* 23, S. 3175–3185.
- Barres, B. A. und M. C. Raff (1999). Axonal control of oligodendrocyte development.
- Bennett, C. L. et al. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. In: *Nature Genetics* 27, S. 20–21.
- Berod, L. et al. (2014). De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. In: *Nature Medicine* 20, S. 1327–1335.
- Bidere, N., H. C. Su und M. J. Lenardo (2006). Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. In: *Annual Review of Immunology* 24, S. 321–352.
- Bielecki, P. et al. (2012). Mutation in elongation factor G confers resistance to the antibiotic argyrimycin in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. In: *ChemBioChem* 13, S. 2339–2345.
- Boldin, M. P. et al. (1995). A Novel Protein That Interacts with the Death Domain of Fas/APO1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 270.14, S. 7795–7798.
- Bouillet, P., D. Metcalf und D. C. Huang (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. In: *Science* 286, S. 1735–1738.
- Brunner, T. et al. (1995). Cell-autonomous fas (CD95)/fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. In: *Nature* 373, S. 441–444.
- Budd, R. C., W.-C. C. Yeh und J. Tschopp (2006). cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. In: *Nature Reviews Immunology* 6, S. 196–204.
- Castro, C. N. et al. (2015). Microbe-associated immunomodulatory metabolites: Influence on T cell fate and function. In: *Molecular Immunology* 68.2, S. 575–584.
- Chang, D. W. et al. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. In: *The EMBO Journal* 22, S. 2132–2142.
- Chang, D. et al. (2002). C-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. In: *The EMBO Journal* 21, S. 3704–3714.
- Chang, L. et al. (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIPLturnover. In: *Cell*.

Literatur

- Charlop-Powers, Z. et al. (2014). Chemical-biogeographic survey of secondary metabolism in soil. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, S. 3757–3762.
- Chen, L. et al. (2010). CD95 promotes tumour growth. In: *Nature* 465, S. 492–496.
- Chen, W. J. (2016). Honoring antiparasitics: The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine. In: *Biomedical Journal* 2.2, S. 93–97.
- Chen, X. et al. (2017). Therapeutic effects of Argyrin F in pancreatic adenocarcinoma. In: *Cancer Letters* 399, S. 20–28.
- Chinnaiyan, A. M. et al. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. In: *Cell*.
- Coffman, R. L. und I. L. Weissman (1981). B220: A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. In: *Nature* 289, S. 681–683.
- Cornforth, A. N. et al. (2008). FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. In: *Oncogene* 27, S. 4422–4433.
- Crawford, N. et al. (2013). SAHA overcomes FLIP-mediated inhibition of SMAC mimetic-induced apoptosis in mesothelioma. In: *Cell Death & Disease* 4, e733.
- Czabotar, P. E. et al. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, S. 49–63.
- Dhein, J. et al. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). In: *Nature* 373.6513, S. 438–441.
- Dickens, L. S. et al. (2012). A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. In: *Molecular Cell* 47.2, S. 291–305.
- Ding, L. et al. (2011). Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-flip. In: *Cancer Investigation* 29, S. 511–520.
- Djerbi, M. et al. (2001). Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different FLIP isoforms. In: *Scandinavian Journal of Immunology* 54, S. 180–189.
- Donepudi, M. et al. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. In: *Molecular Cell* 11, S. 543–549.
- Dutton, A. et al. (2004). Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Dworkin, M. (1966). Biology of the Myxobacteria. In: *Annual Review of Microbiology* 20, S. 75–106.
- Eckhart, L. et al. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. In: *Molecular Biology and Evolution* 25, S. 831–841.
- Esser, C., S. Alberti und J. Höhfeld (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system.
- Ewald, F. et al. (2011). The role of c-FLIP splice variants in urothelial tumours. In: *Cell Death & Disease* 2.12, e245.
- Fink, J. M. und J. F. Zissler (1989). Characterization of lipopolysaccharide from *Myxococcus xanthus* by use of monoclonal antibodies. In: *Journal of Bacteriology* 171.4, S. 2028–2032.
- Fisher, G. H. et al. (1995). Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. In: *Cell* 81, S. 935–946.

- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. In: *British Journal of Experimental Pathology* 10.1923, S. 226–236.
- Fricker, N. et al. (2010). Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. In: *Journal of Cell Biology* 190, S. 377–389.
- Friedrich, T. et al. (1994). Two binding sites for naturally occurring inhibitors in mitochondrial and bacterial NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). In: *Biochemical Society Transactions* 22.1, 226 LP –230.
- Fu, T. M. et al. (2016). Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. In: *Molecular Cell* 64.2, S. 236–250.
- Fuentes-Prior, P. und G. S. Salvesen (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. In: *Biochemical Journal* 384, S. 201–232.
- Fulda, S. (2013). Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17, S. 195–201.
- Fulda, S., E. Meyer und K. M. Debatin (2000). Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. In: *Cancer Research*.
- Fuss, I. J. et al. (1997). Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity. In: *Journal of Immunology* 158, S. 1912–1918.
- Galluzzi, L., O. Kepp und G. Kroemer (2016). Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. In: *Microbial Cell* 3, S. 101–108.
- Galluzzi, L. et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. In: *Cell Death and Differentiation* 25.3, S. 486–541.
- Gibert, B. und P. Mehlen (2015). Dependence receptors and cancer: Addiction to trophic ligands. In: *Cancer Research* 75, S. 5171–5175.
- Golks, A. et al. (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 280, S. 14507–14513.
- Golks, A. et al. (2006). The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. In: *The Journal of Experimental Medicine* 203, S. 1295–1305.
- Goltsev, Y. V. et al. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. In: *Journal of Biological Chemistry* 272, S. 19641–19644.
- Griffith, T. S. et al. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. In: *Journal of Immunology* 161, S. 2833–2840.
- Han, D. K. et al. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, S. 11333–11338.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). The Hallmarks of Cancer. In: *Cell* 100.1, S. 57–70.
- Hao, Z. et al. (2004). T Cell-specific Ablation of Fas Leads to Fas Ligand-mediated Lymphocyte Depletion and Inflammatory Pulmonary Fibrosis. In: *Journal of Experimental Medicine*.
- Hardy, K., A. Handyside und R. Winston (1989). The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. In: *Development*.
- Hartley, S. B. et al. (1991). Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. In: *Nature* 353, S. 765–769.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. In: *Nature* 407, S. 770–776.

Literatur

- Hennino, A. et al. (2000). Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. In: *Journal of Immunology* 165, S. 3023–3030.
- Henry, C. M. und S. J. Martin (2017). Caspase-8 Acts in a Non-enzymatic Role as a Scaffold for Assembly of a Pro-inflammatory FADDosome Complex upon TRAIL Stimulation. In: *Molecular Cell* 65.4, 715–729.e5.
- Höfle, G. und H. Irschik (2008). Isolation and Biosynthesis of Aurachin P and 5-Nitroresorcinol from *Stigmatella erecta*. In: *Journal of Natural Products* 71.11, S. 1946–1948.
- Höfle, G. und B. Kunze (2008). Biosynthesis of Aurachins A-L in *Stigmatella aurantiaca*: A Feeding Study. In: *Journal of Natural Products* 71.11, S. 1843–1849.
- Horn, S. et al. (2017). Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- κ B Activation and Cell Survival. In: *Cell Reports* 19.4, S. 785–797.
- Hu, S. et al. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272, S. 17255–17257.
- Hughes, M. A. et al. (2016). Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8 : A Unified Model Defines How c-FLIP Article Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8 : A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. In: *Molecular Cell* 61.6, S. 834–849.
- Hughes, P. D. et al. (2008). Apoptosis Regulators Fas and Bim Cooperate in Shutdown of Chronic Immune Responses and Prevention of Autoimmunity. In: *Immunity* 28, S. 197–205.
- Humphreys, L., M. Espona-Fiedler und D. B. Longley (2018). FLIP as a therapeutic target in cancer. In: *The FEBS Journal*, S. 1–20.
- Hutcheson, J. et al. (2008). Combined Deficiency of Proapoptotic Regulators Bim and Fas Results in the Early Onset of Systemic Autoimmunity. In: *Immunity* 28, S. 206–217.
- Igney, F. H. und P. H. Krammer (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. In: *Nature Reviews Cancer* 2.April, S. 277–288.
- Inohara, N. et al. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, S. 10717–10722.
- Irmeler, M. et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. In: *Nature* 388, S. 190–195.
- Irschik, H. und H. Reichenbach (1985). The Mechanism of Action of Myxovalargin A, a Peptide Antibiotic from *Myxococcus fulvus*. In: *The Journal of Antibiotics* 38.9, S. 1237–45.
- Irschik, H. et al. (1995a). Sorangiolid A, a New Antibiotic Isolated from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce 12. In: *The Journal of Antibiotics* 48.8, S. 886–887.
- Irschik, H. et al. (1995b). The Ripostatins, Novel Inhibitors of Eubacterial RNA Polymerase Isolated from Myxobacteria. In: *The Journal of Antibiotics* 48.8, S. 787–792.
- Irschik, H. et al. (2013). Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Maltepolides: Remarkable Macrolides from Myxobacteria. In: *Angewandte Chemie International Edition* 52.20, S. 5402–5405.
- Itoh, N. und S. Nagata (1993). A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. In: *The Journal of Biological Chemistry* 268, S. 10932–10937.
- Iwase, M. et al. (2003). Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to FAS-mediated apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. In: *International Journal of Cancer* 106, S. 619–625.
- Jacobson, M. M. D., M. M. Weil und M. M. C. Raff (1997). Programmed cell death in animal development. In: *Cell* 88, S. 347–354.

- Jorgensen, I. und E. A. Miao (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. In: *Immunological Reviews*.
- Ju, S. T. et al. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. In: *Nature* 373, S. 444–448.
- Juo, P. et al. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. In: *Current Biology* 8.18, S. 1001–1008.
- Juo, P. et al. (1999). FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. In: *Cell Growth & Differentiation* 10, S. 797–804.
- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele und D. V. Krysko (2013). Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. In: *Immunity*.
- Kallenberger, S. M. et al. (2014). Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis. In: *Science Signaling* 7, ra23.
- Kataoka, T. et al. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. In: *Current Biology* 10, S. 640–648.
- Kataoka, T. und J. Tschopp (2004). N-Terminal Fragment of c-FLIP(L) Processed by Caspase 8 Specifically Interacts with TRAF2 and Induces Activation of the NF- κ B Signaling Pathway. In: *Molecular and Cellular Biology* 24, S. 2627–2636.
- Kayagaki, N. et al. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. In: *Nature*.
- Kendal, A. R. et al. (2011). Sustained suppression by Foxp3 regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. In: *The Journal of Experimental Medicine*.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie und A. R. Curriet (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Journal of Internal Medicine* 26, S. 239–257.
- Kersse, K. et al. (2011). The death-fold superfamily of homotypic interaction motifs. In: *Trends in Biochemical Sciences* 36, S. 541–552.
- Kim, S. J., S. Kang und J. B. Kim (2012). Possible therapeutic effects of myxobacterial metabolites on type I Gaucher disease. In: *Gene* 504.2, S. 156–159.
- Kim, S. J., Y. J. Lee und J. B. Kim (2013). Myxobacterial metabolites enhance cell proliferation and reduce intracellular stress in cells from a Parkinson's disease mouse model. In: *Gene* 514.1, S. 36–40.
- Kischkel, F. C. et al. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. In: *The EMBO Journal* 14, S. 5579–5588.
- Kischkel, F. C. et al. (1998). Assignment of CASP8 to human chromosome band 2q33- ζ q34 and Casp8 to the murine syntenic region on chromosome 1B-proximal C by in situ hybridization. In: *Cytogenetics and Cell Genetics* 82, S. 95–96.
- Kischkel, F. C. et al. (2001). Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. In: *Journal of Biological Chemistry* 276, S. 46639–46646.
- Koenig, A. et al. (2014). The c-FLIP L Cleavage Product p43FLIP Promotes Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK), Nuclear Factor κ B (NF- κ B), and Caspase-8 and T Cell Survival. In: 289.2, S. 1183–1191.
- Komatsu, N. et al. (2009). Heterogeneity of natural Foxp3 T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Literatur

- Körner, H. und J. D. Sedgwick (1996). Tumour necrosis factor and lymphotoxin: Molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. In: *Immunology and Cell Biology* 74, S. 465–472.
- Krammer, P. H., R. Arnold und I. N. Lavrik (2007). Life and death in peripheral T cells. In: *Nature Reviews in Immunology* 7.7, S. 532–542.
- Kreuz, S. et al. (2001). NF- κ B Inducers Upregulate cFLIP, a Cycloheximide-Sensitive Inhibitor of Death Receptor Signaling. In: *Molecular and Cellular Biology* 21, S. 3964–3973.
- Krueger, A. et al. (2001). Cellular FLICE-inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-inducing Signaling Complex. In: *Journal of Biological Chemistry*.
- Kunze, B. (1985). Production, Isolation, Physicochemical and Biological Properties of Angiolam A, a new Antibiotic from *Angiococcus Disciformis* (Myxobacteriales). In: *The Journal of Antibiotics* 38.12, S. 1649–1654.
- Kunze, B., G. Höfle und H. Reichenbach (1987). The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: Production, physico-chemical and biological properties. In: *The Journal of Antibiotics* 40.3, S. 258–265.
- Landwehr, W., C. Wolf und J. Wink (2016). Actinobacteria and myxobacteria—two of the most important bacterial resources for novel antibiotics, S. 273–302.
- Lee, J.-S. et al. (2010). NIH Public Access. In: 11.11, S. 1355–1362.
- Lemke, J. et al. (2014). Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1. In: *Cell Death and Differentiation* 21, S. 491–502.
- Li, H. et al. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. In: *Cell* 94, S. 491–501.
- Li, J. und J. Yuan (2008). Caspases in apoptosis and beyond. In: *Oncogene* 27, S. 6194–6206.
- Li, X.-W. W. et al. (2013). Synthesis and biological activities of the respirator chain inhibitor aurachin D and new ring versus chain analogues. In: *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 9. Figure 1. Hrsg. von J. S. Dickschat, S. 1551–1558.
- Lin, Y. (2014). »RIP1-Mediated Signaling Pathways in Cell Survival and Death Control«. In: *Necrotic Cell Death*. Hrsg. von H.-M. Shen und P. Vandenabeele. New York, NY: Springer New York, S. 23–43.
- Lindsten, T. et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. In: *Molecular Cell* 6, S. 1389–1399.
- Lockshin, R. A. und C. M. Williams (1965). Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. In: *Journal of Insect Physiology* 11.2, S. 123–133.
- Logan, A. E. et al. (2010). In vitro and in vivo characterisation of a novel c-FLIP-targeted antisense phosphorothioate oligonucleotide. In: *Apoptosis* 15.12, S. 1435–1443.
- Lübke, T. (2016). »Influence of c-FLIP and A20 on apoptosis regulation«. Diss. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, S. 114.
- Luo, X. et al. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. In: *Cell* 94, S. 481–490.
- Majkut, J. et al. (2014). Differential affinity of FLIP and procaspase 8 for FADD's DED binding surfaces regulates DISC assembly. In: *Nature Communications* 5, S. 3350.
- Majkut, J. et al. (2017). Abstract LB-305: Development and pre-clinical assessment of a first-in-class small molecule inhibitor of FLIP. In: *Cancer Research* 77.13 Supplement, LB-305 LP – LB-305.

- Marsters, S. a. et al. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. In: *Current Biology* 8, S. 525–528.
- Mathas, S. et al. (2004). c-FLIP Mediates Resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg Cells to Death Receptor-induced Apoptosis. In: *The Journal of Experimental Medicine* 199, S. 1041–1052.
- Matsuda, I. et al. (2014). The c-terminal domain of the long form of cellular fliceinhibitory protein (c-FLIPL) inhibits the interaction of the caspase 8 prodomain with the receptor-interacting protein 1 (RIP1) death domain and regulates caspase 8-dependent nuclear factor NFkB. In: *Journal of Biological Chemistry* 289, S. 3876–3887.
- Medema, J. P. et al. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). In: *The EMBO Journal* 16.10, S. 2794–2804.
- Meo, T. (1979). »The MLR Test in the Mouse«. In: *Immunological Methods*. Academic Press, S. 227–239.
- Meunier, B. et al. (1995). New inhibitors of the quinol oxidation sites of bacterial cytochromes bo and bd. In: *Biochemistry* 34.3, S. 1076–1083.
- Micheau, O. et al. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. In: *Molecular and Cellular Biology* 21, S. 5299–5305.
- Mistereck, M. B. (2012). »Masterarbeit Maria Mistereck«. Diss.
- Mizuno, T., X. Zhong und T. L. Rothstein (2003). Fas-induced apoptosis in B cells. In: *Apoptosis* 8, S. 451–460.
- Muthusamy, B. P. et al. (2009). Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Nachtigall, J. et al. (2010). Two new aurachins from *Rhodococcus* sp. Acta 2259. In: *The Journal of Antibiotics* 63, S. 567.
- Nagata, S. und M. Tanaka (2017). Programmed cell death and the immune system. In: *Nature Reviews Immunology* 17.5, S. 333–340.
- Nemazee, D. A. und K. Bürki (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. In: *Nature* 337, S. 562–566.
- Neumann, L. et al. (2010). Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. In: *Molecular Systems Biology* 6, S. 352.
- Nickeleit, I. et al. (2008). Argyrin A Reveals a Critical Role for the Tumor Suppressor Protein p27 kip1 in Mediating Antitumor Activities in Response to Proteasome Inhibition. In: July, S. 23–35.
- Niggemann, J. et al. (2014). Baceridin, a cyclic hexapeptide from an epiphytic bacillus strain, inhibits the proteasome. In: *ChemBioChem* 15, S. 1021–1029.
- Nikolaev, A. et al. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. In: *Nature* 457, S. 981–989.
- Oettmeier, W. et al. (1990). The Aurachins , Naturally Occurring Inhibitors of Photosynthetic Electron Flow through Photosystem II and the Cytochrome b j f -Complex. In:
- Opferman, J. T. und S. J. Korsmeyer (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. In: *Nature Immunology* 4, S. 410–415.
- Öztürk, S., K. Schleich und I. N. Lavrik (2012). Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): Fine-tuners of life and death decisions. In: *Experimental Cell Research* 318.11, S. 1324–1331.
- Pan, G. et al. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. In: *Science* 277, S. 815–818.
- Peter, M. E. und P. H. Krammer (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. In: *Cell Death and Differentiation* 10, S. 26–35.

Literatur

- Pihan, P., A. Carreras-Sureda und C. Hetz (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. In: *Cell Death and Differentiation* 24, S. 1478–1487.
- Plaza-Sirvent, C. et al. (2017). c-FLIP Expression in Foxp3-Expressing Cells Is Essential for Survival of Regulatory T Cells and Prevention of Autoimmunity. In: *Cell Reports* 18.1, S. 12–22.
- Poukkula, M. et al. (2005). Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. In: *Journal of Biological Chemistry*.
- Ramp, U. et al. (2003). Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. In: *British Journal of Cancer* 88, S. 1800.
- Rasheed, S. et al. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). In: *Cancer* 33.4, S. 1027–1033.
- Rasper, D. M. et al. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. In: *Cell Death and Differentiation* 5, S. 271–288.
- Rathmell, J. C. et al. (1995). CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4 T cells. In: *Nature* 376, S. 181–184.
- Reboll, M. R. et al. (2012). The myxobacterial compounds spirangien a and spirangien M522 are potent inhibitors of IL-8 expression. In: *ChemBioChem* 13.3, S. 409–415.
- Reichenbach, H. (1999). The ecology of the myxobacteria. In: *Environmental Microbiology* 1.1, S. 15–21.
- Reichenbach, H. (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27.3, S. 149–156.
- Reichenbach, H. und G. Höfle (1993). Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. In: *Biotechnology Advances* 11.2, S. 219–277.
- Rendl, M. et al. (2002). Caspase-14 expression by epidermal keratinocytes is regulated by retinoids in a differentiation associated manner. In: *J Invest Dermatol* 119, S. 1150–1155.
- Rieux-Laucat, F. et al. (1995). Mutations in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. In: *Science* 268, S. 1347–1349.
- Ron, I. und M. Horowitz (2005). ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. In: *Human Molecular Genetics*.
- Roos, W. P., A. D. Thomas und B. Kaina (2015). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. In: *Nature Reviews Cancer* 16, S. 20–33.
- Sakaguchi, S. et al. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. In: *Cell* 133.5, S. 775–787.
- Samraj, A. K. et al. (2006). Loss of Caspase-9 Provides Genetic Evidence for the Type I/II Concept of CD95-mediated Apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.40, S. 29652–29659.
- Sasse, F. et al. (2002). Argyrins, Immunosuppressive Cyclic Peptides from Myxobacteria. In: *The Journal of Antibiotics* 55.6, S. 543–551.
- Scaffidi, C. et al. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. In: *The EMBO Journal* 17, S. 1675–1687.
- Scaffidi, C. et al. (1999a). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 274, S. 22532–22538.
- Scaffidi, C. et al. (1999b). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.3, S. 1541–1548.

- Schleich, K. et al. (2012). Stoichiometry of the CD95 Death-Inducing Signaling Complex: Experimental and Modeling Evidence for a Death Effector Domain Chain Model. In: *Molecular Cell*.
- Schmitz, I. et al. (2004). Resistance of Short Term Activated T Cells to CD95-Mediated Apoptosis Correlates with De Novo Protein Synthesis of c-FLIPshort. In: *The Journal of Immunology*.
- Schneider, U., H.-U. Schwenk und G. Bornkamm (1977). Characterization of EBV-genome negative null and T cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. In: *International Journal of Cancer* 19.5, S. 621–626.
- Schneiker, S. et al. (2007). Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. In: *Nature Biotechnology* 25.11, S. 1282–1289.
- Schulze-Osthoff, K. et al. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. In: *European Journal of Biochemistry* 254, S. 439–459.
- Sehgal, S. N., H. BAKER und V. Claude (1975). Rapamycin (AY-22, 989), A New Antifungal Antibiotic. In: *The Journal of Antibiotics* 28.10, S. 727–732.
- Sekundärmetaboliten aus Myxobakterien und anderen Mikroorganismen (1996). 4. Auflage. GBF, Gesellschaft für Biotechnologie Braunschweig.
- Shen, B. (2015). A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. In: *Cell* 163, S. 1297–1300.
- Shi, J. et al. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. In: *Nature*.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. In: *Molecular Cell* 9, S. 459–470.
- Shimizu, J., S. Yamazaki und S. Sakaguchi (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25 CD4 T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. In: *Journal of immunology*.
- Shirley, S. und O. Micheau (2013). Targeting c-FLIP in cancer. In: *Cancer Letters* 332, S. 141–150.
- Shu, H. B., D. R. Halpin und D. V. Goeddel (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. In: *Immunity* 6, S. 751–763.
- Spormann, A. M. (1999). Gliding motility in Bacteria: Insights from Studies of *Myxococcus xanthus*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63.3, S. 621–641.
- Sprent, J. und D. F. Tough (2001). T cell death and memory. In: *Science* 293, S. 245–248.
- Sprick, M. R. et al. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. In: *Immunity* 12, S. 599–609.
- Sprick, M. R. et al. (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. In: *The EMBO Journal*.
- Srinivasula, S. M. et al. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 272, S. 18542–18545.
- Stempel, E. et al. (2018). Painting argyrins blue: Negishi cross-coupling for synthesis of deep-blue tryptophan analogue beta-(1-azulenyl)-L alanine and its incorporation into argyrian C. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.
- Stranges, P. B. et al. (2007). Elimination of Antigen-Presenting Cells and Autoreactive T Cells by Fas Contributes to Prevention of Autoimmunity. In: *Immunity* 26, S. 629–641.

Literatur

- Straus, S. E. et al. (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. In: *Blood* 98, S. 194–200.
- Suda, T. et al. (1993). Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. In: *Cell*.
- Takahashi, T. et al. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. In: *Cell* 76, S. 969–976.
- Tartaglia, L. A. et al. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. In: *Cell* 74, S. 845–853.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen und S. J. Martin (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, S. 231–241.
- Teh, H. S. et al. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha/beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. In: *Nature* 335, S. 229–233.
- Tenev, T. et al. (2011). The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs. In: *Molecular Cell* 43, S. 432–438.
- Thaxter, R. (1892). On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. In: *Botanical Gazette* 17, S. 389–406.
- Thome, M. et al. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. In: *Nature* 386, S. 517–521.
- Thornberry, N. A. et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B: Functional relationships established for key mediators of apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 272, S. 1790717911.
- Tsukada, N. et al. (1999). Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. In: *Blood* 93, S. 2738–2747.
- Ueffing, N. et al. (2008a). Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. In: *Cell Death and Differentiation* 15.4, S. 773–782.
- Ueffing, N. et al. (2008b). resistance of short-term activated T cells Up-regulation of c-FLIP short by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells. In: *Blood* 112.3, S. 690–698.
- Ueffing, N. et al. (2009). A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein. In: *Blood* 114.3, S. 572–579.
- Vahlensieck, H. F. et al. (1994). Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide sorafenin A. In: *Current Genetics* 25, S. 95–100.
- Verbrugge, I. et al. (2010). Radiation and anticancer drugs can facilitate mitochondrial bypass by CD95/Fas via c-FLIP downregulation. In: *Cell Death and Differentiation* 17, S. 551–561.
- Voelkel-Johnson, C. (2011). TRAIL-mediated signaling in prostate, bladder and renal cancer. In: *Nature Reviews Urology* 8, S. 417–427.
- Wajant, H., J. Gerspach und K. Pfizenmaier (2013). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. In: *Cancer Letters* 332, S. 163–174.
- Walczak, H. et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. In: *Nature Medicine* 5, S. 157–163.
- Wang, J. et al. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, S. 13884–13888.
- Wang, Y. et al. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. In: *Nature* 547, S. 99–103.

- Wani, M. C. et al. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. In: *Journal of the American Chemical Society* 93.9, S. 2325–2327.
- Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. In: *Nature* 356, S. 314–317.
- Weant, A. E. et al. (2008). Apoptosis Regulators Bim and Fas Function Concurrently to Control Autoimmunity and CD8 T Cell Contraction. In: *Immunity* 28, S. 218–230.
- Wei, H. et al. (2008). ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. In: *Human Molecular Genetics*.
- Weissman, K. und R. Müller (2009). A brief tour of myxobacterial secondary metabolism.
- Yang, B. F. et al. (2003). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of c-FLIP expression and phosphorylation in modulation of Fas-mediated signaling in malignant glioma cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 278, S. 7043–7050.
- Yang, J. K. et al. (2005). Crystal structure of MC159 reveals molecular mechanism of DISC assembly and FLIP inhibition. In: *Molecular Cell* 20, S. 939–949.
- Yang, W. S. und B. R. Stockwell (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. In: *Trends in Cell Biology* 26.3, S. 165–176.
- Zhang, N. und Y.-W. He (2005). An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. In: *The Journal of Experimental Medicine*.
- Zhang, X. et al. (2016). MLKL and FADD Are Critical for Suppressing Progressive Lymphoproliferative Disease and Activating the NLRP3 Inflammasome. In: *Cell Reports*.
- Zhang, Chung und Oldenburg (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.
- Zinkernagel, R. M. und P. C. Doherty (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. In: *Nature* 248, S. 701–702.
- Zong, W. X. et al. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. In: *Journal of Cell Biology*.
- Zou, H. et al. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. In: *Cell* 90, S. 405–413.

Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchlich Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Datum, Ort

Unterschrift