

**Entschlüsselung neuer molekularer Mechanismen zur CD95/Fas-
abhängigen Induktion des programmierten Zelltods/ Entwicklung
innovativer Ansätze zur gezielten Modifikation des CD95/Fas Signalweges**

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 Master of Science Laura Katharina Hillert-Richter (geb. Hillert)

geb. am 21. Juli 1989 in Wolmirstedt

Gutachter: Prof. Dr. Inna Lavrik

Prof. Dr. Thomas Brunner

eingereicht am: 7.12.2022 verteidigt am: 4.5.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Programmierte Zelltod	1
1.1.1	Apoptose	2
1.1.2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie (TNF-Rezeptor Superfamilie).....	3
1.1.3	Der CD95/Fas-vermittelte, apoptotische Signalweg.....	3
1.1.4	Caspasen- eine Familie von Cysteiny-Aspartat-spezifischen Proteasen	6
1.1.5	c-FLIP-Regulator des extrinsischen, apoptotischen Signalweges	8
1.1.6	Der CD95/Fas-vermittelte, nekroptotische Signalweg	10
1.1.7	bekannte Behandlungsstrategien gegen Tumorerkrankungen mittels spezifischer Beeinflussung der Zelltodsignalwege	12
1.2	Akute myeloide Leukämie (AML).....	13
1.2.1	Der FLT3-Rezeptor.....	14
1.3	Zielstellung.....	16
2	wissenschaftliche Ergebnisse-Publikationen.....	18
2.1	Entschlüsselung neuer Induktionsmechanismen der CD95/Fas-vermittelten Apoptose.....	18
2.1.1	neueste Erkenntnisse zum regulatorischen c-FLIP Mechanismus am CD95-DISC....	18
2.2	Entwicklung innovativer therapeutischer Behandlungsansätze zur gezielten Beeinflussung des CD95/Fas Signalweges	22
2.2.1	Entwicklung innovativer <i>small molecules</i> zur gezielten Beeinflussung des CD95/Fas Signalweges.....	22
2.2.2	RIPK1- ein Schlüsselprotein entscheidet über Zelltod und -überleben in AML-Zellen mit FLT3-ITD Mutation.....	26
3	Diskussion	32
3.1	Entschlüsselung neuer Induktionsmechanismen der CD95/Fas-vermittelten Apoptose.....	32
3.1.1	c-FLIP Isoformen fungieren als Kontrollpunkte in der DED-Filamentformation.....	32
3.2	Entwicklung innovativer therapeutischer Behandlungsansätze zur gezielten Beeinflussung des CD95/Fas Signalweges	36
3.2.1	pharmakologische Beeinflussung des Caspase-8/c-FLIP _L -Heterodimers am DISC....	36
3.2.2	gezielte Behandlungsstrategie zur Bekämpfung von AML mit FLT3-ITD Mutation .	38

4	Literaturverzeichnis.....	i
---	---------------------------	---

„Das Leben ist für niemanden von uns einfach.

Aber was heißt das schon?

Wir müssen Ausdauer und vor allem Vertrauen in uns selbst haben.

Wir müssen daran glauben, dass wir für eine Sache geschaffen sind

und dass diese Sache erreicht werden muss.“ Marie Curie (1815 – 1852)

Vorwort

Bei der vorliegenden kumulativen Dissertation handelt es sich um eine verkürzte Darstellung der Forschungsergebnisse. Die ausführlichen Ergebnisse wurden bereits in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

- L. K. Hillert; K. Bettermann-Bethge; S. C. Nimmagadda; T. Fischer; M. Naumann & I. N. Lavrik, „*Targeting RIPK1 in AML cells carrying FLT3-ITD*“, *International Journal of Cancer*, **145**, 1558–1569, (2019).
- L. K. Hillert; N. V. Ivanisenko; J. Espe; C. König; V. A. Ivanisenko; T. Kähne & I. N. Lavrik, „*Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly*“, *Oncogene*, **39**, 1756–1772, (2020).
- L. K. Hillert; N. V. Ivanisenko; D. Busse; J. Espe; C. König; S. E. Peltek; N. A. Kolchanov; V. A. Ivanisenko & I. N. Lavrik, „*Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIP_L heterodimer*“, *Cell Death and Differentiation*, **27**, 2117–2130, (2020).

Weitere Publikationen

- Y. Boege, M. Malehmir, M. E. Healy, K. Bettermann, A. Lorentzen, M. Vucur, A. K. Ahuja, F. Böhm, J. C. Mertens, Y. Shimizu, L. Frick, C. Remouchamps, K. Mutreja, T. Kähne, D. Sundaravinayagam, M. J. Wolf, H. Rehrauer, C. Koppe, T. Speicher, S. Padrissa-Altés, R. Maire, J. M. Schattenberg, J.-S. Jeong, L. Liu, S. Zwirner, R. Boger, N. Hüser, R. J. Davis, B. Müllhaupt, H. Moch, H. Schulze-Bergkamen, P.-A. Clavien, S. Werner, L. Borsig, S. A. Luther, P. J. Jost, R. Weinlich, K. Unger, A. Behrens, **L. Hillert**, C. Dillon, M. Di Virgilio, D. Wallach, E. Dejardin, L. Zender, M. Naumann, H. Walczak, D. R. Green, M. Lopes, I. Lavrik, T. Luedde, M. Heikenwalder & A. Weber, „*A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development*“, *Cancer Cell*, **32**, 342-359, (2017).
- N. V. Ivanisenko, J. H. Buchbinder, J. Espe, M. Richter, M. Bollmann, **L. K. Hillert**, V. A. Ivanisenko & I. N. Lavrik, „*Delineating the role of c-FLIP/NEMO interaction in the CD95 network via rational design of molecular probes*“, *BMC Genomics*, **20** (Suppl 3), 293, (2019).
- C. König*, **L. K. Hillert-Richter***, N. V. Ivanisenko, V. A. Ivanisenko & I. N. Lavrik, „*Pharmacological targeting of c-FLIP_L and Bcl-2 family members promotes apoptosis in CD95L-resistant cells*“, *Scientific Reports*, **10**, 20823, (2020).
- **L. K. Hillert-Richter** & I. N. Lavrik, „*Measuring Composition of CD95 Death-Inducing Signaling Complex and Processing of Procaspase-8 in this Complex*“, *Journal of Visualized Experiments*, **174**, (2021).
- J. Espe, N. V. Ivanisenko, **L. K. Hillert-Richter**, V. A. Ivanisenkob & I. N. Lavrik, „*Development of Small Molecules Targeting Procaspase-8 at the DISC*“, *Cell and Tissue Biology*, **16**, (2022).

* Diese Autoren haben gleichwertige Anteile an dieser Veröffentlichung.

Review Artikel

- K. Seyrek, N. V. Ivanisenko, M. Richter, **L. K. Hillert**, C. König & I. N. Lavrik, „*Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins*“, *Trends in Cell Biology*, **30**, 354-369, (2020).
- N. V. Ivanisenko*, K. Seyrek*, **L. K. Hillert-Richter**, C. König, J. Espe, K. Bose & I. N. Lavrik, „*Regulation of extrinsic apoptotic signaling by c-FLIP: towards targeting cancer networks*“, *Trends in Cancer*, **8**, (2022).

* Diese Autoren haben gleichwertige Anteile an dieser Veröffentlichung.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des extrinsischen CD95/Fas-vermittelten und intrinsischen, apoptotischen Signalweges.	5
Abbildung 2: Die zwei Varianten der Procaspase-8 Spaltung am DISC.	8
Abbildung 3: c-FLIP Isoformen und ihre Spaltprodukte.	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des apoptotischen als auch nekroptotischen CD95/Fas-vermittelten Signalweges.	11
Abbildung 5: Grafische Darstellung der Tumorerkrankungen bei Kindern unter 18 Jahren in Deutschland.	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors und dessen beeinflusster Signalwege. .	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung der zu untersuchenden, komplexen CD95/Fas-vermittelten Signalwege.	17
Abbildung 8: c-FLIP Isoformen binden Caspase8-unabhängig am CD95-DISC und inhibieren nach Überexpression den extrinsischen, apoptotischen CD95-Signalweg.	19
Abbildung 9: c-FLIP Isoformen regulieren in unterschiedlicher Weise die CD95L-induzierte CD95-DISC-Formation.	21
Abbildung 10: Caspase-8/c-FLIP _L -Heterodimerstruktur zur <i>in silico</i> -Bestimmung von putativen <i>small molecules</i>	23
Abbildung 11: Kombinierte FLIPinB γ /CD95L Behandlung induziert einen erhöhten Verlust der Zellviabilität und verstärkt Apoptose in Tumorzelllinien.	26
Abbildung 12: Kombinierte BV6/CD95L Behandlung führt zur Sensitivierung von FLT3-ITD-positiven AML-Zellen.	28
Abbildung 13: Kombinierte BV6/CD95L-Stimulation führt zu einem RIPK1- und Caspase-abhängigen Zelltod in 32D-FLT3-ITD Zellen.	30
Abbildung 14: Kooperatives DED-Filamentformationsmodell.	34

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Protein Kinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Apaf-1	engl. <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> , dt. Apoptotischer Protease-aktivierender Faktor
APO-1	Apoptose Antigen-1
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BC	engl. <i>Beads Control</i>
Bcl-2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	engl. <i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BIR	engl. <i>Baculoviral IAP Repeat</i>
BV6	engl. <i>Bivalent SMAC mimetic 6</i>
CARD	Caspase-Aktivierungs-und Rekrutierungs-Domäne
Caspase	engl. <i>CysteinyI-aspartate specific protease</i> , dt. Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i> , dt. Oberflächenmarker auf der Zelle
CD40	engl. <i>Cluster of Differentiation 40</i>
CD95	engl. <i>Cluster of Differentiation 95</i>
CD95L	CD95-Ligand
c-FLIP	engl. <i>cellular FLICE-Like Inhibitory Protein</i> , dt. zelluläres, FLICE-ähnliches, inhibitorisches Protein
c-FLIP _L	c-FLIP _{Long}
c-FLIP _R	c-FLIP _{Raji}
c-FLIP _S	c-FLIP _{Short}

cIAP1/2	engl. <i>cellular Inhibitors of Apoptosis Protein 1/2</i> , dt. zelluläre Inhibitoren der Apoptose Protein 1/2
C-terminal	Carboxy-terminal
DD	engl. <i>Death Domain</i> , dt. Todesdomäne
DED	engl. <i>Death Effector Domain</i> , dt. Todeseffektordomäne
DIABLO/SMAC	engl. <i>Direct IAP Binding protein with Low pI, Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
DISC	engl. <i>Death-Inducing Signalling Complex</i> , dt. Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dt.	deutsch
engl.	englisch
ERK	engl. <i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i> , dt. Extrazelluläre, Signal-regulierte Kinasen
<i>et al.</i>	lat. <i>et alia</i> , dt. und andere
FADD	engl. <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> , dt. Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
Fas	engl. <i>Factor activating ExoS</i> , dt. ExoS-aktivierender Faktor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FLIPin	FLIP inhibitor
FLT3	engl. <i>Fms-like tyrosine kinase 3</i> , dt. Fms-ähnliche Tyrosinkinase 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	engl. <i>Green Fluorescent Protein</i> , dt. grün-fluoreszierendes Protein
GRB2	engl. <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> , dt. Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein
h	engl. <i>hour</i> , dt. Stunde

HF	Hellfeld
IAP	engl. <i>Inhibitors of apoptosis protein</i> , dt. Apoptose-Inhibitoren
IκB	engl. <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IKK	IκB Kinase
ITD	interne Tandem-Duplikation
JAK	Januskinase
lat.	latein
l.B.	lange Belichtungszeit
k.B.	kurze Belichtungszeit
kDa	kilo-Dalton
M	Molare Masse
Mcl-1	engl. <i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> , dt. Zelldifferenzierungsprotein, das myeloide Leukämie induziert
MEK	engl. <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> , dt. Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
min	Minuten
MLKL	engl. <i>Mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>
MOMP	engl. <i>Mitochondrial Outer Membrane Polarization</i> , dt. Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran
mTOR	engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
Nec-1s	Necrostatin-1s
NF-κB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cell</i>
N-terminal	Amino-terminal
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PI	Propidiumiodid
PIM-1	engl. <i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>

PI3K/AKT	engl. <i>Phosphoinositide 3-kinase/AKT</i>
PKD	Punktmutation der Kinase Domäne
PRL-3	engl. <i>protein of regenerating liver-3</i> , dt. Protein der regenerierenden Leber-3
PS	Phosphatidylserin
RAF	engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , dt. schnell beschleunigtes Fibrosarkom
RAS/MAPK	engl. <i>rat sarcoma/Mitogen-activated protein kinase</i> , dt. RAS/Mitogen-aktivierte Proteinkinase
RHIM	engl. <i>RIP homotypic interaction motif</i> , dt. RIP homotypisches Interaktionsmotiv
RIPK1	engl. <i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i> , dt. Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 1
RIPK3	engl. <i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i> , dt. Rezeptor-interagierende Serin/Threonin-Proteinkinase 3
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , dt. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOS	engl. <i>son of sevenless</i>
STAT5	engl. <i>Signal Transducers and Activators of Transcription 5</i> , dt. Signal-Transducer und Transkriptionsaktivator
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i> , dt. Tumornekrosefaktor
TNFR	engl. <i>tumor necrosis factor receptor</i> , dt. Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	engl. <i>TNF receptor-associated factor</i> , dt. Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte Faktoren
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> , dt. TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TRAIL-R1/2	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i> , dt. Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand-Rezeptor 1/2

v-FLIP	engl. <i>viral FLICE-like inhibitory protein</i> , dt. virales FLICE-ähnliches inhibitorisches Protein
wt	Wildtyp
XIAP	engl. <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> , dt. X-chromosomaler Inhibitor der Apoptose Protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
zVAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone

abstract

Since 1989, when Trauth *et al.* and Yonehara *et al.* laid the foundation for a new extrinsic research field, the apoptotic CD95/Fas signalling pathway, many other scientists have worked on deciphering this signalling cascade over the past 30 years^{1,2}. Based on the state of the art information on the pathway, it has become possible to further identify specific protein interactions using novel biochemical and computer-based *in silico* methods and in addition to use this knowledge for improved treatment strategies to cure diseases such as tumors. In the publication "*Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly*", the role of two isoforms of the apoptosis-regulating protein c-FLIP at the CD95-DISC was investigated. This provided the basis for a more detailed analysis of the pro-apoptotic function of the protein c-FLIP_L in the procaspase-8/c-FLIP_L heterodimer. After extensive interaction analyses, the idea arose to test small molecules, selected by *in silico* screenings from the ZINC12 database of over 16 million compounds, in combination with CD95 stimulation in malignant cells in order to sensitize them towards cell death. "*Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIP_L heterodimer*" was the follow-up publication for deciphering the induction mechanisms after combinatorial treatment of small molecules and CD95L of CD95/Fas-mediated apoptosis. Finally, it could be shown in malignant AML cells with FLT3-ITD mutation by "*Targeting RIPK1 in AML cells carrying FLT3-ITD*" that programmed cell death can be induced by CD95L binding to the receptor and BV6 treatment. The focus of the analyses was on the sensitisation of tumor cells towards cell death. All three publications were based on the scientific goal of deciphering new molecular mechanisms for the CD95-dependent induction of programmed cell death and developing innovative approaches for targeted modifications of the CD95/Fas signalling pathway in tumor cells.

Zusammenfassung

Seit 1989 Trauth *et al.* und Yonehara *et. al* den Grundstein für die Erforschung des extrinsischen, apoptotischen CD95/Fas Signalweges gelegt haben, haben in den vergangenen 30 Jahren viele weitere Wissenschaftler an der Entschlüsselung dieser Signalkaskade gearbeitet^{1,2}. In Folge dessen wurde es mittels neuartiger biochemischer und computer-basierter *in silico* Methoden möglich, spezifische Protein-Interaktionen zu identifizieren und dieses Wissen für verbesserte Behandlungsstrategien zur Bekämpfung von Krankheiten wie zum Beispiel Tumorerkrankungen einzusetzen. In der Publikation „*Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly*“ wurde die Rolle zweier Isoformen des Apoptose-regulierenden Proteins c-FLIP am CD95-DISC untersucht. Dabei entstand die Basis für die detailliertere Analyse der pro-apoptotischen Funktion des Proteins c-FLIP_L im Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimer. Nach ausgiebigen Interaktionsanalysen entstand die Idee *small molecules*, die durch *in silico* Screenings aus der ZINC12 Datenbank aus über 16 Millionen Verbindungen ausgewählt wurden, in Kombination mit CD95-Stimulation in malignen Zellen zu testen, um diese zu sensitivieren. „*Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer*“ setzte demnach einen weiteren Grundstein für die Entschlüsselung der Induktionsmechanismen der CD95/Fas-vermittelten Apoptose. Final konnte in malignen AML-Zellen mit FLT3-ITD Mutation durch „*Targeting RIPK1 in AML cells carrying FLT3-ITD*“ gezeigt werden, dass programmierter Zelltod durch CD95L-Bindung an den Rezeptor und BV6 Behandlung ausgelöst werden kann. Dabei stand die Sensitivierung von Tumorzellen im Fokus der Analysen. Alle drei Publikationen basierten auf dem wissenschaftlichen Ziel: einer Entschlüsselung neuer molekularer Mechanismen zur CD95-abhängigen Induktion des programmierten Zelltods und der Entwicklung innovativer Ansätze zur gezielten Modifikation des CD95/Fas Signalweges in Tumorzellen.

1 EINLEITUNG

Nichts existiert in der Natur allein. (*Rachel Carson*)

So existiert auch ein notwendiges Gleichgewicht zwischen Leben und Tod. Dysregulationen dieser empfindlichen Balance führen zu schwerwiegenden Erkrankungen. Das lymphoide Wachstum und die damit verbundene Bildung unreifer Lymphozyten im Thymus ist ein zentraler Prozess in der Entwicklung eines gesunden Immunsystems. Durch negative Selektion kommt es zur Beseitigung autoreaktiver Thymozyten³. Eine Störung dieses Prozesses kann ein Auslöser für Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ 1 sein⁴. Der Verlust der Homöostase in Bezug auf eine Dysregulation des Zelltods ist oftmals mit der Ausbildung schwerwiegender Erkrankungen wie Morbus Parkinson⁵, Morbus Alzheimer⁶ und Tumorerkrankungen⁷ assoziiert. Dies sind nur einige Beispiele, die die Notwendigkeit dieses sensiblen Gleichgewichts verdeutlichen.

1.1 DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD

Die wissenschaftliche Historie über die Erforschung des regulierten Zelltods begann 1842 mit der Untersuchung des deutschen Naturforschers Carl Vogt, welcher sterbende Zellen in Geburtshelferkröten bemerkte. Jedoch waren es J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie und A. R. Currie im 20. Jahrhundert, die mittels Elektronenmikroskopie den bis dato unbekanntem, programmierten Zelltod wissenschaftlich beschrieben. Der Begriff Apoptose wurde das erste Mal in ihrer Publikation von 1972 verwendet und geprägt⁸. Dabei wurden die morphologischen Eigenschaften einer apoptotischen Zelle sehr genau beschrieben. Das Schrumpfen der Zelle, die Kondensierung des Chromatins, als auch die Fragmentierung der Membran, bis hin zur Ausbildung der Apoptosekörperchen und final der Phagozytose mittels Makrophagen sind bis heute markante apoptotische Merkmale. Im Detail ist dieser regulierte Prozess abhängig von Signalkaskaden, die enzymatische Proteine wie Proteasen und Nukleasen aktivieren⁹. Nur ein Jahr später 1973 beschrieben J.-U. Schweichel und H.-J. Merker drei Typen des Zelltods. Einerseits entdeckten auch sie mittels mikroskopischer Aufnahmen charakteristische Eigenschaften einer apoptotischen Zelle (Typ I). Andererseits wurde Autophagie als 2. Typ des Zelltods beobachtet. Dabei stellten sie zahlreiche Autophagie-Vakuolen und keine beziehungsweise keine starke Veränderung des Nukleus fest. Der 3. Typ des Zelltods zeichnete sich durch das Anschwellen der Zelle, einem schnellen Verlust der Membranintegrität und das Ausschütten intrazellulärer Bestandteile in die extrazelluläre Matrix aus¹⁰. Diese Form des Zelltods hat oftmals Entzündungsreaktionen zur Folge.

In den letzten Jahren wurden weitere Signalwege zur Aktivierung eines programmierten, nicht-apoptotischen Zelltods entdeckt wie zum Beispiel Nekroptose¹¹, Entose¹², Pyroptose¹³ oder Ferroptose¹⁴. Trotz dieser Vielzahl an wissenschaftlichen Entdeckungen sind noch nicht alle regulatorischen Mechanismen in humanen Zellen entschlüsselt worden.

1.1.1 Apoptose

Der aus dem Griechischen stammende Begriff *ἀπόπτωσης* (apoptōsis) oder Apoptose bedeutet übersetzt „Abfall“ oder „Niedergang“. Diese Ausdrücke beschreiben lediglich das Resultat eines stark regulierten Prozesses-des programmierten Zelltods.

Apoptose zeichnet sich durch spezifische morphologische als auch biochemische Merkmale aus. Der apoptotische Prozess beginnt mit dem Zell- und Nucleusschrumpfen, wobei es zur Kondensation des nukleären Chromatins und zur DNA Fragmentierung durch endogene DNasen kommt. Letztendlich führt dies zur Karyorrhexis, der destruktiven Fragmentierung des Nukleus. Die Zelle im Ganzen bildet blasenartige Strukturen aus, die später zu Apoptosekörperchen werden. Diese engbepackten Zellreste enthalten zelluläre Organelle und Teile des fragmentierten Nukleus und werden durch Phagozytose durch zum Beispiel Makrophagen beseitigt. Dabei tritt dieser apoptotische Prozess charakteristisch ohne Inflammationsaktivierung auf⁸.

Die Unterscheidung zwischen zu phagozytierenden Apoptosekörperchen und gesunden Zellen ist evolutionär von niedrigeren Organismen wie *Caenorhabditis elegans* bis zu Säugetieren konserviert^{15,16}. Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) ist in gesunden Zellen auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Durch Apoptoseinduktion werden die Phosphatidylserine auf der Außenseite der Zellmembran präsentiert. Dies ist ein Caspase-abhängiger Prozess¹⁷, der sich durch Scramblase Aktivierung und Flippase Inaktivierung in der Zellmembran auszeichnet^{18,19}. Daraufhin erkennen Makrophagen durch Phosphatidylserin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche oder abgesonderter, Phosphatidylserin-bindender Proteine apoptotische Zellen und phagozytieren diese^{20,21}.

Nach heutigem Wissensstand kann Apoptose durch zwei regulatorische Signalwege induziert werden. Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg wird durch die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (MOMP, engl. *Mitochondrial Outer Membrane Polarization*) initiiert²². Dabei kommt es zur Ausschüttung mitochondrialer Proteine wie CytochromC und DIABLO/SMAC (engl. *direct IAP binding protein with low pI, second mitochondria-derived activator of caspases*). Darauffolgend formiert sich intrazellulär das Apoptosom, ein Komplex bestehend aus CytochromC, Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) und Caspase-9 (engl. *CysteinyI-aspartate specific protease*), der die Effektorcaspase-3 aktiviert²³⁻²⁵.

Caspase-3 aktiviert eine Vielzahl verschiedener Substrate in der Zelle, die meist durch Spaltung die zellulären, biochemischen Apoptose-Mechanismen auslösen (Abbildung 1).

Der extrinsische, apoptotische Signalweg wird durch die Aktivierung eines Todesrezeptors mittels seines Liganden initiiert. Todesrezeptoren wie zum Beispiel TNF-Rezeptor (Tumornekrosefaktor-Rezeptor), TRAIL-R1/2 (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand-Rezeptor) oder CD95/Fas (engl. *Cluster of Differentiation 95*/ engl. *Factor activating ExoS*) gehören zur Todesrezeptor-Familie, die wiederum eine Untergruppe der TNF-Rezeptor Superfamilie ist. Sie haben verschiedene biologische Funktionen wie die Regulation des Zelltods und des Zellüberlebens, sowie die Zelldifferenzierung und die Immunregulation.

1.1.2 Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie (TNF-Rezeptor Superfamilie)

Am Ende der 1960er und am Anfang der 1970er Jahre wurden die Zytokine Lymphotoxin und TNF als Ausscheidungsprodukte von Lymphozyten und Makrophagen identifiziert^{26,27}. Nach näheren Analysen wurde eine große strukturelle Homologie in ihrer Ektodomäne festgestellt²⁸. So kam es nicht überraschend, dass auch die dazugehörigen Rezeptoren in die TNF-Rezeptor Superfamilie nach Sequenzierungen mittels *expressed sequence tags* eingegliedert werden konnten²⁹.

TNF-Rezeptor Superfamilie Rezeptoren und ihre dazugehörigen Liganden bieten die Grundlage für wichtige Kommunikationssignale zwischen verschiedenen Zelltypen während der gesamten Zellentwicklung. Sie sind Typ I Membran-Rezeptoren und zeichnen sich durch eine signifikante Homologie in ihrer extrazellulären Domäne aus, die durch bis zu 6 Cystein-reiche Domänen charakterisiert ist und die ihre Liganden-Spezifität definiert²⁹. Die Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie können in drei untergeordnete Familien eingegliedert werden: Todesrezeptoren, die nach Aktivierung Zelltod durch ihre zytoplasmatische Todes-Domäne (DD, engl. *death domain*) auslösen wie CD95/Fas und TRAIL-R1/2; Nicht-Todesrezeptoren, die meist über ein oder mehrere TNF-R-assoziierte Faktoren (TRAF, engl. *TNF receptor-associated factor*) ein Signal weiterleiten wie CD40 und lösliche Rezeptoren, die Liganden binden, aber es nicht zur Signalweiterleitung kommt wie Decoy-Rezeptor 3^{30,31}. Bei den meisten Rezeptoren führt Ligandenbindung zur Trimerisierung des Rezeptors und somit zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade³².

1.1.3 Der CD95/Fas-vermittelte, apoptotische Signalweg

1989 wurde ein monoklonaler Antikörper namens anti-APO-1¹ oder CH11² von zwei unabhängigen Gruppe aus Mäusen isoliert.

Dabei wurde der oberflächengebundene Rezeptor CD95 (APO-1/Fas) als Zielprotein dieser Antikörper in zum Beispiel einer malignen humanen B-Lymphozyten Tumorzelllinie SKW 6.4 identifiziert.

CD95/Fas ist ein meist glykosylierter Transmembran-Rezeptor Typ I, welcher in vielen Zellsystemen exprimiert wird³³. Durch Bindung des CD95L an den CD95/Fas-Rezeptor kommt es zur Trimerisierung/Oligomerisierung des Rezeptors und damit zur Initiation der Signalkaskade³⁴. Der C-terminale, intrazelluläre Teil des Rezeptors ist durch eine DD gekennzeichnet³⁵, welche durch Konformationsänderung für Adapterproteine wie FADD (engl. *Fas-associated protein with death domain*) frei zugänglich wird^{36,37}. DD-besitzende Proteine gehören zur großen DD Superfamilie und zeichnen sich durch 6 α -helikale Strukturen aus, die sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Ausrichtung variieren können. Allerdings weisen diese Proteine auch eine geringe Sequenzhomologie auf und besitzen damit unterschiedliche Oberflächeneigenschaften, die wiederum für die Spezifität der einzelnen Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind^{30,38-40}. Das Adapterprotein FADD besitzt sowohl eine DD als auch eine Todeseffektor-Domäne (DED, engl. *death effector domain*). Durch homotypische DD-Interaktion mit dem Rezeptor, sowie DED-Interaktion mit DED-besitzenden Proteinen wie Procaspase-8, -10 oder c-FLIP (engl. *FLICE-like inhibitory protein*) kommt es zur Formation des Todes-induzierten Signalkomplexes (DISC, engl. *death-inducing signalling complex*). Dieser Komplex dient zur Rekrutierung und damit Dimerisierung sogenannter Initiatorcaspasen wie Procaspase-8, die für die apoptotische Signalkaskade von großer Bedeutung sind⁴¹. Die Dimerisierung und somit Procaspase-8 Aktivierung findet am DISC statt, sodass es je nach Stärke des Stimulus zur Formation der aktiven Protease kommt, die ins Zytosol abgegeben wird⁴². Fu *et al.* veröffentlichten 2016 die Kristallstruktur der DED-Procaspase-8 Region und eröffneten dadurch eine neue Sichtweise auf die hierarchische DED-Filamentbildung. Diese Komplexbildung basierend auf Typ I, II, III Interaktionen zwischen 3 DED-Ketten in dem DED-Filament dient als Plattform zur Procaspase-8 Dimerisierung/Aktivierung⁴³. In der weiteren Signalkaskade spaltet der aktive Heterotetramer spezifische Substrate wie zum Beispiel die Effektorcaspase-3 und induziert somit Apoptose in der Zelle (Abbildung 1)⁴⁴. Darauf folgend spalten diese Proteasen Struktur- und DNA-Reparaturproteine wie zum Beispiel die Polymerase PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1), sodass es zur charakteristischen Apoptoseinduktion kommt, indem die DNA fragmentiert wird und das Chromatin kondensiert⁴⁵⁻⁴⁸.

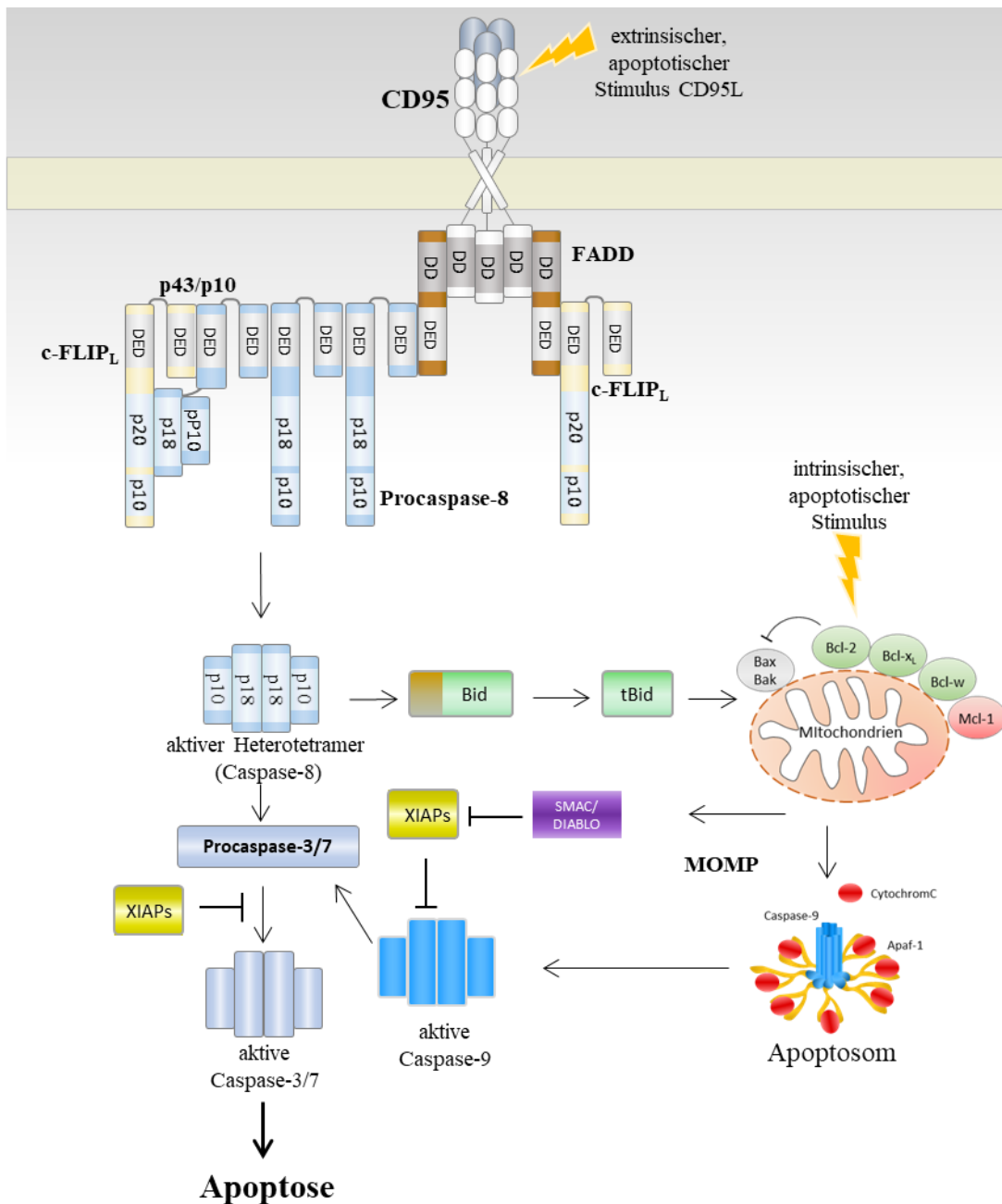


Abbildung 1: Schematische Darstellung des extrinsischen CD95/Fas-vermittelten und intrinsischen, apoptotischen Signalweges.

Die CD95L-vermittelte Stimulation des membrangebundenen CD95/Fas-Rezeptors führt zur Oligomerisierung des Rezeptors und anschließend Formation des Todes-induzierten Signalkomplexes (DISC). Der DISC besteht aus dem CD95/Fas-Rezeptor, dem Adapterprotein FADD (braun) und den DED-besitzenden Proteinen Procaspase-8 (blau), Procaspase-10 (nicht abgebildet) und c-FLIP (gelb). Die CD95 Todesdomäne (DD) interagiert mit der FADD DD. Die Todeseffektordomäne (DED) des Adapterproteins FADD bindet wiederum an Procaspase-8 und c-FLIP. Procaspase-8 Dimerisierung und anschließende Formation der DED-Filamente führen zu einer Induktion der Signalkaskade, welche final Apoptose in der Zelle auslöst. Die Initiierung der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose führt zur Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (MOMP), gefolgt von CytochromC Ausschüttung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Das Apoptosom (Caspase-9, Apaf-1 und CytochromC) formiert sich. Es kommt zur Aktivierung einer Signalkaskade, welche ebenfalls Apoptose in der Zelle auslöst. modifiziert nach⁴⁹

1.1.4 Caspasen- eine Familie von Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Proteasen

Caspasen sind eine evolutionär konservierte Familie von intrazellulären Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Proteasen, die essenzielle Funktionen in der Apoptose, in Entzündungsreaktionen, dem Zellüberleben, der Zellproliferation und –differenzierung haben. 1993 wurde die erste humane Caspase von Yuan *et al.* identifiziert und als IL-1 β -konvertierendes Enzyme (ICE) und später als Caspase-1 benannt⁵⁰. Caspasen werden in der Zelle in inaktiver Form als sogenannte Zymogene oder Procaspasen synthetisiert⁵¹. Basierend auf deren Funktion können humane Caspasen in zwei Gruppen unterteilt werden: inflammatorische und apoptotische Caspasen. Caspase-1, -4, -5, -11 und -12 gehören zu den inflammatorischen Caspasen, wobei Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 an apoptotischen Signalwegen beteiligt sind. Apoptotische Caspasen lassen sich weiter in Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) gruppieren. Funktionell spalten und aktivieren Initiatorcaspasen Effektorcaspasen und lösen damit eine Signalkaskade aus. Caspase-14 kann funktionell in keine Gruppe eingegliedert werden. Diese Protease ist an epidermaler Differenzierung beteiligt^{52,53}. Alle Caspasen besitzen eine C-terminale Caspase-Domäne, die proteolytisch Zielproteine spaltet. Zusätzlich haben alle Initiatorcaspasen eine nicht-enzymatische Domäne wie eine DED (Caspase-8/-10) oder eine Caspase Aktivierungs- und Rekrutierungs-Domäne (CARD) (z. B. Caspase-1/-2) am N-Terminus. Die DED- als auch die CARD-besitzenden Proteine gehören wie DD-besitzende Proteine auch zur DD Superfamilie und ermöglichen den Aufbau von großen, oligomeren Signalkomplexen⁵⁴.

Im zellulären System existieren Proteine, die die Funktion spezifischer Caspasen mittels Interaktion inhibieren. Beispielsweise XIAP (engl. *x-linked inhibitor of apoptosis protein*), ein Mitglied der IAP (engl. *inhibitors of apoptosis protein*) Familie blockiert Caspase-3, -7 als auch -9 durch spezifische Bindung mittels BIR-Domänen (engl. *baculoviral IAP repeat*)⁵⁵.

1.1.4.1 Die Initiatorcaspase- Caspase-8

In der extrinsischen, apoptotischen Signalkaskade ist Procaspase-8 die wichtigste Initiatorcaspase. Sie wird auch als CAP4, FLICE, MACH oder MCH5 bezeichnet. Nach derzeitigem Wissen sind zwei Procaspase-8 Isoformen Procaspase-8a (p55) und -8b (p53) bekannt, die an der DISC-Formation beteiligt sind⁵⁶. Beide Isoformen besitzen aufeinanderfolgende DED (Tandem-DED): DED1 und DED2⁴⁵. Zusätzlich besitzt Procaspase-8a eine 2 kDa große Sequenz zwischen der zweiten DED und der großen katalytischen Untereinheit⁴⁵. DED1 und DED2 sind N-terminal lokalisiert, wohingegen sich am C-Terminus die katalytisch aktiven Domänen p18 und p10 befinden. Nach detaillierten Procaspase-8 Kryo-Elektronenmikroskopie-Analysen wurde die Proteinzusammensetzung und -faltung der Procaspase-8 Moleküle am DISC entschlüsselt.

Diese formen filamentöse Strukturen, die als DED-Filamente bezeichnet werden^{57,58}. Davor dachte man, dass lediglich lineare Procaspase-8 Ketten für die Dimerisierung und anschließende Procaspase-8 Aktivierung am DISC erforderlich sind. Mittlerweile wurde gezeigt, dass diese Ketten lediglich Substrukturen der Procaspase-8 DED-Filamente sind. Drei Procaspase-8 Ketten bilden eine funktionelle Triplehelix aus^{42,57-59}. In den Filamenten erfolgt die Aktivierung mittels Homodimerisierung zweier Procaspase-8 Moleküle durch DED-DED-Interaktion gefolgt von proteolytischer Spaltung an bestimmten Aspartatresten (Asp). Dabei kommt es bei der Homodimerisierung in den DED-Filamenten zu Konformationsänderungen der Procaspase-8a/b, die zur Formation des aktiven Procaspase-8 Zentrums und damit zur Aktivierung führen^{59,60}. Darauf folgt eine stufenweise Procaspase-8 Spaltung, die auf zwei verschiedene Wege ablaufen kann. Der erste Abspaltungsweg beginnt mit der Bildung der p43/p41 Spaltprodukte (Abbildung 2). Die p43/p41 Spaltungsvariante ist initialisiert durch die Procaspase-8a/b Spaltung am Asp374, dass die Produkte p43/p41 und p12 zur Folge hat. Des Weiteren werden die Fragmente autokatalytisch am Asp384 und Asp210/216 getrennt. Final führt dies zum aktiven Caspase-8 Heterotetramer p18₂/p10₂⁶¹⁻⁶³. Dieser besteht aus zwei großen (p18) und zwei kleinen (p10) Untereinheiten, wobei p18 das aktive, enzymatische Zentrum beinhaltet⁶⁴⁻⁶⁸. Zusätzlich wurde ein paralleler Spaltungsweg entdeckt. Procaspase-8a/b kann ebenfalls am Asp216 gespalten werden. Dies führt zur Formation des C-terminalen Spaltproduktes p30. Die anschließende Proteolyse dieses Fragments bildet auch die Untereinheiten p18 und p10, die schließlich zum aktiven Heterotetramer formieren (Abbildung 2)⁶². An die Procaspase-8 Aktivierung sind weitere Signalwege angeschlossen. Die aktive Caspase-8 ist nun in der Lage weitere spezifische Substrate wie zum Beispiel die Effektorcaspasen Procaspase-3/7 zu spalten und final Apoptose auszulösen^{44,69,70}.

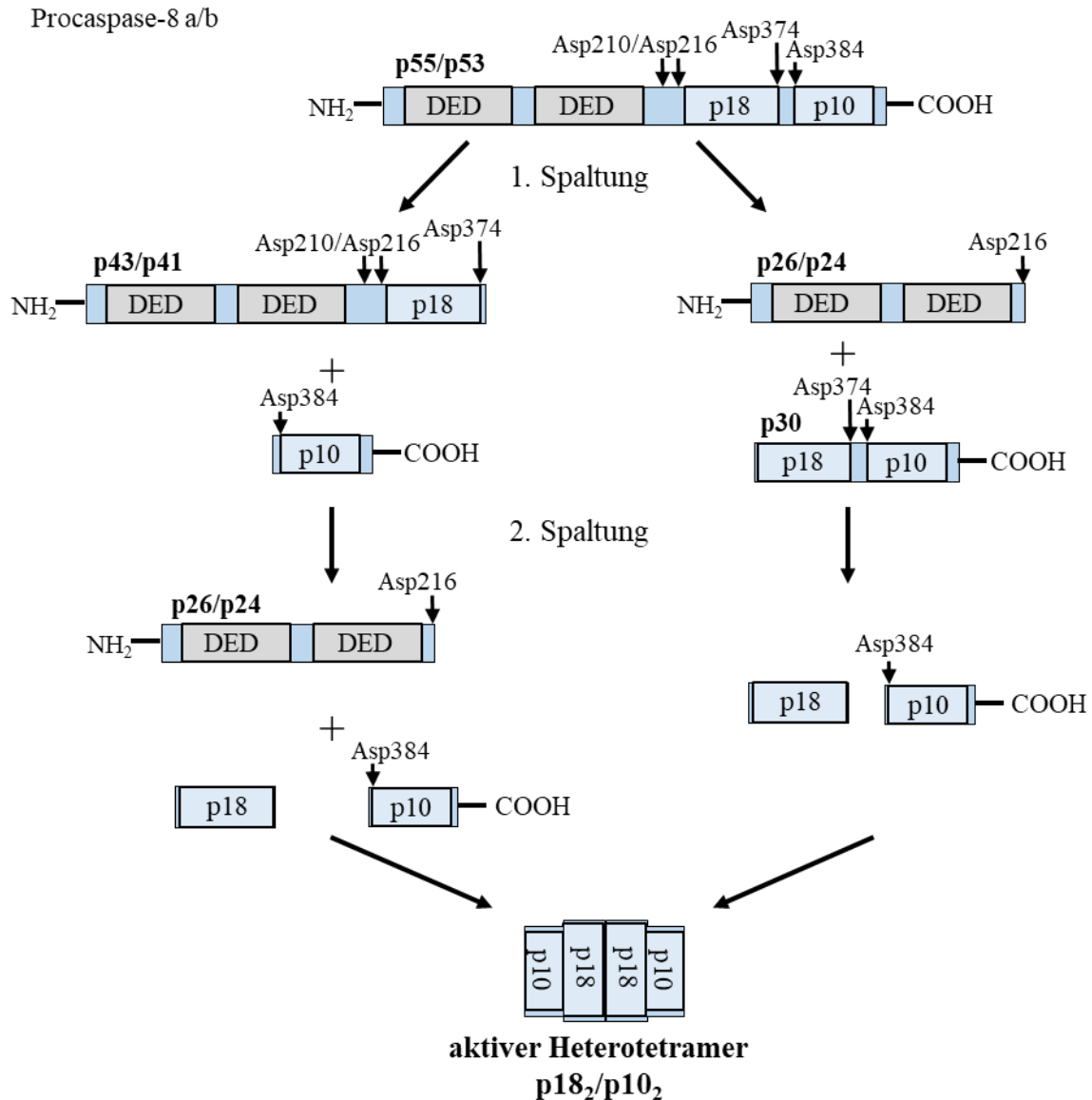


Abbildung 2: Die zwei Varianten der Procaspase-8 Spaltung am DISC.

Zwei Procaspase-8 Spaltungswege am DISC sind schematisch dargestellt. Der auf der linken Seite dargestellte p43/p41 Spaltweg beinhaltet die Trennung in p43/p41 am Asp374 gefolgt von der finalen Spaltung am Asp216 in p18. Die auf der rechten Seite dargestellte Spaltvariante zeigt die Spaltung von p30 am Asp216, die zur Bildung von p18 und p10 nach weiterer Spaltung an Asp374 und Asp384 führt. Der nach beiden Spaltungswegen resultierende, aktive Caspase-8 Heterotetramer p18₂/p10₂ aktiviert daraufhin zum Beispiel Procaspase-3, sodass letztendlich Apoptose ausgelöst wird.

1.1.5 c-FLIP-Regulator des extrinsischen, apoptotischen Signalweges

c-FLIP fungiert als ein wichtiger Apoptoseregulator direkt am DISC⁷¹. Kurz bevor das humane c-FLIP entdeckt wurde, identifizierten Thome *et al.* ein virales Protein (v-FLIP). Dieses DED-besitzende Protein wurde in humanen Zellen durch verschiedene Viren exprimiert, um Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in der späten Phase der Infektion zu blockieren⁷². Strukturell ist das Protein c-FLIP ein Procaspase-8 Homolog und besitzt auch wie Procaspase-8 zwei DEDs.

Es sind drei c-FLIP Isoformen c-FLIP_{Long} (c-FLIP_L), c-FLIP_{Short} (c-FLIP_S) und c-FLIP_{Raji} (c-FLIP_R) und zwei Spaltprodukte p43 und p22 bekannt (Abbildung 3)⁷³. Alle drei Isoformen besitzen N-terminal zwei DEDs, wobei lediglich c-FLIP_L eine katalytisch inaktive Caspase-8-ähnliche Region am C-Terminus aufweist. Funktionell inhibieren die kurzen Isoformen c-FLIP_S und c-FLIP_R die Procaspase-8 Aktivierung am DISC durch Formation von inaktiven Heterodimeren⁷⁴.

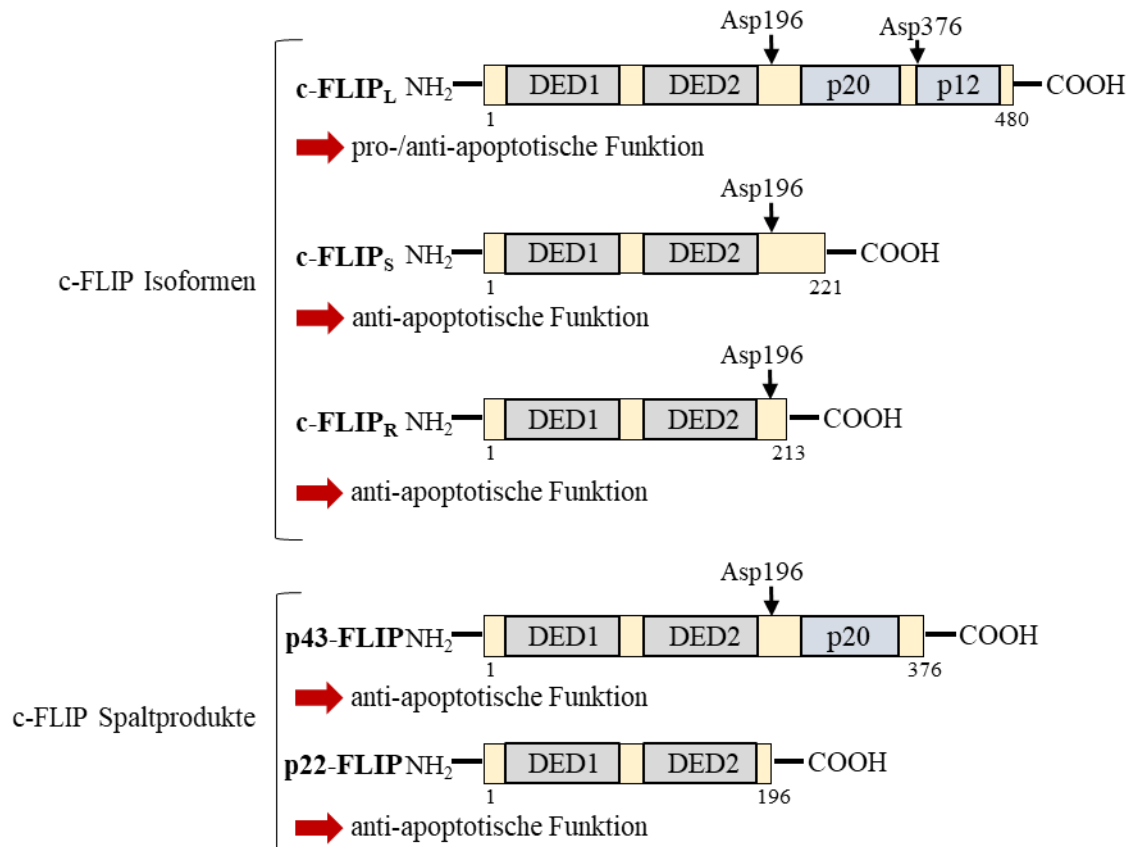


Abbildung 3: c-FLIP Isoformen und ihre Spaltprodukte.

c-FLIP besitzt drei, in der Zelle auftretende Isoformen: c-FLIP_L (c-FLIP_{Long}), c-FLIP_S (c-FLIP_{Short}) und c-FLIP_R (c-FLIP_{Raji}). Die Isoformen haben anti-apoptotische Effekte nach CD95-DISC-Formation. Jedoch kann c-FLIP_{Long} auch pro-apoptotisch je nach Konzentration am DISC wirken. Die Spaltung der c-FLIP Proteine führt zur Bildung zweier Spaltprodukte p43 und p22. modifiziert nach ⁷⁵

Des Weiteren bewiesen Hughes *et al.* durch *in vitro* Analysen mit rekombinanten Proteinen, dass c-FLIP_S als „Kettenbrecher“ fungiert und somit die Filamentformation und Caspase-8 Aktivierung blockiert⁷⁶. c-FLIP_L hat im Gegensatz dazu eine konzentrationsabhängige pro- als auch anti-apoptotische Doppelfunktion. Fricker *et al.* zeigten, dass es bei geringer c-FLIP_L-Konzentration und starker CD95L-Stimulation zu einer Verstärkung des apoptotischen Signals kommt. Existiert eine Überexpression des c-FLIP_L Proteins in der Zelle, inhibiert das Protein die Procaspase-8 Homodimerisierung durch Bildung von Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimeren⁷⁷. Des Weiteren kann c-FLIP_L durch Procaspase-8 am DISC gespalten werden. Die resultierenden Spaltprodukte p43 und p22 sind nun in der Lage mit am NF-κB (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalweg beteiligten Proteinen zu interagieren. Dies führt zur Aktivierung des NF-κB Transkriptionsfaktors und somit zur Signalweiterleitung von überlebenswichtigen Abläufen in der Zelle⁷⁸.

In den letzten Jahren wurden viele wissenschaftliche Veröffentlichungen zur funktionellen Rolle des regulatorischen Proteins c-FLIP publiziert. Eine Hypothese lautete, dass sowohl c-FLIP als auch Procaspase-8 direkt an FADD binden und somit um die Bindung am DISC konkurrieren⁷⁹. Weiterhin wurde nach Mutagenese-Analysen die Relevanz beider c-FLIP DED1/DED2 Regionen für die Interaktion mit FADD DED festgestellt^{80,81}. 2014 belegten Majkut *et al.*, dass nach Rezeptor-Stimulation FADD DED bevorzugt mit seiner strukturellen Bindungsfläche der $\alpha 1/\alpha 4$ Helizes mit der DED2 Region von c-FLIP interagiert. Im Gegensatz dazu besteht eine höhere Affinität zwischen den FADD $\alpha 2/\alpha 5$ Helizes und der DED1 Region von Procaspase-8⁸². Im Widerspruch dazu steht das hierarchische DISC-Modell, das eine FADD-Procaspase-8-Interaktion voraussetzte, um im Anschluss c-FLIP am DISC zu detektieren⁷⁶. Durch die 2016 veröffentlichte DED-Procaspase-8 Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur konnte eine neue Hypothese entwickelt werden, in der sowohl c-FLIP Proteine als auch Procaspase-8 Moleküle in die Filamentstruktur einbaut werden⁵⁷.

1.1.6 Der CD95/Fas-vermittelte, nekroptotische Signalweg

Die Aktivierung des CD95/Fas-Todesrezeptors resultiert nicht nur in einer apoptotischen Signalkaskade. Durch Caspase-8 Inhibierung können auch andere Signalwege zur Initiierung eines programmierten Zelltods wie zum Beispiel der Nekroptose ausgelöst werden. RIPK1 (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) bildet dabei ein Schlüsselprotein in der apoptotischen und nekroptotischen Signalkaskade am CD95-DISC in Abhängigkeit von einer Caspase-8 Aktivierung oder Inhibierung^{83,84}. Das Protein gehört zur RIP Kinase Familie und besitzt strukturell eine DD Region am C-Terminus⁸⁵. Des Weiteren wird die Proteinfunktion durch post-translationale Modifikationen wie Ubiquitylierung oder Phosphorylierung reguliert. RIPK1 wird durch cIAP1/2 (engl. *cellular inhibitor of apoptosis protein 1 and 2*), die wie auch das Protein XIAP zur Familie der IAP Proteine gehören, ubiquityliert. Geserick *et al.* zeigten, dass die Inhibierung von cIAPs in Kombination mit pharmakologischer Caspase Inhibierung zu einer verstärkten RIPK1 Rekrutierung am DISC und zu einer erhöhten Formation des Komplexes II, bestehend aus FADD, RIPK1, Procaspase-8 und c-FLIP, kommt und schließlich der programmierte Zelltod induziert wird⁸⁶. Deubiquityliertes, phosphoryliertes RIPK1 interagiert durch seine RHIM-Domäne (engl. *RIP homotypic interaction motif*) mit RIPK3 (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) und phosphoryliert es⁸⁷. Die aktivierte Kinase RIPK3 phosphoryliert die Pseudokinase MLKL (engl. *mixed lineage kinase domain-like protein*), die final durch Komplexbildung die Porenformation in der Plasmamembran auslöst (Abbildung 4). Diese Form des programmierten Zelltods nennt man Nekroptose⁸⁸.

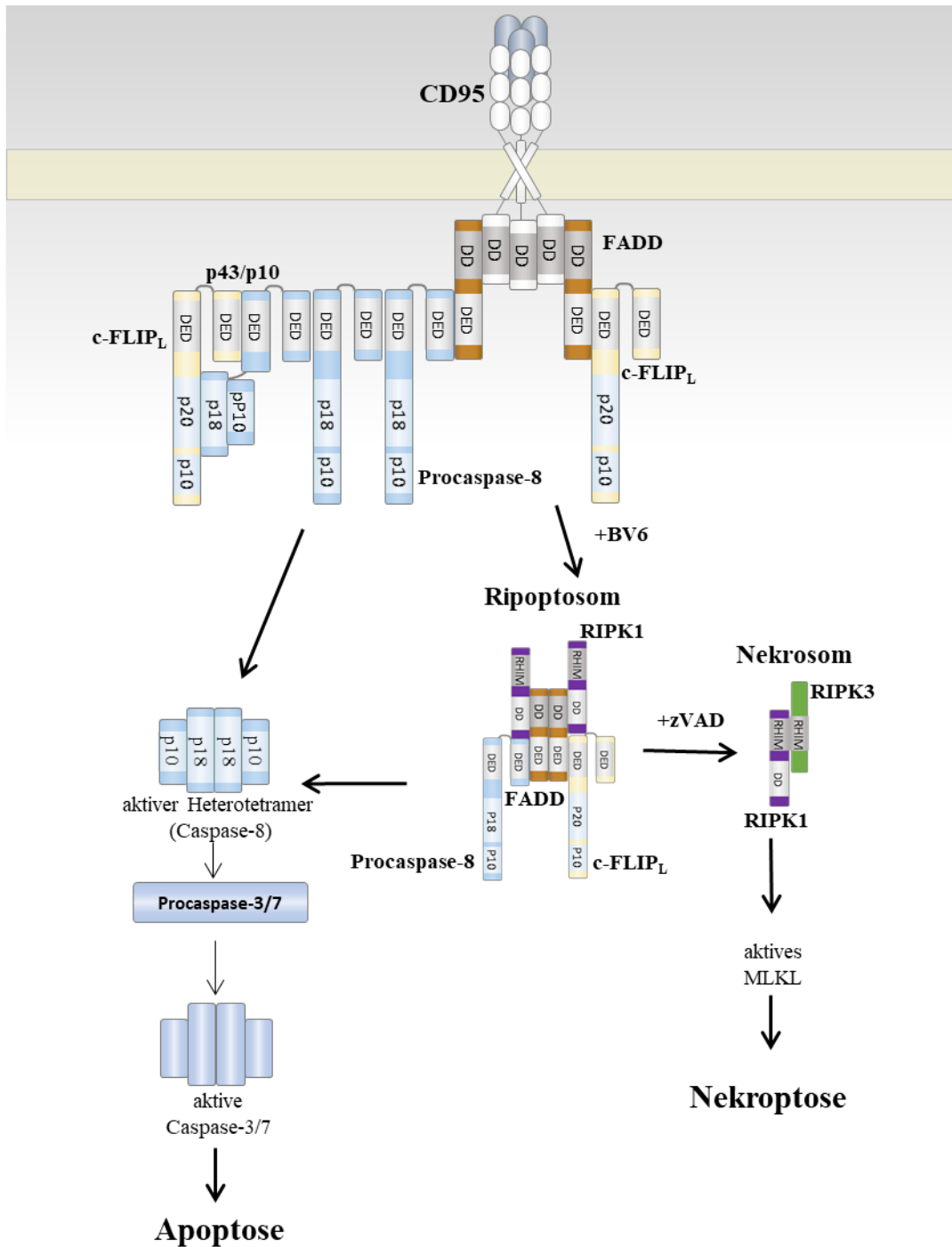


Abbildung 4: Schematische Darstellung des apoptotischen als auch nekroptotischen CD95/Fas-vermittelten Signalweges.

Die CD95L-vermittelte Stimulation des membrangebundenen CD95/Fas-Rezeptors führt zur Oligomerisierung des Rezeptors und anschließend Formation des Todes-induzierten Signalkomplexes (DISC). Der DISC besteht aus dem CD95/Fas-Rezeptor, dem Adapterprotein FADD (braun) und den DED-besitzenden Proteinen Procaspase-8 (blau), Procaspase-10 (nicht dargestellt) und c-FLIP (gelb). Die CD95 Todesdomäne (DD) interagiert mit der FADD DD. Die Todeseffektordomäne (DED) des Adapterproteins FADD bindet wiederum an Procaspase-8 und c-FLIP. Procaspase-8 Dimerisierung und anschließende Formation der DED-Filamente führen zu einer Induktion der Signalkaskade, welche final Apoptose in der Zelle auslöst. Die Inhibierung der Proteine cIAP1/2 mittels SMAC *mimetics* wie BV6 führt zur Deubiquitinylierung des Proteins RIPK1 und somit zur Formation des Ripoptosoms bestehend aus RIPK1, Procaspase-8, FADD und c-FLIP. Dieser Komplex aktiviert die Caspasekaskade und initiiert Apoptose. Caspase-8 Inhibierung mittels zum Beispiel zVAD (pan-Caspase-Inhibitor) fördert Nekroptose durch die Formation des Nekrosoms. In diesem Komplex phosphoryliert die Kinase RIPK1 RIPK3. Es folgt eine MLKL Aktivierung durch Phosphorylierung, die final durch Oligomerisierung die Porenformation in der Plasmamembran auslöst. Es kommt zur Nekroptose. modifiziert nach⁴⁹

1.1.7 bekannte Behandlungsstrategien gegen Tumorerkrankungen mittels spezifischer Beeinflussung der Zelltodsignalwege

Veränderungen im apoptotischen Signalweg können verschiedenste Krankheitsbilder wie Tumorerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen hervorrufen. In den letzten Jahren wurde vermehrt versucht Therapeutika zu entwickeln, die lediglich die apoptotische Dysregulation beheben. Dazu gehören auch sogenannte *small molecules*. Diese niedermolekularen Verbindungen binden spezifisch an ihre direkten Zielproteine und beeinflussen damit deren Funktion. *Small molecules* haben eine molekulare Masse von maximal 900 Da und sind somit in der Lage ohne aktive Hilfe durch die Zellmembran ins Innere der Zelle zu diffundieren⁸⁹. Die Inhibitoren Necrostatin-1 (inhibiert RIPK1 Phosphorylierung), S63845 (inhibiert Mcl-1 (engl. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*)) und BV6 (engl. *bivalent SMAC mimetic 6*) sind nur einige, in den letzten Jahren entwickelte Anwendungsbeispiele für *small molecules*⁹⁰⁻⁹².

Die intrazelluläre Aktivierung der verschiedenen Zelltodmechanismen kann durch verschiedene Stimuli induziert werden. Ein negativer Regulator der IAP Proteinfamilie ist zum Beispiel das mitochondriale SMAC Protein, welches nach apoptotischem Stimulus aus den Mitochondrien in das Zytosol ausgeschüttet wird und mittels Interaktion an speziellen N-terminalen Aminosäureresten (Ala-Val-Pro-Ile) die Funktion der IAP Proteine blockiert^{93,93-96}. Des Weiteren wurde in mehreren Publikationen festgestellt, dass explizit AML (Akute Myeloide Leukämie)-Patienten eine Überexpression der IAP Proteine und ein Verlust des endogenen Inhibitors SMAC aufwiesen, welche mit schlechten Prognosen assoziiert sind⁹⁷⁻⁹⁹. Diese Erkenntnis bot einen Angriffspunkt zur Entwicklung von spezifischen Medikamenten, die die Funktion des IAP Regulators SMAC nachahmen. Dabei war die Entdeckung der SMAC Kristallstruktur im Jahr 2000 von wesentlicher Bedeutung⁹⁴. In den darauffolgenden Jahren wurden verschiedenste SMAC *mimetics* (Nachahmer) synthetisiert, um sie als innovative Medikation für AML-Patienten einzusetzen.

Der 2007 zum ersten Mal publizierte, bivalente IAP Antagonist BV6 ist ebenfalls ein SMAC *mimetic*⁹². Im Detail initiiert BV6 die proteasomale Degradation von cIAP1/2, sodass es zur RIPK1 Deubiquitylierung kommt. Des Weiteren konnte belegt werden, dass die cIAP- und XIAP(*X-linked inhibitor of apoptosis protein*)-vermittelte Caspase Inhibierung aufgehoben wurde^{92,100,101}. Petersen *et al.* stellten allerdings fest, dass eine Behandlung mit SMAC *mimetics* wie BV6 zu einer rückgekoppelten cIAP2 Hochregulierung führt¹⁰². Um diese Resistenz zu reduzieren, wurden in den vergangenen Jahren kombinatorische Behandlungsstrategien für verschiedene Tumorerkrankungen getestet. Die Kombination aus IAP Antagonisten und Chemotherapeutika wie zum Beispiel Gemcitabin, Etoposid und Cisplatin zeigten in verschiedenen Tumormodellen eine Sensitivierung der malignen Zellen¹⁰³⁻¹⁰⁵. Die Medikationen lösten trotzdem leider starke Nebenwirkungen aus und beeinflussten das Immunsystem der Patienten drastisch.

1.2 AKUTE MYELOIDE LEUKÄMIE (AML)

Die erst im 19. Jahrhundert als „Leukämie“ von Rudolf Virchow erstmalig beschriebene maligne Erkrankung wurde nach neuesten Datenauswertungen des Robert-Koch-Institutes bei knapp 14.000 erwachsenen Menschen in Deutschland allein 2016 diagnostiziert¹⁰⁶. Bei Kindern unter 15 Jahren sind Leukämieerkrankungen mit etwa ein Drittel die häufigste Tumorerkrankung (Abbildung 5). Es existieren diverse Leukämietypen wie zum Beispiel akuter myeloider Leukämie (AML) oder akute lymphatische Leukämie (ALL). Dabei ist die lymphatische Leukämie mit 24,9 % die häufigste Einzeldiagnose bei Kindern unter 15 Jahren. Ein Viertel aller deutschen erwachsenen Patienten und 4,1 % aller Kinder (am häufigsten bei unter 2-Jährigen) erkrankt an Akuter Myeloider Leukämie (AML).

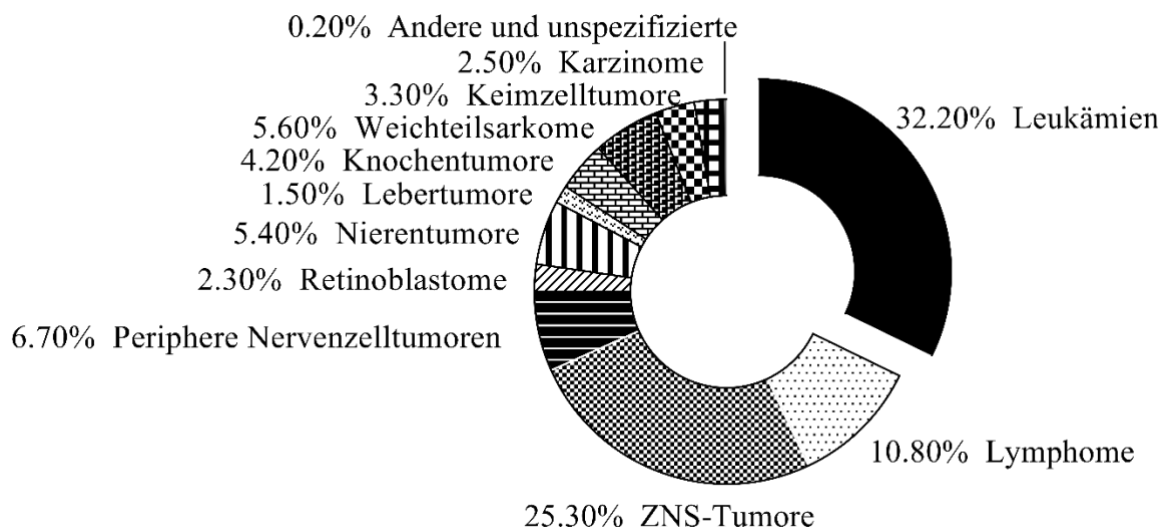


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Tumorerkrankungen bei Kindern unter 18 Jahren in Deutschland.

Darstellung der ermittelten Tumorerkrankungen bei Kindern unter 18 Jahren in Deutschland) Die Daten wurden ab 2008 bis 2017 generiert, modifiziert nach¹⁰⁶

Dabei liegt das relative 5-Jahres-Überleben bei adulten Erkrankten lediglich bei 21 %¹⁰⁶. Zwar erkranken weniger Kinder unter 15 Jahren an AML, jedoch ist die Überlebenschancen dieser deutlich niedriger im Vergleich zu anderen auftretenden Leukämieformen. Prozentual sind 11 % aller Zweitneoplasien basierend auf AML. Eine Ursache für die Aggressivität dieser Erkrankung sind verschiedene chromosomale Translokationen und Genmutationen, die wiederum die hämatopoetische Entwicklung und Differenzierung beeinflussen, sodass es zu Anhäufungen nicht ausdifferenzierter, myeloider Zellen kommt. Ein Drittel dieser heterogenen Erkrankung lässt sich auf eine Mutation im FLT3-(engl. *Fms-like tyrosine kinase 3*)Rezeptor zurückführen¹⁰⁷.

1.2.1 Der FLT3-Rezeptor

Der Rezeptor FLT3 gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase Klasse III, welche sich durch fünf zusammengehörige, extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen, eine Transmembrandomäne, eine zytosolische Juxtamembran-Region und eine zytoplasmatische Kinase-Domäne charakterisieren lassen¹⁰⁸. Im Zellgleichgewicht hat der FLT3-Rezeptor eine wichtige Funktion als Wachstumsregulator in myeloiden und in B-Progenitorzellen. Auf Grundlage dessen, können durch Mutationen des Rezeptors ein unkontrolliertes Wachstumsverhalten und ein unendliches Zellüberleben resultieren. Die häufigsten, bekannten Genmutationen sind interne Tandem-Duplikationen (ITD), die zwischen 3-400 Basenpaare lang sein können und die im Exon 14 oder 15 vorkommen. Des Weiteren treten Punktmutationen, die in der Kinase-Domäne (PKD) lokalisiert sind, auf. Beide Formen führen zu einer Phosphorylierung des Rezeptors und damit zu einer Ligand-unabhängigen, konstitutiven Aktivierung der Überlebenssignalwege in der Zelle^{109,110}. Die Signalkaskade aktiviert durch Phosphorylierung zum Beispiel STAT 5 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5*)¹¹¹, den RAS/MAPK Signalweg (engl. *rat sarcoma /Mitogen-activated protein kinase*)¹¹¹, den PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/ protein kinase B*)¹¹² Signalweg und NF-κB¹¹³, die für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und das Zellüberleben von großer Bedeutung sind (Abbildung 6).

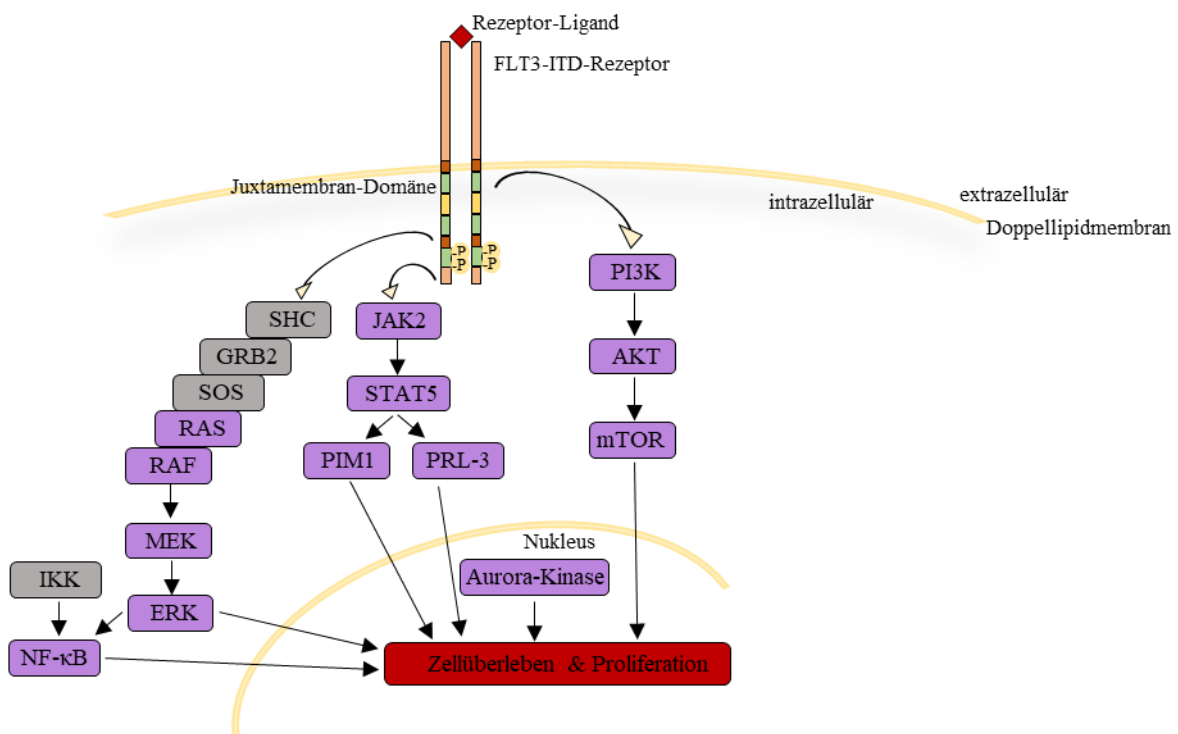


Abbildung 6: Schematische Darstellung des FLT3-Rezeptors und dessen beeinflusster Signalwege.

Durch die interne Tandem-Duplikation im FLT3-Rezeptor kommt es zu einer Ligand-unabhängigen Dimerisierung des Rezeptors und somit zu einer Autophosphorylierung, die zu einer konstitutiven Rezeptoraktivierung führt. Diese Aktivierung initiiert verschiedene Signalkaskaden wie zum Beispiel den STAT 5 Signalweg, den ERK Signalweg, den PI3K/AKT Signalweg und die NF-κB Aktivierung. Diese führen wiederum zum Zellüberleben und zu einer verstärkten Proliferation. modifiziert nach ¹¹⁴

Diese konstitutive Signalweiterleitung führt zu einem gestörten Zellzyklus. Daraufhin besteht dadurch ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung onkogener Mutationen. Im Gegensatz dazu wurden auch Veränderungen des apoptotischen Signalweges, bezogen auf eine Hochregulierung der anti-apoptotischen Schlüsselproteine Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) und Mcl-1, festgestellt^{115,116}. Jedoch wurde die Regulation des extrinsischen, apoptotischen Signalweges dabei nicht detailliert untersucht. Nach Studien von Mead *et al.* ist die 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit FLT3-ITD Mutation signifikant schwächer im Vergleich zu Patienten mit PKD-Mutationen¹¹⁷.

1.3 ZIELSTELLUNG

Während meiner Doktorarbeit beschäftigte ich mich mit einem der bedeutendsten Zelltod-auslösenden Signalwege, dem CD95/Fas-vermittelten Apoptose Signalweg. Im Speziellen galt mein Interesse dem Entschlüsseln neuer molekularer Mechanismen zur CD95-abhängigen Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen, als auch der Entwicklung innovativer Ansätze zur gezielten Modifikation des Signalweges in Tumorerkrankungen.

In den meisten Tumorerkrankungen ist die Homöostase und somit das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und programmiertem Zellsterben gestört. Eine Ursache dafür ist beispielsweise eine zelluläre Überproduktion von anti-apoptotischen Proteinen wie c-FLIP. Um den Einfluss beider bekannter c-FLIP Isoformen c-FLIP_L und c-FLIP_S im CD95-Signalweg in Tumorzellen zu untersuchen sollten neuartige biochemische und computer-basierte *in silico* Methoden angewendet werden, um ein detailliertes Wissen über die inhibitorische Funktion und Komplexinteraktion dieser Proteine im CD95-DISC zu erlangen (Abbildung 7). Um nun diese analysierte Protein-Interaktion zwischen Procaspase-8 und c-FLIP_L im Komplex zu stabilisieren sollten spezifische *small molecules*, welche die Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimerbildung beeinflussen, mittels *in silico* Screening ausgewählt werden. Diese kombinatorische Behandlung des *small molecules* mit einer CD95-Stimulation in malignen Zellen sollte mittels *in vitro* Analysen untersucht werden, um eine Sensitivierung der Tumorzellen festzustellen (Abbildung 7). Danach CD95 Aktivierung nicht nur Apoptose sondern auch Nekroptose ausgelöst werden kann, war ein weiteres Ziel die Entschlüsselung eines Zielproteins in malignen AML-Zellen mit FLT3-ITD Mutation, welches an beiden Signalwegen beteiligt ist. Dabei sollten die Tumorzellen mittels CD95L und SMAC *mimetic* Behandlung in Richtung programmierten Zelltod sensitiviert und dessen molekularer Mechanismus analysiert werden (Abbildung 7).

Zusammenfassend können die Ziele meiner wissenschaftlichen Arbeit also in zwei Hauptteile aufgegliedert werden:

1. Entschlüsselung neuer Induktionsmechanismen der CD95/Fas-vermittelten Apoptose
2. Entwicklung innovativer therapeutischer Behandlungsansätze zur gezielten Beeinflussung des CD95/Fas Signalweges

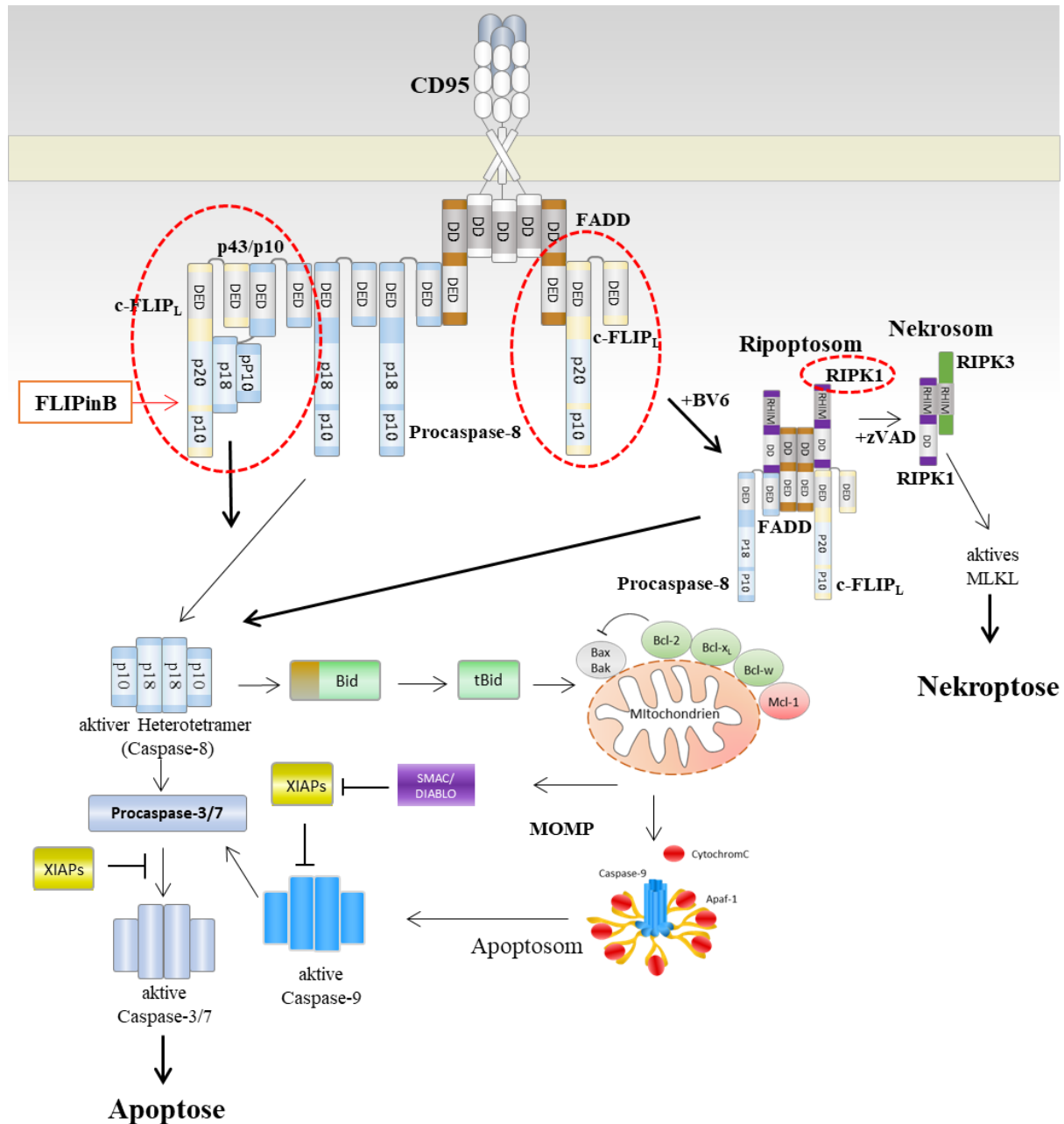


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zu untersuchenden, komplexen CD95/Fas-vermittelten Signalwege.

Die CD95L-vermittelte Stimulation des membrangebundenen CD95/Fas-Rezeptors führt zur Oligomerisierung des Rezeptors und anschließende Formation des Todes-induzierten Signalkomplexes (DISC). Der DISC besteht aus dem CD95/Fas-Rezeptor, dem Adapterprotein FADD (braun) und den DED-besitzenden Proteinen Procaspase-8 (blau), Procaspase-10 (nicht abgebildet) und c-FLIP (gelb). Die CD95 DD interagiert mit der FADD DD. Die DED des Adapterproteins FADD bindet wiederum an Procaspase-8 und c-FLIP. Procaspase-8 Dimerisierung und anschließende Formation der DED-Filamente führen zu einer Induktion der Signalkaskade, welche final Apoptose in der Zelle auslöst. Die Initiierung der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose führt zur Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (MOMP), gefolgt von CytochromC Ausschüttung aus den Mitochondrien ins Zytosol. Das Apoptosom (Caspase-9, Apaf-1 und CytochromC) formiert sich. Es kommt zur Aktivierung einer Signalkaskade, welche ebenfalls Apoptose in der Zelle auslöst. Die Inhibierung der Proteine cIAP1/2 mittels SMAC *mimetics* wie BV6 führt zur Deubiquitynylierung des Proteins RIPK1 und somit zur Formation des Ripoptosoms bestehend aus RIPK1, Procaspase-8, FADD und c-FLIP. Dieser Komplex aktiviert die Caspasekaskade und initiiert Apoptose. Caspase-8 Inhibierung mittels zum Beispiel zVAD (pan-Caspase-Inhibitor) fördert Nekroptose durch die Formation des Nekrosoms. Die Kinase RIPK1 phosphoryliert RIPK3. Es folgt eine MLKL Aktivierung durch Phosphorylierung, die final durch Oligomerisierung die Porenformation in der Plasmamembran auslöst. Es kommt zur Nekroptose. Die in den drei Publikationen analysierten Interaktionsschnittstellen und Signalwegmechanismen wurden mit einer Markierung (rote Ellipsen) hervorgehoben. modifiziert nach⁴⁹

2 WISSENSCHAFTLICHE ERGEBNISSE-PUBLIKATIONEN

2.1 ENTSCHLÜSSELUNG NEUER INDUKTIONSMECHANISMEN DER CD95/FAS-VERMITTELTEN APOPTOSE

2.1.1 neueste Erkenntnisse zum regulatorischen c-FLIP Mechanismus am CD95-DISC

Die zusammengefassten Ergebnisse dieses Kapitels wurden in der Publikation „*Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly*“ von Hillert *et al.* 2020 in *Oncogene*, welches im Vorwort aufgelistet ist, veröffentlicht.

Die Entdeckung der pro- und anti-apoptischen Doppelfunktion der Isoform c-FLIP_L, sowie die deutliche Caspase Inhibierung durch die kurzen Isoformen c-FLIP_S und c-FLIP_R ließen einige Fragen zu mechanistischen Details dieses Prozesses offen. In der Publikation „*Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly*“ konnte mittels CD95-DISC-Immünpräzipitationen (CD95-DISC-IP) von Caspase-8-defizienten malignen T-Lymphozyten eine Caspase-8-unabhängige c-FLIP Rekrutierung am DISC gezeigt werden (Abbildung 8 A). Eine lentivirale, stabile Überexpression der einzelnen c-FLIP Isoformen c-FLIP_L und c-FLIP_S in humanen Zervixkarzinomzellen ergab nach zellbasierten Zelltodanalysen, dass sowohl c-FLIP_S (in HeLa-CD95-FS) als auch c-FLIP_L (in HeLa-CD95-FL) eine deutliche Resistenz in Bezug auf CD95/Fas Aktivierung entwickelten (Abbildung 8 B-E). Die früh als auch spät apoptotischen Zellen der unterschiedlichen Tumorzelllinien wurden nach CD95L-Stimulation mittels AnnexinV-FITC/Sytox™Orange gefärbt und durch bildgebende Durchflusszytometrie quantifiziert (Abbildung 8 B-D). Im Gegensatz dazu zeigten parentale HeLa-CD95 Zellen eine zeit-abhängige Erhöhung der früh apoptotischen Zellpopulation (AnnexinV-FITC-positive Zellen) als auch der spät apoptotischen Zellpopulation (AnnexinV-FITC/Sytox™Orange-positive Zellen).

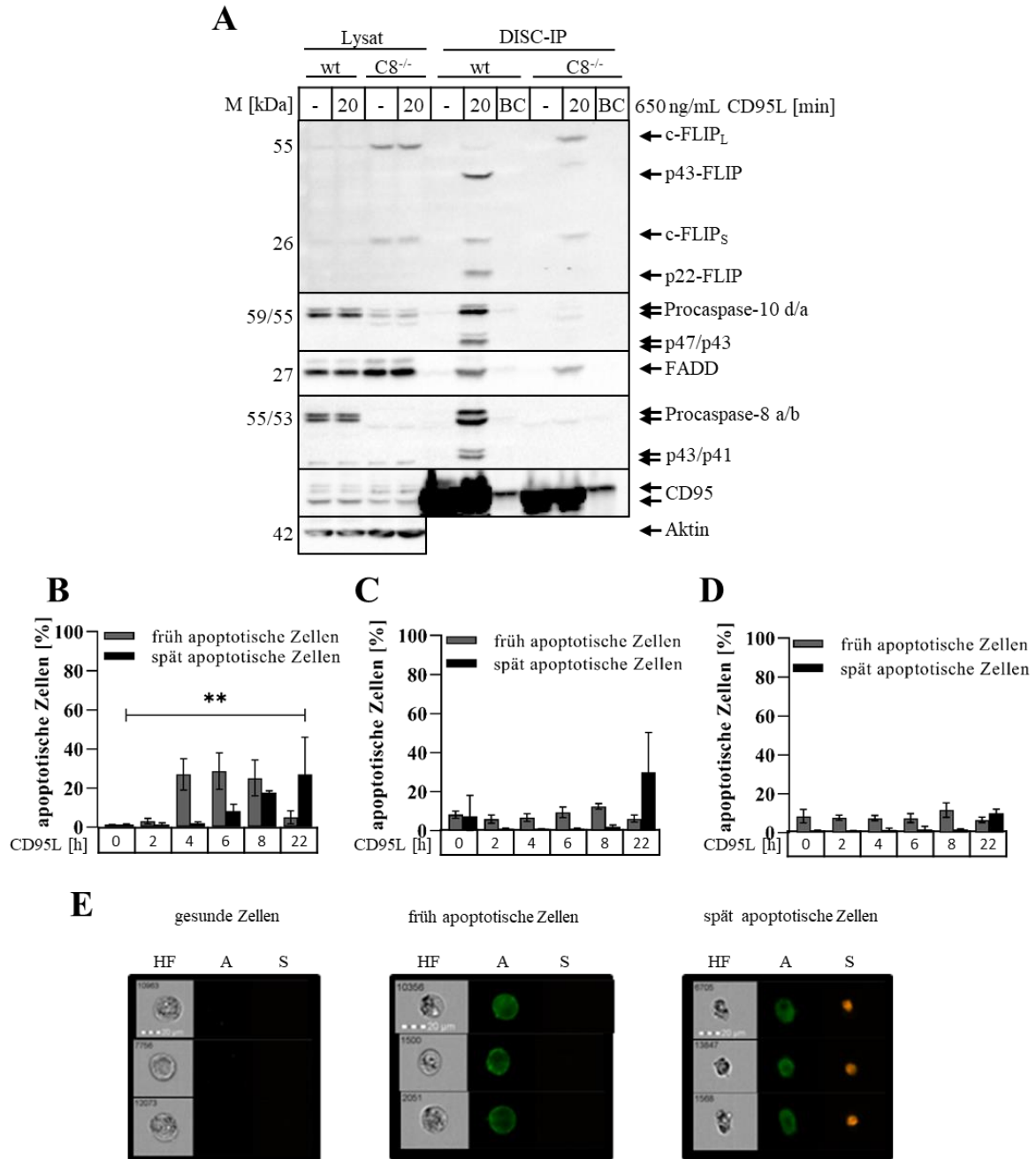


Abbildung 8: c-FLIP Isoformen binden Caspase8-unabhängig am CD95-DISC und inhibieren nach Überexpression den extrinsischen, apoptotischen CD95-Signalweg.

(A) Jurkat Wildtyp-Zellen (wt) als auch Caspase-8-defiziente Jurkat Zellen (C8^{-/-}) wurden mit 650 ng/mL CD95L für 20 min stimuliert. Die CD95-DISC-IP wurde mittels APO-1 Antikörper (anti-CD95) durchgeführt. Im Anschluss wurden die CD95-DISC-IP als auch die dazugehörigen Zelllysate durch Western Blot Analysen untersucht. Aktin diente als Ladekontrolle. BC → IP-Kontrolle, das Lysat wird lediglich mit *beads* ohne Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu detektieren. Ein repräsentatives Experiment aus 5 unabhängigen Experimenten wurde gezeigt. (B-D) HeLa-CD95 (B), HeLa-CD95-FL (C) und HeLa-CD95-FS Zellen (D) wurden mit 125 ng/mL CD95L für die dargestellten Zeitpunkte stimuliert. Der Zelltod wurde mittels AnnexinV-FITC- und SytoxTMOrange-Färbung visualisiert und durch das bildgebende Durchflusszytometer Amnis[®] FlowSight[®] (Luminex) gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. (E) Jeweils drei repräsentative Aufnahmen zu den drei untersuchten Zellpopulationen (gesunde Zellen, früh apoptotische Zellen und spät apoptotische Zellen), die durch das bildgebende Durchflusszytometer Amnis[®] FlowSight[®] (Luminex) generiert wurden, sind dargestellt. HF → Hellfeld; A → AnnexinV-FITC; S → SytoxTMOrange. modifiziert nach ¹¹⁸

Detailliertere Untersuchungen des CD95-DISC mittels CD95-DISC-Immunpräzipitation verdeutlichten daraufhin die unterschiedlichen Wirkungsweisen beider Isoformen. Bei c-FLIP_L-überexprimierenden Zellen (HeLa-CD95-FL) kam es zu einer deutlich verringerten Caspase-8 Aktivierung, wohingegen in der c-FLIP_S-überexprimierenden Tumorzelllinie (HeLa-CD95-FS) die komplette Signalkaskade blockiert wurde (Abbildung 9 A-C). Jedoch zeigten alle drei untersuchten Zelllinien (HeLa-CD95, HeLa-CD95-FL und HeLa-CD95-FS) die Bildung des CD95-DISC mit den bekannten Bestandteilen wie CD95, FADD, Caspase-8/-10 und den c-FLIP Proteinen. Die quantitative AQUA-basierte Massenspektrometrie^{42,74} des CD95-DISC eröffnete die Möglichkeit zur näheren Analyse der DED-Kettenformation und damit der DED-Filamentbildung in Abhängigkeit zur c-FLIP_{L/S}-Konzentration in der Zelle. Überexpression der c-FLIP Isoformen veränderten das Verhältnis von DED-besitzenden Proteinen am CD95-DISC drastisch^{42,59}. c-FLIP_S-überexprimierende Zellen (HeLa-CD95-FS) haben doppelt so viele c-FLIP Proteine am DISC im Vergleich zu Procaspase-8 und FADD (Abbildung 9 D, E). Dies wies auf eine verkürzte DED-Filamentformation hin. Das Verhältnis von FADD:Procaspase-8:c-FLIP am CD95-DISC von c-FLIP_L-überexprimierenden Zellen (HeLa-CD95-FL) ergab ungefähr 1:1:1 (Abbildung 9 D, E). Auch diese Ergebnisse lassen auf eine verkürzte Filamentbildung schließen. Darauf aufbauend, zeigten die strukturellen Modellierungen des CD95-DISC-Komplexes, dass sowohl das hierarchische Model von Hughes *et al.* als auch die Filamentbildung, entdeckt durch Fu *et al.*, eine entscheidende Rolle in der CD95-Komplexbildung einnehmen (Daten sind in der Publikation dargestellt). Die Interaktion mit FADD DED ist sowohl in einer „vorwärts“ als auch in einer „rückwärts“ Orientierung möglich, sodass es zu einer FADD/Procaspase-8-Interaktion als auch zu einer FADD/c-FLIP-Interaktion ohne sterische Behinderungen der einzelnen Interaktionspartner kommen kann. Diese neuesten Erkenntnisse zur regulatorischen Funktion des Proteins c-FLIP am CD95-DISC lassen auf eine multidirektionale Filament-Komplexformation schließen, die bis dato noch nicht analysiert wurde.

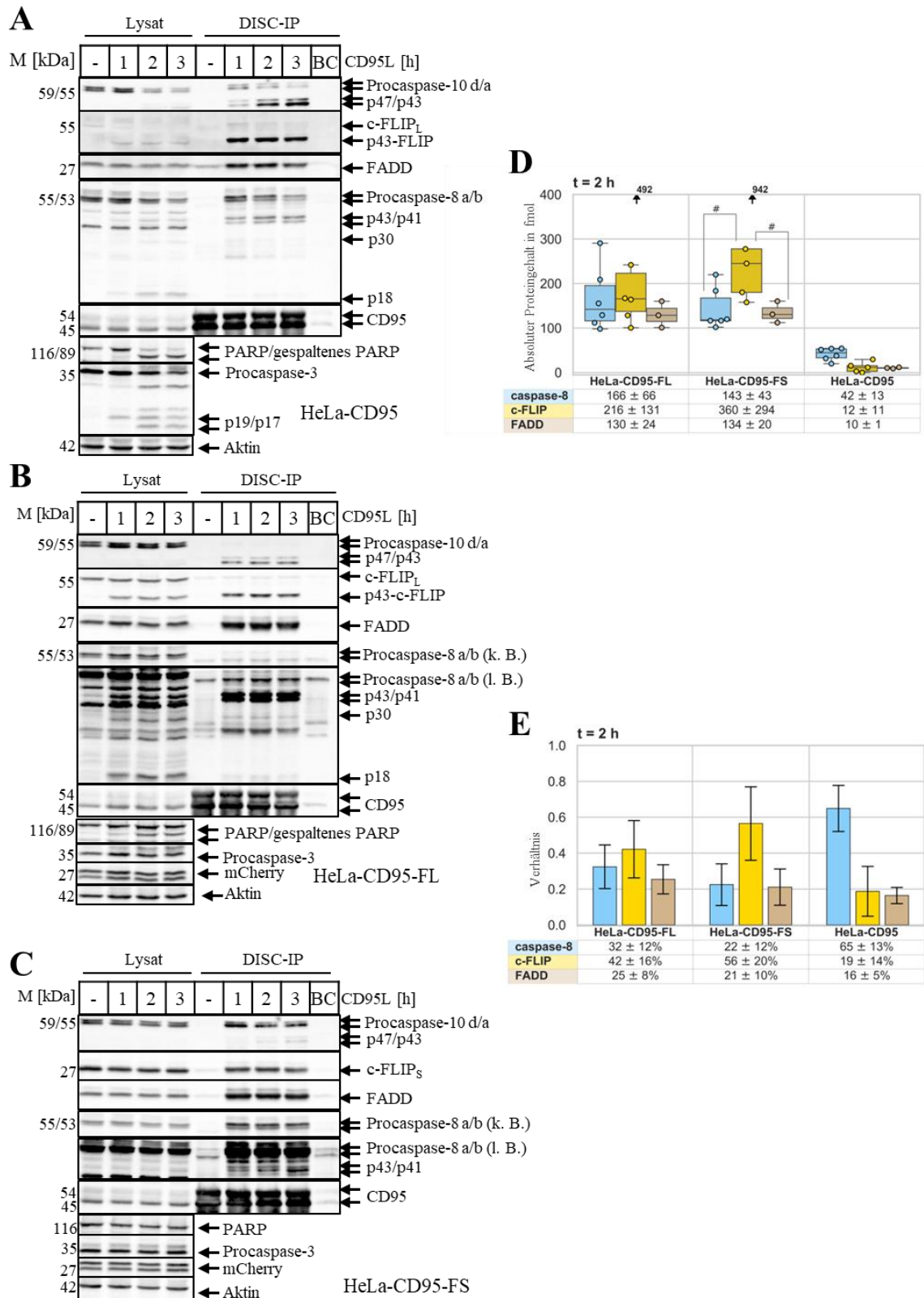


Abbildung 9: c-FLIP Isoformen regulieren in unterschiedlicher Weise die CD95L-induzierte CD95-DISC-Formation. (A-C) HeLa-CD95 (A), HeLa-CD95-FL (B) und HeLa-CD95-FS (C) Zellen wurden mit 125 ng/mL (A) oder 250 ng/mL CD95L (B+C) für 1 h bis 3 h stimuliert. Die CD95-DISC-Immunpräzipitationen (IPs) wurden mit dem Antikörper anti-APO-1 (anti-CD95) durchgeführt. Mittels Western Blot Analyse wurden die bekannten CD95-Proteine detektiert. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Das Zelllysat der verwendeten stimulierten Bedingungen wurde dargestellt. BC → IP-Kontrolle, das Lysat wird lediglich mit *beads* ohne Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu detektieren.; M → molekulare Masse; k.B. → kurze Belichtungszeit; l. B. → lange Belichtungszeit.

(D+E) Caspase-8-, c-FLIP- und FADD-Quantifizierung am DISC nach AQUA-basierter Massenspektrometrie. Die CD95-DISC-IP der HeLa-CD95, HeLa-CD95-FL und HeLa-CD95-FS Zelllysate nach zweistündiger Stimulation mit 125 ng/mL (HeLa-CD95) oder 250 ng/mL (HeLa-CD95-FL oder HeLa-CD95-FS) wurde durchgeführt (identisch zu A-C) und im Anschluss mittels 1D SDS-PAGE separiert. Daraufhin wurden die Proben mit der AQUA-basierten Massenspektrometrie quantifiziert. Absolute Peptidmengen am CD95-DISC wurden mittels Box Plot (Median, 25/75 % Konfidenzintervall) dargestellt (D). Das Caspase-8:c-FLIP:FADD Verhältnis am CD95-DISC (Mittelwert und Standardabweichung) wurde im Balkendiagramm präsentiert (E). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden unter den Diagrammen dargestellt. Werte, die sich außerhalb des dargestellten Bereiches befinden, sind mit Pfeilen markiert. Statistische Signifikanz wurde durch # markiert ($p < 0,05$) und basiert auf dem Mann-Whitney-Test. modifiziert nach¹¹⁸

2.2 ENTWICKLUNG INNOVATIVER THERAPEUTISCHER BEHANDLUNGSANSÄTZE ZUR GEZIELTEN BEEINFLUSSUNG DES CD95/FAS SIGNALWEGES

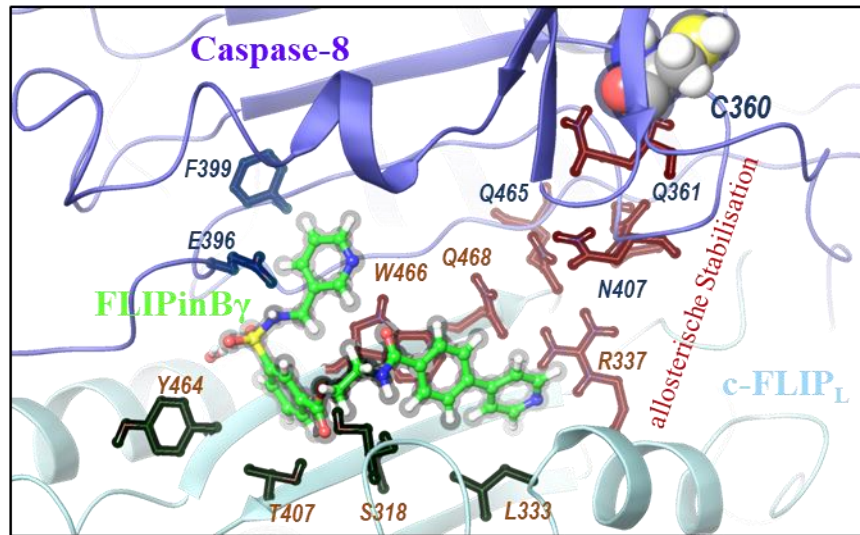
2.2.1 Entwicklung innovativer *small molecules* zur gezielten Beeinflussung des CD95/Fas Signalweges

Die zusammengefassten Ergebnisse dieses Kapitels wurden in der Publikation „*Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIP_L heterodimer*“ von Hillert *et al.* 2020 in *Cell Death and Differentiation*, welches im Vorwort aufgelistet ist, veröffentlicht.

Die neusten wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Regulation von Apoptose durch DISC-Formation und der multidirektionalen Filamentbildung bildeten die Basis für weitere Interaktionsanalysen zur Entschlüsselung der Protein-Protein-Interaktionen am DISC^{43,76}. Dabei wurde vermehrt das Hauptaugenmerk auf die pro-apoptotische Rolle des regulatorischen Proteins c-FLIP_L und dessen Mechanismus gerichtet. Die pro-apoptotische Funktion von c-FLIP_L basiert auf der Formation von Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimeren. Es wird vermutet, dass die Caspase-8 L2 Schleife in der aktiven Konformation durch c-FLIP_L stabilisiert wird und damit die katalytische Caspase-8 Aktivität verstärkt wird^{119–121}. Im Speziellen wurde in der Struktur des Heterodimers eine „geschlossene“ Konformation des unprozessierten L2' Fragments festgestellt, die offenbar das aktive Caspase-8 Zentrum stabilisiert¹¹⁹. Die Spaltung der Caspase-8 L2 Schleife führt vermutlich zu einer Translokation der L2 Schleife an der Heterodimerschnittstelle. Dies führt zu einer Konformationsänderung von einer „geschlossenen“ zu einer „offenen“ Konformation. Letztendlich resultiert daraus eine Destabilisierung des aktiven Zentrums und es kommt zu einer verringerten Caspase-8 Aktivierung. Um diese Hypothese zu belegen, wurden *in silico* Screenings durchzuführen, welche *small molecules* detektierten, die die „geschlossene“ Konformation der Caspase-8 L2' Schleife im Caspase-8/c-FLIP_L-Heterodimer nachahmen (Abbildung 10 A, B). *Small molecules* haben eine molekulare Masse von höchstens 900 Da (Dalton)⁸⁹. Aus der ZINC12 Datenbank wurden über 16 Millionen *small molecules* stufenweise überprüft¹²². Es ist gelungen 18 verschiedene *small molecules* zu identifizieren, die daraufhin mittels zellbasierter Verfahren auf ihre Wirkungsweise in Kombination mit CD95-Stimulation getestet wurden. Dabei zeigte eine Verbindung FLIPinB (**FLIP inhibitor B**) in Kombination mit der Aktivierung des apoptotischen Signalweges eine erhöhte Apoptoseinduktion (Daten sind in der Publikation dargestellt).

Nach weiteren Modifikationen des *small molecule* FLIPinB konnte ein wasserlösliches *small molecule* namens FLIPinBy entwickelt und synthetisiert werden.

A



B

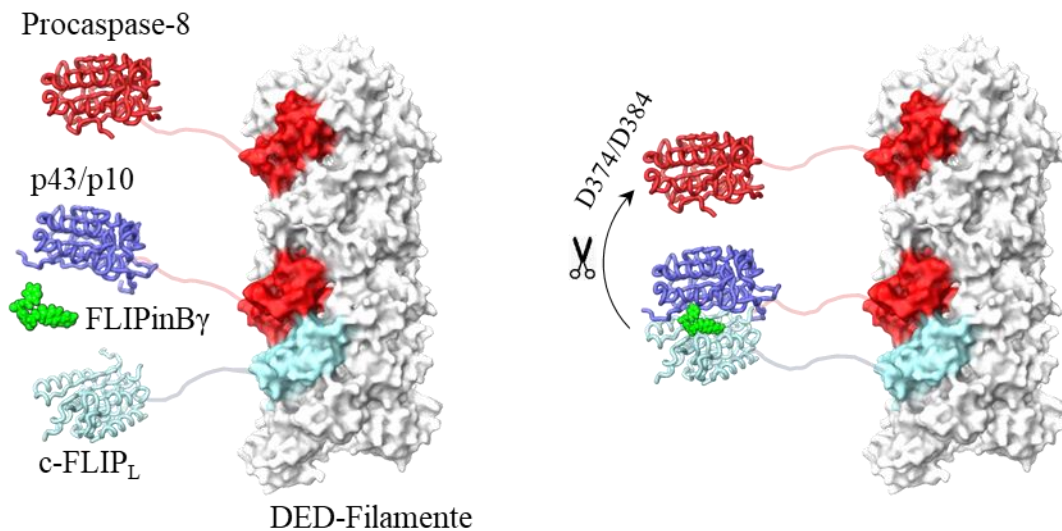


Abbildung 10: Caspase-8/c-FLIP_L-Heterodimerstruktur zur *in silico*-Bestimmung von putativen *small molecules*.

(A) Vorhergesagte FLIPinBy-Interaktion mit den Bindungsstellen des Caspase-8/c-FLIP_L-Heterodimers. c-FLIP_L- und Caspase-8-Aminosäurereste wurden in hellblau (c-FLIP_L) und in blau (Caspase-8) dargestellt. Reste, die potenziell an der allosterischen Stabilisation der Caspase-8-Schleife L2 beteiligt sind, wurden in rot hervorgehoben. Das aktive Zentrum C360 wurde als Kalottenmodell präsentiert. (B) Schematische Präsentation des vorgeschlagenen FLIPinBy-Mechanismus. FLIPinBy bindet am Caspase-8/c-FLIP_L-Komplex nach der einleitenden Caspase-8-Spaltung zu p43 und p10. Dies führt zu einer erhöhten Caspase-8 Aktivierung im FLIPinBy/p43/p10/c-FLIP_L-Komplex. Procaspase-8 wurde in rot, p43 und p10 wurden in blau, FLIPinBy in grün und c-FLIP_L wurde in hellblau dargestellt. modifiziert nach¹²³

FLIPinB γ in Kombination mit einer CD95-Stimulation zeigte in Leben/Tod-Analysen mittels bildgebender Durchflusszytometrie und Echtzeit-Untersuchungen (IncuCyte) in Tumorzellen eine Aktivierung des apoptotischen Signalweges sowie eine erhöhte Apoptoseinduktion (Abbildung 11 A+B & D+E). Biochemisch konnte belegt werden, dass es nach kombinierter FLIPinB γ /CD95L Behandlung zu einer verstärkten Caspase-8 Aktivierung (Abbildung 11 C) und zu einer erhöhten Effektorcaspase-3/7-Aktivität kommt (Abbildung 11 D+E). Resultierend aus diesen Daten wurde *in silico* die erste chemische Substanz entwickelt, die die Effekte der Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimere in Bezug auf Apoptose verstärkte. Die Publikation „*Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIP_L heterodimer*“ setzte zusammenfassend einen weiteren Grundstein zur Entschlüsselung des CD95/Fas Signalweges, um in Zukunft gezieltere Behandlungen zu entwickeln und daraufhin schwerwiegende Nebeneffekte oder Rezidive zu reduzieren.

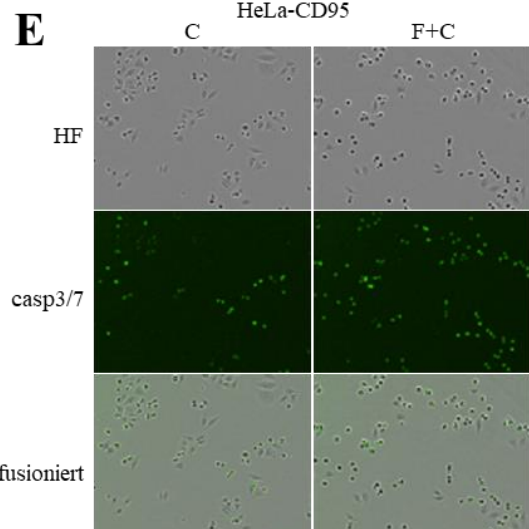
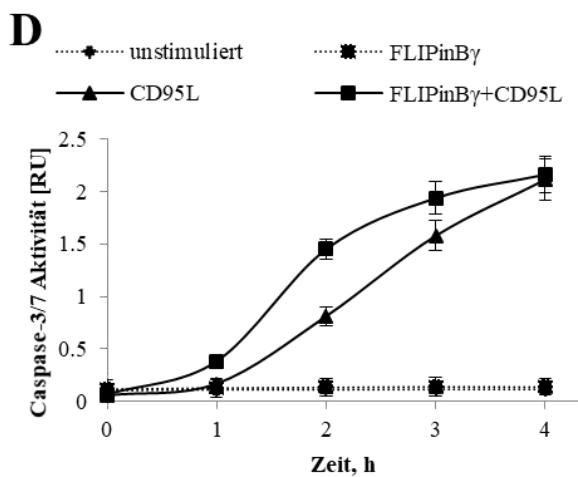
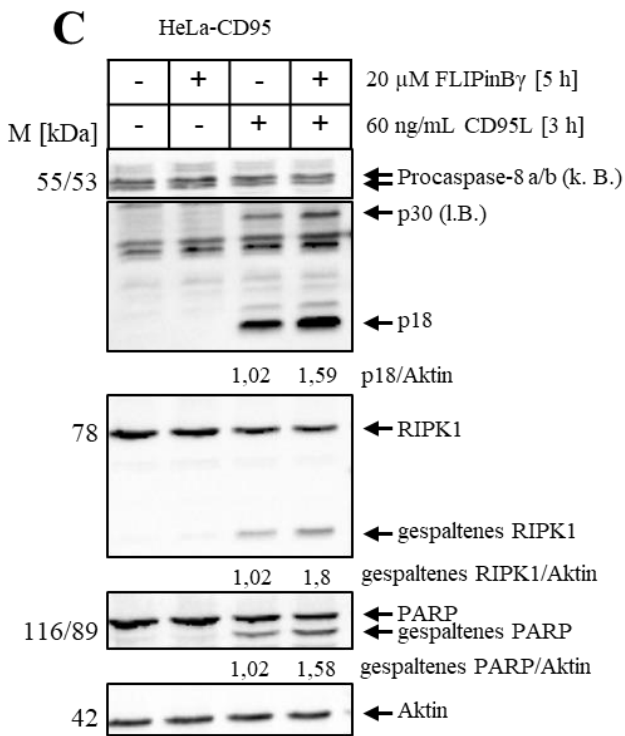
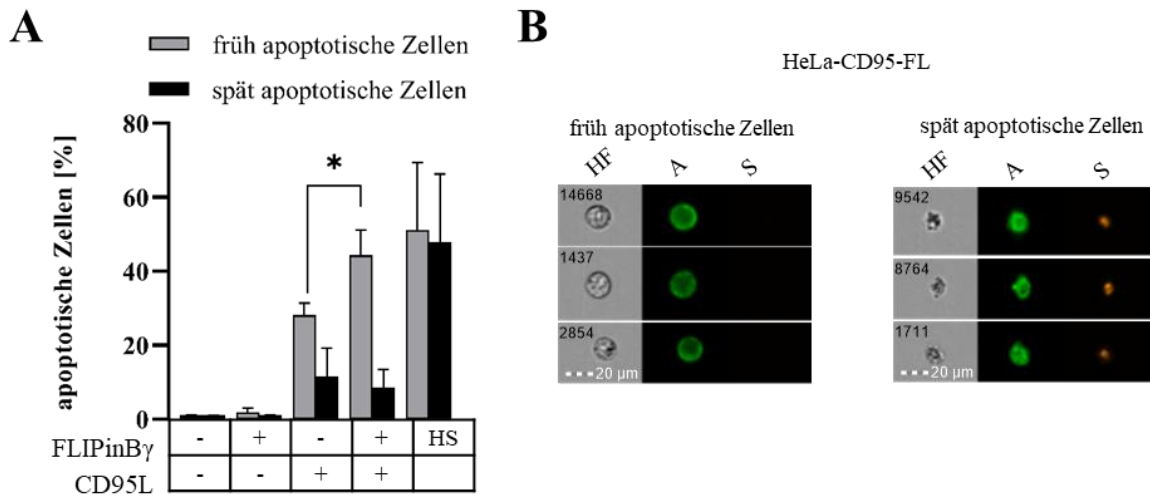


Abbildung 11: Kombinierte FLIPinBy/CD95L Behandlung induziert einen erhöhten Verlust der Zellviabilität und verstärkt Apoptose in Tumorzelllinien.

(A+B) HeLa-CD95-FL Zellen wurden mit 30 μM FLIPinBy für 2 h behandelt und im Anschluss mit 1667 ng/mL CD95L für weitere 4 h stimuliert. Der Zelltod wurde mittels AnnexinV-FITC- (A) und SytoxTMOrange (S)-Färbung bestimmt und durch das bildgebende Durchflusszytometer Amnis[®] FlowSight[®] (Luminex) analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von früh (AnnexinV-FITC-positiven Zellen) als auch von spät apoptotischen (AnnexinV-FITC- und SytoxTMOrange-positiven Zellen) Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurde gezeigt. * $\rightarrow p < 0,05$. Drei repräsentative Aufnahmen von früh und spät apoptotischen Zellen (B) wurden durch das bildgebende Durchflusszytometer Amnis[®] FlowSight[®] (Luminex) generiert und dargestellt. HF \rightarrow Hellfeld; A \rightarrow AnnexinV-FITC; S \rightarrow SytoxTMOrange. (C) HeLa-CD95 Zellen wurden mit 20 μM FLIPinBy behandelt und im Anschluss mit 60 ng/mL CD95L für 3 h stimuliert. Mittels Western Blot Analyse wurden die Zellysate mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Aktin wurde als Ladekontrolle genutzt. Ein repräsentatives Experiment aus drei Experimenten wurde dargestellt. Die Proteinquantifizierung wurde mit der Software Image LabBeta 5.1 (BioRad) durchgeführt, wobei die Proteinmenge auf das Aktinsignal normalisiert wurde. k.B. \rightarrow kurze Belichtungszeit; l.B. \rightarrow lange Belichtungszeit (D+E) HeLa-CD95 Zellen wurden mit 40 μM FLIPinBy behandelt und im Anschluss mit 50 ng/mL CD95L für die dargestellte Zeit stimuliert. Die Zellen wurden mittels *Caspase 3/7 Green Apoptosis Assay Reagent* (Sartorius) angefärbt. Die Caspase-Aktivität wurde durch Lebend-Zellaufnahmen visualisiert. Die Fluoreszenz Caspase-3/7-positiver Zellen wurde mit Hilfe des IncuCyte Lebend-Zell-Analyse Systems (Sartorius) detektiert (D). Repräsentative Aufnahmen nach 2 h CD95L-Stimulation wurden dargestellt (E). HF \rightarrow Hellfeld; C \rightarrow 50 ng/mL CD95L; F+C \rightarrow 40 μM FLIPinBy + 50 ng/mL CD95L. modifiziert nach¹²³

2.2.2 RIPK1- ein Schlüsselprotein entscheidet über Zelltod und -überleben in AML-Zellen mit FLT3-ITD Mutation

Die zusammengefassten Ergebnisse dieses Kapitels wurden in der Publikation „*Targeting RIPK1 in AML cells carrying FLT3-ITD*“ von Hillert *et al.* 2019 im *International Journal of Cancer*, welches im Vorwort aufgelistet ist, veröffentlicht.

Die Protein-Kinase RIPK1 ist funktionell an vielen zellulären Signalwegen in Bezug auf Zellüberleben als auch Zellsterben beteiligt. Die ITD-Mutation im FLT3-Rezeptor führt zu einer konstitutiven Aktivierung verschiedener hintereinander geschalteter Signalwege wie dem NF- κ B Signalweg. Dieses Ungleichgewicht führt wiederum zu einer Verringerung des apoptotischen Signalweges^{115,124}. Nach Proteinexpressionsanalysen des CD95/Fas Signalweges in der FLT3-ITD-Rezeptor (human) mutierten, murinen AML-Zelllinie 32D im Vergleich zu Wildtyp-FLT3-Rezeptor exprimierenden Zellen stellte sich eine interessante Entdeckung heraus. Die „klassischen“ Proteine des apoptotischen DISC-Netzwerkes wie FADD und Procaspase-8 waren unverändert in malignen AML-Zellen mit FLT3-ITD-Rezeptormutation (Abbildung 12 A). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine deutliche Hochregulierung des Proteins RIPK1 in AML-Zellen mit mutiertem FLT3-Rezeptor (FLT-ITD) (Abbildung 12 A). Der 2007 zum ersten Mal publizierte, bivalente IAP Antagonist BV6 erwies sich nach diesen Erkenntnissen als ideale Substanz, um diese malignen Zellen mittels gezielter RIPK1-Modifikation zu sensibilisieren (Abbildung 12 B-E)⁹². Maligne Leukämiezellen mit mutiertem FLT3-Rezeptor zeigten nach kombinierter BV6/CD95L Behandlung eine starke konzentrationsabhängige Verringerung der Zellvitalität von bis zu 50 % (Abbildung 12 C). Dieses spezifische Zellsterben konnte auch mittels Lebend-Tod-Färbung und anschließender mikroskopischer Analyse in Abhängigkeit der Zeit bestätigt werden (Abbildung 12 D).

Kombinierte BV6/CD95L-Stimulation führte zu einer abnehmenden GFP-positiven (engl. *green fluorescent protein*), lebenden Zellpopulation und zu einer erhöhten Zahl CytotoxRed-positiver, sterbender Zellen. Auch nach Western Blot Analysen stellte sich eine Apoptoseaktivierung durch die Detektion aktiver, gespaltenen Caspase-3 und des PARP-Spaltproduktes dar (Abbildung 12 E). Zellbasierte Analysen mittels spezifischer Zelltod-Inhibitoren ergaben daraufhin, dass es sich dabei um einen RIPK1-vermittelten, Caspase-abhängigen Zelltod handelte (Daten in der Publikation dargestellt).

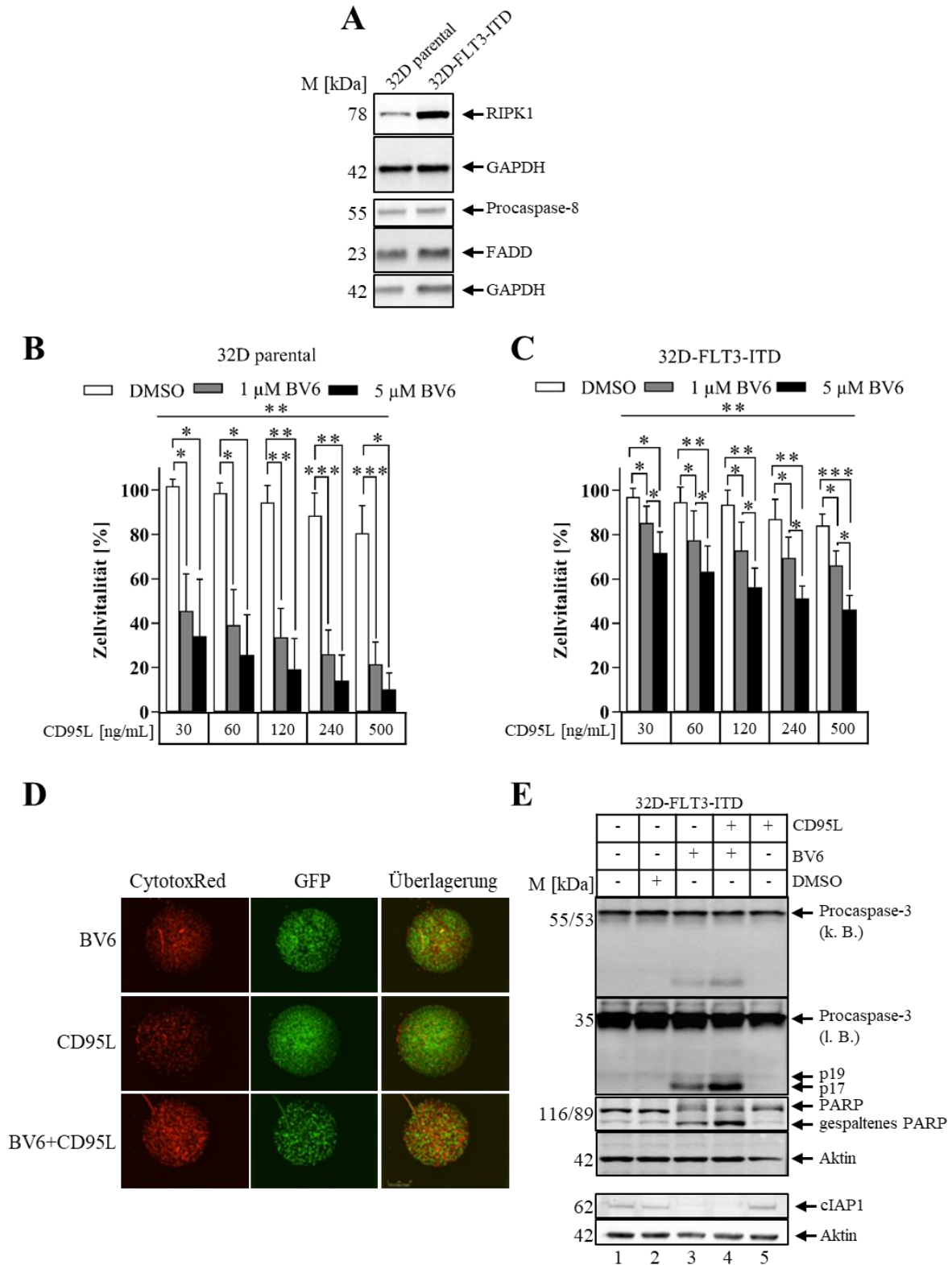


Abbildung 12: Kombinierte BV6/CD95L Behandlung führt zur Sensitivierung von FLT3-ITD-positiven AML-Zellen. (A) Western Blot Analyse von parentalen 32D und 32D-FLT3-ITD Zelllysaten mittels dargestellter Antikörper. Ein Experiment aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. (B+C) parentale 32D Zellen (B) als auch 32D-FLT3-ITD Zellen (C) wurden mit zwei unterschiedlichen BV6-Konzentrationen (1 μM & 5 μM) für 1 h behandelt. Danach wurden die Zellen für weitere 6 h mit den dargestellten CD95L-Konzentrationen (30-500 ng/mL) stimuliert.

Die Zellviabilität wurde mittels *Cell Titer Glow*[®]-*Luminescent Cell Viability Assay* bestimmt, indem der ATP-Gehalt gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Prozent (%) angegeben, wobei alle Werte auf den Mittelwert der unstimulierten Zellen normalisiert wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten wurden dargestellt. *→ p < 0,05; **→ p<0,01; ***→ p<0,001. (D) 32D-FLT3-ITD Zellen wurden mit 5 µM BV6 für 1 h behandelt und im Anschluss mit 60 ng/mL CD95L stimuliert. Sterbende Zellen wurden durch den Farbstoff CytotxRed angefärbt und mittels bildgebender Lebend-Zell-Analyse IncuCyte[™] (EssenBioscience) detektiert. GFP wird in lebenden Zellen überexprimiert. Repräsentative Bilder nach 7 h CD95L-Stimulation wurden dargestellt. (E) 32D-FLT3-ITD Zellen wurden mit 5 µM BV6 für 1 h behandelt. Danach wurden die Zellen mit 60 ng/mL CD95L für 3 h stimuliert. Mittels Western Blot Analyse wurden die Zellysate mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Aktin wurde als Ladekontrolle genutzt. Ein repräsentatives Experiment aus zwei Experimenten wurde dargestellt. k.B. → kurze Belichtungszeit; l.B. → lange Belichtungszeit. modifiziert nach¹²⁵

Diese beschriebenen Erkenntnisse wurden weiterhin durch *knockdown* Experimente gestützt. Nach Herunterregulierung des Proteins RIPK1 zeigte sich eine Resistenz gegenüber der kombinierten BV6/CD95L Behandlung (Abbildung 13 A). Die Caspase Inhibition mittels zVAD als auch die Necrostatin-1s Behandlung hemmten den BV6/CD95L-abhängigen Zelltod (Abbildung 13 B+C). Spezielle Untersuchungen zur Detektion des programmierten Zelltods mittels bildgebender Durchflusszytometrie¹²⁶ präsentierten, dass eine kleine Zellpopulation apoptotisch und viele Zellen nekroptotisch nach Doppelstimulation starben (Abbildung 13 C+D). Daraufhin wurden primäre Patientenproben mit speziellen FLT3-ITD Rezeptormutationen getestet. Die Analysen ergaben auch in diesen Fällen eine Sensitivierung mittels kombinierter BV6/CD95L Behandlung (Daten sind in der Publikation dargestellt). Zusammenfassend stellten Hillert *et al.* fest, dass die Beeinflussung des Proteins RIPK1 mittels SMAC *mimetics* in Kombination mit einer CD95L-Stimulation als Basis zur Weiterentwicklung neuerer Behandlungsstrategien in AML-Zellen mit FLT3-ITD Mutation verwendet werden kann. Diese neusten Erkenntnisse bilden eine weitere Grundlage zur gezielteren, krankheitsbasierten Entwicklung neuartiger Behandlungsstrategien.

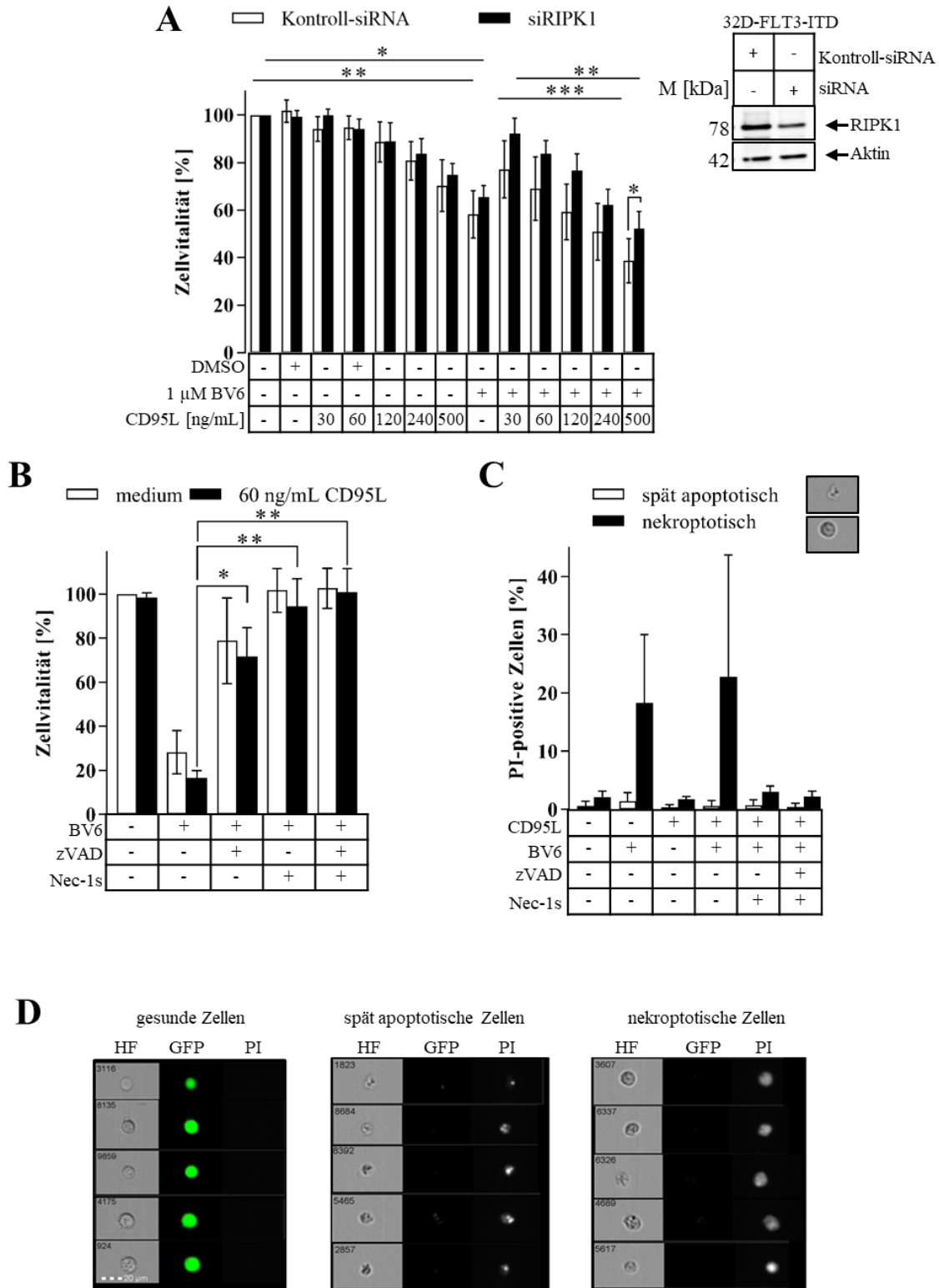


Abbildung 13: Kombinierte BV6/CD95L-Stimulation führt zu einem RIPK1- und Caspase-abhängigen Zelltod in 32D-FLT3-ITD Zellen.

(A) Mittels RIPK1-siRNA (SMARTpool siRNA von Dharmacon) wurde der RIPK1-Proteingehalt in 32D-FLT3-ITD Zellen herunterreguliert. Kontroll-siRNA wurde als Negativkontrolle genutzt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und in 96-Well Platten ausgesät. Danach wurden die Zellen mit 1 μ M BV6 für 1 h behandelt und direkt im Anschluss mit den beschriebenen CD95L-Konzentrationen (30-500 ng/mL) für 6 h stimuliert. Die Zellviabilität wurde mittels *Cell Titer Glow[®]-Luminescent Cell Viability Assay* bestimmt, indem der ATP-Gehalt gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Prozent (%) angegeben, wobei alle Werte auf den Mittelwert der unstimulierten Zellen normalisiert wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten wurden dargestellt. * \rightarrow $p < 0,05$; ** \rightarrow $p < 0,01$; *** \rightarrow $p < 0,001$.

Die Zelllysate siRNA-behandelter Zellen wurde mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B+C) 32D-FLT3-ITD Zellen wurden mit 5 μM BV6, 50 μM zVAD-fmk (pan-Caspase-Inhibitor) und 10 μM Nec-1s (RIPK1-Inhibitor) für 1 h behandelt. Danach wurden die Zellen mit 60 ng/mL CD95L für 4 h (C) oder 6 h (B) stimuliert. (B) Die Zellviabilität wurde mittels *Cell Titer Glow[®]-Luminescent Cell Viability Assay* bestimmt, indem der ATP-Gehalt gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Prozent (%) angegeben, wobei alle Werte auf den Mittelwert der unstimulierten Zellen normalisiert wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten wurden dargestellt. * \rightarrow $p < 0,05$; ** \rightarrow $p < 0,01$ (C) Zelltod wurde durch den DNA-Farbstoff PI detektiert und mittels bildgebender Durchflusszytometrie (Amnis[®] FlowSight[®], Luminex) analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten wurde dargestellt. (D) 5 repräsentative Aufnahmen für jede gemessene Bedingung (gesunde Zellen, spät apoptotische Zellen, nekroptotische Zellen), die mittels Amnis[®] FlowSight[®], Luminex gemessen wurden, wurden dargestellt. Abkürzungen: HF \rightarrow Hellfeld; GFP \rightarrow engl. *green fluorescent protein*; PI \rightarrow Propidiumiodid. modifiziert nach¹²⁵

3 DISKUSSION

3.1 ENTSCHLÜSSELUNG NEUER INDUKTIONSMECHANISMEN DER CD95/FAS-VERMITTELTEN APOPTOSE

3.1.1 c-FLIP Isoformen fungieren als Kontrollpunkte in der DED-Filamentformation

In den letzten Jahren wurden viele wissenschaftliche Veröffentlichungen zur funktionellen Rolle des regulatorischen Proteins c-FLIP publiziert. Die Initialidee lautete, dass sowohl c-FLIP als auch Procaspase-8 direkt an FADD binden und somit um die Bindung am DISC konkurrieren⁷⁹. Weiterhin wurde nach Mutagenese-Analysen die Relevanz beider c-FLIP DED1/DED2 Regionen für die Interaktion mit FADD DED festgestellt^{80,81}. 2014 belegten Majkut *et al.*, dass nach Rezeptor-Stimulation FADD DED bevorzugt mit seiner strukturellen Bindungsfläche der $\alpha 1/\alpha 4$ Helizes mit der DED2 Region von c-FLIP interagiert. Im Gegensatz dazu besteht eine höhere Affinität zwischen den FADD $\alpha 2/\alpha 5$ Helizes und der Procaspase-8 DED1 Region⁸². Im Widerspruch dazu steht das hierarchische DISC-Modell, das eine FADD-Procaspase-8-Interaktion voraussetzte, um im Anschluss c-FLIP am DISC zu detektieren^{58,76}. Durch die 2016 veröffentlichte DED-Procaspase-8 Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur konnte gezeigt werden, dass sich sowohl c-FLIP Proteine als auch Procaspase-8 Moleküle in die Filamentstruktur einbauen⁵⁷.

Aufbauend auf diesen widersprüchlichen Erkenntnissen entstand die Basis zur wissenschaftlichen Arbeit von Hillert *et al.* zur funktionellen Untersuchung des Regulators c-FLIP und zur Analyse molekularer Mechanismen am CD95-DISC mittels biochemischer Verfahren und *in silico* entwickelter Behandlungsansätze¹¹⁸. Des Weiteren konnten in dieser Veröffentlichung weitere Einblicke in die DISC-Architektur gewonnen werden, um die Rolle der beiden c-FLIP Proteine c-FLIP_L und c-FLIP_S in den DED-Filamenten zu entschlüsseln. Dies war nur durch die Anwendung quantitativer Massenspektrometrie-Analysen in Kombination mit strukturbezogener Modellierung möglich. Letzteres ist ein mächtiges Werkzeug, das neue Erkenntnisse in molekulare Signalwegmechanismen ermöglicht. Unter Verwendung dieser Technologie wurde ein *in silico* Strukturmodell des CD95-DISC entwickelt. Dieses Modell erlaubte es, molekulare Mechanismen der DED-Filamentformation vorzuschlagen, sowie mehrere Möglichkeiten der c-FLIP-Interaktionen mit dem DED-Filament zu erklären.

Einer der wichtigen Aspekte dieses Modells war die Vorhersage von unterschiedlichen Procaspase-8- als auch c-FLIP-Bindungsstellen am FADD DED. Die Verbindung zwischen DEDs dieser Proteine wird durch alle drei Arten von DED-Interaktionen (Typ I, II und III) vermittelt. Anhand dieses Modells wurde gezeigt, dass FADD- und Procaspase-8-Interaktion mittels Bindung an der Procaspase-8 DED1 Ia/IIIb-Schnittstelle entsteht, um das Filamentwachstum in einer "Vorwärtsrichtung" auszubilden.

Im Gegensatz dazu kann FADD DED mit der c-FLIP DED2 Ib/IIIa-Schnittstelle interagieren und fördert damit das Filamentwachstum in entgegengesetzter "Rückwärtsrichtung". Außerdem entschlüsselten diese Ergebnisse die bestehenden kontroversen Diskussionen zur c-FLIP-Bindung an den DISC. Wie bereits erwähnt, wurde einerseits berichtet, dass c-FLIP über die $\alpha 2/\alpha 5$ -Schnittstelle seiner DED2 (Ib-Schnittstelle) mit der $\alpha 1/\alpha 4$ -Region der FADD DED (Ia-Schnittstelle) interagiert, während Procaspase-8 die andere Bindungsstelle zur Interaktion mit FADD nutzt, die sich in der $\alpha 2/\alpha 5$ -Region der FADD DED (Ib-Schnittstelle) befindet⁸². Demgegenüber wurde eine kooperative Bindung von c-FLIP an FADD in Abhängigkeit von Procaspase-8 beschrieben⁷⁶. Hillert *et al.* kombinierte beide Hypothesen und zeigte, dass beide Mechanismen eine wichtige Rolle bei der DED-Filamentorganisation spielen.

Die molekularen Mechanismen zur beginnenden DED-Filamentformation am FADD DED und die sterischen Beschränkungen dieses Prozesses sind für das Verständnis der Apoptoseinitiation von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde festgelegt, dass die Procaspase-8 Bindung durch DED1 an FADD für die Initiation des Filamentwachstums notwendig ist. Gleichzeitig gab es bisher keine Erkenntnisse, ob die hypothetische c-FLIP DED2-Bindungsstelle mit FADD sterisch zugänglich ist und ob es strukturelle Einschränkungen gibt, die diese Interaktion verhindern. Mit Hilfe des Strukturmodells wurde gezeigt, dass die FADD DD/DED-Plattform kein sterisches Hindernis für die Bindung von c-FLIP DED2 darstellt, sodass die Grundlage für ein "multidirektionales" Filamentwachstum und den Aufbau von "kooperativen" DED-Filamenten geschaffen wird. Der Modellierungsansatz demonstrierte, dass die Flexibilität der Schleife zwischen FADD DD und FADD DED eine wichtige strukturelle Funktion besitzt, indem sie eine Konformationsänderung ermöglicht, die wiederum die DED-Filament-Initiation auslösen kann¹¹⁸. In zukünftigen Studien könnten Mutationen in dieser FADD-Schleife oder gezielte Beeinflussungen mittels *small molecules* neue Erkenntnisse über die Apoptoseregulation liefern.

Das in Hillert *et al.* veröffentlichte DED-Filamentstrukturmodell beantwortete mehrere Fragen. Die erste Frage, die sich stellte, war, wie Caspase-8 bei hoher c-FLIP-Überexpression aktiviert werden kann. Die Analyse des 3D-Strukturfilamentmodells zeigte, dass die Bildung von Procaspase-8-Dimeren auch in kurzen DED-Filamenten stattfindet. Dies könnte durch die Interaktionen zwischen benachbarten Procaspase-8 DED2 aus nah aneinander liegenden DED-Ketten über Typ-II-Schnittstellen unterstützt werden (Abbildung 14). Diese architektonische Formation ist nur durch die unabhängigen, spezifischen Procaspase-8/c-FLIP-Bindungsstellen mit FADD in der FADD DED-Plattform möglich. Die FADD-spezifische Procaspase-8-Bindungsstelle ermöglicht eine korrekte räumliche Lage der Procaspase-8 DED, die zu einer Procaspase-induzierten Dimerisierung der C-terminalen Domänen und somit zu einer Caspase-8 Aktivierung führt. c-FLIP DEDs wiederum kontrollieren die räumliche Anordnung der DED-Filamente im DISC, indem sie die Menge an Procaspase-8 begrenzen und gleichzeitig die DISC-Struktur über die Bindung an FADD DED stabilisieren. Des Weiteren stabilisiert die c-FLIP-induzierte Bildung eines langen DED-Filaments, wie zum Beispiel im kooperativen DISC-Netzwerk, den DISC

und erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Procaspase-8 Homo- und Heterodimerisierung (Abbildung 14 C).

Diese Vorhersagen stimmen mit den in Hillert *et al.* generierten, experimentellen Daten zur Caspase-8 Aktivität überein. Die Daten zeigen, dass selbst bei hoher c-FLIP_{L/S}-Überexpression Procaspase-8 am DISC aktiviert wird¹¹⁸.

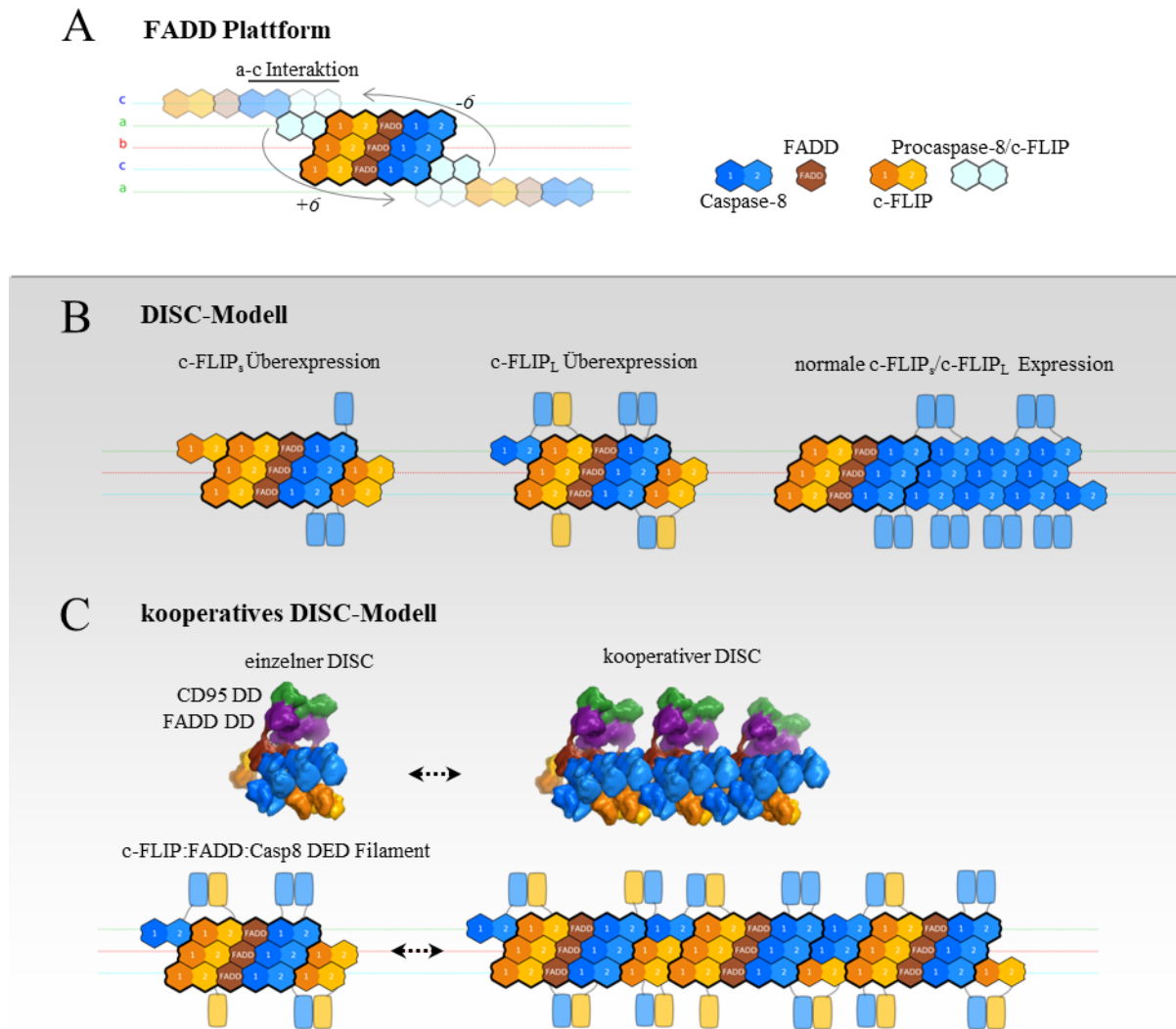


Abbildung 14: Kooperatives DED-Filamentformationsmodell.

(A) Schematische Darstellung der FADD-Plattform, die final zur DISC-Formation führt. Die drei DED-Ketten a (grün), b (rot) und c (blau), die durch Typ-I-Wechselwirkung im DED-Filament gebunden sind, sind durch Linien in den jeweiligen Farben gekennzeichnet. Die Wechselwirkungsstellen der Ketten a und c im DED-Filament sind durch Verdoppelung in transparenter Farbe oberhalb und unterhalb des Schemas dargestellt. Dies impliziert die Verschiebung auf -6 und $+6$ Positionen in der DED-Kette, entsprechend der DED-Filamentsymmetrie. (B) Das schematische Modell der einzelnen DISC-Formationen in HeLa-CD95-FS (links), HeLa-CD95-FL (Mitte) und HeLa-CD95 (rechts) Zellen wurde dargestellt. (C) Das strukturelle (oben) und das schematische Modell (unten) der kooperativen DISC-Formation in HeLa-CD95-FL Zellen ist gezeigt. Die Anordnung der FADD-Plattform ist hervorgehoben. c-FLIP DED1 und DED2 sind in orange und gelb gekennzeichnet. Procaspase-8 DED1 und DED2 sind in dunkelblau beziehungsweise hellblau dargestellt. FADD DED ist in braun gezeigt. Die C-terminalen Domänen von c-FLIP und Procaspase-8 sind als gelbe (c-FLIP) und blaue (Caspase-8) Rechtecke präsentiert. CD95 DD und FADD DD sind in grüner bzw. violetter Farbe dargestellt. modifiziert nach¹¹⁸

Nach näheren Untersuchungen mittels Massenspektrometrie wurde festgestellt, dass es nach c-FLIP-Überexpression zu einer erhöhten Anzahl an DISC-Formationen kommt.

Offensichtlich führt die c-FLIP-abhängige Bildung von kooperativen DISC-Netzwerken zu einer erhöhten Filament-Stabilität, die eine erhöhte DISC-Anzahl bei c-FLIP-Überexpression zur Folge hat. Das Phänomen der Längen-abhängigen Stabilisierung einer filamentösen Struktur ist bereits bekannt und wurde für andere Systeme umfassend untersucht¹²⁷. Eine weitere bereits veröffentlichte Beobachtung zur DISC-Formation ist die Internalisierung und Degradation des DISC^{128,129}. Es wurde gezeigt, dass die Internalisierung des DISC von der Caspase-8 Aktivität abhängig ist. Somit kommt es bei einem höheren Gehalt an c-FLIP-Proteinen zu einer Verringerung der Caspase-8 Aktivität am DISC und somit auch zur verringerten DISC-Internalisierung. Die beschriebenen Faktoren tragen zu den höheren DISC-Anzahlen bei, die Hillert *et al.* nach c-FLIP-Überexpression feststellten.

Die kooperative DED-Filamentformation könnte ein wichtiger Mechanismus für das Filamentwachstum darstellen. Tatsächlich könnte eine hohe, lokale Konzentration von kurzen DED-Filamenten eine Plattform bilden, um Filamentwachstum auszulösen. Benachbarte Filamente, die verschiedene FADD-Plattformen als Ursprung haben und die somit unabhängig voneinander gebildet wurden, können aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu einer Einheit assoziieren. Letzteres könnte auch durch lokale Nähe von CD95-Rezeptoren auf der Membranoberfläche erleichtert werden.

Die quantitativen Massenspektrometriedaten aus Hillert *et al.* deuten daraufhin, dass die Stärke der c-FLIP/c-FLIP-Interaktionen innerhalb des DED-Filaments eher gering ist. Nach Überexpression beider c-FLIP Isoformen wurde keine Formation von langen c-FLIP-Ketten beobachtet¹¹⁸. Leider sind die molekularen Mechanismen, die das Wachstum von c-FLIP-DED-Filamenten begrenzen, noch nicht aufgeklärt. Gleichzeitig kann man nach den experimentellen Daten die Hypothese aufstellen, dass mehrere c-FLIP_L-induzierte kooperative Netzwerke auf Grund des höheren, experimentell ermittelten Procaspase-8-Anteils am DISC und daraus folgend der putativ erhöhten Procaspase-8/Procaspase-8-Interaktionen zwischen benachbarten DISC-Formationen und der Procaspase-8/c-FLIP_L-Interaktionen mittels C-terminaler Domänen entstehen können. (Abbildung 14 C). Darüber hinaus wurde ein weiterer DED-Filament-Bestandteil des DISC, Procaspase-10, in dem Modell von Hillert *et al.* nicht berücksichtigt, da das Protein am DISC nur in geringer Menge detektiert wurde. Trotzdem wurde in früheren Veröffentlichungen eine anti-apoptische Procaspase-10 Funktion nach extrinsischer Apoptoseinduktion beschrieben¹³⁰⁻¹³². Somit ist es für weitere Analysen essenziell die Rolle dieser Initiatorcaspase in der DED-Filamentdynamik zu analysieren.

Die veröffentlichten Daten in Hillert *et al.* zeigten, dass c-FLIP Isoformen funktionell eine Art von Kontrollpunkten in der Dynamik der DED-Filamente darstellen, indem sie deren Wachstum und Stöchiometrie beeinflussen. Insbesondere können c-FLIP Isoformen die Zusammensetzung der DED-Filamente modulieren, indem sie kurze DED-Filamente aufbauen oder die Bildung langer kooperativer Netzwerke von DED-Filamenten fördern. Diese Analysen bilden die Basis für weitere Untersuchungen

über die Signalübertragung des CD95-DISC-Modells oder anderen Zelltod-induzierenden Komplexen und eröffnen neue Blickweisen zur Entwicklung therapeutischer Anwendungsansätze.

3.2 ENTWICKLUNG INNOVATIVER THERAPEUTISCHER BEHANDLUNGSANSÄTZE ZUR GEZIELTEN BEEINFLUSSUNG DES CD95/FAS SIGNALWEGES

3.2.1 pharmakologische Beeinflussung des Caspase-8/c-FLIP_L-Heterodimers am DISC

Die Kombination aus *in silico* und damit computergestützter Analysen und *in vitro* Experimenten bietet eine erstaunliche Bandbreite an Anwendungsbereichen und ermöglicht einen enormen Wissensgewinn in den heutigen wissenschaftlichen Fragestellungen. In der Veröffentlichung von Hillert *et al.* wurden *in silico* Verfahren verwendet, um ein kleines Molekül (engl. *small molecule*) zu entwerfen, das spezifisch mit dem Heterodimer Procaspase-8/c-FLIP_L interagiert. Die Modifikation dieses kleinen Komplexes bot eine gezielte Angriffsfläche, um Apoptose in der Zelle zu aktivieren. Die Strategie zur Entwicklung eines spezifischen *small molecules* bestand darin, durch Interaktion mit dem Caspase-8/c-FLIP_L-Heterodimer die L2'-Schleife in einer "geschlossenen" Konformation zu stabilisieren, dadurch die Caspase-8 Aktivität am DISC zu erhöhen und effektiv Apoptose zu induzieren. Letzteres basierte auf der Hypothese, dass der Wechsel von einer "geschlossenen" zu einer "offenen" Konformation der L2'-Schleife, wie er durch die L2-Schleifenprozessierung induziert wird, zur Destabilisierung des p43/p10/c-FLIP_L-Komplexes führen könnte. Die experimentellen Daten in Hillert *et al.*, die mit dem *small molecule* FLIPinBy gewonnen wurden, unterstützten den *in silico* vorhergesagten Mechanismus¹²³. Die Experimente wiesen stark daraufhin, dass die Stabilisierung des aktiven Caspase-8 Zentrums im Heterodimer Procaspase-8/c-FLIP_L für dessen Aktivierung essenziell ist. Darüber hinaus unterstützten die Ergebnisse die Hypothese der L2'-Schleifen-Translokation als Schlüsselereignis für die Deaktivierung dieses Heterodimers¹³³. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Behandlung mit FLIPinBy und CD95L oder TRAIL zu einem verstärkten apoptotischen Zelltod und einer erhöhten Caspase-8 Aktivität am DISC führte, was den *in silico* vorgeschlagenen Mechanismus für die Wirkung von FLIPinBy stärkte¹²³.

Überdies könnte eine allosterische Regulation im Heterodimer am vermuteten, molekularen FLIPinBy Mechanismus beteiligt sein. Im Hinblick auf andere Caspasen wurde über diese Eigenschaft bereits berichtet. Caspasen besitzen eine allosterische Stelle in der Homodimerisierungsschnittstelle in ihrer Untereinheit^{134,135}. Insbesondere die allosterischen Regulationsmechanismen der Caspase-1, -7 und -8 wurden bereits auf mögliche Interaktionen mit *small molecules* untersucht. Es wurde gezeigt, dass allosterische Inhibitoren von Caspase-7 und Caspase-1 die inaktive Zymogenkonformation blockieren^{134,135}. Dementsprechend wurde in Hillert *et al.* auch die Existenz einer bisher unbeschriebenen allosterischen Stelle innerhalb der Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimerinteraktionsstelle vermutet, die zur Caspase-8 Aktivierung führte. Des Weiteren

veröffentlichten Bucur *et al.* ein *small molecule*, das mit der Schnittstelle des Caspase-8-Homodimers interagiert und TRAIL-induzierte Apoptose verstärkt. Leider konnte dieser kombinatorische Effekt in den Experimenten nur nach hoher *small molecule* Konzentration gezeigt werden¹³⁶.

Trotz dessen wurde in Hillert *et al.* vorausgesetzt, dass die gezielte, kombinierte Behandlung der Heterodimerisierungsinteraktionsstelle des Procaspase-8/c-FLIP_L-Komplexes mit der Aktivierung des Todessignalweges durch CD95L oder TRAIL eine vielversprechendere Strategie für die weitere Entwicklung von *small molecules* bietet.

Die intrazelluläre Signalweiterleitung, die final Apoptose reguliert und auslöst, stellt ein ideales System für quantitative Studien zur Entwicklung von innovativen Methoden im Bereich der Systembiologie dar¹³⁷. Die computergestützte Modellierung dynamischer Prozesse des apoptotischen Signalweges ist sehr weit fortgeschritten. Es sind bereits sehr detaillierte, experimentell validierte Modelle entwickelt wurden, die sich auf verschiedene Aspekte der apoptotischen Induktion konzentrierten¹³⁷. In dieser wissenschaftlichen Arbeit von Hillert *et al.* wurde eine Verbindung zwischen *in silico* Methoden zur Modellierung der apoptotischen Signalwege und der Entwicklung neuartiger Medikamente für neue Tumortherapieansätze hergestellt, indem das Modell der DISC- und Apoptose-Signalkaskade um die Wirkung des spezifischen *small molecules* FLIPinB γ erweitert wurde. Die durch Einzelstimulation mit CD95L ausgelöste Procaspase-8/c-FLIP_L Heterodimersaktivität und final die Apoptoseinduktion wurde durch kombinierte Behandlung mit FLIPinB γ und CD95L erhöht oder verstärkt. Im Speziellen ist es gelungen, dass das generierte Modell die biochemische Reaktionskinetik der FLIPinB γ -Wirkung am DISC beschreiben konnte, eine Erhöhung der Heterodimerkonzentration vorhersagte, welche zur Erhöhung der Caspase-8 Aktivität führte und die Wirkung nach FLIPinB γ -Zugabe auf die Tumorzellpopulation bestimmte. Darüber hinaus erlaubte das Modell, die FLIPinB γ Wirkung in Abhängigkeit der intrazellulären c-FLIP_L-Proteinkonzentration vorausszusehen. Dieses Verfahren bot eine entscheidende Möglichkeit für die Weiterentwicklung von Therapien, wobei durch Modellierungen Wechselwirkungen von Medikamenten spezifisch für Zelltodsignalwege hervorgesagt werden könnten. Interessanterweise hat die modellbasierte Wirkstoffentwicklung für wachstumsfaktorbezogene Signalwege bereits den Schritt zu klinischen Studien gemacht¹³⁸.

Das ausgearbeitete *in silico* Modell hat gezeigt, dass die erhöhte Procaspase-8 Aktivität in den ersten Stunden nach CD95L/TRAIL-Stimulation zu einer verstärkten Apoptoseinduktion führte. Letzteres kann durch eine hohe Degradationsrate des DISC-Komplexes in Abhängigkeit zur Zeit sowie durch den limitierenden Prozess der Procaspase-8-Oligomerisierung zur Bildung katalytisch aktiver Untereinheiten erklärt werden. In der Publikation von Kallenberger *et al.* wurde die Halbwertszeit des DISC auf nur 1 h geschätzt, während nach dem verwendeten Modell in Hillert *et al.* deutlich mehr Zeit benötigt wurde, um die Procaspase-8 Moleküle am DISC zu aktivieren^{123,139}. Darüber hinaus ist eine weitere Schlussfolgerung, dass die Erhöhung der Procaspase-8 Prozessierungsrate in den ersten Stunden nach der Todesrezeptor-Stimulation ein innovativer Ansatz ist, Apoptoseinduktion in einer Population

zu erhöhen. Bezogen darauf zeigten frühere Publikationen ebenfalls, dass die intrazelluläre Procaspase-8 Aktivierungsrate in Abhängigkeit zum induzierten Zelltod steht^{139,140}.

In diesem Zusammenhang belegte der wissenschaftliche Ansatz in Hillert *et al.*, dass durch stabilisierende Effekte mittels *small molecules* die Heterodimer Aktivität verlängert werden konnte und dies als vielversprechende Strategie in zukünftigen Forschungsbereichen genutzt werden könnte.

Die moderate pro-apoptotische Aktivität des *small molecules* FLIPinB γ könnte durch mehrere Faktoren erklärt werden. Eine kurze Halbwertszeit des Procaspase-8/c-FLIP_L-Komplexes könnte eine hohe FLIPinB γ -Konzentration erfordern, um einen stabilisierenden Effekt zu erzielen. Des Weiteren könnte die limitierende FLIPinB γ Wirkung auf eine geringere c-FLIP_L Präsenz in den DED-Filamenten erklärt werden. Tatsächlich zeigte eine quantitative DED-Filament-Proteomanalyse, dass c-FLIP in den Filamenten in einer zehnmal geringeren Konzentration vorhanden ist als Procaspase-8⁴². Auf Grund dessen kann man davon ausgehen, dass nur eine begrenzte Anzahl von Procaspase-8/c-FLIP_L-Heterodimeren in jeder Kette vorhanden sind, die im Umkehrschluss die Auswirkungen von FLIPinB γ am DISC begrenzen. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass verschiedene Tumorzellen eine höhere intrazelluläre c-FLIP_L-Konzentration aufweisen, und aus diesem Grund die Entwicklung von *small molecules* basierend auf FLIPinB γ generell ein extrem hohes therapeutisches Potenzial besitzt¹⁴¹.

Im Gegensatz zu den Hauptregulatoren des intrinsischen Apoptoseweges, für die bereits spezifische niedermolekulare Inhibitoren erfolgreich entwickelt wurden und sich derzeit in klinischen Studien befinden, steht man mit der Entwicklung von *small molecules* zur Modifikation des extrinsischen Weges erst am Anfang¹⁴². Zusammenfassend bietet die Arbeit von Hillert *et al.* eine erste Grundlage für die Entwicklung neuer Tumorthérapien mittels spezifischer Aktivitätsverstärkung des extrinsischen, apoptotischen Schlüsselenzyms – der Caspase-8 - und eröffnet neue Wege, um die Todesrezeptor-induzierte Apoptose gezielt zu verstärken.

3.2.2 gezielte Behandlungsstrategie zur Bekämpfung von AML mit FLT3-ITD Mutation

AML ist eine heterogene Erkrankung mit diversen Mutationen, die es erschweren eine perfekte Behandlung mit Chemotherapeutika zu gewährleisten. Auf Grund dessen werden neue Technologien wie zum Beispiel das *next generation sequencing* genutzt, um Therapieansätze zu erforschen und zu entwickeln¹⁴³. Eine der häufigsten Mutationen bei AML-Erkrankungen befindet sich in der Juxtamembran-Region im Tyrosinkinase-Rezeptor FLT3 (FLT3-ITD). Diese Mutation bewirkt eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors. Patienten mit dieser spezifischen Mutation weisen eine im Krankheitsverlauf schlechte Prognose auf^{107,108}. Um die FLT3-ITD Mutation im Hinblick auf Veränderungen der Zelltodsignalwege näher zu analysieren, ist es entscheidend ein zelluläres System

wie zum Beispiel die murine hämatopoetische Progenitor-Zelllinie 32D zu verwenden, die lediglich den humanen, mutierten FLT3-Rezeptor überexprimiert^{144,145}.

Dieses Zellmodell verhindert den Einfluss eines stark heterogenen Hintergrunds, der oftmals bei AML-Patienten vorhanden ist, auf die zu untersuchenden Effekte. Damit war es möglich lediglich die Auswirkung der Rezeptormutation FLT3-ITD in 32D Zellen in Bezug auf Todesrezeptor-Signalwege zu analysieren¹⁴⁶. Damit wurde ein guter Ansatz geboten, um einzelne Signalknoten zu identifizieren, die zur Sensitivierung von AML-Zellen gegenüber Zelltod-induzierter Stimuli beitragen, ohne alle möglichen Nebenwirkungen des heterogenen Genotyps dieser Zellen einzubeziehen. Im Speziellen konnte so in Hillert *et al.* gezeigt werden, dass das Kinaseprotein RIPK1 als Zielprotein für Behandlungsansätze gegen AML-Zellen mit FLT3-ITD Mutation verwendet werden kann. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Intensität des Zelltods nach CD95L-Stimulation und BV6 Behandlung in primären AML-Zellen stark mit der RIPK1-Expression korrelierte. Bildgebende Durchflusszytometrie konnte belegen, dass die Zellen an einem nekroptotischen Zelltod starben, während die zusätzliche Behandlung mit Necrostatin-1s (Nec-s), einem nekroptotischen Inhibitor, die Zellen effektiv vor Zelltod schützte. Darüber hinaus boten die experimentellen Ergebnisse die Erkenntnis, dass eine kombinierte Todesrezeptor/BV6-Stimulation Nekroptose auslöste und ermöglichten die Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, um AML-Zellen über nekroptotische Stimuli im Falle einer apoptotischen Signalblockade zu sensitivieren¹²⁵.

Um die klinische Relevanz der experimentellen Analysen zur CD95L-Stimulation zusätzlich zu stützen, wurden Patientenproben mit FLT3-ITD Mutation auch mit TRAIL, einem weiteren Mitglied der TNF Superfamilie behandelt. TRAIL ist ein potenzielles Tumormedikament, das sich in mehreren klinischen Studien befindet^{147,148}. Herbst *et al.* veröffentlichten eine Phase I Studie, in der 71 Patienten mit dem humanen, rekombinanten TRAIL (Apo2L) behandelt wurden¹⁴⁹. Die Behandlung erwies sich als sicher und gut verträglich. In Hillert *et al.* wurde gezeigt, dass die kombinatorische Behandlung mit TRAIL und dem SMAC *mimetic* BV6 primäre AML-Zellen, die eine FLT3-ITD Mutation trugen, in Richtung Zelltod sensitivierte. Dies bietet also weitere Möglichkeiten für die Entwicklung neuer therapeutischer Anwendungen in Bezug auf AML.

Darüber hinaus wurde in früheren Studien eine verstärkte Hochregulierung verschiedener Mitglieder der anti-apoptotischen Bcl-2-Familie in AML-Zellen festgestellt¹⁵⁰⁻¹⁵². Diese Proteine sind Teil des intrinsischen Todessignalweges und sind Zielgene des Transkriptionsfaktors NF- κ B¹⁵³. Insbesondere die Studie von Kasper *et al.* ergab eine signifikante Hochregulierung von Mcl-1 in AML-Zellen und zeigte, dass die Herunterregulierung dieses Proteins in 32D-FLT3-ITD Zellen eine effektive Zelltodsensitivierung zur Folge hatte. Im Umkehrschluss ist allerdings die Hochregulierung des anti-apoptotischen Proteins auch wesentliche Ursache für die FLT3-ITD-vermittelte Medikamentenresistenz¹⁵⁴.

Neben der anti-apoptotischen Signalübertragung wurden bereits Schlüsselproteine des Todesrezeptor-Netzwerks wie RIPK3 und Procaspace-8 als essentiell für die Sensibilisierung in Richtung Zelltod von AML-Zellen mit einer FLT3-ITD Mutation beschrieben^{155–157}.

Insbesondere wurde berichtet, dass das Kinaseprotein RIPK3 in AML-Zellen mit einer FLT3-ITD Mutation unterdrückt wird¹⁵⁷. Interessanterweise konnte in Hillert *et al.* keine verringerte Expression von RIPK3 in 32D-FLT3-ITD Zellen beobachtet werden, sodass man dies auf eine mögliche Einschränkung dieses Zelllinienmodells zurückführen könnte. Trotzdem deuten auch diese Studien daraufhin, dass die Induktion des nekroptotischen Signalweges eine mögliche Strategie ist, um der konstitutiven Aktivierung von anti-apoptotischen Signalkaskaden entgegenzuwirken.

In Hillert *et al.* setzte man den Fokus auf die Analyse der Todesrezeptor-Netzwerke in AML-Zellen, die eine FLT3-ITD Mutation beinhalten. Diese beschriebenen, experimentellen Ergebnisse haben eine hohe klinische Relevanz insbesondere in Bezug auf die Veröffentlichung von Dominguez *et al.*. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass TRAIL-R2 Aktivierung in myeloid-abgeleitete Suppressorzellen *in vivo* herunterreguliert werden kann¹⁵⁸. Diese Erkenntnisse erhöhten das Interesse an Analysen der verschiedenen Todesrezeptor-Netzwerke in AML-Zellen insbesondere mit Fokus auf spezifische Mutationen. Darüber hinaus unterstrich die Identifizierung des Zielproteins RIPK1 in AML-Zellen, die eine FLT3-ITD Mutation tragen, die Relevanz der kombinierten Behandlungsstrategien mit z.B. SMAC *mimetics*. In diesem Zusammenhang ist außerdem zu bemerken, dass sich mehrere SMAC *mimetics* wie z. B. Birinapant derzeit in klinischen Studien zur AML Behandlung befinden¹⁵⁹. Im Speziellen zeigte bereits Birinapant allein und in Kombination mit anderen Medikamenten eine wirksame Antitumoraktivität bei AML¹⁶⁰. Darauf aufbauend wurde auch die kombinierte Behandlung mit Birinapant und einem Caspase-Inhibitor analysiert, wobei eine Zelltoderhöhung festgestellt werden konnte. Die Caspase Inhibition und damit die Apoptoseblockade führte zur Aktivierung von Nekroptose¹⁵⁵ und kann die Analysen aus der Veröffentlichung von Hillert *et al.* stützen¹²⁵. Zusammenfassend zeigten die Resultate zur gezielten Behandlung des Proteins RIPK1 in Kombination mit der Aktivierung des CD95 Signalweges eine hohe klinische Relevanz und fördern damit die Entwicklung von kombinierten SMAC *mimetic*-basierten Therapien für AML-Erkrankungen.

4 LITERATURVERZEICHNIS

1. Trauth, B. C. *et al.* Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science (80-)*. **245**, 301–305 (1989).
2. Yonehara, S., Ishii, A. & Yonehara, M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **169**, 1747–1756 (1989).
3. Jenkinson, E. J., Kingston, R., Smith, C. A., Williams, G. T. & Owen, J. J. T. Antigen-induced apoptosis in developing t cells: a mechanism for negative selection of the t cell receptor repertoire*. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2175–2177 (1989).
4. Hayashi, T. & Faustman, D. L. Role of Defective Apoptosis in Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases. *Recent Progress in Hormone Research* vol. 58 131–153 (2003).
5. Walkinshaw, G. & Waters, C. M. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* **95**, 2458–2464 (1995).
6. Landfield, P. W., Thibault, O., Mazzanti, M. L., Porter, N. M. & Kerr, D. S. Mechanisms of neuronal death in brain aging and alzheimer's disease: Role of endocrine-mediated calcium dyshomeostasis. *J. Neurobiol.* **23**, 1247–1260 (1992).
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* vol. 100 57–70 (2000).
8. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
9. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251–306 (1980).
10. Schweichel, J.-U. & Merker, H.-J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253–266 (1973).
11. Hirsch, T. *et al.* The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* **15**, 1573–1581 (1997).
12. Overholtzer, M. *et al.* A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* **131**, 966–979 (2007).
13. Brennan, M. A. & Cookson, B. T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* **38**, 31–40 (2000).

14. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
15. Van Den Eijnde, S. M. *et al.* Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* vol. 3 (1998).
16. Venegas, V. & Zhou, Z. Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3180–3192 (2007).
17. Martin, S. J., Finucane, D. M., Amarante-Mendes, G. P., O'Brien, G. A. & Green, D. R. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 28753–28756 (1996).
18. Bratton, D. L. *et al.* Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26159–26165 (1997).
19. Verhoven, B., Schlegel, R. A. & Williamson, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic t lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 1597–1607 (1995).
20. Hanayama, R. *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182–187 (2002).
21. Miyanishi, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435–439 (2007).
22. Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. & Green, D. R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* **2**, 156–162 (2000).
23. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* **1**, 949–957 (1998).
24. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1 · cytochrome C multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549–11556 (1999).
25. Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R. & Alnemri, E. S. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 17941–17945 (1999).
26. Granger, G. A., Shacks, S. J., Williams, T. W. & Kolb, W. P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells [20]. *Nature* vol. 221 1155–1157 (1969).
27. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3666–3670 (1975).
28. Pennica, D. *et al.* Human tumour necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724–729 (1984).
 29. Craig Smith, M. A. & Farmh, T. *The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, & stimulation, and Death.* *Cell* vol. 76 (1994).
 30. Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P. & Feslk, S. W. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* **384**, 638–641 (1996).
 31. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J. & Goeddel, D. V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681–692 (1994).
 32. Banner, D. W. *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431–445 (1993).
 33. Itoh, N. *et al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233–243 (1991).
 34. Peitsch, M. C. & Tschopp, J. Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol. Immunol.* **32**, 761–772 (1995).
 35. Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. W. & Goeddel, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845–853 (1993).
 36. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505–512 (1995).
 37. Boldin, M. P. *et al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif elated to the death domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 7795–7798 (1995).
 38. Jeong, E. J. *et al.* The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *J. Biol. Chem.* **274**, 16337–16342 (1999).
 39. Berglund, H. *et al.* The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *J. Mol. Biol.* **302**, 171–188 (2000).
 40. Sukits, S. F. *et al.* Solution structure of the tumor necrosis factor receptor-1 death domain. *J. Mol. Biol.* **310**, 895–906 (2001).
 41. J P Medema, C Scaffidi, F C Kischkel, A Shevchenko, M Mann, P H Krammer, and M. E. P. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* **16** (10), 2794–2804 (1997).

42. Schleich, K. *et al.* Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. *Mol. Cell* **47**, 306–19 (2012).
43. Fu, T.-M. *et al.* Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. *Mol. Cell* **64**, 236–250 (2016).
44. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 2926–2930 (1998).
45. Muzio, M. *et al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817–827 (1996).
46. Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 7320–7326 (2001).
47. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. & Earnshaw, W. C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346–347 (1994).
48. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. & Poirier, G. G. Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Res.* **53**, (1993).
49. Seyrek, K. *et al.* Controlling Cell Death through Post-translational Modifications of DED Proteins. *Trends Cell Biol.* **30**, 354–369 (2020).
50. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* **75**, 641–652 (1993).
51. Alnemri, E. S. *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* vol. 87 171 (1996).
52. Eckhart, L. *et al.* Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J. Invest. Dermatol.* **115**, 1148–1151 (2000).
53. Lippens, S. *et al.* Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.* **7**, 1218–1224 (2000).
54. Hyun, H. P. *et al.* The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual Review of Immunology* vol. 25 561–586 (2007).
55. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor

- of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300–304 (1997).
56. Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H. & Peter, M. E. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J. Biol. Chem.* **272**, 26953–8 (1997).
 57. Fu, T. M. *et al.* Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. *Mol. Cell* **64**, 236–250 (2016).
 58. Fox, J. L. *et al.* Cryo-EM structural analysis of FADD:Caspase-8 complexes defines the catalytic dimer architecture for co-ordinated control of cell fate. *Nat. Commun.* **12**, 1–17 (2021).
 59. Dickens, L. S. *et al.* A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Mol. Cell* **47**, 291–305 (2012).
 60. Hughes, M. A. *et al.* Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival. *Mol. Cell* **35**, 265–279 (2009).
 61. Lavrik, I. *et al.* The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC [2]. *Cell Death and Differentiation* vol. 10 144–145 (2003).
 62. Hoffmann, J. C., Pappa, A., Krammer, P. H. & Lavrik, I. N. A New C-Terminal Cleavage Product of Procaspase-8, p30, Defines an Alternative Pathway of Procaspase-8 Activation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4431–4440 (2009).
 63. Golks, A. *et al.* The role of CAP3 in CD95 signaling: New insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death Differ.* **13**, 489–498 (2006).
 64. Rotonda, J. *et al.* The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 619–625 (1996).
 65. Blanchard, H. *et al.* The three-dimensional structure of caspase-8: An initiator enzyme in apoptosis. *Structure* **7**, 1125–1133 (1999).
 66. Walker, N. P. C. *et al.* Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme: A (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343–352 (1994).
 67. Watt, W. *et al.* The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* **7**, 1135–1143 (1999).
 68. Wilson, K. P. *et al.* Structure and mechanism of interleukin-1 β converting enzyme. *Nature* **370**, 270–275 (1994).
 69. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. & Alnemri, E. S. Molecular

- ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14486–14491 (1996).
70. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. & Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803–815 (1996).
71. Irmeler, M. *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190–195 (1997).
72. Thome, M. *et al.* Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517–521 (1997).
73. Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H. & Lavrik, I. N. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 14507–13 (2005).
74. Schleich, K. *et al.* Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell Death Differ.* **23**, 681–694 (2016).
75. Lavrik, I. N. & Krammer, P. H. Life and Death Decisions in the CD95 System: Main Proand Anti-Apoptotic Modulators. *Acta Naturae* **1**, 80–83 (2009).
76. Hughes, M. A. *et al.* Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Mol. Cell* **61**, 834–849 (2016).
77. Fricker, N. *et al.* Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *J. Cell Biol.* **190**, 377–389 (2010).
78. Kataoka, T. *et al.* The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.* **10**, 640–648 (2000).
79. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. & Peter, M. E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 1541–1548 (1999).
80. Hwang, E. Y., Jeong, M. S., Park, S. Y. & Jang, S. B. Evidence of complex formation between FADD and c-FLIP death effector domains for the death inducing signaling complex. *BMB Rep.* **47**, 488–493 (2014).
81. Ueffing, N. *et al.* Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell Death Differ.* **15**, 773–782 (2008).
82. Majkut, J. *et al.* Differential affinity of FLIP and procaspase 8 for FADD's DED binding surfaces

- regulates DISC assembly. *Nat. Commun.* **5**, 1–12 (2014).
83. Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* **1**, 489–495 (2000).
84. Degterev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 112–119 (2005).
85. Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E. & Seed, B. RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**, 513–523 (1995).
86. Geserick, P. *et al.* Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J. Cell Biol.* **187**, 1037–1054 (2009).
87. Cho, Y. S. *et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* **137**, 1112–1123 (2009).
88. Cai, Z. *et al.* Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* **16**, 55–65 (2014).
89. Jung, H., Park, M., Kang, M. & Jeong, K.-H. Silver nanoislands on cellulose fibers for chromatographic separation and ultrasensitive detection of small molecules. *Light Sci. Appl.* **5**, e16009–e16009 (2016).
90. Degterev, A. *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 313–321 (2008).
91. Kotschy, A. *et al.* The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* **538**, 477–482 (2016).
92. Varfolomeev, E. *et al.* IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B Activation, and TNF α -Dependent Apoptosis. *Cell* **131**, 669–681 (2007).
93. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
94. Chai, J. *et al.* Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855–862 (2000).
95. Liu, Z. *et al.* Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **408**, 1004–1008 (2000).
96. Verhagen, A. M. *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43–53 (2000).

97. Tamm, I. *et al.* Expression and Prognostic Significance of IAP-Family Genes in Human Cancers and Myeloid Leukemias. *Clin. Cancer Res.* **6**, (2000).
98. Yamamoto, K. *et al.* Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. *Leuk. Res.* **28**, 1203–1211 (2004).
99. Mizutani, Y. *et al.* Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* **23**, 448–454 (2005).
100. Li, W. *et al.* BV6, an IAP antagonist, activates apoptosis and enhances radiosensitization of non-small cell lung carcinoma in vitro. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 1801–1809 (2011).
101. El-Mesery, M., Shaker, M. E. & Elgaml, A. The SMAC mimetic BV6 induces cell death and sensitizes different cell lines to TNF- α and TRAIL-induced apoptosis. *Exp. Biol. Med.* **241**, 2015–2022 (2016).
102. Petersen, S. L., Peyton, M., Minna, J. D. & Wang, X. Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11936–11941 (2010).
103. Stadel, D. *et al.* Requirement of nuclear factor κ B for smac mimetic-mediated sensitization of pancreatic carcinoma cells for gemcitabine-induced apoptosis. *Neoplasia* **13**, 1162–1170 (2011).
104. Cheng, Y. J. *et al.* XIAP-mediated protection of H460 lung cancer cells against cisplatin. *Eur. J. Pharmacol.* **627**, 75–84 (2010).
105. Bockbrader, K. M., Tan, M. & Sun, Y. A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **24**, 7381–7388 (2005).
106. Dr. Peter Kaatsch, Dr. Claudia Spix, Prof. Dr. Alexander Katalinic, Dr. Stefan Hentschel, Dr. Sabine Luttmann, Dr. Mechthild Waldeyer-Sauerland, Dr. Annika Waldmann, Monika Christ, Dr. Juliane Folkerts, Dr. Jutta Hansmann, Dr. Stefanie Klein, Dr. Kristine, D. A. W. *Krebs - Krebs in Deutschland für 2015/2016.* (2019). doi:10.25646/5977.2.
107. Verstraete, K. & Savvides, S. N. Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 753–766 (2012).
108. Gu, T. *et al.* Survey of Activated FLT3 Signaling in Leukemia. *PLoS One* **6**, e19169 (2011).
109. Yamamoto, Y. *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**, 2434–2439 (2001).
110. Kiyoi, H. *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* **12**, 1333–1337 (1998).

111. Mizuki, M. *et al.* Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**, 3907–3914 (2000).
112. Jönsson, M., Engström, M. & Jönsson, J. I. FLT3 ligand regulates apoptosis through AKT-dependent inactivation of transcription factor FoxO3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 899–903 (2004).
113. Takahashi, S. *et al.* Over-expression of Flt3 induces NF- κ B pathway and increases the expression of IL-6. *Leuk. Res.* **29**, 893–899 (2005).
114. Rattu, M. A., Shah, N., Iskhakova, T. & Popovitz, B. The Utility of FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *U.S. Pharm.* **39**, 8–11 (2014).
115. Slape, C. I. *et al.* Inhibition of apoptosis by BCL2 prevents leukemic transformation of a murine myelodysplastic syndrome. *Blood* **120**, 2475–2483 (2012).
116. Glaser, S. P. *et al.* Anti-apoptotic mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev.* **26**, 120–125 (2012).
117. Mead, A. J. *et al.* FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **110**, 1262–1270 (2007).
118. Hillert, L. K. *et al.* Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly. *Oncogene* **39**, 1756–1772 (2020).
119. Yu, J. W., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8169–8174 (2009).
120. Micheau, O. *et al.* The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 45162–71 (2002).
121. Pop, C. *et al.* FLIPL induces caspase 8 activity in the absence of interdomain caspase 8 cleavage and alters substrate specificity. *Biochem. J.* **433**, 447–457 (2011).
122. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S. & Coleman, R. G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling* vol. 52 1757–1768 (2012).
123. Hillert, L. K. *et al.* Dissecting DISC regulation via pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer. *Cell Death Differ.* **27**, 2117–2130 (2020).
124. Testa, U. & Riccioni, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **92**, 81–94 (2007).

125. Hillert, L. K. *et al.* Targeting RIPK1 in AML cells carrying FLT3-ITD. *Int. J. Cancer* **145**, 1558–1569 (2019).
126. Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H. & Lavrik, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J. Immunol. Methods* **423**, 99–103 (2015).
127. Schilling, B. *et al.* Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: Application to protein acetylation and phosphorylation. in *Molecular and Cellular Proteomics* vol. 11 202–214 (Elsevier, 2012).
128. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Molecular Ordering of the Initial Signaling Events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 207–220 (2002).
129. Algeciras-Schimmich, A. & E. Peter, M. Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett.* **546**, 185–188 (2003).
130. Schleich, K. *et al.* Molecular architecture of the DED chains at the DISC: Regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell Death Differ.* **23**, 681–694 (2016).
131. Sprick, M. R. *et al.* Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* **21**, 4520–4530 (2002).
132. Horn, S. *et al.* Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- κ B Activation and Cell Survival. *Cell Rep.* **19**, 785–797 (2017).
133. Yu, J. W., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8169–8174 (2009).
134. Hardy, J. A., Lam, J., Nguyen, J. T., O'Brien, T. & Wells, J. A. Discovery of an allosteric site in the caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12461–12466 (2004).
135. Scheer, J. M., Romanowski, M. J. & Wells, J. A. A common allosteric site and mechanism in caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7595–7600 (2006).
136. Bucur, O. *et al.* A novel caspase 8 selective small molecule potentiates TRAIL-induced cell death. *Sci. Rep.* **5**, 9893 (2015).
137. Spencer, S. L. & Sorger, P. K. Measuring and modeling apoptosis in single cells. *Cell* vol. 144 926–939 (2011).
138. Schoeberl, B. *et al.* Systems biology driving drug development: From design to the clinical

- testing of the anti-ErbB3 antibody seribantumab (MM-121). *npj Systems Biology and Applications* vol. 3 1–17 (2017).
139. Kallenberger, S. M. *et al.* Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis. *Sci. Signal.* **7**, ra23–ra23 (2014).
140. Roux, J. *et al.* Fractional killing arises from cell-to-cell variability in overcoming a caspase activity threshold. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 803 (2015).
141. Du, X. *et al.* Expression and biological significance of c-FLIP in human hepatocellular carcinomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 24 (2009).
142. Roberts, A. W. *et al.* Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 311–322 (2016).
143. Stein, E. M. & Tallman, M. S. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood* **127**, 71–8 (2016).
144. Heidel, F. H. *et al.* 3,4-Diarylmaleimides—a novel class of kinase inhibitors—effectively induce apoptosis in FLT3-ITD-dependent cells. *Ann. Hematol.* **91**, 331–344 (2012).
145. Arreba-Tutusaus, P. *et al.* Impact of FLT3-ITD location on sensitivity to TKI-therapy in vitro and in vivo. *Leukemia* **30**, 1220–1225 (2016).
146. Levis, M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2013**, 220–226 (2013).
147. Ashkenazi, A. *et al.* Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* **104**, 155–162 (1999).
148. Walczak, H. *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157–163 (1999).
149. Herbst, R. S. *et al.* Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2839–2846 (2010).
150. Yoshimoto, G. *et al.* FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood* **114**, 5034–5043 (2009).
151. Minami, Y. *et al.* Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* **102**, 2969–2975 (2003).
152. Kohl, T. M. *et al.* BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia* **21**, 1763–1772 (2007).

153. Khoshnan, A. *et al.* The NF- κ B Cascade Is Important in Bcl-x L Expression and for the Anti-Apoptotic Effects of the CD28 Receptor in Primary Human CD4 + Lymphocytes . *J. Immunol.* **165**, 1743–1754 (2000).
154. Kasper, S. *et al.* Targeting MCL-1 sensitizes FLT3-ITD-positive leukemias to cytotoxic therapies. *Blood Cancer J.* **2**, 60 (2012).
155. Brumatti, G. *et al.* The caspase-8 inhibitor emricasan combines with the SMAC mimetic birinapant to induce necroptosis and treat acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* **8**, 339ra69-339ra69 (2016).
156. Safferthal, C., Rohde, K. & Fulda, S. Therapeutic targeting of necroptosis by Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in acute myeloid leukemia cells. *Oncogene* **36**, 1487–1502 (2017).
157. Höckendorf, U. *et al.* RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell* **30**, 75–91 (2016).
158. Dominguez, G. A. *et al.* Selective targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients using DS-8273a, an agonistic TRAIL-R2 antibody. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2942–2950 (2017).
159. Frey, N. V. *et al.* A Phase I Study Using Single Agent Birinapant in Patients with Relapsed Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia. *Blood* **124**, 3758–3758 (2014).
160. Carter, B. Z. *et al.* Synergistic targeting of AML Stem/progenitor cells with IAP antagonist birinapant and demethylating agents. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).