

Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. rer.nat. Thomas Brocker

Analyse der Funktion von Signaladaptoren zelltodvermittelnder Rezeptoren

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Robert Wilke

aus München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. H. Engelmann, Ph.D

Mitberichterstatter Priv. Doz. Dr. R. Huss
Priv. Doz. Dr. C. Folwaczny

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. H. Engelmann, Ph.D

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 6.11.2003

Meinen Eltern

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	NEKROSE UND APOPTOSE: UNTERSCHIEDLICHE FORMEN DES ZELLTODES	7
1.2	DIE STADIEN DES APOPTOTISCHEN ZELLTODES	10
1.2.1	<i>Stadium 1: Auslösen der Apoptose - Mechanismen der Stimulation.....</i>	<i>11</i>
1.2.1.1	Die TNF-Rezeptorfamilie.....	12
1.2.2	<i>Stadium 2: Intrazelluläre Signaltransduktion</i>	<i>14</i>
1.2.2.1	Signalweg von Fas und TNFR1	17
1.2.2.2	Die Ausführung der Apoptose - Caspase-Familie	18
1.2.2.3	Die Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose.....	20
1.2.3	<i>Stadium 3: Apoptose - die morphologischen und biochemischen Veränderungen.....</i>	<i>23</i>
2	FRAGESTELLUNG	25
3	MATERIAL.....	27
3.1	REAGENZIEN.....	27
3.2	ZYTOKINE.....	27
3.3	PUFFERLÖSUNGEN UND KULTURMEDIENT.....	27
3.4	ZELLEN UND GEWEBEKULTUR.....	31
4	METHODEN	33
4.1	ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN	33
4.1.1	<i>Trennung von Nukleinsäuren</i>	<i>33</i>
4.1.2	<i>Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten mittels DEAE Zellulose</i>	<i>33</i>
4.1.3	<i>Reinigung von Nukleinsäuren</i>	<i>33</i>
4.1.3.1	Phenolextraktion	33
4.1.3.2	HPLC-Reinigung.....	34
4.1.4	<i>Konzentrierung von Nukleinsäuren durch Präzipitation</i>	<i>34</i>
4.1.5	<i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	<i>34</i>
4.1.6	<i>Isolation von RNA, cDNA Synthese</i>	<i>35</i>
4.1.7	<i>Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren</i>	<i>35</i>
4.1.7.1	Spezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
4.1.7.2	Enzymatische Sequenzierung von doppelsträngiger DNA nach der Strangabbruchmethode nach Sanger	35

4.1.8	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	36
4.1.8.1	PCR vermitteltes Einfügen von Punktmutationen in ein DNA Fragment	37
4.1.9	<i>Subklonierung von DNA-Fragmenten</i>	37
4.1.9.1	Vektorpräparation durch enzymatische Spaltung im Polylinker	37
4.1.9.2	Dephosphorylierung freier Vektorenden mit alkalischer Phosphatase	38
4.1.9.3	Verknüpfung von DNA Ketten durch T4-Ligase	38
4.2	BAKTERIENTRANSFORMATION MIT PLASMID-DNA	38
4.2.1	<i>Herstellung transformationskompetenter Bakterien</i>	38
4.2.2	<i>Transformation</i>	38
4.2.3	<i>Plasmidgewinnung aus Bakterien</i>	39
4.2.3.1	Schnellpräparation von Plasmid DNA	39
4.2.3.2	Großansatz zur Isolierung von Plasmid DNA	39
4.3	TRANSFEKTION	39
4.3.1	<i>Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit DNA</i>	39
4.3.1.1	DEAE Transfektion	39
4.3.1.2	Elektroporation	40
4.3.1.3	Transfektion mit Lipidkomplexen	40
4.3.2	<i>Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels β-Gal Färbung</i>	41
4.3.3	<i>Bestimmung des zytotoxischen Effektes eines transfizierten Konstruktes mittels CPRG-Färbung</i>	41
4.4	ZELLTOD ASSAY	42
4.4.1	<i>Induktion von Zelltod über Stimulation von Fas und TNFR1</i>	42
4.4.2	<i>Schutz vor Zelltod</i>	42
4.4.2.1	BHA, Rotenone, D609	42
4.4.2.2	YVAD, ZVAD, DEVD	43
4.4.3	<i>Bestimmung der Zelltodrate</i>	43
4.5	INTERLEUKIN-6 BESTIMMUNG	43
4.6	MESSUNG DER CASPASENAKTIVITÄT	44
5	ERGEBNISSE	46
5.1	KLONIERUNG VON FADD UND FUNKTIONSPRINZIP DER MUTANTE Δ FADD	47
5.1.1	<i>Umklonierung in den Expressionsvektor pEBVHis</i>	49
5.2	TRANSFEKTION DER ZELLINIEN A9FAS ⁺ UND SV80FAS ⁺	50

5.3	EXPRESSION VON FADD UND Δ FADD IN DEN ZELLINIEN A9FAS+ UND SV80FAS+	52
5.4	HEMMUNG DER Δ FADD-VERMITTELTEN APOPTOSE	58
5.5	KLONIERUNG VON RAIDD, Δ RAIDD UND RAIDDMUT	65
5.6	KLONIERUNG VON CRMA	69
5.7	MESSUNG DER CASPASE AKTIVITÄT	70
6	DISKUSSION	73
6.1	KANN Δ FADD ÜBER REKRUTIERUNG ANDERER DEATH-DOMAIN-PROTEINE APOPTOSE AUSLÖSEN?	75
6.2	KANN DIE TOXIZITÄT VON Δ FADD MIT HEMMSTOFFEN DER APOPTOSE BLOCKIERT WERDEN?	76
6.3	BESTEHT EIN UNTERSCHIED IN DER ART DES ZELLTODES DER DURCH FAS, TNFR1 ODER EXPRESSION VON Δ FADD AUSGELOST WIRD?	77
7	ANHANG	82
7.1	ZUSAMMENFASSUNG	82
7.2	LITERATURVERZEICHNIS	83
7.3	LEBENS LAUF	96
7.4	DANKSAGUNG	97

Verzeichnis der Abkürzungen

Ag	Antigen
AICD	Activation Induced Cell Death
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum Albumin
CARD	Caspase Recruiting Domain
cDNA	komplementäre (zu RNA) DNA
CPRG	Chlorophenol red D-galacto-pyranosid Mononatriumsalz
DD	Death Domain
DEAE	Diethylaminoethan
dFADD, ΔFADD	dominant negatives FADD
DMEM	Dubleco's modified eagles medium
DMRIE	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy Ethyl Ammonium Bromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxiribonuklease
dNTP	Desoxiribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FADD	Fas Associated Death Domain
FCS	Fatales Kälberserum
FLICE	FADD-like ICE, identisch mit Caspase-8
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (high pressure liquid chromatografie)
ICE	Interleukin 1β converting enzyme
ICH	ICE Homolog
Il	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
JNK	Jun N-terminal kinases
kb	Kilobasen

kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni-Nährmedium
LT	Lymphotoxin
M	Molar
mRNA	Messenger (Boten) Ribonukleinsäure
NGF	Nerve Growth Factor
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-Saline-Puffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
RAIDD	RIP Associated ICH1-homologous protein with a Death Domain
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion mit vorgeschalteter reverser Transkription
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRADD	TNF-Receptor associated Death Domain
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid

1 Einleitung

Apoptose ist die genetisch kontrollierte Form des Zelltodes, die es erlaubt Zellen, die ein Stadium erreicht haben in dem sie alle ihre vorgesehenen biologischen Aufgaben erfüllt haben, sicher zu entsorgen. Beispiele für Apoptose kann man im gesamten Pflanzen- und Tierreich finden. Sie ist ein für das Überleben eines Gesamtorganismus während der normalen Entwicklung sowie auch im adulten Leben unabdingbarer Prozess. Beim Menschen kann eine Fehlregulation der Apoptose zu entzündlichen, malignen, autoimmun- und neurodegenerativen Erkrankungen führen. Darüber hinaus modifizieren einige infektiöse Erreger, vor allem Viren, gezielt die Apoptosemechanismen des Wirtes, um dem Immunsystem zu entkommen.

1.1 Nekrose und Apoptose: unterschiedliche Formen des Zelltodes

Im Jahr 1859 beobachtete und beschrieb Virchow [1] die Abläufe und morphologischen Veränderungen in Körpergeweben, die kurz nach dem Tod auftreten. Er erkannte als erster, dass es mehr als nur eine Form des Zelltodes gibt: zum einen die Nekrose, bei der die verstorbene Zelle in ihrer ursprünglichen Form erhalten bleibt und im Gegensatz dazu „Nekrobiosis oder Schrumpfnekrose“, bei der die Zelle verschwindet und in ihrer ursprünglichen Form nicht mehr aufzufinden ist. Nekrobiosis entspricht dem, was wir heute unter Apoptose verstehen.

In den mehr als hundert Jahren seit der ersten Beschreibung wurde die Apoptose oftmals neu entdeckt. So beschrieb zum Beispiel Walther Flemming 1885 [2] die Veränderungen des Zellkerns, die heute als Charakteristikum der Apoptose gelten erstmals, und gab ihnen den Namen „Chromatolysis“. 1914 beschrieb L. Graper [3] die Bedeutung der Chromatolysis in seiner Arbeit „Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung“, und 1951 konnte Glucksmann [4] Chromatolysis während der Embryogenese nachweisen. Alle diese Untersuchungen stützten sich auf histopathologische Beobachtungen, so dass Mitte der 60er Jahre mit Einsatz des Elektronenmikroskops große Fortschritte durch Untersuchungen sterbender Zellen auf ultrastruktureller Ebene erzielt werden konnten. Es waren Kerr et al. [5], die erkannten, dass die

bisherigen Ausdrücke wie Nekrobiosis, Schrumpfnekrose, Chromatolysis oder Koagulationsnekrose nur verschiedene Beschreibungen für ein einziges Zelltodprogramm sind, das sich klar von der herkömmlichen Nekrose abgrenzt. Sie haben den Begriff „Apoptose“ geprägt, um diesen besonderen Ablauf des Zelltodes von dem der Nekrose zu unterscheiden.

Bis heute herrscht allerdings noch Uneinigkeit über den Begriff Nekrose, der im allgemeinen zur Beschreibung des alternativen Weges des Zelltodes neben der Apoptose verwendet wird. [6] haben vorgeschlagen, die Vorgänge, die in einer sterbenden Zelle ablaufen, mit Apoptose bzw. Onkose zu beschreiben. Der Term Nekrose sollte den Veränderungen vorbehalten werden, die nach diesen beiden verschiedenen Prozessen in allen Zellen gleichermaßen auftreten können, nämlich den unspezifischen postmortalen Degradationserscheinungen. (Vgl. Abb. 3-1). Diese Terminologie ist zwar sicherlich exakter, konnte sich im allgemeinen wissenschaftlichen Sprachgebrauch jedoch nicht durchsetzen. „Nekrose“ wird in der Regel verwendet um den Gegenpol zur Apoptose zu

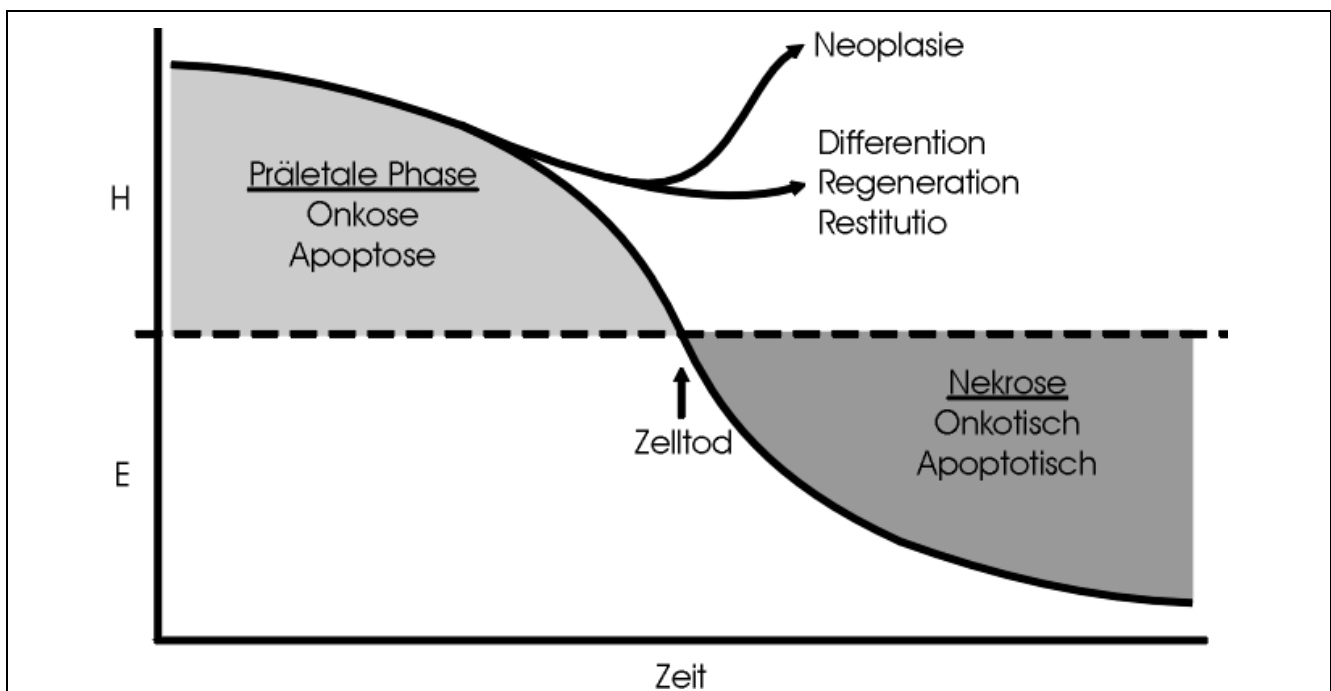


Abbildung 1-1 Model zur Klassifikation von Apoptose, Onkose und Nekrose nach Majno et al.

Reaktion einer Zelle auf ein Stimulus zum Zeitpunkt 0, der nach gewisser Zeit zum Zelltod führt. Darauf folgen präletale Vorgänge, die reversibel sind solange der eigentliche Zelltod noch nicht eingetreten ist. In vielen Fällen kann der Stimulus wieder entfernt werden, so bei Ischämie oder Anoxie, und die Zelle kann sich erholen. Während dieser Phase können die Veränderungen nach morphologischen und biochemischen Erscheinungen unterschieden werden als Onkose oder Apoptose. Hat die Zelle einmal den Punkt des Zelltodes überschritten, treten die postmortalen Veränderungen, bezeichnet als Nekrose, auf. Während dieser Phase erreicht die Zelle ein physikalisch-chemisches Equilibrium mit der Umgebung. H = Homöostase; E = Equilibrium

beschreiben.

Im allgemeinen wird heute „programmierter Zelltod“ synonym mit „Apoptose“ verwendet, was allerdings streng gesehen nicht korrekt ist. Apoptose beschreibt nur Veränderungen sterbender Zellen, die rein morphologisch definiert sind. Der Ausdruck „programmierter Zelltod“ hingegen wurde von Entwicklungsbiologen geprägt, die damit das vorhersagbare Auftreten von Zelltod während der Entwicklung oder Metamorphose bezeichneten. Die Veränderungen die hierbei in den sterbenden Zellen auftreten sind genetisch festgelegt und laufen nach einem bestimmten Programm ab. Sie entsprechen zwar gewöhnlich den Veränderungen die man bei der Apoptose findet, jedoch ist das nicht zwingend der Fall, weswegen Apoptose nicht mit programmiertem Zelltod gleichgesetzt werden kann. So konnte in aktuellen Untersuchungen gezeigt werden, dass der während der normalen Entwicklung der vorderen Extremitäten der Maus auftretende Zellverlust immer noch ablaufen konnte, obwohl der Signalweg der Apoptose auf genetischer Ebene unterbrochen war [7]. Allerdings dominierte hierbei, im Gegensatz zu den Befunden in Wildtyp-Mäusen nicht apoptotischer sondern nekrotischer Zelltod.

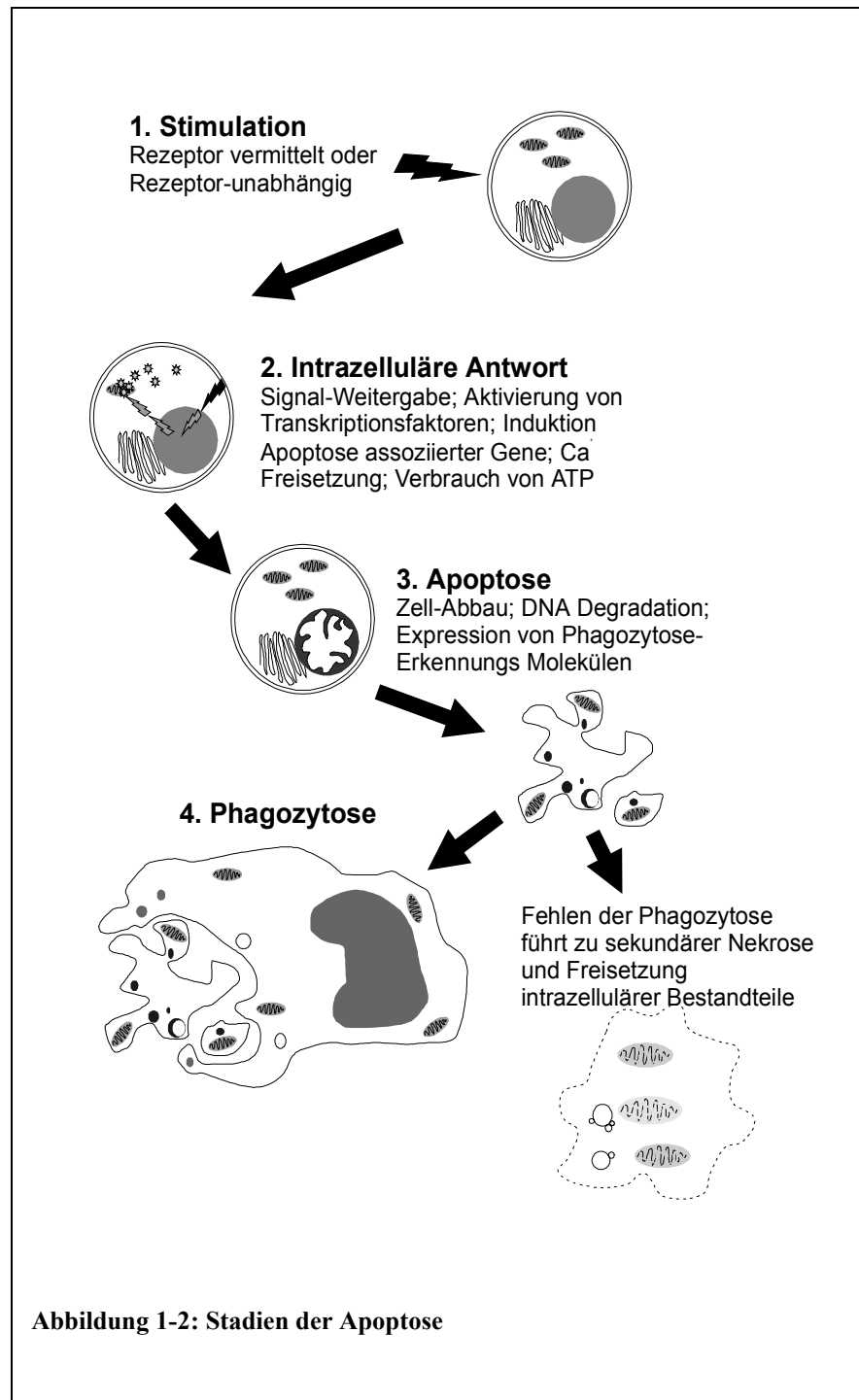
Scheinbar sind also die zwei Wege des Zelltodes gemeinsam verantwortlich einerseits für eine normale Entwicklung und andererseits für die Aufrechterhaltung einer Homöostase im adulten Organismus. Es bleibt offen, ob beide Zelltodformen möglicherweise zwei Extreme eines gemeinsamen Kontinuums sind, wobei eine Form in die andere übergehen kann. Dass sich beide Wege zumindest in gewissem Ausmaß überlappen scheint plausibel, da in vivo eine Art des Zelltodes oft von der anderen begleitet wird, und in der Zellkultur apoptotische Zellen unter Umständen nekrotisches Aussehen annehmen können [8].

Obwohl wir bis heute nur ein unvollständiges Bild der unterschiedlichen Erscheinungen der Apoptose oder des „programmierten Zelltodes“ besitzen, so ist doch ihre weitreichende Bedeutung für alle lebenden Organismen unumstritten. Fehler in der Kontrolle des „Selbstmordprogrammes“ können zu verschiedensten Krankheiten führen, wie zum Beispiel Graft versus Host Disease [9], Systemischer Lupus Erythematoses [10, 11], bestimmten Symptomen von AIDS [12], Tumore, Alzheimer oder Herzinfarkt [10, 13]. Apoptose ist ein Schlagwort geworden, das in aller Munde ist. Eine Literaturrecherche mit dem Schlagwort Apoptose liefert über 58.000 eingetragene Artikel.

1.2 Die Stadien des apoptotischen Zelltodes

Die Veränderungen bei der Apoptose laufen nacheinander in verschiedenen Schritten ab, die sicherstellen, dass das Ziel, nämlich die sicherere Entfernung einer Zelle, kontrolliert durchgeführt wird. Dabei muss die Gefahr minimiert werden, dass Undichtigkeiten in der Zelle auftreten und potentiell zytotoxische Zellbestandteile freigesetzt werden. Die drei verschiedenen Stadien sind hierbei:

1. Die Stimulation - ein Reiz der auf die Zelle einwirkt startet den Prozess,
2. Die intrazelluläre Antwort - Entscheidung über die Ausführung des Zelltodprogramms und
3. Die eigentliche Apoptose - Veränderungen in der Zelle die zum kontrollierten Verschwinden der Zelle führen (Abbildung 1-2).



1.2.1 Stadium 1: Auslösen der Apoptose - Mechanismen der Stimulation

Viele Studien konnten klar zeigen, dass alle Zellen zum Sterben „programmiert“ sind, das heißt, dass jede Zelle die enzymatische Ausstattung und die entsprechenden Signalwege besitzt, um ein Selbstmordprogramm auszulösen und durchzuführen [14]. Der Mechanismus der „biologischen Uhr“ nach dem die Zellen spontan die Apoptose starten, ist noch nicht völlig geklärt. Scheinbar können Veränderungen der Umgebungsbedingungen der Zelle diesen Prozess starten, beschleunigen oder auch abbremsen [15, 16]. Dabei gibt es eine Vielzahl verschiedener Situationen, in denen es von Vorteil für den Gesamtorganismus ist, dass einzelne Zellen gezielt entfernt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Steuerung des Lebenszyklus eines reifen neutrophilen Granulozyten. Wenn er das Knochenmark verlässt und in die periphere Zirkulation ausgeschwemmt wird ist er voll ausgereift und kann sich nicht mehr weiter teilen. Wird er nicht an einem Entzündungsherd benötigt, wo er über Degranulation seine potenten zytotoxischen Bestandteile freisetzt, wird er in der Lunge apoptotisch, wo er sofort von Alveolarmakrophagen phagozytiert wird. Durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, dass sein gefährlicher Inhalt geregelt entsorgt wird [17].

Es gibt eine Reihe von Stimuli, die von außen auf die Zelle einwirken, und die apoptotische Kaskade modulieren können, ohne dass spezifische Zell-Rezeptoren benötigt werden. Beispiele für solche Stimuli sind z.B. Hitzeschock [10], freie Radikale [18], ultraviolette Strahlung [19], verschiedene Chemotherapeutika und synthetische Peptide [20], Toxine [21] sowie starke toxische Enzyme, wie z.B. die Granzyme [22].

Andere Wege der Apoptose sind auf spezifische Rezeptoren angewiesen. Auch hier gibt es eine große Vielzahl unterschiedlicher Signalstoffe, die in bestimmten Zellen je nach momentanen Differenzierungszustand Apoptose auslösen können. Darunter befinden sich bestimmte Hormone wie z.B. beim Glucocorticoid vermitteltem Zelltod von Lymphozyten [23] oder physiologische Signalstoffe wie z.B. Glutamat, das durch Überstimulation am NMDA-Rezeptor von Nervenzellen zum Zelltod führt, des weiteren bakterielle Superantigene wie beim „Activation Induced Cell Death“ (AICD) von T-Lymphozyten [24], und die große Gruppe von Zytokinen z.B. beim Zelltod von Hepatozyten nach TGF- β Stimulation. Auch der Entzug von Zytokinen kann Apoptose auslösen, etwa NGF-Mangel bei Nervenzellen. Einige zelltodvermittelnde Rezeptoren können aufgrund struktureller Homologien zu einer gemeinsamen Familie gerechnet werden. Dazu gehört u.a. Fas (CD95/Apo-1) und TNFR, sie bilden die TNF-Rezeptorfamilie (siehe Abbildung 1-3).

Untergruppen einteilen. Der eine Teil, wie z.B. p55TNFR und Fas besitzt ein gemeinsames, ca. 80 Aminosäuren langes Motiv von ca. 28% Übereinstimmung, von dem gezeigt werden konnte, dass es für die Weitergabe des Zelltod vermittelnden Signals unabdingbar ist. Aus diesem Grund wird dieses Motiv als „Death Domain“ (Todes-Domäne) bezeichnet [41-43]. Die zweite Gruppe, zu welcher der p75TNFR und CD40 gehören, lässt keine zytoplasmatischen Gemeinsamkeiten erkennen. Dennoch weisen keine der Rezeptoren erkennbare katalytische Motive, wie z. B. Kinasen oder Phosphatasen auf, was darauf hindeutet, dass die Ausführung des Signals durch weitere zytoplasmatische Proteine adaptiert werden muss.

Fas ist ein glykosiliertes Typ I Transmembranprotein von ca. 43 kD Größe. Es wird auf einer Reihe normaler Gewebe konstitutiv exprimiert, wie z.B. aktivierten T-Zellen, Leber, Ovar und Lunge [44] sowie auf verschiedenen Karzinomzellen [25, 45], kann aber auch auf anderen Geweben induziert werden [25, 26]. Apoptose via Fas kann über den Liganden CD95L in seiner membranständigen Form oder nach Abspaltung durch Metalloproteasen auch in der löslichen Form, sowie durch agonistische Antikörper ausgelöst werden. Eine der Hauptaufgaben von CD95 liegt vermutlich in der Selektion von T-Zellen im Thymus, der Induktion von Toleranz durch Antigen vermittelten Selbstmord reifer T-Zellen und dem durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Töten von Zielzellen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Punktmutation im Fas Gen besitzen (*lpr* Mäuse) oder einen Defekt im Fas Liganden aufweisen (*gld* Mäuse) keinen „*activation induced cell death*“ (AICD) mehr ausführen und eine generalisierte progressive lymphatische Hyperplasie entwickeln, die dem Systemischen Lupus Erythematoses, einer beim Menschen bekannten Autoimmunerkrankung sehr ähnlich ist [46]. Für das „autoimmune lymphoproliferative Syndrom“ (ALPS), einer seltenen rezessiv vererbten Erkrankung im Kindesalter, konnte inzwischen eine Mutation in der intrazellulären Domäne von CD95 nachgewiesen werden [47, 48].

Der p55-TNF-Rezeptor findet sich auf einem breiten Spektrum verschiedener normaler und neoplastischer Zellen und bindet die beiden Liganden TNF (früher: $\text{TNF}\alpha$) und Lymphotoxin $\alpha 3$ ($\text{LT}\alpha 3$, früher $\text{TNF}\beta$). TNF kommt in zwei biologisch aktiven Formen vor, einer membrangebundenen und einer löslichen, die durch proteolytische Abspaltung gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass der p75TNFR bevorzugt durch membranständiges TNF aktiviert wird, während der p55TNFR sowohl durch lösliches als auch durch membranständiges TNF stimuliert wird. TNF ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine [49], das seine pleiotropen Eigenschaften - je nach Art und Zustand der Zelle Aktivierung von NF- κ B oder Apoptose - über die beiden Rezeptoren vermittelt [41, 50-56]. Die Mechanismen, die für die unterschiedliche Antwort einer Zelle auf den TNF Stimulus verantwortlich sind, bleiben bis heute weitgehend

unverstanden. Man konnte jedoch zeigen, dass Tumorzellen, die primär resistent gegen TNF-induzierte Apoptose sind, unter Behandlung mit Proteinsynthesehemmern hochempfindlich werden gegen TNF vermittelten Zelltod. Eine Hypothese, die diesen Befund erklärt, geht davon aus, dass der Vorgang der Apoptose einer engmaschigen Regulation durch eine Vielzahl verschiedener zytoplasmatischer Proteine unterliegt. Je nach „innerer Differenzierung“ der Zelle, die durch Blockade der Proteinbiosynthese verändert wird, resultiert eine unterschiedliche Antwort auf den gleichen exogenen Stimulus.

1.2.2 Stadium 2: Intrazelluläre Signaltransduktion

Nach Bindung des spezifischen trimeren Liganden an den TNF-Rezeptor bzw. CD95 kommt es zur Oligomerisation des Rezeptors. Stimulation des Rezeptors über agonistische Antikörper kann nur erfolgen, wenn diese Antikörper in der Lage sind eine Quervernetzung der Rezeptoren zu vermitteln. In Experimenten zeigte sich hier der Subtyp IgG3 besonders effektiv, offensichtlich weil er eine besondere Fähigkeit zur Aggregation über den Fc-Teil besitzt [57]. Immunglobulin-Subklassen, die lediglich eine Dimerisierung der Rezeptoren bewirken (z.B. IgG 2b), sind ineffizient. Als wahrscheinlichste Struktur, die in der Lage ist, das apoptotische Signal zu übermitteln, kann ein Trimer aus dem jeweiligen Rezeptor angenommen werden. Mittels Röntgen-

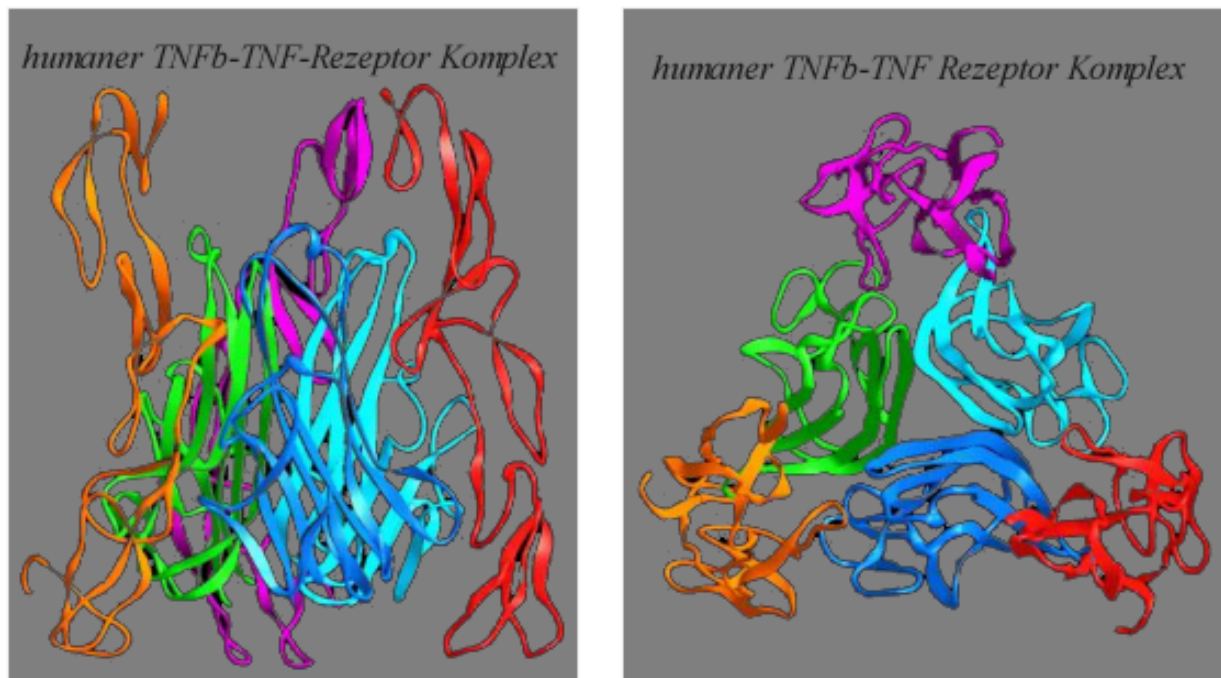









Abbildung 1-4: Dreidimensionale Struktur des TNF-TNF-Rezeptor Komplexes: die drei einzelnen Rezeptorketten sind in orange, rot und violett dargestellt, die einzelnen TNF-Monomere grün blau und hellblau (nach „The Cytokines Web“)

Kristallographie konnte ein solcher Komplex aus trimeren Liganden mit trimerelem Rezeptor für den TNF Rezeptor1 bereits nachgewiesen werden [58] (siehe Abbildung 1-4).

Zunächst konnte in keinem der beiden Rezeptoren eine intrazelluläre Konsensussequenz identifiziert werden, die eine Einbindung in eine der bisher bekannten Signalwege vorhersagen könnte. Erst nach Deletionsanalysen konnten Tartaglia et al. [41] eine Sequenz von ca. 80 Aminosäuren in der intrazellulären Domäne des TNFR1 beschreiben, die essentiell für die Weitergabe des Zelltodsignals ist. Auch für CD95 konnte eine ähnliche Domäne nachgewiesen werden, die eine hohe Homologie zu derjenigen des TNFR1 aufweist. Aufgrund ihrer offensichtlichen Funktion nennt man dieses Motiv „death domain“(DD). Inzwischen konnte man weitere Rezeptoren mit DD finden (vgl. Abbildung 1-3). Mit Hilfe des „yeast two-hybrid-system“ [59] konnten intrazelluläre Moleküle identifiziert werden, die mit CD95, TNFR1 bzw. dem aktivierten Rezeptorkomplex, interagieren (vgl. Tabelle 1-1). Da das *yeast two-hybrid-system* vor

Tabelle 1-1: Signaladaptoren des Fas/TNFR1 Signalweges

<i>Signalmolekül</i>	<i>Interaktion mit</i>		<i>Einfluß auf Apoptose</i>
	<i>TNFR1</i>	<i>CD95</i>	
FADD 	(+)	+	<i>fördernd</i>
TRADD 	+	-	<i>fördernd</i>
RIP 	+	+	<i>fördernd</i>
FAP-1	?	+	<i>hemmend</i>
Sentrin	+	+	<i>hemmend</i>
RAIDD 	-	-	<i>fördernd</i>
FLICE 	-	-	<i>fördernd</i>
DAXX	+	+	<i>fördernd</i>
TNFR1 			
CD95 			

FADD: *Fas associated death domain*, TRADD: *TNF-Receptor Associated Death Domain*, RIP: *Receptor Interacting Protein*, FAP-1: *Fas Associated Phosphatase 1*, RAIDD: *RIP Associated ICH-1 homologous with a Death Domain*, FLICE: *FADD Like ICE*

allem niedrig-affine Bindungen selektiert, bleibt die Bedeutung einiger auf diesem Weg identifizierten Moleküle *in vivo* noch zu überprüfen.

Die beiden DD Proteine FADD [60-63] und RIP [64, 65] binden direkt an die CD95 DD, sowie an TRADD, nicht jedoch direkt an die DD des TNFR1 [50]. TRADD bindet vornehmlich an TNFR1 [43] und ermöglicht damit die Rekrutierung von FADD und RIP an den TNFR1 [38, 65, 66]. Überexpression von FADD oder RIP induziert Apoptose. DAXX ist ein Protein [67], das bei Überexpression Apoptose auslöst. Es bindet an die DD von CD95 und TNFR1 und aktiviert Jun N-terminale Kinasen (JNK). Fas-associated phosphatase 1 (FAP-1) benötigt zur Interaktion mit dem

Tabelle 1-2: Apoptose modulierende Proteine

Signalmolekül	Einfluss auf die Apoptose
<i>PKC</i>	<i>hemmend</i>
<i>Ceramid/SMase</i>	<i>fördernd</i>
<i>PTK</i>	<i>fördernd</i>
<i>Caspasen</i>	<i>fördernd</i>
<i>Bcl-2 Familie:</i>	
<i>bcl-2, bcl-x_L, bcl-w, Mcl-1</i>	<i>hemmend</i>
<i>bcl-x_S</i>	<i>fördernd</i>
<i>Bax-Familie:</i>	
<i>bax, bok</i>	<i>fördernd</i>
<i>BH3-Familie:</i>	
<i>Bix, blk, bid, bad, bim</i>	<i>fördernd</i>
<i>BAK</i>	<i>fördernd</i>

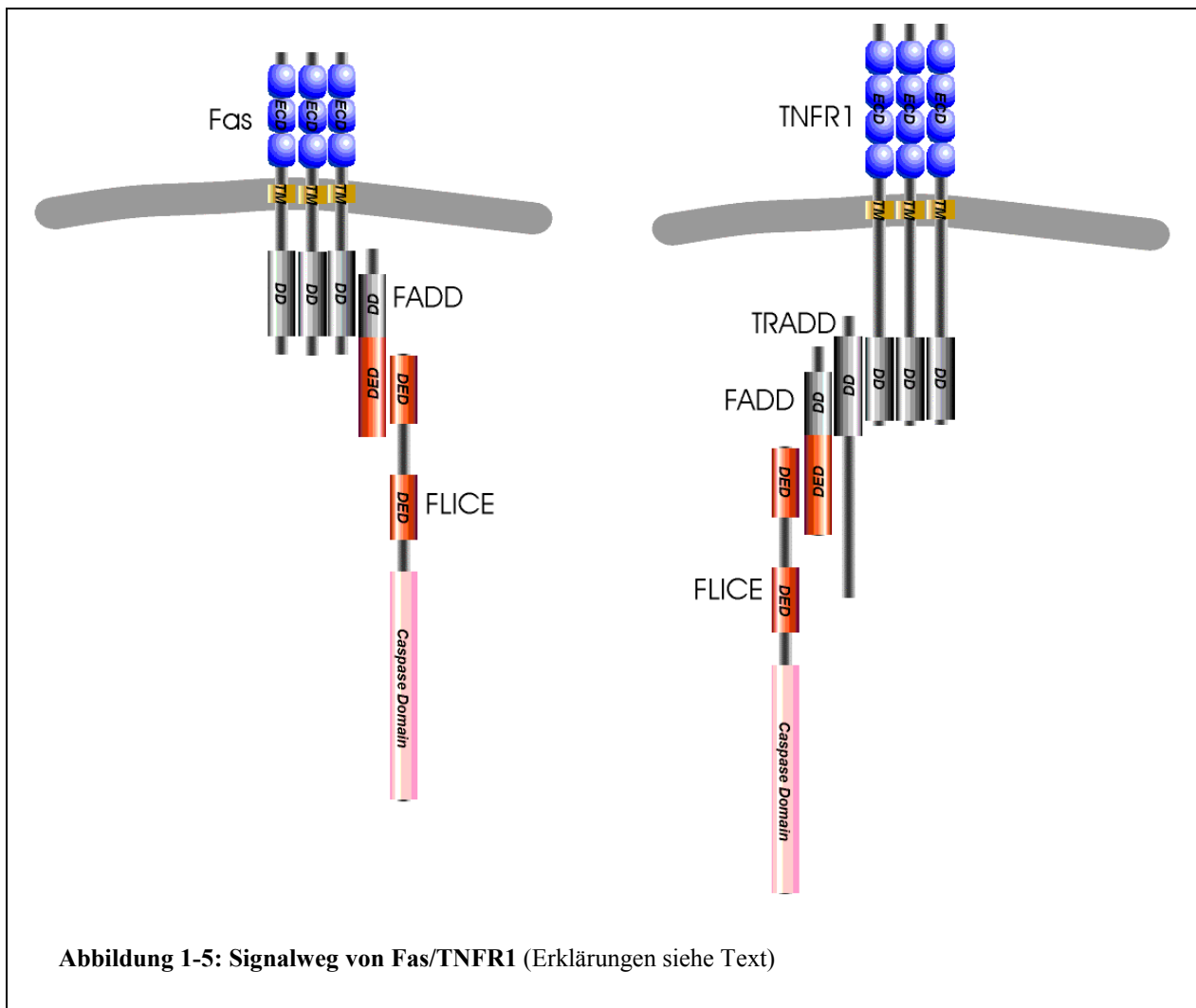
Rezeptor die C-terminalen 15 Aminosäuren von CD95. Es ist eine Protein-Phosphatase, die in der Lage ist CD95-vermittelte Apoptose zu hemmen [68]. Ein weiteres Molekül das in der Lage ist Apoptose durch Rezeptorinteraktion zu hemmen, ist Sentrin [69]. Es bindet sowohl an CD95 als auch an TNFR1.

Es sind eine Reihe weiterer Moleküle beschrieben, die einen Einfluss auf die CD95/TNFR1 vermittelte Apoptose haben sollen, deren genaue biologische Bedeutung im Rahmen der Apoptose noch nicht geklärt ist. Dazu gehören z.B. Ceramid, das durch Sphingomyelinasen (SMase) aus Sphingolipiden abgespalten wird [70, 71], sowie die Protein Tyrosin Kinase (PTK) [72] und die Proteinkinase C (PKC) [73-75] (Vgl. Tabelle 1-2). Proteine, deren Aktivität in der Modulation bzw.

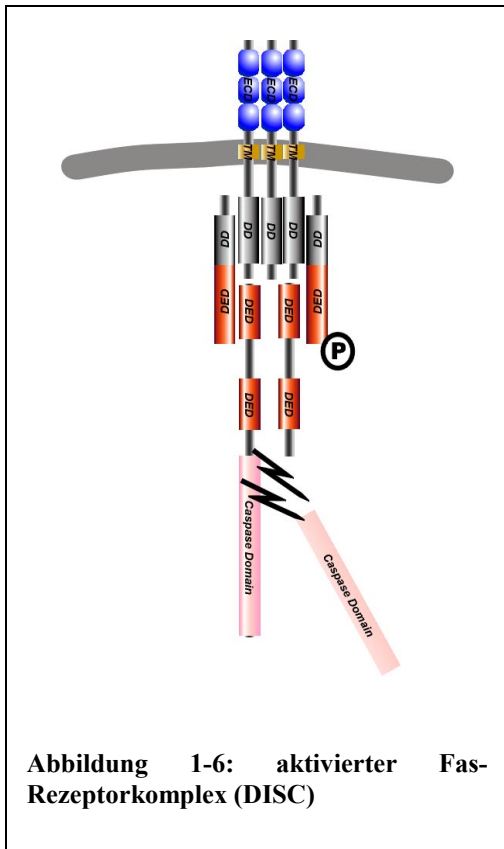
Ausführung der CD95/TNFR1 vermittelten Apoptose weitaus besser geklärt sind, gehören zu der Familie der Bcl-2 [76-81], Bax [82-84], BH3 Familie [85-91] und BAK [92-95] , bzw. der Caspasen-Familie [96].

1.2.2.1 Signalweg von Fas und TNFR1

In dieser Arbeit wurden die intrazellulären Signalwege von Fas und TNFR1 untersucht. Es war bekannt, dass Fas nach Aktivierung und erfolgter Trimerisierung die ausführende Maschinerie der Apoptose über Rekrutierung zweier intrazellulärer Moleküle adaptiert. Dies ist FADD, von dem gezeigt werden konnte, dass es mit Hilfe der „Death Domain“ (DD) direkt an Fas bindet, sowie FLICE (für *FADD like ICE*). FLICE hat mit FADD eine Domäne hoher Homologie, die für die Interaktion der beiden Proteine verantwortlich ist [97, 98]. Da gezeigt werden konnte, dass diese Domäne in FADD für die Weitergabe des Signals von FADD auf FLICE unverzichtbar ist, wird sie als *Death Effektor Domain* (DED) bezeichnet [99-101] (vgl. Tabelle 1-1, Abbildung 1-5).



Der aktivierte TNFR1 Komplex benötigt für den selben Schritt der Signalübergabe auf die ausführende Maschinerie der Apoptose ein zusätzliches Molekül, nämlich TRADD (für *TNF-Rezeptor interacting Death Domain*) [43, 50, 65, 66, 102]. Hier bindet zunächst TRADD an den TNF Rezeptorkomplex und rekrutiert dann mit Hilfe seiner Death Domain FADD. Jetzt kann, ganz ähnlich wie bei Fas, FLICE an FADD binden (vgl. Tabelle 1-1, Abbildung 1-5).



Nach Aktivierung von Fas konnte ein solcher Komplex in vivo nachgewiesen werden. Diese auch DISC (für *Death inducing signalling complex*) genannte Einheit [98, 103] besteht tatsächlich aus dem trimeren Rezeptor, an den vier weitere Proteine angelagert sind (vgl. Abbildung 1-6). Es sind zunächst zwei unterschiedlich serin-phosphorylierte FADD Moleküle. Die Phosphorylierung von FADD ist dabei unabhängig von der Rezeptoraktivierung, ihre Bedeutung jedoch bleibt unbekannt. Weiterhin besteht der aktivierte Komplex aus zwei unterschiedlich langen Molekülen FLICE. Man nimmt an, dass es durch Rekrutierung von FLICE an den Rezeptorkomplex zu einer autokatalytischen Abspaltung der Caspase Domäne kommt, die dann in das Zytoplasma freigesetzt wird. Die DED bleibt an den Rezeptor gebunden. Die Caspase-Domäne alleine ist nun in der Lage weitere Caspase

Domänen aus anderen FLICE Molekülen abzuspalten. Somit fungiert FLICE als Bindeglied zwischen dem Rezeptorkomplex und der ausführenden Maschinerie, nämlich den zytoplasmatischen Caspasen. FLICE wurde von mehreren Arbeitsgruppen gleichzeitig beschrieben und ist deshalb auch als MACH oder Mch5 bekannt [97, 100, 104]. Allgemein wird heute FLICE der Caspasen-Familie zugeordnet und trägt den Namen Caspase 8.

1.2.2.2 Die Ausführung der Apoptose - Caspase-Familie

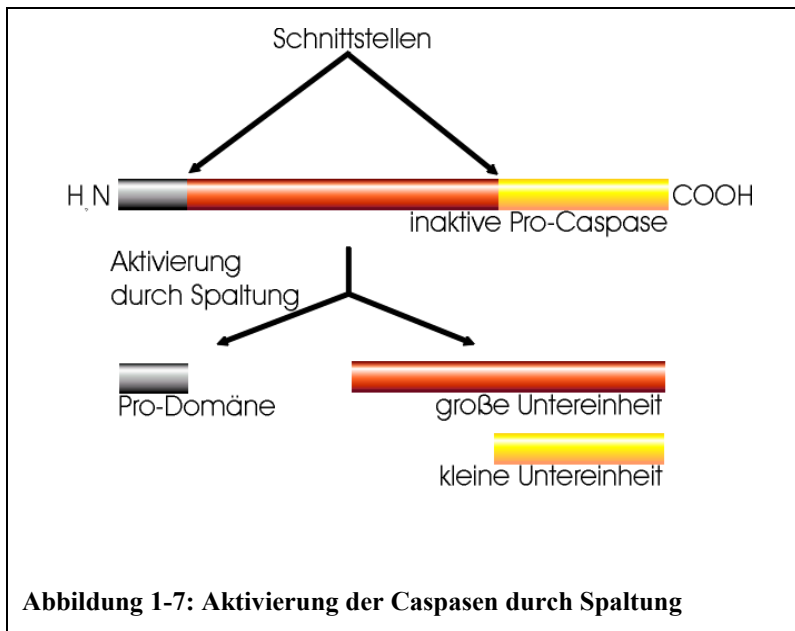
FLICE (Caspase 8) gehört zu einer immer noch wachsenden Familie der sogenannten Caspasen [96]. Der Name dieser Enzyme erklärt sich durch ihre Spezifität: in ihrem aktiven Zentrum besitzen

sie ein Cystein, und wirken auf Proteine mit einem *ASP*argininrest als Protease *ASEN* [105]. Bis heute konnten 11 Caspasen identifiziert werden, die nach Sequenz-Homologien in 3 Subfamilien unterteilt werden können (vg. Tabelle 1-3) [102, 106, 107]. Funktionell kann man Initiator- und Effektor Caspasen unterscheiden. Erstere (wie z.B. Caspase-8) stehen am Anfang der Kaskade. Danach aktivieren sie die Effektor-Caspasen. Die Effektor-Caspasen wiederum spalten die Proteine, die schließlich zu den typischen Veränderungen der Apoptose führen [108-110].

Tabelle 1-3: Einteilung der humanen Caspasen in Subfamilien. Nach [96].

Subfamilie	Familienmitglieder	andere Bezeichnungen
Caspase-1	Caspase-1	ICE
	Caspase-4	ICE _{rel} -III, TX, ICH-2
	Caspase-5	ICE _{rel} -III, TY
	Caspase-13	ERICE
Caspase-2	Caspase-2	ICH-1
	Caspase-9	Mch-6, ICE-LAP6
Caspase-3	Caspase-3	CPP32, Yama, Apopain
	Caspase-6	Mch-2
	Caspase-7	Mch-3, ICE-Lap3, CMH-1
	Caspase-8	MACH, FLICE, Mach-5
	Caspase-10	Mch-4

Die Aktivierung der Caspasen muss exakt reguliert sein, um einerseits die rasche Durchführung der Apoptose zu gewährleisten, andererseits darf keine unkontrollierte Aktivierung erfolgen, um das Überleben der Zelle zu sichern.. Die Regulierung erfolgt deshalb auf posttranslationaler Ebene. Die Caspasen sind im Zytoplasma als inaktive Pro-Caspasen vorhanden, erst nach limitierter Proteolyse erfolgt die Aktivierung. Durch diese Spaltung entstehen drei Fragmente, die nun zum Teil proteolytische Aktivitäten besitzen: Die Pro-Domäne, eine große Untereinheit und eine kleine Untereinheit (vgl. Abbildung 1-7). Die Initiator Caspasen besitzen lange Pro-Domänen für die Interaktion der signalvermittelnden Proteine (z.B. FADD). Effektor-Caspasen hingegen weisen nur kurze Pro-Domänen auf, da hier keine Protein-Protein Interaktion stattfindet.



Werden die beiden aktiven Untereinheiten abgespalten, bilden sie zusammen ein Heterodimer. Zwei dieser Heterodimere bilden das enzymatisch wirksame Tetramer. Daraufhin können in einer Kaskade- vergleichbar jener der Blutgerinnung- weitere Caspasen aktiviert werden. Die verschiedenen aktivierten Caspasen spalten unterschiedliche Zellbestandteile, was zu den

typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose führt.

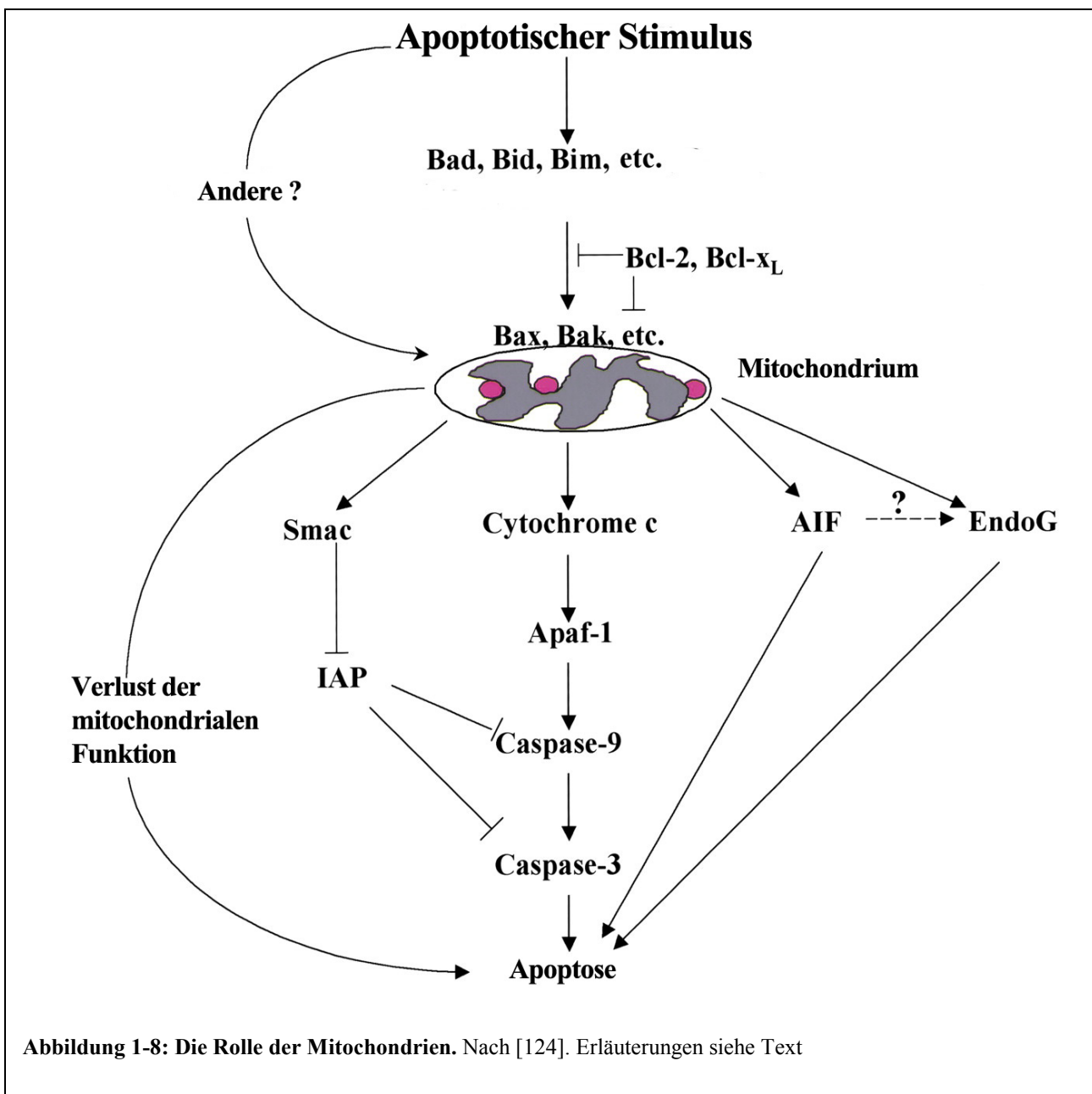
1.2.2.3 Die Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose

Apoptose kann nicht nur über Oberflächenrezeptoren ausgelöst werden, sondern auch, wie weiter oben bereits besprochen, durch eine Reihe zum Teil unspezifischer Reize. Die komplexe Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose wurde erkannt, als eine Reihe mitochondrialer Proteine identifiziert werden konnte, die in der Lage sind, das Apoptose Programm direkt zu starten [111-116]. Normalerweise befinden sich diese Proteine im Raum zwischen den Mitochondrienmembranen, als Antwort auf eine Vielzahl apoptotischer Stimuli können sie in das Zytosol freigesetzt werden. Sie fördern dann die Apoptose entweder, indem sie Caspasen und Nukleasen aktivieren, oder in dem sie Inhibitoren der Apoptose neutralisieren. Es hat sich eine komplexe Vorstellung davon entwickelt, wie eine Zelle die Balance unter Verwendung mitochondrialer Proteine zwischen Apoptose und Überleben wahrt (vgl. Abbildung 1-8). Die Ausführung des mitochondrialen Signals zur Apoptose kann durch die Freisetzung eines von vier verschiedenen mitochondrialen Proteinen gestartet werden. Von Zentraler Bedeutung ist Cytochrom C. Zytosolisches Cytochrom C kann APAF-1 (für „*apoptotic protease activating factor*“) binden, das eine „Caspase-Recruiting Domain“ (CARD) enthält [117]. Dadurch entsteht ein Oligomerer Komplex aus Cytochrom C und APAF-1, der in der Lage ist Procaspase-9 in die aktive Caspase-9 zu überführen [118]. Die aktive Caspase-9 kann nun ihrerseits Procaspase-3 zu Caspase-3 aktivieren [119]. Diese Caspase spaltet viele intrazelluläre Substrate, was zu den typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose führt [120-124]. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen von Knock-

out Mäusen, denen APAF-1, Caspase-9 oder Caspase-3 fehlt nicht mehr in der Lage sind, Caspasen als Antwort auf UV-, γ -Strahlung oder Chemotherapeutika zu aktivieren [125-130].

Neben Cytochrom C kann auch SMAC von den Mitochondrien während der Apoptose in das Zytosol freigesetzt werden [114, 115]. SMAC kann verschiedene IAP's (für „*Inhibitor of Apoptosis Protein*“) binden und somit inaktivieren. IAP's sind eine Familie intrazellulärer Proteine, die aktive Caspasen inhibieren [131-133]. Somit ist SMAC in der Lage, eine Regulation von Caspaseaktivität zu ermöglichen.

Ein weiterer Faktor, der von Mitochondrien freigesetzt werden kann, ist AIF (für „*Apoptosis Inducing Factor*“) [113]. Nach Aktivierung kommt es zu einer Translokation von AIF in den Kern,



wo es Chromatin Kondensation und DNA Fragmentation verursacht [113]. Diese Effekte sind unabhängig von Caspasen [134].

Das letzte bisher bekannte Protein, das von Mitochondrien während der Apoptose freigesetzt wird ist die *Endonuklease G* (EndoG), von der Li et al [116] zeigen konnten, dass sie nach Aktivierung von Zelltodrezeptoren die Mitochondrien verlässt. EndoG ist in der Lage unabhängig von Caspasen DNA Fragmentierung auszulösen [135-137]. Somit scheint ein Weg zu bestehen, der es ermöglicht unabhängig von Caspasenaktivierung das Zelltodprogramm auszulösen [116, 124, 138].

Die Freisetzung von Cytochrom C und der anderen mitochondrialen Faktoren wird durch Proteine der Bcl-2-, Bax- und BH3 Familie reguliert [139]. Die Apoptose fördernden Proteine dieser Gruppe (vgl. Tabelle 1-2) bewirken eine erleichterte Freisetzung der mitochondrialen Faktoren, wohingegen die Apoptose hemmenden Mitglieder dies verhindern.

Nach Aktivierung von Zelltodrezeptoren wird Bid (ein Mitglied der BH-3 Familie) von Caspase-8 gespalten, wandert in die Mitochondrien und bewirkt hier die Freisetzung von Cytochrom C [87, 88]. Somit besteht eine Verbindung einerseits des klassischen Signalweges der Apoptose über Oberflächenrezeptoren und anschließender Aktivierung von Caspasen, und andererseits der durch alleinige Freisetzung von mitochondrialen Proteinen ausgelösten Apoptose. Es wird vermutet, dass einige Zellen nach Rezeptoraktivierung nicht in der Lage sind genug Caspase-8 zu rekrutieren, um dadurch die weitere Caspasen-Kaskade zu starten und so Apoptose auszulösen. Sie können durch Aktivierung von Bid das apoptotische Signal verstärken [124, 140].

Bim, ein weiteres Mitglied der BH-3 Familie ist in der Lage nach Aktivierung in den Mitochondrien Cytochrom C und EndoG freizusetzen [116]. Bad, ebenfalls ein BH-3 Mitglied, kann nach Aktivierung durch Dephosphorylierung an antiapoptotische Vertreter der Bcl-2 Familie binden, und so deaktivieren [141-144].

Erreichen die verschiedenen Mitglieder der BH-3 Familie nach Aktivierung die Mitochondrien, so müssen sie die Freisetzung der apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien über weitere Proteine vermitteln. Dazu gehören Bax und Bak [139, 145]. Unter dem Einfluß der Proteine der BH-3 Familie können Bax und Bak eine Konformationsänderung durchmachen, oligomerisieren und so Poren in der mitochondrialen Membran bilden. Nun können die apoptotischen mitochondrialen Proteine in das Zytosol freigesetzt werden [139, 146].

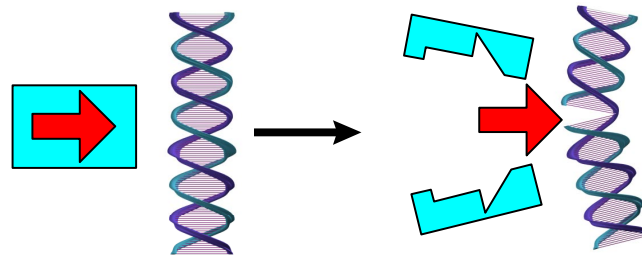
Zusammenfassend hat die durch Mitochondrien induzierte Apoptose drei wichtige Merkmale (vgl. Abbildung 1-8). Zum Ersten zeigt sich, dass mehrere Faktoren gemeinsam dazu beitragen

können Zelltod auszulösen. Die Freisetzung von Cytochrom C aktiviert Caspasen, die Freisetzung von Smac entfernt IAP-Inhibitoren von den Caspasen, und die Freisetzung von AIF und EndoG verursacht DNA Fragmentation und Chromatin Kondensation. Zum Zweiten kann das apoptotische Signal verstärkt werden. Aktivierte Caspasen können Bcl-2 Familien Proteine spalten [147] und so die Freisetzung mitochondrialer apoptotischer Proteine fördern. Zum dritten kann, auch wenn Caspase abhängige und unabhängige Signalwege blockiert sind, apoptotische Signale zum Verlust der mitochondrialen Integrität und Funktion führen und so aufgrund fehlendem ADP/ATP Metabolismus und anderer energetischer Stoffwechselleistungen zum Zelltod führen [124].

1.2.3 Stadium 3: Apoptose - die morphologischen und biochemischen Veränderungen

Im Gegensatz zur Nekrose tritt bei der Apoptose keine Schwellung der Zelle auf, es kommt im Gegenteil zu einer Verdichtung und Schrumpfung der Zelle. Dabei bleiben die Plasmamembran und andere Zellorganellen insbesondere die Mitochondrien lange intakt. Es kommt zum sogenannten „membrane-blebbing“, bei dem sich Zytoplasma in kleinen Bläschen abschnürt. Dabei werden spezifische Oberflächenmoleküle präsentiert (z.B. ICAM 3), so dass diese Partikel rasch von umgebenden phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Ein weiterer charakteristischer Schritt ist die Kondensation des Kerns und die Fragmentierung der DNA. All diese Veränderungen sind Folgen der Caspasenaktivität. Abbildung 1-9 gibt einige Beispiele der Aktivität der Caspasen und ihrer spezifischen Substrate. (A) verdeutlicht die Aktivierung bestimmter Enzyme durch Spaltung der entsprechenden Inhibitoren dieses Enzyms. Beispiele hierfür sind CAD (Caspase-Activated-Deoxyribonuklease) und ICAD (Inhibitor of CAD). Wenn ICAD an CAD bindet, bleibt CAD inaktiviert. Aktivierte Caspasen können nun ICAD spalten und somit aktives CAD freisetzen. CAD ist eine Endonuklease, welche die DNA in die typischen Fragmente spaltet, die als DNA-Laddering imponieren [136, 148, 149]. (B) zeigt, dass aktivierte Caspasen auch direkt Strukturproteine spalten können. Dazu gehören z. B. das nukleäre Lamin, das für die Aufrechterhaltung der Integrität des Kerns verantwortlich ist. Wird es gespalten, kommt es zur typischen Kondensation des Kerns [150, 151]. Schließlich ist in (C) gezeigt, wie Caspasen durch limitierte Proteolyse bestimmte Proteine aktivieren können. Ein Beispiel hierfür ist PAK2. Wenn Caspasen die autoinhibitorische Domäne von PAK2 abspalten, wird PAK2 aktiviert, das eine wichtige Rolle in der Generierung des membrane-blebbing spielt [152, 153].

(A) Inaktivierung von Inhibitoren der Apoptose



(B) Abbau von Strukturproteinen



(C) Deregulation von Enzymaktivität

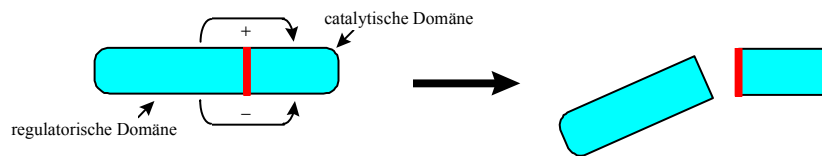


Abbildung 1-9: Schematische Übersicht der Wirkung von Caspasen und ihrer Substrate

2 Fragestellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Befunde von Rensing-Ehl 1995 [154], die zeigen konnten, dass in bestimmten Zelllinien die Ausführung der Apoptose nach Stimulierung über den TNF Rezeptor durch Hemmstoffe der Atmungskette blockiert werden kann (siehe Abbildung 2-1). Aus diesem Experiment ist der Schluss zu ziehen, dass in A9-Fibroblasten TNFR1 und Fas unterschiedliche Wege zur Ausführung des apoptotischen Signals benutzen. Da TNFR1 induzierte

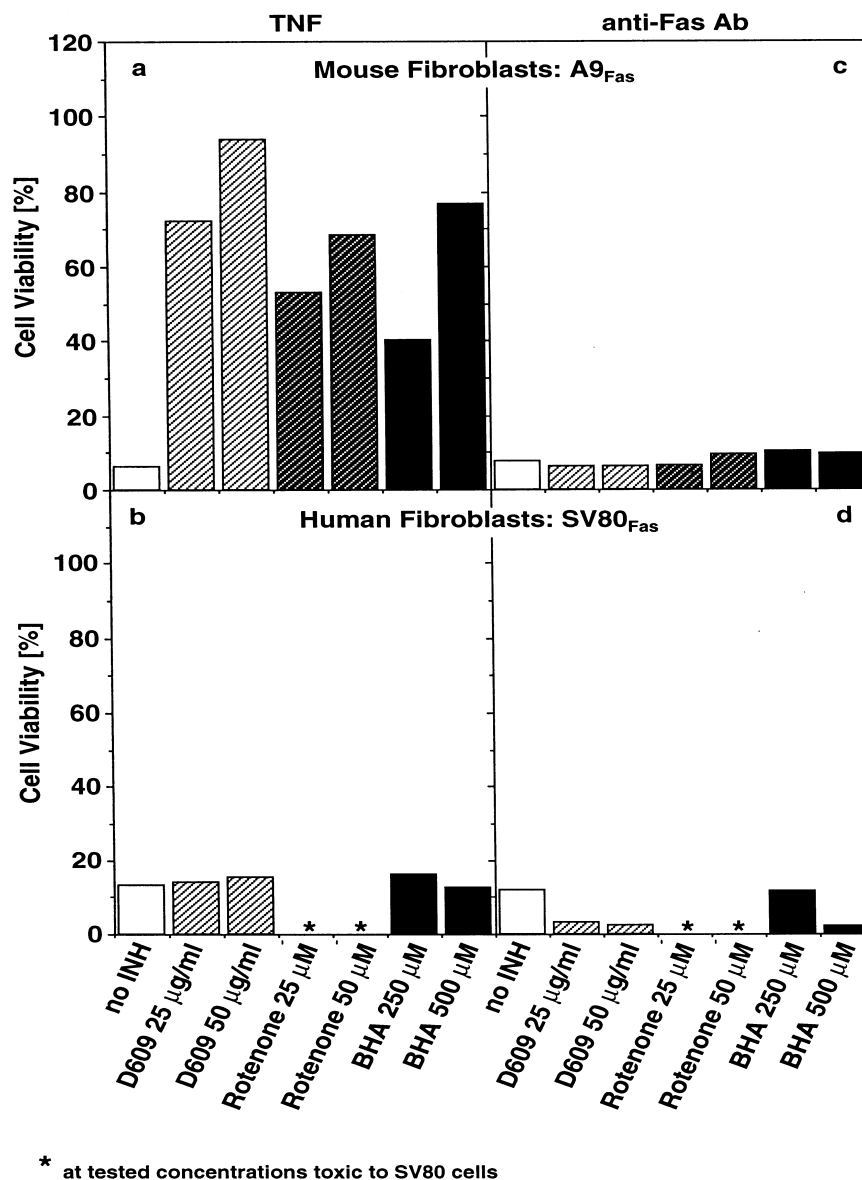


Abbildung 2-1: Hemmbarkeit der Apoptose in A9 und SV80 Zellen

Apoptose durch bestimmte Inhibitoren hemmbar ist, nicht jedoch die durch Fas induzierte Apoptose, besteht offensichtlich ein Unterschied im Signalweg oder in der Ausführung der Apoptose. Die in dem Experiment benutzten Inhibitoren BHA und Rotenone sind spezifische Hemmstoffe der Atmungskette, D609 ist ein Phospholipid Stoffwechsel Hemmer [71], sie alle besitzen keinen bekannten Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen. Diese Beobachtung war mit der allgemein herrschenden Vorstellung über die Signalwege von Fas und TNF-R1 nicht vereinbar. Demnach benutzt, wie bereits beschrieben, der TNFR1 nach Aktivierung TRADD und FADD, Fas lediglich FADD, als Adaptionmoleküle um die Caspasen-Kaskade zu aktivieren. Nach Rekrutierung von FADD sollten also beide Signalwege identisch verlaufen. Wie ist also der Unterschied in der Hemmbarkeit der Apoptose über die beiden Rezeptoren zu erklären?

Könnte der Signalweg in der hier untersuchten Zelllinie vielleicht von der bisherigen Vorstellung abweichen und einen bisher noch unbekannten Signalweg für TNF oder Fas benutzen? Um diese Frage zu klären sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle von FADD im Signalweg der beiden Rezeptoren in den oben gezeigten Zelllinien untersucht werden.

Hierzu sollte in den Zellen FADD transient exprimiert werden, und zwar in einer Form, die so verändert ist, dass sie das apoptotische Signal nicht mehr weitergeben kann. Danach sollte überprüft werden, ob in der transfizierten Zelllinie Apoptose über Fas oder TNFR1 noch auslösbar ist.

3 Material

3.1 Reagenzien

Die Reagenzien dieser Studie stammen, soweit nicht anders angegeben, von der Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH (Deisenhofen bei München, Deutschland). Der chimäre humanisierte monoklonale murine Antikörper gegen das humane Fas Antigen (α Fas IgG₃ κ) wurde freundlicherweise von Dr. John Grayebh (Malvern, Philadelphia, PA) zur Verfügung gestellt.

3.2 Zytokine

Rekombinantes humanes TNF α (spezifische Aktivität $5,3 \times 10^7$ U/mg Protein) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. G. Adolf (Bender und Co., Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes humanes Interleukin 6 (Il-6) wurde von der Firma Boehringer bezogen.

3.3 Pufferlösungen und Kulturmedien

Hochsalzpuffer	50mM Tris-HCl pH 8 1mM EDTA pH 8 1M NaCl
Auftragspuffer für DNA Agarosegele:	70% Glycerin 1% OrangeG

PBS	150 mM NaCl 3mM KCl 8mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄
CPP32 Lysepuffer	10 mM HEPES KOH (pH 7,4) 2 mM EDTA 0,1 % NP40 1 mM PMSF 10 µg/ml Pepstatin A 20 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin in DTT
5fach RT Puffer:	250 mM Tris/HCl pH 8,3 375 mM KCl 15mM MgCl ₂ 50 mM DTT
Zitratpuffer	0,1 M Zitronensäure 196 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
TE:	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA
STE:	1,5 M NaCl 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA

Färbelösung für X-Galaktosidase:

5 mM K_3FeCN_6
5 mM $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$
2 mM $MgCl_2$
0,01 % Natriumdeoxycholat
0,02 % NP40
1 mg/ml X-Gal

Fixierlösung für X-Gal Färbung:

1 % Paraformaldehyd
0,02 % Glutardialdehyd
in PBS

TYM Medium

2% Bacto-Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1M NaCl
10 mM $MgSO_4$

TFB1 Medium

30 mM KOAc
50 mM $MnCl_2$
100 mM KAc
10 mM $CaCl_2$
15 % Glycerin (v/v)

LB Agar

1 % NaCl
1 % Bacto-Trypton
0,5 % Hefeextrakt
2 % Agar

LB-Amp Agar

LB-Agar
0,005 % Ampicillin

SOB Medium

2 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,05 % NaCl

10 mM MgSO₄10 mM MgCl₂

SOC Medium

2 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,05 % NaCl

10 mM MgSO₄10 mM MgCl₂

2 mM Glucose

Lysepuffer für CPRG Färbung

0,1 % Triton X-100

250 mM Tris pH 8,0

CPRG - Lösung

100 mM Hepes

150 mM NaCl

1 % BSA

0,1 % NaN₃

1 mg / ml CPRG

3.4 Zellen und Gewebekultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3-1 zusammengestellt.

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Quelle
SV80 Fas ⁺ Klon 9	humane SV40 transformierte Fibroblasten Zelllinie [155], exprimiert stabil das humane Fas-Antigen [25]
A9 Fas ⁺ Klon 6	muriner L-Zell Abkömmling [156], exprimiert stabil das humane Fas-Antigen [25]
MCF-7	humane Zelllinie, Brustkarzinom
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC CCL2)

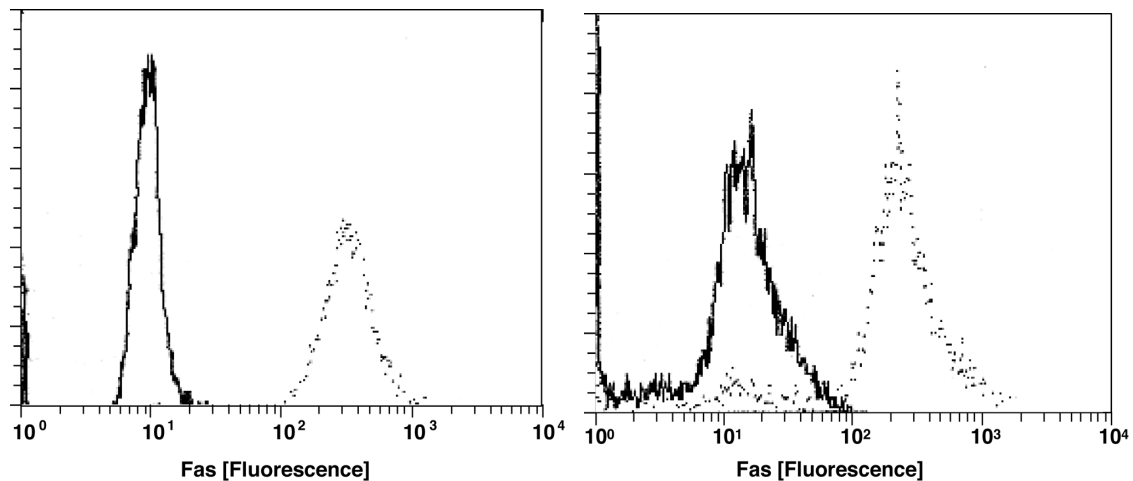


Abbildung 3-1: Expression von Fas in der Zelllinie A9 Fas⁺ Klon 6 (rechts) und SV80 Fas⁺ Klon 9 (links). Jeweils gefärbt mit dem Fas spezifischen Antikörper α Fas IgG₃ κ und entsprechender Isotypkontrolle.

A9fas und MCF7 Zelllinien wurden in RPMI Medium (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, Deutschland), SV80 Fas⁺ Klon 9 (im weiteren SV80fas bezeichnet) und HeLa Zelllinien in DMEM unter Hinzufügung von 10% hitzeinaktivierten FCS (Biochrom KG, Berlin, Deutschland),

100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat (alles Gibco GmbH, Eggenstein, Deutschland) kultiviert. Das Medium für A9 Fas⁺ Klon 6 (im weiteren A9fas bezeichnet) und SV80fas enthielt zusätzlich 200µg/ml G418 (Gibco GmbH, Eggenstein, Deutschland) zur Selektion Fas exprimierender Zellen. Alle Zellen wuchsen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 6% CO₂ bei 37°C.

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 Trennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach dem Molekulargewicht wurde die horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen verwendet [157]. Die Gelkonzentration wurde entsprechend dem Größenbereich der aufzutrennenden Nukleinsäuren im Bereich zwischen 1,0 und 2,5% gewählt. Als Puffer zum Ansetzen der Gele wurde 1 x TBE-Puffer unter Zusatz von 0,1mg/ml Ethidiumbromid, als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer 1 x TBE-Puffer verwendet. Zum Größenvergleich wurde eine „1kb-ds-DNA-Leiter“ der Firma Boehringer Ingelheim benutzt.

4.1.2 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten mittels DEAE Zellulose

Zur Aktivierung wurde die DEAE Zellulose (NA 45, Schleicher & Schuell, Dassel) zunächst mit einem sterilen Skalpell in geeignete, ca. 0,5cm breite Streifen geschnitten, danach für 10min in 10mM NaEDTA pH 8,0 und 5min in 0,5M NaOH eingelegt, schließlich mehrmals mit sterilem, doppelt destillierten Wasser gewaschen. Die Lagerung der DEAE-Streifen erfolgte bei 4°C in 0,1mM NaEDTA.

Zur DNA Isolierung wurde das Agarosegel auf der anodalen Seite der gewünschten DNA Bande geschlitzt und in den Spalt ein Streifen der aktivierten DEAE Zellulose eingelegt. Die DNA wurde ca. 5min bei 100 Volt weiter elektrophoretisch aufgetrennt um die Bindung der DNA an die Membran zu ermöglichen. Der Streifen mit der aufgelaufenen DNA wurde aus dem Gel genommen, kurz mit Wasser gewaschen, und die DNA in STE Hochsalzpuffer bei 65°C für 60min eluiert. Danach wurde die Lösung phenolisiert, die DNA mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen. Nach der Präzipitation wurde die isolierte DNA in 10µl destilliertem Wasser gelöst.

4.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren

4.1.3.1 *Phenolextraktion*

Proteine und andere organische Verunreinigungen werden aus wässrigen Nukleinsäurelösungen durch Phenolisierung abgetrennt. Dazu wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Phe-

mol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch versetzt, kräftig geschüttelt und bei ca. 2000g abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abpipetiert und zur Präzipitation der DNA-Fragmente weiterverwendet. Die untere Phenol- sowie die Interphase wurden verworfen.

4.1.3.2 HPLC-Reinigung

Die Reinigung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Pumpensystems „Waters 510 HPLC Pump“ der Firma Millipore auf der Ionenaustauschersäule „ProteinPak DEAD 8HR“ der Firma Pharmacia. Die Säule wurde vor jedem Lauf wie folgt gewaschen: 4x mit 0,1M NaOH, anschließend 3x mit 0,04M H₃PO₄. Danach wurde die Anlage mit Puffer A (Niedrigsalzpuffer 25mMTris, 1mM EDTA) durchspült. Die DNA Probe wurde auf 37°C erwärmt, kurz abzentrifugiert, auf die Säule aufgetragen und die Gradientenpumpen gestartet. Durch Beimischung von Puffer B (Hochsalzpuffer 25mMTris, 1mMEDTA 1M NaCl) entstanden linear steigende Salzkonzentrationen. Aufgrund unterschiedlicher Affinität der DNA, abhängig vom Salzgehalt der Lösung, eluiert die DNA zu einer bestimmten Zeit von der Säule. Die Spülflüssigkeit wurde mit dem UV Detektor „Waters 470 Scanning Fluorescence Detector“ der Firma Waters bei 260nm untersucht. Die gesamte Spüllösung wurde automatisch fraktioniert gesammelt.

4.1.4 Konzentrierung von Nukleinsäuren durch Präzipitation

Nukleinsäuren werden bei hohen Konzentrationen monovalenter Kationen in Anwesenheit von Alkohol in einen unlöslichen Zustand überführt und fallen aus. Als Salz wurde Natriumacetat in einer Endkonzentration von 0,3M verwendet. Es wurden 2 Volumen Ethanol hinzugefügt und gemischt. Die Fällung erfolgte zur Erhöhung der Präzipitation auf Trockeneis für 20min. Die gefällten Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das DNA Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, für kurze Zeit an Luft getrocknet und anschließend in Wasser gelöst.

4.1.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte im Spektralphotometer durch Messung der Absorption bei 260nm. Der optischen Dichte (OD) von 1 entsprechen 50mg/ml dsDNA. Der Reinheitsgrad einer Nukleinsäurepräparation, insbesondere in Bezug auf Proteinverunreinigungen lässt sich am Quotienten OD(260nm) / OD(280nm) abschätzen. Reine DNA besitzt einen OD Quotienten von 1,8, Proteinkontaminationen reduzieren diese Werte.

4.1.6 Isolation von RNA, cDNA Synthese

Isolation von RNA und cDNA Synthese erfolgten nach Standardprotokollen [157]. Die fertige FADD cDNA war im Labor aus früheren Arbeiten vorhanden.

4.1.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

4.1.7.1 Spezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden von doppelsträngiger DNA wurden kommerziell erhältliche Endonukleasen der Firma Boehringer Mannheim oder Pharmacia verwendet. Puffer und Temperaturoptimum für die einzelnen Enzyme wurden jeweils den Angaben des Herstellers entnommen. Durch Auswahl geeigneter Puffer konnte mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig gearbeitet werden. Die Enzymmenge wurde abhängig von der DNA-Menge so gewählt, dass ein vollständiger Verdau innerhalb einer Stunde stattfinden konnte. Das Ergebnis der enzymatischen Spaltung wurde jeweils durch Gelelektrophorese überprüft.

4.1.7.2 Enzymatische Sequenzierung von doppelsträngiger DNA nach der Strangabbruchmethode nach Sanger

Das Grundprinzip des Verfahrens ist die enzymatische Elongation eines an einzelsträngige DNA gebundenen Oligonukleotid-Primers, die durch zufälligen Einbau von je einem der vier Dideoxynukleotide bei der entsprechenden Base zum Abbruch kommt. Aus vier Reaktionen, die jeweils mit einem der vier Dideoxynukleotiden versetzt waren, wurden die Fragmentlängengemische auf einem Sequenziergel nebeneinander aufgetragen, das Fragmentlängenunterschiede von einem Basenpaar auftrennen kann. Aus dem sich ergebenden Muster lässt sich die DNA-Sequenz ermitteln.

Pro Sequenzierreaktion wurden 5µg doppelsträngige DNA durch 10 - 20 minütige Inkubation in 20µl 0,4M Natronlauge denaturiert und anschließend durch Zugabe von 6µl Na-Acetat, 14µl Wasser und 120µl Ethanol präzipitiert. An die alkalisch denaturierte DNA wurde ein Oligonukleotid-Primer sequenzspezifisch gebunden (primer-template Verhältnis: 5:1 bis 50:1) und von seinem 3'OH-Ende in vier verschiedenen Reaktionsansätzen in Anwesenheit aller vier Deoxynukleotide, fluoreszenzmarkiertem dATP sowie einem der vier Dideoxynucleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) durch eine Polymerase verlängert. Abhängig vom Konzentrationsverhältnis ddNTP/dNTP kam es bei einem Teil der neu synthetisierten Komplementstränge durch Einbau des Dideoxyanalogons zu Kettenabbrüchen an Positionen, in denen sonst das entsprechende Deoxynukleotid eingebaut würde. Jede der vier Sequenzierreaktionen enthält somit ein Fragmentgemisch

von verschieden langen Komplementärsträngen, die alle mit dem gleichen Nukleotid enden. Durch partiellen Einbau von fluoreszenzmarkiertem dATP wurden die synthetisierten DNA-Stränge zusätzlich markiert. Diese vier Sequenzierreaktionen wurden nach dreiminütigem Denaturieren bei 80°C parallel auf ein Polyacrylamidgel geladen und einer vertikalen Elektrophorese unterzogen. Diese erlaubt die Detektion von nur einem Nukleotid Längendifferenz. Da jede der vier Sequenzierreaktionen vom gleichen Primer startet, sind die Kettenabbrüche aller vier Reaktionen untereinander der Größe nach auf dem Sequenziergel geordnet. Das Bandenmuster wurde durch einen automatischen Sequenzierer (ALF, Pharmacia) detektiert und die entsprechende DNA Sequenz ausgegeben.

4.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion wurde in 0,5ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Ansatz durchgeführt:

2,0µl PCR Puffer 10x mit 15mM MgCl₂ (Boehringer Mannheim)

1,0µl dNTP (2,5mM) (Pharmacia)

je 5µM 5'- und 3'-Primer

1,0U Pfu Polymerase (Stratagene Cloning Systems, Heidelberg)

H₂O ad 20µl

bei Klonierung von FADD zusätzlich:

3,0µl Formamid (20%)

0,5µl BSA (20µg/µl)

Das Reaktionsgemisch wurde mit 20 - 30µl Mineralöl überschichtet. Vor dem Start des PCR Programms wurde 1,0µl cDNA in das Reaktionsgemisch pipetiert. Der PCR Zyklus wurde an einem Hybaid TR1 Thermocycler (MWG, Ebersberg) durchgeführt.

Die Polymerasekettenreaktion verläuft in drei Schritten: 1. Denaturierung des DNA Doppelstranges bei 94°C, 2. Bindung der Primer bei ca. 65°C, 3. Synthese der DNA Einzelstränge bei 72°C. Die exakten PCR Programme sind bei der Beschreibung der Klonierung der einzelnen Gene angegeben.

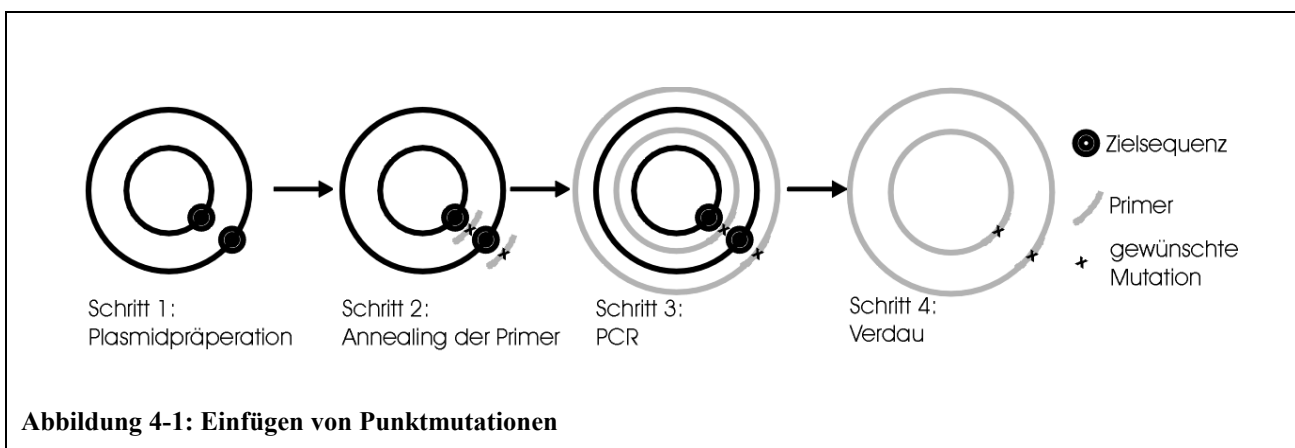
Die PCR-Produkte wurden in 1-2% Agarosegelen mit 5µg/ml Ethidiumbromid gelelektrophoretisch aufgetrennt.

4.1.8.1 PCR vermitteltes Einfügen von Punktmutationen in ein DNA Fragment

Die Mutagenese erfolgte mit Hilfe des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene® Cloning Systems, Heidelberg).

Die theoretische Vorgehensweise ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Zur punktgerichteten Mutagenese von DNA Fragmenten wurden diese in einen Vektor ligiert, in einer PCR wurde das gesamte Plasmid unter Verwendung der Pfu Polymerase vervielfältigt. Um die gezielte Mutation einzufügen wurden 2 komplementäre Oligonukleotide eingesetzt, welche die gewünschte Mutation enthielten. So entstanden Kopien des Plasmids, in welche die Oligonukleotide mit der gewünschten Mutation eingebaut waren. Dieses Plasmid enthält einen DNA-Strangbruch (Nick). Um das unerwünschte ursprüngliche Plasmid zu entfernen, wurde es mit dem Enzym Dpn I (Erkennungssequenz: 5'-G^m6ATC-3') abgebaut. Dpn I schneidet spezifisch methylierte DNA und damit nicht die synthetisch erzeugten Stränge. DNA die aus E. coli isoliert wurde ist *dam* methyliert und dadurch durch Dpn I abbaubar.

Der verbliebene genickte synthetische Vektor wurde anschließend in kompetente E. coli Bakterien transformiert.



4.1.9 Subklonierung von DNA-Fragmenten

4.1.9.1 Vektorpräparation durch enzymatische Spaltung im Polylinker

Werden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme zum Verdau eines Vektors eingesetzt, die an eng benachbarten Stellen im Polylinker (MCS, multiple cloning site) schneiden, kann es zur gegen-

seitigen Inhibition der Enzyme kommen. In solchen Fällen wurden zwei getrennte Verdaureaktionen angesetzt und dazwischen phenolisiert und präzipitiert. Nach dem zweiten Verdau wurde erneut phenolisiert und gefällt. Dabei wurde das kurze ausgeschnittene Oligonukleotid größtenteils von der Fällung ausgeschlossen, so dass eine Selbstligation des Vektors reduziert wurde. Sollten größere Oligonukleotide ausgeschnitten werden, erfolgte eine Reinigung über Agarosegele.

4.1.9.2 Dephosphorylierung freier Vektorenden mit alkalischer Phosphatase

Die enzymatische Spaltung von DNA generiert Enden, die am 5'Terminus phosphoryliert sind. Um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphatgruppen an Vektorenden mit komplementären Überhängen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase enzymatisch entfernt.

4.1.9.3 Verknüpfung von DNA Ketten durch T4-Ligase

Die Ligation eines Oligonukleotids in einen Vektor erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (Boehringer). Die Ligation wurde in 10µl Gesamtvolumen durchgeführt. Es wurden ungefähr 10 - 100ng Vektor und 100 - 500ng Fragment eingesetzt, Puffer und T4 Ligase nach Angaben des Herstellers. Bei Ligation eines Fragmentes mit beidseitig überhängenden Enden wurde mindestens 3 Stunden, bei glatten Enden über Nacht, bei 15°C inkubiert.

4.2 Bakterientransformation mit Plasmid-DNA

4.2.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Escherichia coli, DH5α Bakterien wurden in 500ml TYM Medium im Bakterienschüttler bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei $\lambda = 550\text{nm}$ kultiviert. Zur Kompetenzinduktion wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, mit 2800g bei 4°C für 15min zentrifugiert und in 100ml eiskaltem sterilfiltriertem TFB1 Medium vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.2 Transformation

Kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, zu je 100µl Bakteriensuspension wurde 1,5µl β -Mercaptoethanol pipetiert und 10min auf Eis inkubiert. Danach wurden 5µl des Ligationsansatzes zugegeben und 15min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für

45sec. wurden die Bakterien unter Zugabe von 1-2ml SOC Nährmedium 60min bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 5min bei 1200g zentrifugiert, der Überstand bis auf 100µl abgenommen, die Bakterien resuspendiert und auf Ampicillin-, IPTG- und X-Gal haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 12h bei 37°C inkubiert. Von 10 blaugefärbten Einzelkolonien wurde die Plasmid DNA isoliert.

4.2.3 Plasmidgewinnung aus Bakterien

4.2.3.1 *Schnellpräparation von Plasmid DNA*

Die Schnellpräparation von Plasmid DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Current Protocols Kap. 1.6.1) durchgeführt. Vor der Fällung wurde zusätzlich eine Phenolextraktion durchgeführt.

4.2.3.2 *Großansatz zur Isolierung von Plasmid DNA*

Zur Isolierung und Reinigung von größeren Mengen Plasmid DNA wurden Quiagen Midi, Maxi bzw. Mega Säulen (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Isolierung erfolgte streng nach Vorschrift des Herstellers. Nach der Isolierung erfolgte die Reinigung mittels HPLC.

4.3 Transfektion

4.3.1 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit DNA

4.3.1.1 *DEAE Transfektion*

Das Einführen von DNA in eukaryotische Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran wurde bereits 1968 von Pagano [158] beschrieben. DEAE-Dextran ist für die verwendeten Zellen in unterschiedlichem Maß toxisch. In der vorliegenden Arbeit gelang eine effiziente Transfektion mit dieser Methode nur in A9fas Zellen.

DEAE Transfektionen wurden zunächst in kleinen Kulturflaschen (Nunc) durchgeführt. Später wurde die Methode für 96-Well Mikrotiterplatten optimiert.

Es wurden 20.000 - 30.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für je sechs Vertiefungen wurde ein Gemisch aus dem zu transfizierenden Plasmid und DEAE-

Dextran wie folgt angefertigt: 2µg Plasmid und 2µg Reporter (beta-Galaktosidase in pEBVHis) wurden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 24µl TBS, dann 40µl DEAE Dextran (10mg/ml) zugegeben und 5min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. In einer neuen Mikrotiterplatte wurden 100µl RPMI Medium mit 1/100 Nutridoma (Boehringer) ohne weitere Zusätze vorgelegt und pro Vertiefung 10µl des Plasmid/DEAE-Gemisches zugegeben. Das Medium wurde vorsichtig von den Zellen abgenommen und durch 100µl des neuen Mediums mit DEAE ersetzt. Nach einer Inkubation für 1,5 - 2h bei 37°C wurden 10µl einer Chloroquin Lösung (0,1mM) zugegeben und für 1 ¼ - 1 ½h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium behutsam abgenommen und 100µl 1% DMSO in Ringerlösung vorsichtig zugegeben und 45 - 60sek inkubiert. Schließlich wurde die DMSO Lösung ebenfalls vorsichtig abgenommen und durch 180µl Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden 36 - 48h inkubiert und danach entweder die Transfektionseffizienz mittels Färbung über beta-Galaktosidase abgeschätzt, oder das Ausmaß toter Zellen über Färbung mit CRPG bestimmt.

4.3.1.2 Elektroporation

Zur Transfektion von A9fas und SV80fas wurde auch die Elektroporation angewendet. Hierzu wurden je 20 - 30µg Plasmid und Reporter (beta-Galaktosidase in pEBVHis) in 250µl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freies PBS pipettiert. Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit Hilfe von 5mM EDTA Lösung in PBS abgelöst und in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS gewaschen. Je 10^7 Zellen wurden in dem PBS/Plasmid Gemisch resuspendiert, in Elektroporationsküvetten überführt und 10min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Strompuls, der durch Einstellung der angelegten Spannung sowie der Kapazität variiert wurde. Es wurden Werte von 350 - 800V, 125 - 960µF, sowie zusätzliche Vorpulse mit kleiner Kapazität (3-50µF) eingesetzt. Nach dem Stromstoß erfolgte wiederum eine 10 minütige Inkubation auf Eis, danach wurden die Zellen in Vollmedium für 24 - 48h bei 37°C inkubiert.

4.3.1.3 Transfektion mit Lipidkomplexen

SV80fas Zellen wurden mit Hilfe kationischer Liposome (DMRIE-C, Gibco) transfiziert. 20.000 - 30.000 Zellen wurden in 96 Well-Platten ausgesät und über Nacht im Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Transfektionslösung wie folgt hergestellt: pro Well wurden 100µl serumfreies Medium (Optimem I, Gibco) mit 0,4µl DMRIE-C bei 37°C über 45min inkubiert. Anschließend wurde je 0,5µg Plasmid und Reporter (beta-Galaktosidase in pEBVHis) hinzupipettiert und weitere 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde vorsichtig von den Zellen abgenommen und durch das DMRIE-C Gemisch ersetzt. Nach einer Inkubation von 6h bei 37°C wurde

dieses Gemisch wieder abgenommen und durch Vollmedium ersetzt. Nach weiterer Inkubation bei 37°C erfolgte nach 24 - 48h die Auswertung zur Abschätzung der Transfektionseffizienz mittels Färbung über beta-Galaktosidase, oder Bestimmung der Anzahl toter Zellen über Färbung mit CRPG.

4.3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels β -Gal Färbung

Die Färbung adhärenter Zellen mittels X- Gal diente zur Bestimmung der Transfektionseffizienz.

Vor dem Nachweis von beta-Galaktosidase wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen, die Fixierlösung wurde auf die Zellen gegeben und 15min bei RT inkubiert. Dann wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die X-Gal Lösung auf die Zellen gegeben und für 3-5h bei 37°C inkubiert, da Zellen, die das beta-Galaktosidase-Gen exprimieren, sich mit der X-Gal Lösung blau anfärben. Die X-Gal Lösung wurde wieder entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen, zuletzt unter dem Lichtmikroskop die blau gefärbten Zellen gezählt. Der Quotient $N(\text{blaue Zellen}) / N(\text{ungefärbte} + \text{blaue Zellen}) \times 100$ gibt die Transfektionseffizienz in % an.

4.3.3 Bestimmung des zytotoxischen Effektes eines transfizierten Konstruktes mittels CPRG-Färbung

Nach erfolgter Transfektion und Expression der entsprechenden Plasmide wurde der zytotoxische Effekt durch Bestimmung der Aktivität von beta-Galaktosidase noch lebender, adhärenter Zellen bestimmt. Als Substrat diente Chlorophenol red D-galacto-pyranosid Mononatriumsalz (CPRG), das nach enzymatischer Umsetzung einen orange-roten Farbton zeigt, der calorimetrisch bei 574 oder 578nm gemessen werden kann. Die Intensität der Farbreaktion steht dabei in direktem Verhältnis zur Aktivität der beta-Galaktosidase. Durch diese Färbemethode wurden nur Zellen erfasst, die 1.) erfolgreich transfiziert wurden und 2.) zum Zeitpunkt der Färbung noch vital und adhärent waren.

Das Medium wurde von den transfizierten Zellen in 96 Well-Platten abgenommen und die Zellen wurden vorsichtig einmal mit 200 μ l PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Pro Well wurden 50 μ l Lysepuffer dazupipettiert und die Platte bei 4°C auf einem Schüttler 45min inkubiert. Die Zelllysate wurden mit je 50 μ l PBS / 0,5% BSA gemischt und 15min bei 1000rpm in einer Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert. Von dem Überstand wurden je 20 μ l in eine neue 96 Well - Platte überführt und je 30 μ l CPRG - Lösung dazugegeben. Nach Inkubation für 5min bei RT auf einem Schüttler,

sowie 15min bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 550nm an einem Elisa-Reader (SLT, Crailsheim).

4.4 Zelltod Assay

4.4.1 Induktion von Zelltod über Stimulation von Fas und TNFR1

Zur Induktion von der Apoptose wurden subkonfluent gewachsene Zellen, bzw. transfizierte Zellen 24 - 48h nach Transfektion verwendet. Die Stimulation der beiden Rezeptoren erfolgte unter Hemmung der Proteinbiosynthese mittels Cycloheximid (CHX), das dem Medium in einer Endkonzentration von 50µg/ml zugegeben wurde.

Der monoklonale Antikörper αFas (αFas IgG₃κ) wurde, falls nicht anders vermerkt, in einer Endkonzentration von 500ng/ml zugegeben. Die Auswertung erfolgte nach Inkubation bei 37°C über 3h.

Rekombinantes humanes TNFα wurde, falls nicht anders vermerkt, in einer Endkonzentration von 5000U/ml zugegeben. Die Auswertung erfolgte nach Inkubation bei 37°C über 6h.

4.4.2 Schutz vor Zelltod

Um den Apoptose-induzierenden Effekt der transfizierten Konstrukte bzw. von TNFα oder αFas zu hemmen, wurden Reagenzien eingesetzt, welche die Apoptose auf verschiedenen Ebenen blockieren.

4.4.2.1 *BHA, Rotenone, D609*

BHA (3-tetr-butyl-4-hydroxyanisol) ist ein starkes Antioxidans, das die Bildung von Superoxiden nach Ligation am TNF-Rezeptor verhindert [159]. Es findet breite Verwendung in der Lebensmittelchemie als Konservierungsstoff (E320). Rotenone (hexahydro-isopropenyl-dimethoxychromeno-furo-chromen) ist ein potenter Inhibitor des mitochondrialen Elektronen-Transportes. Aufgrund dieser Wirkung mit Hemmung der Atmungskette wird Rotenone gewöhnlich als Insektizid und Piscizid eingesetzt. D609 gilt als Hemmstoff der phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PC-PLC). Ca²⁺ Einstrom in die Zelle und Aktivierung der sauren Sphingomyelinase sind Kennzeichen der Apoptose, die durch PC-PLC vermittelt wird [70]. D609 ist in der Lage diese Effekte zu inhibieren.

Diese Substanzen wurden in verschiedenen Endkonzentrationen der Zellkultur zugegeben. Dabei wurden hochkonzentrierte wässrige Stammlösungen verwendet (Ausnahme Rotenone: gelöst in 66%-igem DMSO), die durch Zugabe in ein definiertes Volumen Kulturmedium verdünnt wurden. Die Zugabe erfolgte entweder zugleich mit TNF α oder α Fas, oder, wenn die zytotoxische Wirkung eines transfizierten Konstruktes untersucht werden sollte, 8 - 10h nach der Transfektion. Die Auswertung erfolgte nach weiteren 14 - 18h Inkubation.

4.4.2.2 YVAD, ZVAD, DEVD

Diese Substanzen sind synthetische Tetrapeptide, die aufgrund ihrer spezifischen Sequenz von Caspasen erkannt werden, aber nicht geschnitten werden können. Sie wirken dadurch als potente Inhibitoren bestimmter Caspasen.

Das in dieser Arbeit verwendete YVAD-cmk (acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethylketon, Bachem) ist ein spezifischer Inhibitor der Caspase 1 (vgl. Tabelle 1-3) [108, 110, 160, 161].

4.4.3 Bestimmung der Zelltodrate

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in adhärent bewachsenen Kulturmedien wurde eine Neutralrotfärbung durchgeführt.

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, durch 200 μ l Medium/Neutralrot - Mischung (1:50) ersetzt und 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 3x vorsichtig mit PBS gewaschen und je 100 μ l Zitratpuffer zugegeben. Nach 15min Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 690nm an einem Elisa-Reader (SLT, Crailsheim) gemessen.

4.5 Interleukin-6 Bestimmung

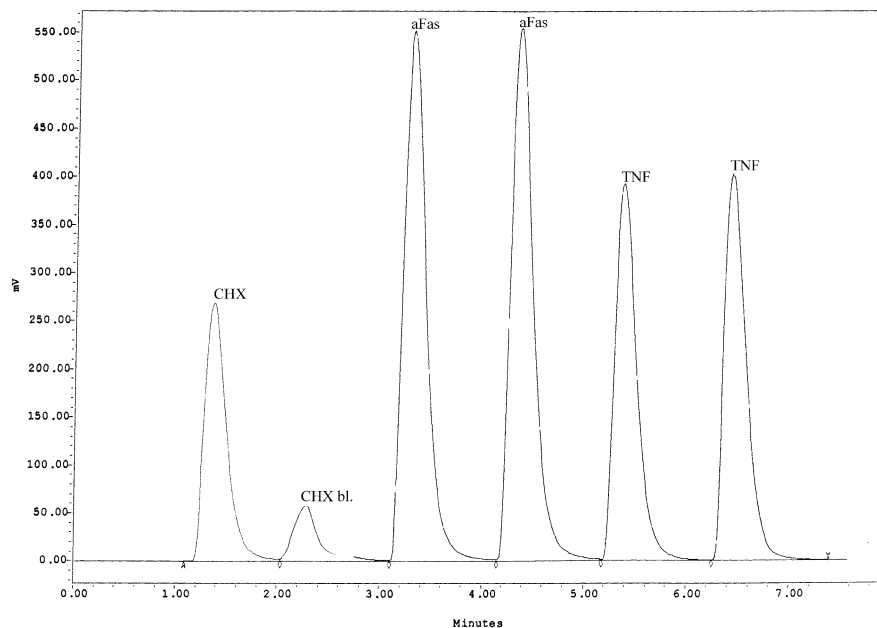
Der Nachweis von Interleukin-6 in Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Eine Mikrotiterplatte (Maxisorb von Nunc, Wiesbaden) wurde mit 5 μ g/ml α IL-6Ak 34-1 in PBS/NaN₃ über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS/TWEEN/0,5% BSA/NaN₃ geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde die Platte mit je 100 μ l der Probenverdünnung beschickt. Als Standard diente rekombinantes IL-6 (CHO) (Boehringer). Das gebundene IL-6 wurde mit affinitäts-gereinigtem Kaninchen-antihumanes-IL-6 Antiserum und anschließend mit

Peroxidase-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin nachgewiesen. Als Substrat diente 10mg TMB gelöst in 100µl DMSO in 10ml Zitratpuffer und 0,006% (v/v) H₂O₂. Nach 2 - 5min wurde die Farbreaktion mit 1M H₂SO₄ gestoppt, und die Absorption an einem Elisa-Reader (SLT, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Menge des durch die Peroxidase umgesetzten Farbsubstrates entsprach der Menge des im Überstand vorhandenen IL-6 [34, 162].

4.6 Messung der Caspasenaktivität

Zur Bestimmung der Caspasenaktivität wurde das kommerziell erhältliche Tetrapeptid DEVD-AFC (DEVD-7amino-4-trifluoromethyl coumarin) der Firma Clontech eingesetzt. DEVD-AFC wird relativ spezifisch von CPP32 (Caspase-3), einer früh nach Auslösung des apoptotischen Signals aktivierten Caspase, gespalten. Dabei wird AFC freigesetzt, das nun bei einer Wellenlänge von 460nm fluoresziert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden ausgesät und je nach Experiment transfiziert oder direkt mit αFas und TNFα stimuliert. Danach wurden die Zellen mit EDTA abgelöst und einmal gewaschen. Jeweils 10⁶ Zellen wurden in 100µl CPP32-Lysepuffer aufgenommen, 10min auf Eis inku-



SampleName: SV80 CPP32 Vial: 1 Inj: 2 Ch: SATIN Type: Unknown

Abbildung 4-2: Messung der Caspase Aktivität

biert und schließlich Dithiothreitol (DTT) zu einer Endkonzentration von 5mM zugegeben. Um eine Kontrollgruppe ohne CPP32 Aktivität zu erhalten wurde zu einer Probe der CPP32 Inhibitor DEVD-CHO in einer Konzentration von 10 μ M zugegeben und 30min bei 37°C inkubiert.

Das Substrat DEVD-AFC wurde in einer Endkonzentration von 50 μ M zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte auf einem Mikrofluoreszenzdetektor (Waters 470 Scanning Fluorescence Detector, Millipore) durch Messung der Emission bei 460nm nach einer Anregung bei einer Wellenlänge von 380nm. Abbildung 4-2 zeigt eine typische Messung. Zur Auswertung wurden die Flächen unter den einzelnen Ausschlägen berechnet.

5 Ergebnisse

Um die Rolle von FADD genauer untersuchen zu können, war es zunächst nötig, FADD zu klonieren und ein Konstrukt zu erzeugen, das nach Transfektion einer Zelle eine hohe Expressionsrate von FADD gewährleistet. Um zu untersuchen ob es einen Signalweg gibt, der FADD unabhängig Zelltod vermittelt, sollte eine veränderte Form von FADD in der Zelle exprimiert werden, die eine Signalweiterleitung verhindert. Die Vorstellung ist, dass nach hoher Expression dieser Mutante der Signalweg an der Stelle von FADD unterbrochen wird, da die künstlich eingebrachte Form wesentlich höher exprimiert wird als der natürlich vorhandene Wildtyp. Diese Mutante ist Δ FADD. Sie besteht aus den N-terminalen 79 Aminosäuren des Wildtyps, besitzt also nur noch die Death Domain (vgl. Tabelle 1-1: Signaladaptoren des Fas/TNFR1 Signalweges). Unter der Vorstellung, dass FADD ein Adaptermolekül darstellt, das die Signalweiterleitung durch Rekrutierung enzymatisch aktiver Proteine bewerkstelligt, wurde eine sogenannte dominant negative FADD Mutante konstruiert.

5.1 Klonierung von FADD und Funktionsprinzip der Mutante Δ FADD

FADD [8] wurde mittels RT-PCR kloniert. Dazu wurde aus SV80 Zellen mRNA isoliert und

```

FFL1 -----GAGGACAGAGGGCGCACGGA 20
FADD CTCTAAAGGTTCGGGGGTGGAATCCTTGGGCCGCTGGGCAAGCGGCAGACCTGGCCAGGGCCAGCGAGCCGAGGACAGAGGGCGCACGGAGGGCCGGGC 100

FFL2 -----

FFL1
FADD CGCAGCCCCGGCCGCTTGCAGACCCCGCCATGACCCGTTCCCTGGTGTCTGCTGCACTCGGTGTCTGCCAGCCTGTGAGCAGCGAGCTGACCGAGCTCAA 200
      M D P F L V L L H S V S S S L S S S E L T E L K
FFL2 -----

FFL1
FADD GTTCCTATGCCTCGGGCGCGTGGGCAAGCGCAAGCTGGAGCGCGTGCAGAGCGGCTAGACCTCTTCTCCATGCTGCTGGAGCAGAACGACCTGGAGCCC 300
      F L C L G R V G K R K L E R V Q S G L D L F S M L L E Q N D L E P
FFL2 -----

FFL1
FADD GGGCACACCGAGCTCCTGCGCGAGCTGCTCGCCTCCCTGCGGCGCCACGACCTGCTCGGCGCGCTCGGACCTCGAGGCGGGGGCGGGCGGGGGCCG 400
      G H T E L L R E L L A S L R R H D L L R R V D D F E A G A A A G A
FFL2 -----

FFL1
FADD CGCCTGGGGAAGAAGACCTGTGTGCAGCATTTAACGTCATATGTGATAATGTGGGGAAGATTGGAGAAGGCTGGCTCGTCAGCTCAAAGTCTCAGACAC 500
      A P G E E D L C A A F N V I C D N V G K D W R R L A R Q L K V S D T
FFL2 -----

FFL1
FADD CAAGATCGACAGCATCGAGGACAGATAACCCCGCAACCTGACAGAGCGTGTGCGGGAGTCACTGAGAATCTGGAAGAACACAGAGAAGGAGAAGCAACA 600
      K I D S I E D R Y P R N L T E R V R E S L R I W K N T E K E N A T
FFL2 -----

FFL1
FADD GTGGCCACCTCGGTGGGGGCTCTCAGGTCTGCCAGATGAACCTGGTGGCTGACCTCGTACAAGAGGTTTCAGCAGGCCCGGTGACCTCCAGAACAGGAGTG 700
      V A H L V G A L R S C Q M N L V A D L V Q E V Q Q A R D L Q N R S
FFL2 -----

FFL1
FADD GGGCCATGTCCCCGATGTCATGGAACCTCAGACGCATCTACCTCCGAAGCGTCCATGAGTGGGCCGCTGCTTT 770
      G A M S P M S W N S D A S T S E A S *
FFL2 -----GGCTTCGCAGGACTACCCGG-----

```

Sal I

Verwendete Primer:

FFL1: 5'-G AGG ACA GAG GGC GCA CGG A-3'

FFL2: 5'-GGC CCA TCA GGA CGC TTC GG-3'

Abbildung 5-1: Der für FADD kodierende DNA Abschnitt. FFL1, FFL2 kennzeichnen die verwendeten PCR Primer

revers transkribiert. Die so gewonnene cDNA wurde von Herrn Gabor Stiegler zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe eines PCR Ansatzes wurde das für FADD kodierende DNA Fragment (siehe Abbildung 5-1) selektiv vervielfältigt. Die Primer wurden so gewählt, dass das Startcodon ATG bei Basenpaar 59 zu liegen kommt. Diese Region entspricht mit ihren angrenzenden Basen (GCCATGG) der Kozak-Sequenz für eine effiziente Initiation der Translation [163]. Die besten Ergebnisse in Bezug auf selektive Amplifizierung des gewünschten DNA Abschnittes wurden mit den in Abbildung 5-2 gezeigten PCR-Zyklen erreicht.

Das durch die PCR entstehende DNA Fragment von 691 Basenpaaren (Abbildung 5-2) wurde über Gelelektrophorese analysiert, gereinigt und anschließend mit Hilfe einer DEAE-Membran isoliert.

PCR-Zyklus:

1. Zyklus:	94 °C, 6 min
	65 °C, 30 sek
	72 °C, 2 min 30 sec
Zyklus 2-16:	94 °C, 45 sek
	65 °C, 30 sek
	72 °C, 1 min
Zyklus 17-37:	94 °C, 45 sek
	65 °C, 30 sek
	72 °C, 1 min 15 sec
Zyklus 38:	72 °C 5 min

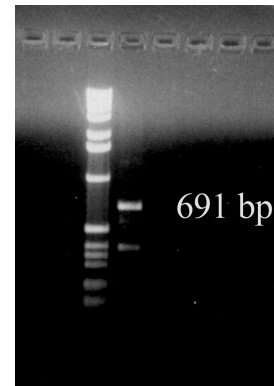


Abbildung 5-2: Zyklen der PCR zur Gewinnung von FADD, gelelektrophoretische Auftrennung des PCR Produktes. Neben der für FADD typischen Bande von ca. 691 bp zeigten sich weitere unspezifische Banden, die durch Optimierung des PCR- Ansatzes und der Zyklen minimiert wurden

Das so gewonnene Fragment wurde mit stumpfen Enden (blund end) in den mit SrfI linearisierten Vektor pCR-Script™ SK(+) (Stratagene® Cloning Systems, Heidelberg) ligiert. Der Ligationsansatz enthielt zusätzlich das Restriktionsenzym SrfI um die Wahrscheinlichkeit der Ligation des gewünschten Fragmentes in den Vektor zu erhöhen und eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden. Abbildung 5-3 zeigt den leeren Vektor und das fertige Konstrukt. Die Orientierung des FADD-Abschnittes wurde durch analytischen Verdau kontrolliert. Um mögliche Punktmutationen, die während der PCR entstanden sein könnten auszuschließen, wurde das gesamte

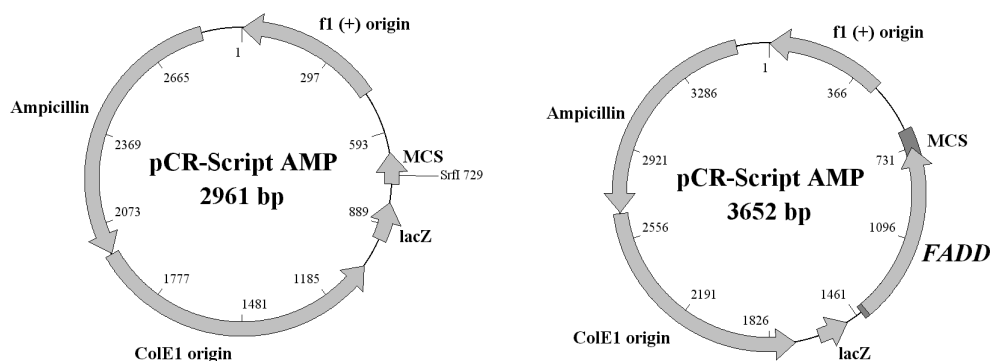
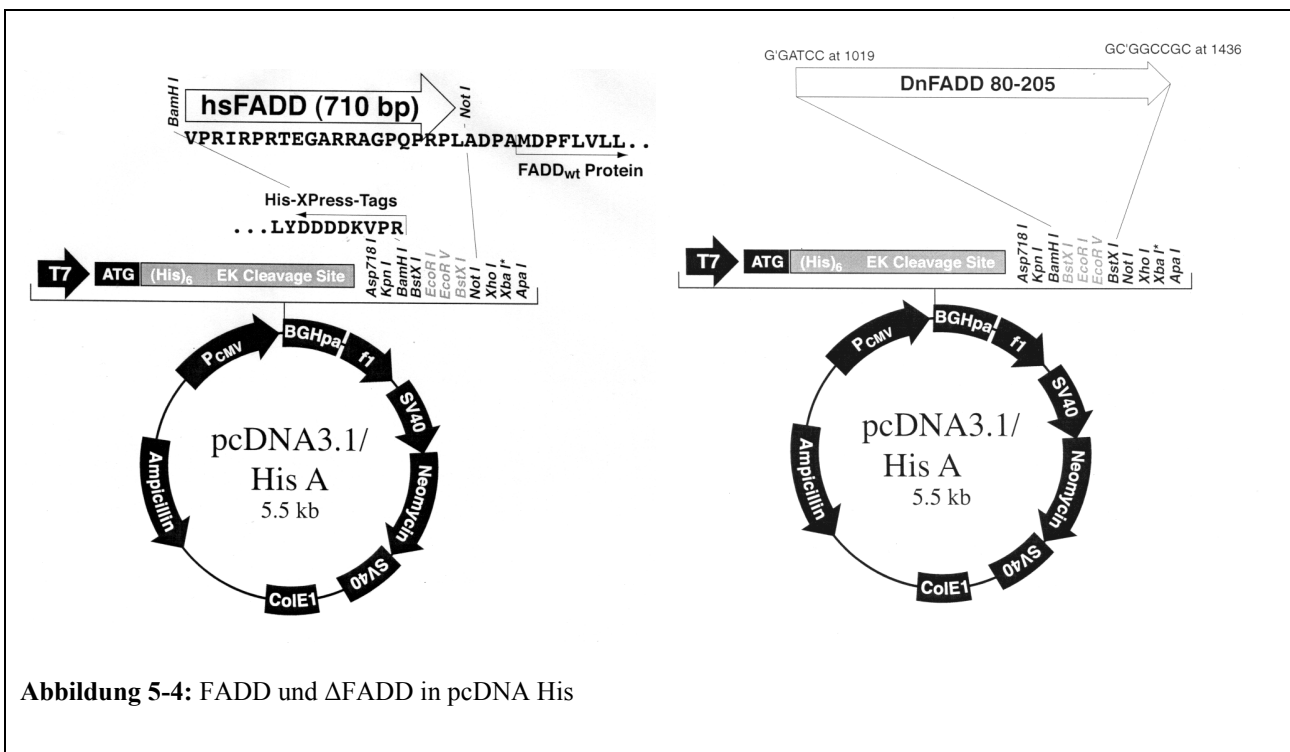


Abbildung 5-3: Der Vektor pCR-Script und das fertige Konstrukt. Das FADD Fragment wurde mit stumpfen Enden, d.h. als DNA Doppelstrang ohne Überhänge, in den mit Srf I (Erkennungssequenz: 5'-GCCCGGGC-3') linearisierten Vektor pCR-Script ligiert. Nach erfolgter Ligation ist die Erkennungssequenz für SrfI verloren.

Insert sequenziert.

Nach DNA Sequenzanalyse wurde der für die Mutante Δ FADD codierende DNA Abschnitt durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid pCR-Script-FADD herausgeschnitten. Ebenso wurde auch das für die Wildtypform FADD codierende Teilstück herausgeschnitten. Beide Fragmente wurden in den Säugetier Expressionsvektor pCDNA His 3 kloniert (vgl. Abbildung 5-4).



5.1.1 Umklonierung in den Expressionsvektor pEBVHis

Das FADD Fragment wurde aus dem Plasmid pCR-Script-FADD mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und NotI herausgeschnitten.

Das Δ FADD Fragment wurde durch Verdau mit NotI und SalI erzeugt. Beide Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels DEAE Zellulose isoliert.

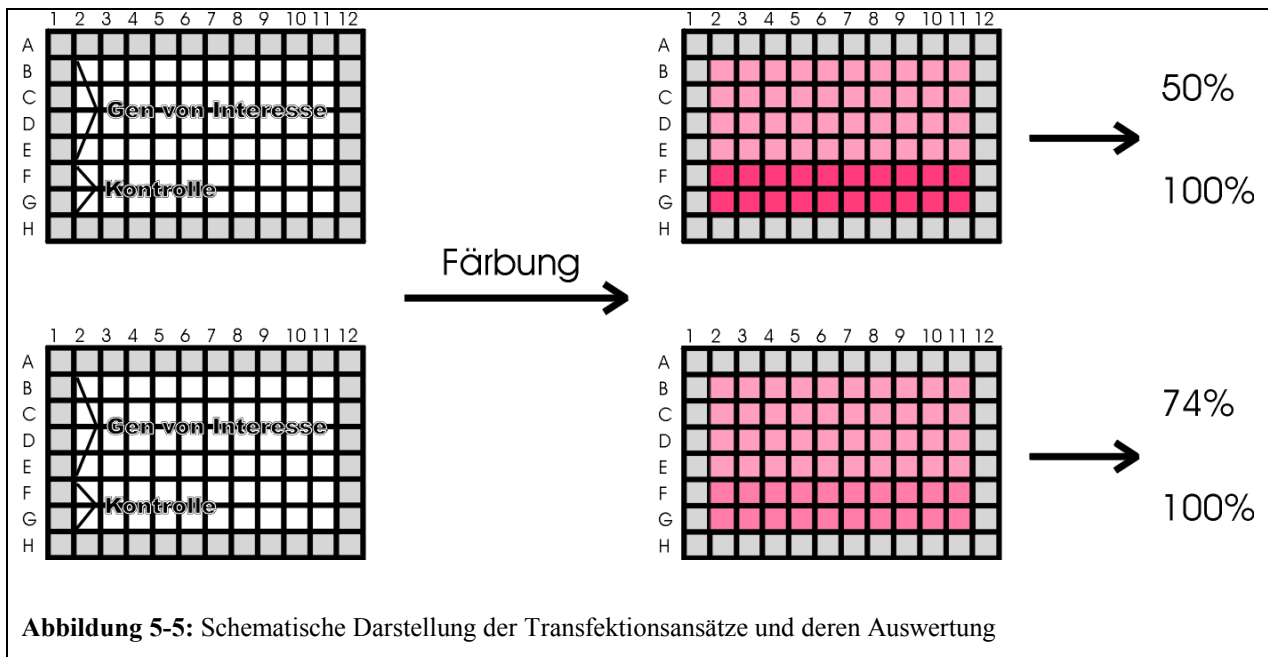
Zur Ligation des FADD Fragmentes mit dem Vektor pEBVHis 3 wurde dieser mit HindIII und NotI (zur Ligation mit dem FADD Fragment), bzw. NotI und XhoI (zur Ligation mit dem Δ FADD Fragment) verdaut, ebenso elektrophoretisch aufgetrennt und mittels DEAE Zellulose isoliert.

Die Ligation der beiden Fragmente mit dem jeweiligen linearisierten Vektor erfolgte nach Standardprotokoll.

5.2 Transfektion der Zelllinien A9fas⁺ und SV80fas⁺

Um zu überprüfen, ob FADD in den gewählten Zelllinien eine entscheidende Rolle im Signalweg des TNFR1 bzw. Fas besitzt, musste zunächst Δ FADD in den gewählten Zelllinien transient zur Expression gebracht werden. Teil der hier vorgelegten Arbeit war es, optimale Methoden zur Transfektion der verschiedenen Zelllinien zu erarbeiten. Versuche zur Elektroporation von A9fas zeigten, dass mit dieser Methode keine ausreichend hohe Transfektionseffizienz erreicht werden kann. Trotz zahlreicher Variationen der Elektroporationsbedingungen konnte lediglich eine Transfektionseffizienz von maximal 30% erreicht werden. Transfektion mittels DEAE-Dextran erwies sich als geeignete Methode, um hohe Transfektionseffizienzen zu erreichen. Effizienzen von über 60% konnten erreicht werden. Diese Methode wurde weiter optimiert, so dass Transfektionsansätze in 96-Well Platten möglich wurden. Die weiteren Untersuchungen der transfizierten Zellen waren hierdurch erheblich beschleunigt. SV80fas konnten mittels Lipidkomplexen (DMRIE-C) transfiziert werden. Auch hier war eine Optimierung der Methode für 96-Well Platte erfolgreich. Es konnten mit dieser Methode ebenfalls Transfektionseffizienzen von über 60% erreicht werden.

Die Abbildung 5-5 zeigt exemplarisch, wie die Versuchsansätze in 96-Well Platten durchgeführt wurden. Dabei wurden die randständigen Wells nicht benutzt, um Variationen, die durch unterschiedliche Verdunstung an den äußeren Wells entstehen können, zu minimieren. Die Schwankungen, die durch unterschiedliche Inkubationszeiten zwischen verschiedenen Wells innerhalb einer Platte bei der Transfektion und der Auswertung mittels CPRG-Assay auftreten können waren minimal, da der zeitliche Ablauf durch Optimierung der Methode gestrafft werden konnte. Außerdem wurden zum Pipettieren Multi-Pipetten verwendet, die das gleichzeitige Beschicken von 12 Wells erlaubten und somit den Zeitaufwand weiter verringerten. Durch die hohe Anzahl von Einzeltransfektionen (n=40) konnte ein Mittelwert berechnet werden, so dass die Aussagekraft durch Berechnung der Standardabweichung gesichert wurde.



Zu beachten war, dass Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Platten bestehen können. Das beruht vor allem auf unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei der CPRG-Färbung, die für verschiedene Platten unterschiedlich ausfallen können. Um trotzdem Ergebnisse verschiedener Platten vergleichen zu können, wurden auf jeder Platte Kontrollen mitgeführt, die als Bezugsgröße für 100%-ige Überlebensrate nach der Transfektion gewertet wurden. Alle anderen Werte auf dieser Platte wurden als %-Werte dieser Bezugsgröße ausgedrückt. Dadurch war es möglich Werte unterschiedlicher Platten untereinander zu vergleichen. Bei der CPRG-Färbung wurden apoptotische, nicht-adhärenente Zellen in verschiedenen Waschschritten entfernt. Somit wurde die Höhe des Substratumsatzes allein durch transfizierte, lebende Zellen bestimmt. Zellen, die nach der Transfektion apoptotisch wurden und auch β -Galaktosidase-Aktivität besitzen, wurden entfernt und konnten nicht mehr zur Umsetzung des Substrates beitragen. Damit ist die Höhe des Substratumsatzes ein Maß für das Überleben transfizierter Zellen. Sie ist umgekehrt proportional zur Toxizität eines transfizierten Konstruktes.

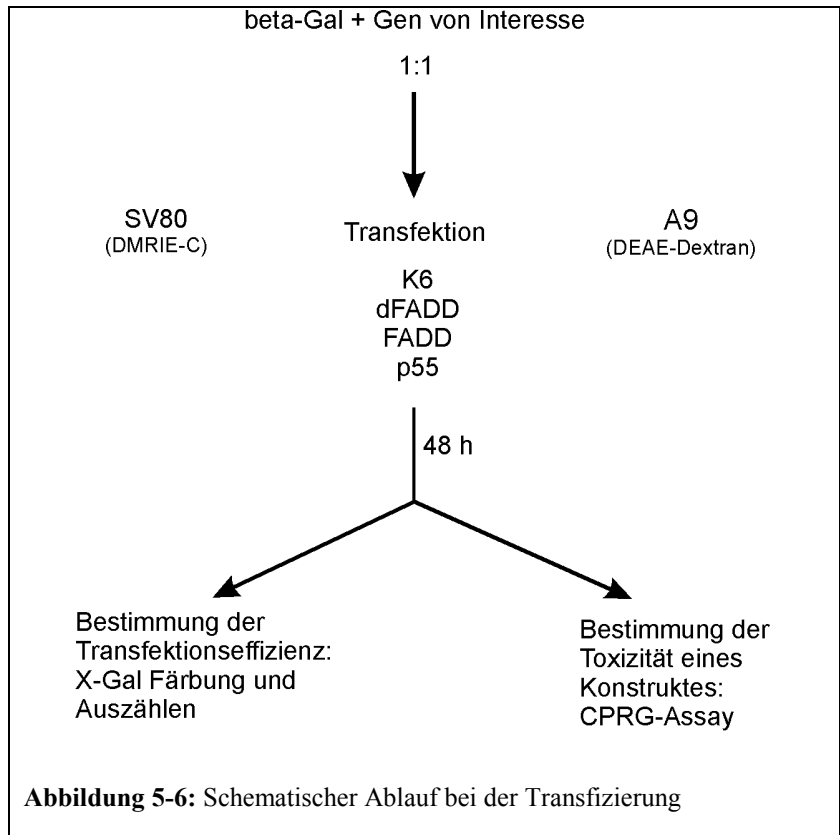
5.3 Expression von FADD und Δ FADD in den Zelllinien A9fas+ und SV80fas+

Der Versuchsablauf gestaltete sich nach dem in Abbildung 5-6 gezeigten Schema. Die Zellen wurden jeweils mit β -Gal in pEBVHis sowie FADD oder Δ FADD transfiziert. Als Kontrolle für die Toxizität eines transfizierten Konstruktes diente der TNFR1 p55 in pEBVHis, von dem bekannt ist, dass er nach Überexpression via Autoaggregation Apoptose induziert [164]. Als Kontrolle, die ohne Effekt auf das Überleben der Zelle ist, wurde eine nicht-funktionelle Mutante des TNFR1 als Konstrukt in pEBVHis (K6)

verwendet. Zunächst erfolgte die Transfektion von SV80fas Zellen. Im ersten Schritt erfolgte die Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Färben transfizierter Zellen mit X-Gal und anschließender Auszählung der Anzahl transfizierter blauer- und nicht-transfizierter weißer Zellen unter dem Lichtmikroskop. Es ergaben sich reproduzierbare Transfektionseffizienzen von ca. 60%. Im nächsten Schritt wurden die Zellen, wie unter 5.2 beschrieben mit CPRG gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-7 dargestellt. Angegeben ist die Überlebensrate der Zellen im Verhältnis zu dem nicht-toxischen Konstrukt K6, sowie +/- eine Standardabweichung. Die Standardabweichung für ein Experiment mit 40 Einzelwerten wurde nach folgender Standardformel berechnet:

$$\sqrt{\frac{40 * \sum_{n=40}^{n=1} [(n1 * 100): MW_{K6}]^2 + [(n2 * 100): MW_{K6}]^2 + \dots - \left\{ \sum_{n=40}^{n=1} [(n1 * 100): MW_{K6}] + [(n2 * 100): MW_{K6}] + \dots \right\}^2}{40^2}}$$

Hierbei steht n1 bis n40 für jeden der 40 einzeln gemessenen Werte, sowie MW_{K6} für den Mittelwert der gemessenen Kontrollwerte K6. Der Ausdruck $(n_x * 100): MW_{K6}$ ergibt den prozentualen



Anteil des x-ten Wertes, im Verhältnis zum Mittelwert aller gemessenen Werte von K6 (entspricht Viability in % von K6).

Die Auswertung ergibt eine hohe Toxizität des transfizierten Konstruktes FADD Wildtyp sowie eine nur geringe Toxizität für p55. Δ FADD hingegen ist nicht toxisch, es werden sogar geringfügig höhere Überlebensraten gemessen als für K6 (vgl. Abbildung 5-7).

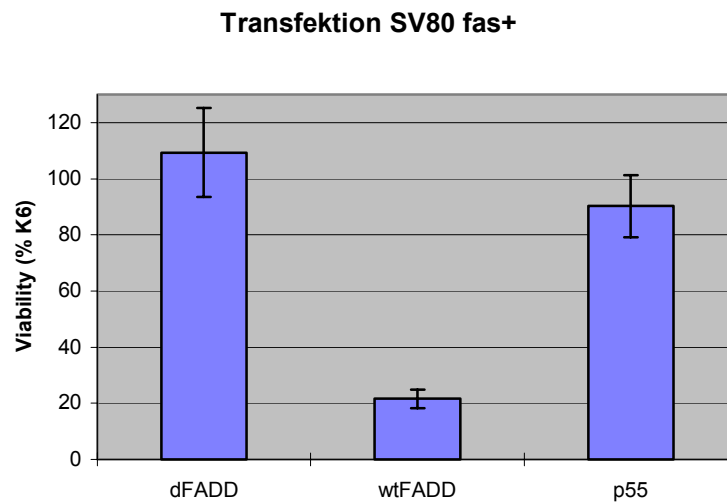


Abbildung 5-7: Transfektion von SV80fas mit vier verschiedenen Konstrukten. dFADD = Δ FADD, wtFADD = FADD Wildtyp. Dargestellt ist die Überlebensrate der mit den verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen in Vergleich zu den Zellen, die mit K6 transfiziert wurden

Im folgenden sollte überprüft werden, ob $\Delta FADD$ nach Transfektion in der Lage ist Apoptose über TNFR1 oder Fas zu unterbinden. In einem ersten Experiment wurde zunächst die Empfindlichkeit der SV80fas⁺ Zelllinie gegenüber TNF und α Fas bestimmt. Zellen wurden ausgesät und mit Verdünnungsreihen für TNF und α Fas inkubiert. Anschließend wurde eine Neutralrotfärbung durchgeführt und im Vergleich zur Kontrollgruppe, die lediglich mit Cycloheximid behandelt

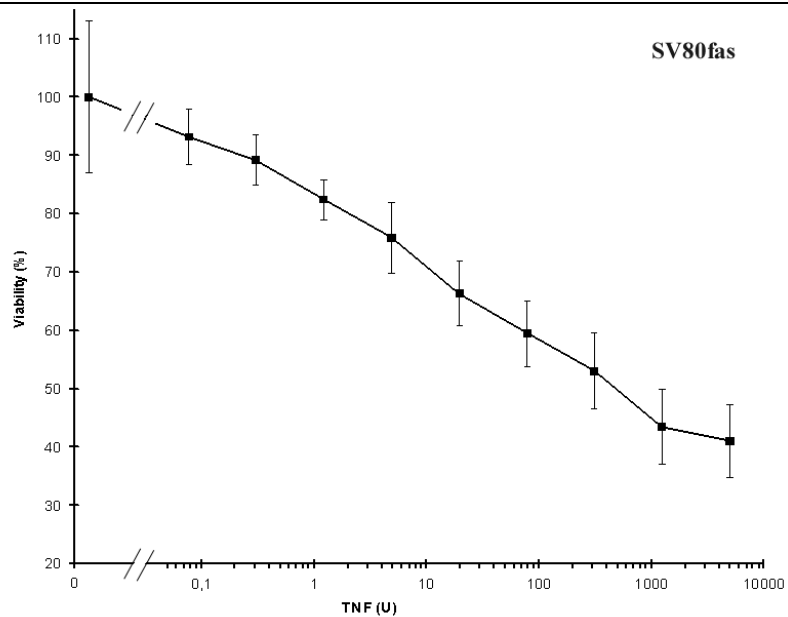


Abbildung 5-8: Dosis-Wirkungs Kurve für Stimulation von SV80fas⁺ mit TNF (in U/ml)

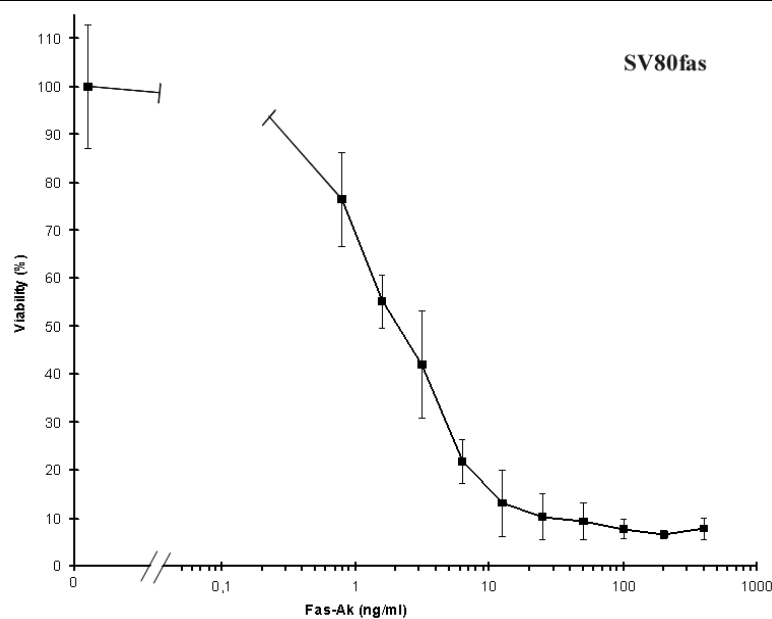


Abbildung 5-9: Dosis-Wirkungs Kurve für Stimulation von SV80fas⁺ mit α Fas (in ng/ml)

wurde, eine Überlebensrate berechnet. Die hieraus gewonnene Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 5-8 und Abbildung 5-9 dargestellt. Aufgetragen sind die Konzentrationen von TNF in Units / ml bzw. von α Fas in ng / ml, sowie + / - eine Standardabweichung.

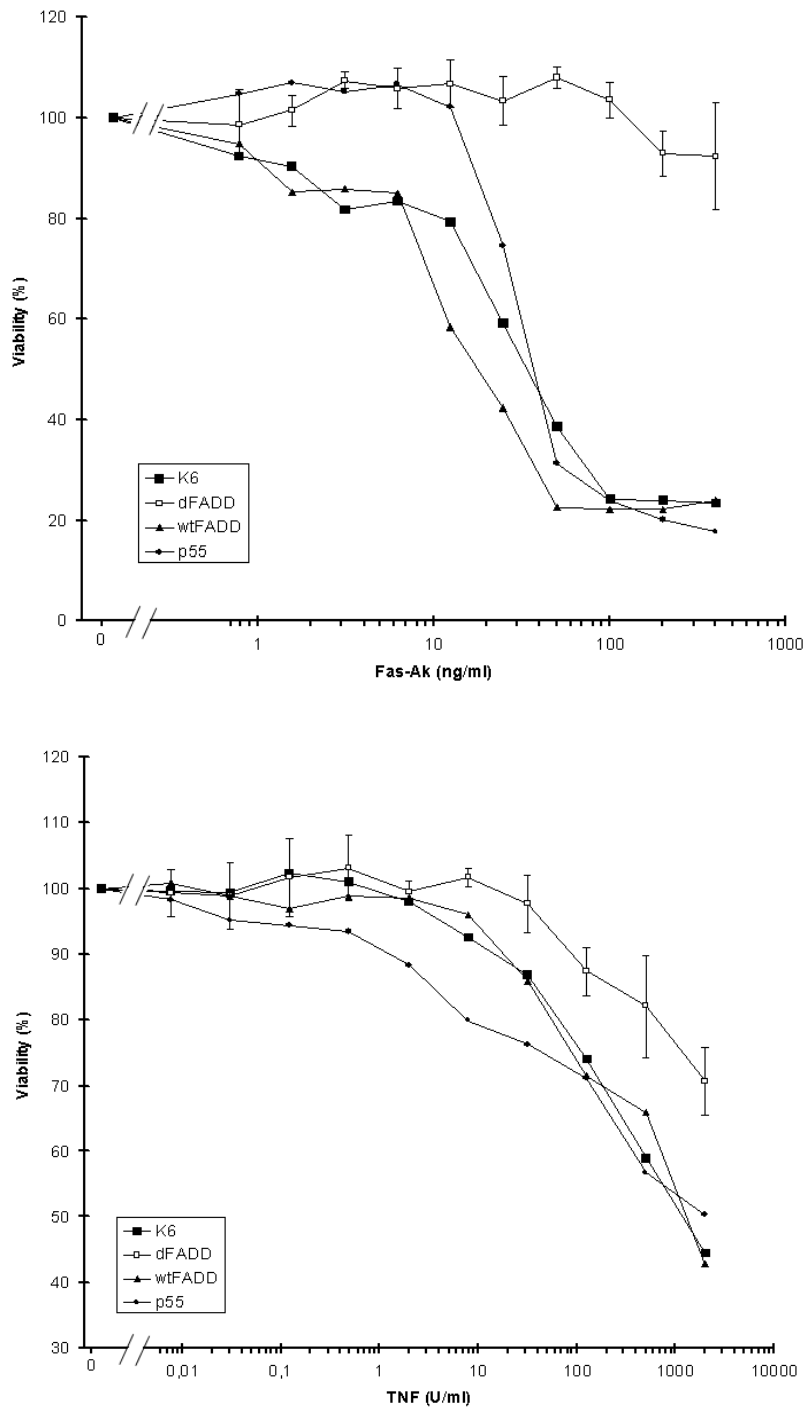
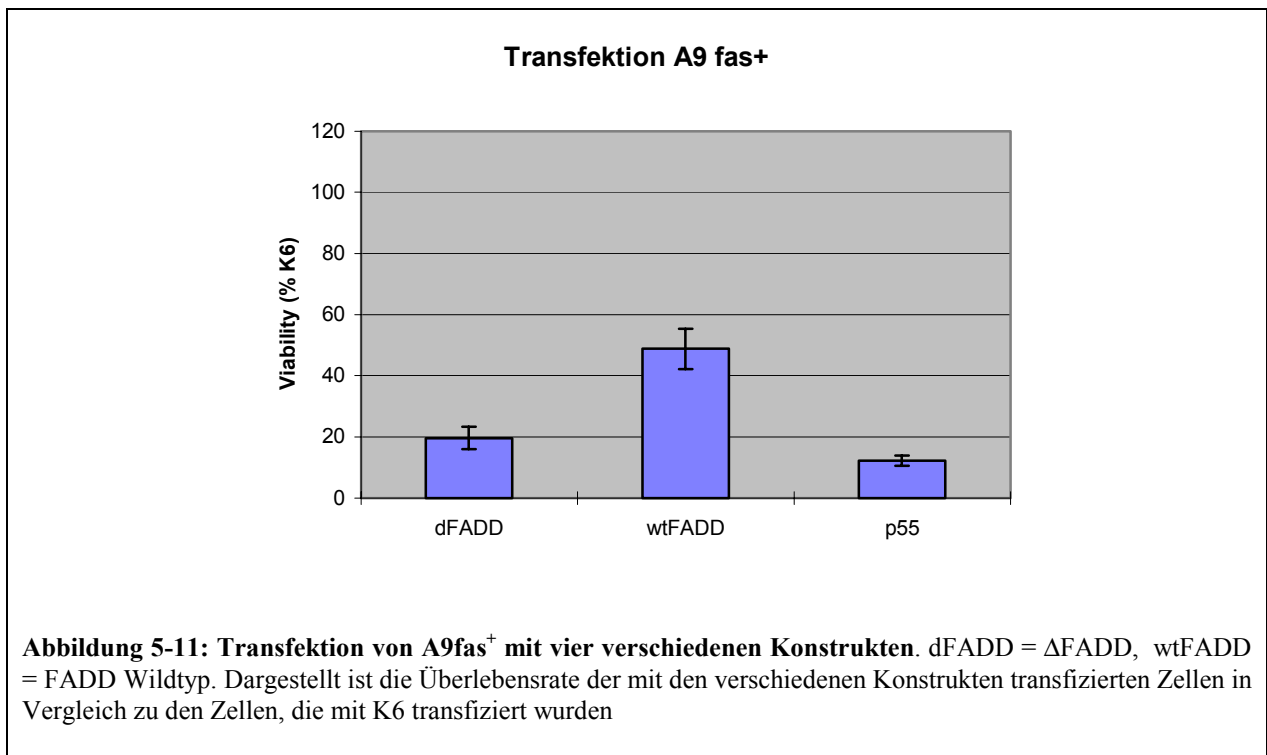


Abbildung 5-10: Stimulation der vier verschiedenen Transfektanten mit α Fas bzw. TNF. Dargestellt ist die Überlebensrate der transient transfizierten Zellen in Abhängigkeit von der Stimulation mit steigender Konzentration von α Fas bzw. TNF. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 10 Einzeltransfektionen. Angegeben ist zusätzlich +/- eine Standardabweichung. p55 (—●—): Kontrollkonstrukt, das Apoptose induziert, K6 (—■—): Kontrollkonstrukt ohne Wirkung auf die Apoptose, dFADD (—□—): Δ FADD, wtFADD (—▲—): FADD Wildtyp

Im nächsten Schritt wurden die mit den vier verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen nach 48h Expression mit geeigneten Konzentrationen von TNF und α Fas stimuliert.

Die Ergebnisse aus über 600 transienten Transfektionen sind in Abbildung 5-10 dargestellt. Aufgetragen ist die Überlebensrate der einzelnen Transfektanten nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von α Fas bzw. TNF. Sie wurde berechnet als Prozentrang derjenigen Zellen, die mit dem gleichen Konstrukt transfiziert wurden, aber nach 48h Expression nicht stimuliert, sondern nur mit cycloheximidhaltigem Kontrollmedium inkubiert wurden. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass Δ FADD eine schützende Wirkung für TNF und Fas vermittelten Zelltod hat. Auffallend bei diesen Ergebnissen ist, dass Fas vermittelter Zelltod komplett gehemmt werden konnte, TNF vermittelter Zelltod im Gegensatz dazu jedoch nur partiell.

In ähnlicher Weise wurde bei der Transfektion der A9fas⁺ Zelllinie vorgegangen. Zunächst wurden alle vier Konstrukte transfiziert und auf ihre Toxizität nach 48h Expression untersucht. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 5-11 gezeigt.



Zu erkennen ist, dass p55 und wtFADD nach Expression wie erwartet toxisch wirken. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass Δ FADD entgegen allen Erwartungen ebenfalls in der Lage ist nach Überexpression Zelltod auszulösen. Die Frage, ob die Blockierung des FADD Signalwegs zur Hemmung der Apoptose führt, lässt sich mit diesem Experiment nicht beantworten,

da Δ FADD als Konstrukt zur Blockierung des FADD-Signalwegs selbst einen toxischen Effekt ausübt. Um die Rolle zu untersuchen die FADD und Δ FADD auf den apoptotischen Signalwege haben, wurde eine Reihe weiterer Experimente geplant.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Δ FADD-induzierte Apoptose durch Blockade verschiedener Caspasen gehemmt werden kann. Caspasen sind spezifische Effektoren am Ende eines apoptotischen Signalweges. Sollte der von Δ FADD induzierte Zelltod durch Blockade verschiedener Caspasen gehemmt werden, wäre dies ein Hinweis darauf, dass Δ FADD unter bestimmten Umständen selbst Apoptose induziert. Die durchgeführten Experimente sind im Kapitel 5.4 beschrieben.

Des weiteren legten Vorbefunde von Stanger, Hsu, Grimm und Duan [50, 64, 165, 166] die Vermutung nahe, dass die Proteine RIP und RAIDD eine wichtige Rolle im apoptotischen Signalweg spielen können. RAIDD steht für *RIP Associated ICH1-homologous protein with a Death Domain* und ist ein Signalmolekül, das eine Verbindung zwischen Rezeptor und Caspasen-Kaskade herstellt (vgl. Abbildung 5-12). Funktionell von Bedeutung sind seine zwei Domänen, die Death Domain und die sogenannte CARD (Caspase Recruitment Domain) [167]. Es konnte gezeigt werden, dass RAIDD über Death Domain mit RIP interagiert, sowie über die ICH-1 Homologie (CARD) die

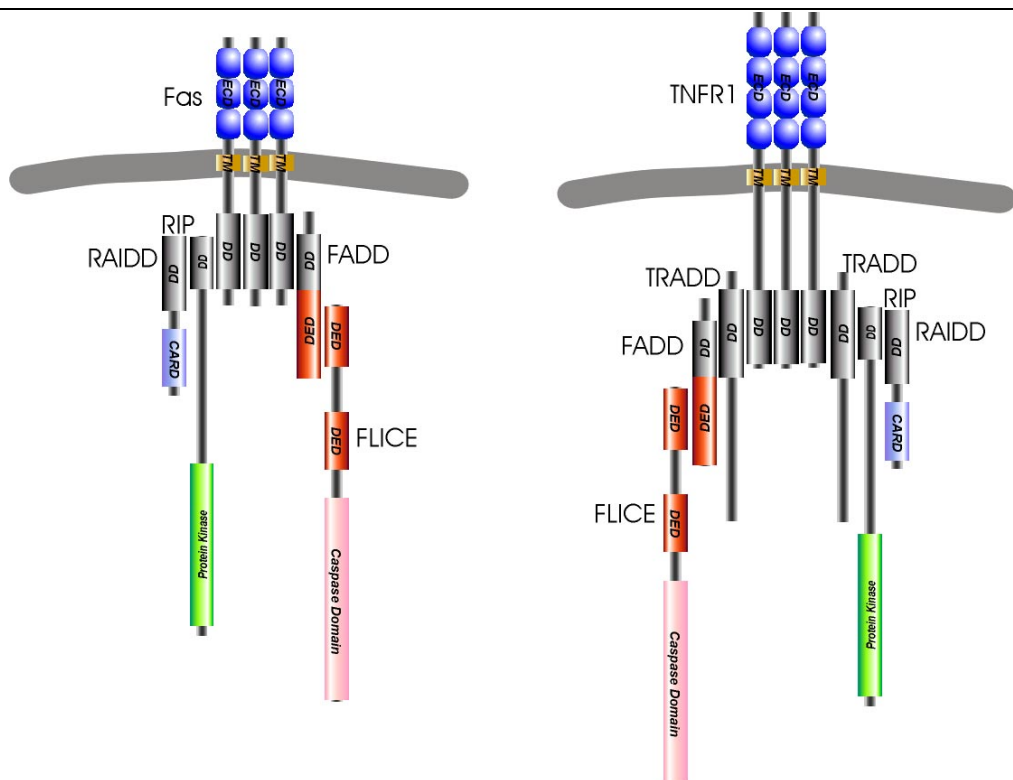


Abbildung 5-12: Mögliche Beteiligung von RAIDD am Signalweg von TNFR1 und Fas

Caspasen-Kaskade anstoßen kann [166, 168]. RAIDD ist in der Lage nach Überexpression Apoptose zu induzieren. Im folgenden sollte untersucht werden, ob RAIDD in den hier untersuchten Signalwegen von Fas und TNF involviert ist. Die hierzu durchgeführten Experimente sind in Kapitel 5.5 beschrieben.

Letztlich sollte geklärt werden, ob Δ FADD in dem hier verwendeten Zellsystem so wie in SV80 Zellen auch in einer dominant negativen Form wirkt, d.h. ob die beobachtete Toxizität durch Blockade eines Signalweges vermittelt wird, oder ob Δ FADD selbst noch in der Lage ist ein apoptotisches Signal weiterzugeben. Hierzu sollte die Messung der Caspasenaktivität erfolgen. Beruht die Wirkung von Δ FADD auf der Blockierung des Signalweges, dann müssten die direkt via FADD aktivierten Caspasen verminderte Aktivität zeigen. Wird Δ FADD jedoch durch das Anstoßen eines apoptotischen Signalweges toxisch, dann sollte die Caspasenaktivität erhöht sein. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 5.7 besprochen.

5.4 Hemmung der Δ FADD-vermittelten Apoptose

Als Hemmstoffe der Apoptose kamen zwei verschiedene Substanzgruppen zum Einsatz. Zum einen die künstlichen Tetrapeptide YVAD-cmk und ZVAD-fmk, die bestimmte Caspasen durch Bindung an ihr aktives Zentrum hemmen können [169, 170].

Zum anderen wurde BHA als Vertreter einer Substanzgruppe gewählt, zu denen auch Rotenone gehört, welche die Apoptose durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette blockieren können [159, 171-173].

Zunächst sollte der Effekt dieser Hemmstoffe anhand nicht-transfizierter Zellen, die mittels TNF oder α FAS stimuliert wurden getestet werden. In einem ersten Experiment wurde die Empfindlichkeit der A9fas⁺ Zelllinie gegenüber TNF und α Fas bestimmt. Zellen wurden ausgesät und mit Verdünnungsreihen für TNF und α Fas inkubiert. Anschließend wurde eine Neutralrotfärbung durchgeführt und im Vergleich zur Kontrollgruppe, die lediglich mit Cycloheximid behandelt wurde, eine Überlebensrate berechnet. Die hieraus gewonnene Dosis-Wirkungs-Kurve ist in Abbildung 5-14 und Abbildung 5-13 dargestellt. Aufgetragen sind die Konzentrationen von TNF in Units/ml bzw. von α Fas in ng/ml, sowie +/- eine Standardabweichung.

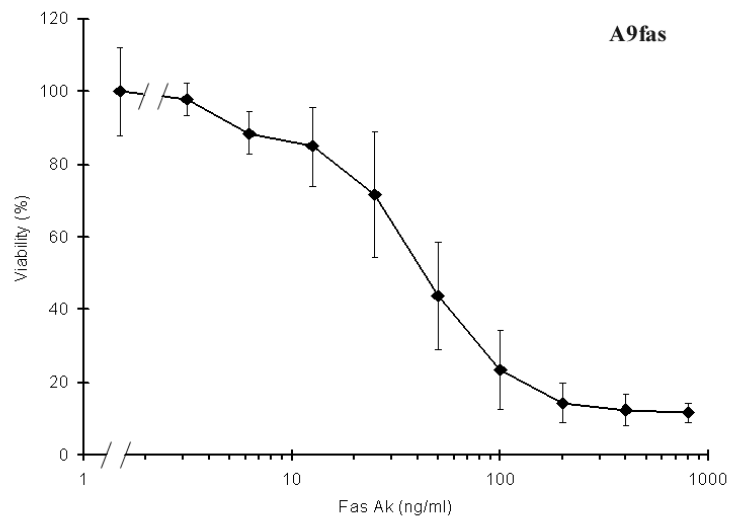


Abbildung 5-14: Dosis-Wirkungs Kurve für Stimulation von A9fas⁺ mit α Fas (in ng/ml)

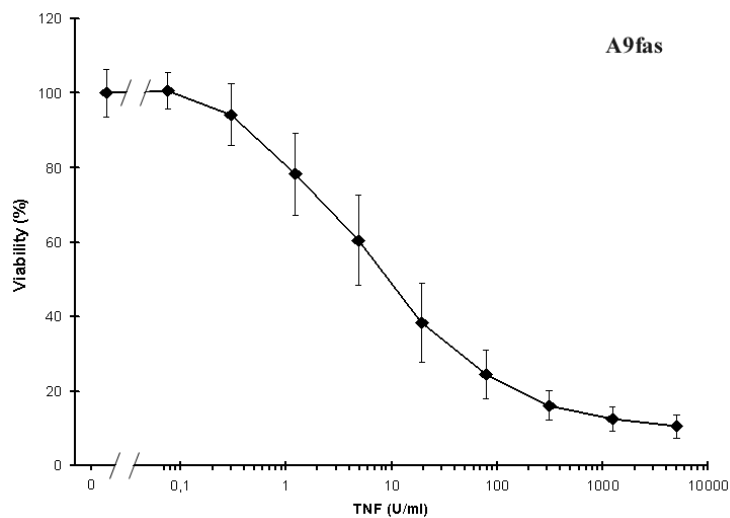


Abbildung 5-13: Dosis-Wirkungs Kurve für Stimulation von A9fas⁺ mit TNF (in U/ml)

Um die Wirkung der oben genannten Hemmstoffe auf die TNF und Fas vermittelte Apoptose zu überprüfen wurde das selbe Experiment unter Einsatz dieser Inhibitoren wiederholt. BHA erwies sich dabei in Konzentrationen $> 75\mu\text{M}$ bei längerer Inkubation als toxisch. Auch YVAD zeigte geringe Toxizität bei Konzentrationen $> 300\mu\text{M}$. Abbildung 5-15 und Abbildung 5-16 zeigen den Effekt von BHA auf die von Fas bzw. TNF vermittelte Apoptose in A9fas. Es ist zu erkennen, dass die Überlebenskurve nach Stimulation mit Fas unabhängig von der Gegenwart von BHA immer gleich verläuft. Hingegen weichen die Kurven unter Stimulation über TNF deutlich voneinander ab.

Dem Diagramm kann entnommen werden, dass in Gegenwart von BHA eine ca. 40-fach höhere Dosis von TNF erforderlich ist um 50% Zelltod zu erzeugen, als ohne BHA. Das heißt, BHA ist in der Lage in A9fas-Zellen TNF-vermittelte Apoptose, nicht jedoch Fas-vermittelte Apoptose in einer Dosis-abhängigen Weise zu hemmen. Dies entspricht den Vorbefunden, welche die Grundlage für diese Arbeit bildeten (vgl. Kap. 2).

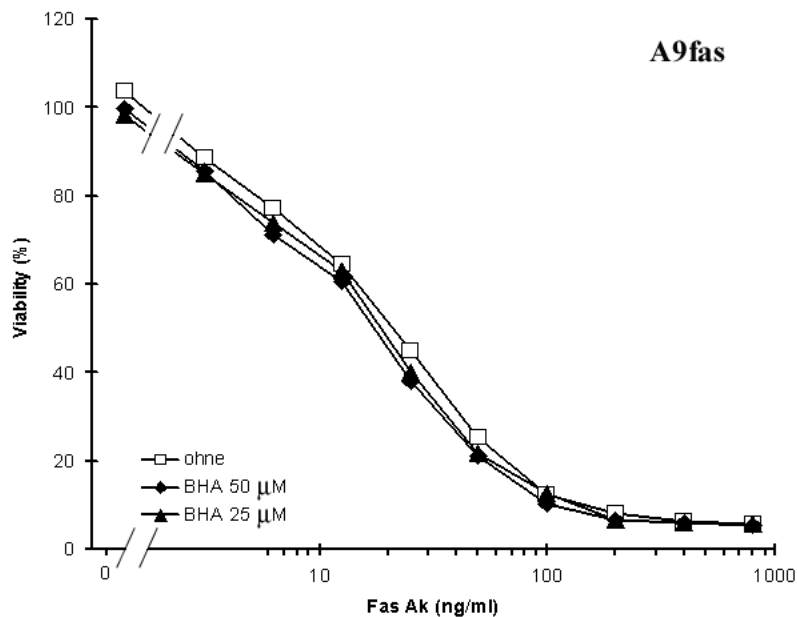


Abbildung 5-15: Hemmung der Fas-vermittelten Apoptose durch BHA

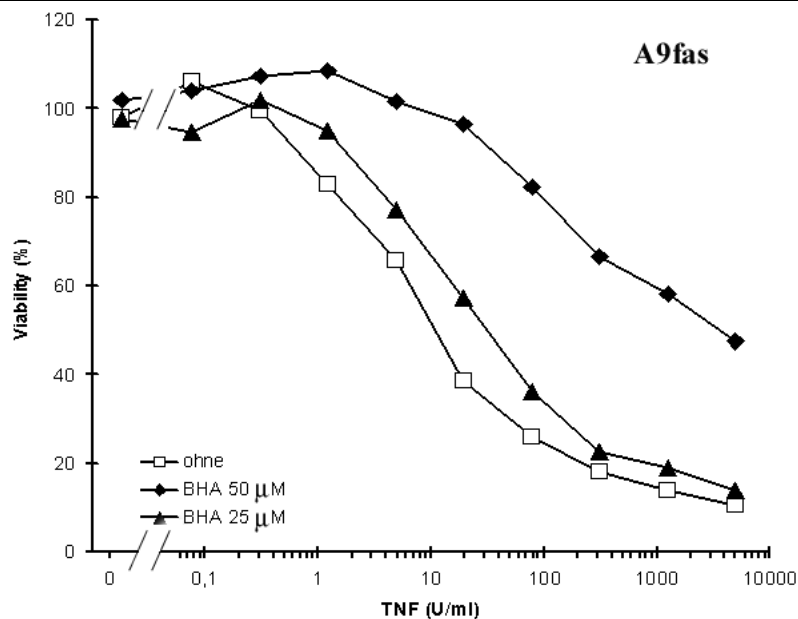


Abbildung 5-16: Hemmung der TNF-vermittelten Apoptose durch BHA

Im Folgenden ist die hemmende Wirkung der Caspase-Inhibitoren YVAD und ZVAD auf Fas-vermittelte Apoptose dargestellt. Abbildung 5-17 und Abbildung 5-18 zeigen die Ergebnisse. Zu erkennen ist, dass sowohl YVAD als auch ZVAD in der Lage sind Zelltod in einer dosisabhängigen Weise leicht zu hemmen. Eine Komplette Blockade konnte nicht beobachtet werden.

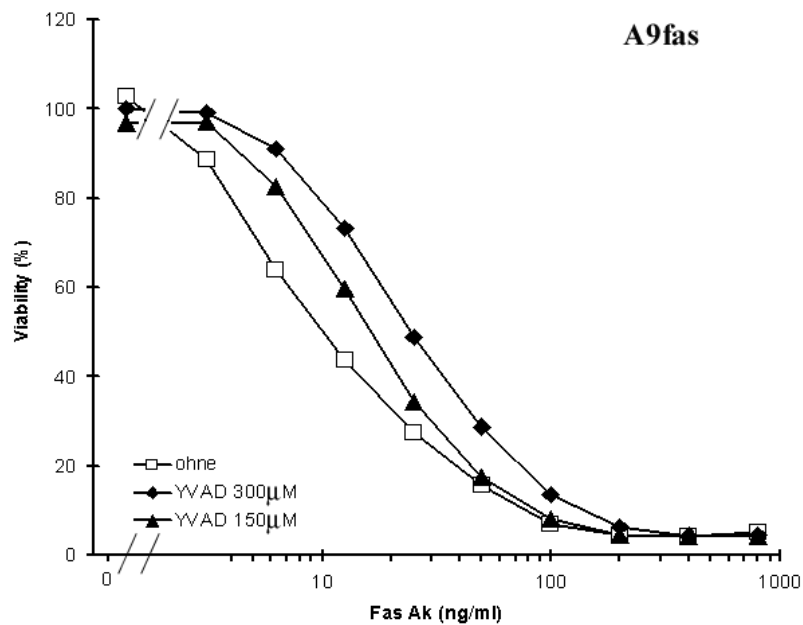


Abbildung 5-17: Hemmung der Fas-vermittelten Apoptose durch YVAD

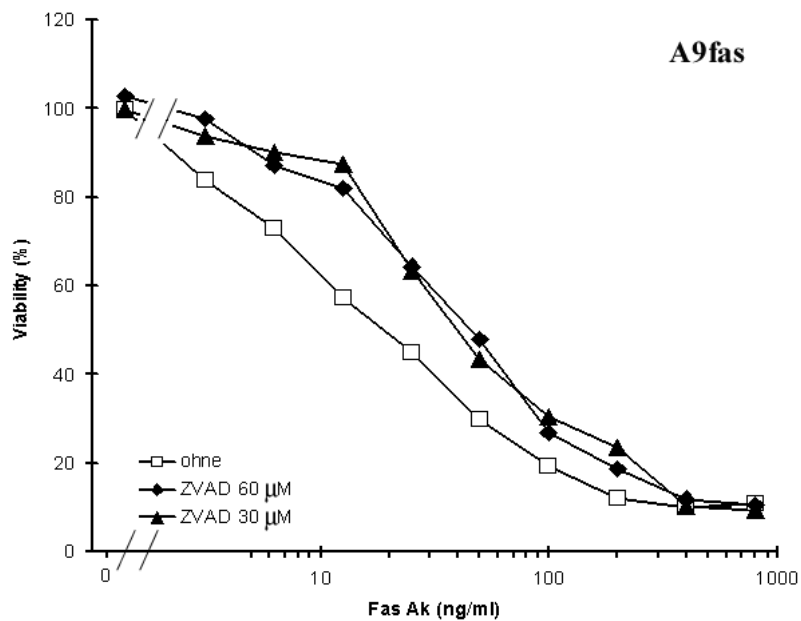


Abbildung 5-18: Hemmung der Fas-vermittelten Apoptose durch ZVAD

Abbildung 5-19 und Abbildung 5-20 zeigen gleiches Experiment nach Stimulation durch TNF. Entgegen den Erwartungen wird die TNF-vermittelte Apoptose durch diese Caspase-Inhibitoren nicht gehemmt, es kommt im Gegenteil sogar zu einer dosisabhängigen Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF: Der Abbildung 5-20 kann entnommen werden, dass eine Behandlung mit

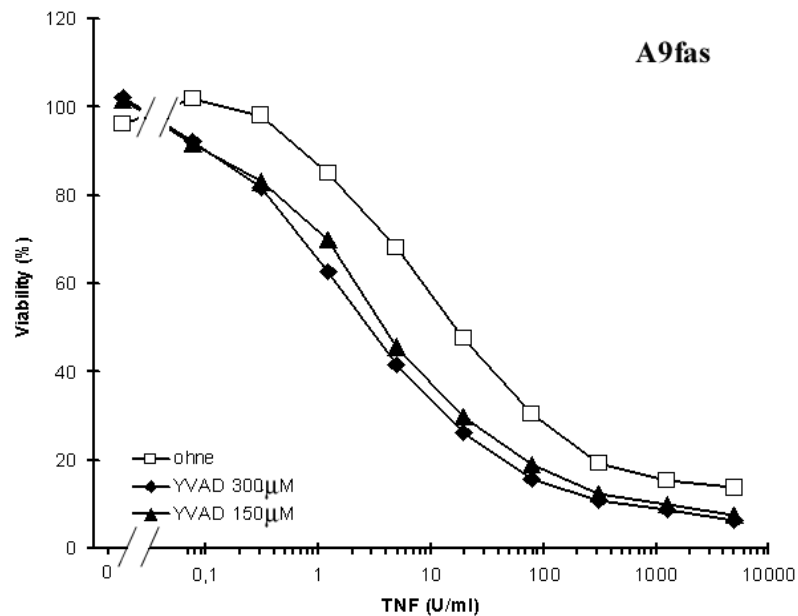


Abbildung 5-19: Hemmung der TNF-vermittelten Apoptose durch YVAD

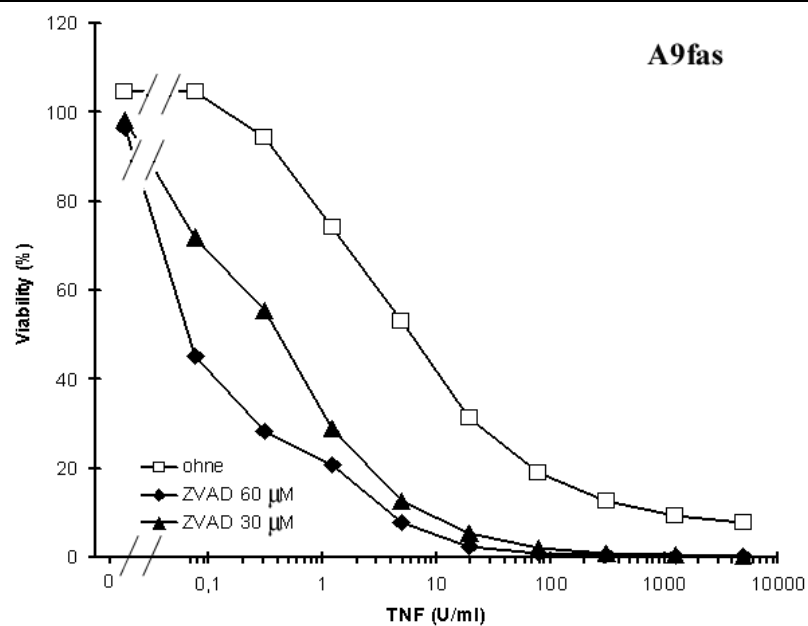


Abbildung 5-20: Hemmung der TNF-vermittelten Apoptose durch ZVAD

30 μ M ZVAD zu einer ca. 10 fachen Sensibilisierung der Zellen gegenüber der TNF-Konzentration führt, bei der 50% der Zellen absterben. Bei Behandlung mit 60 μ M ZVAD ist die Sensibilität nochmals deutlich erhöht.

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

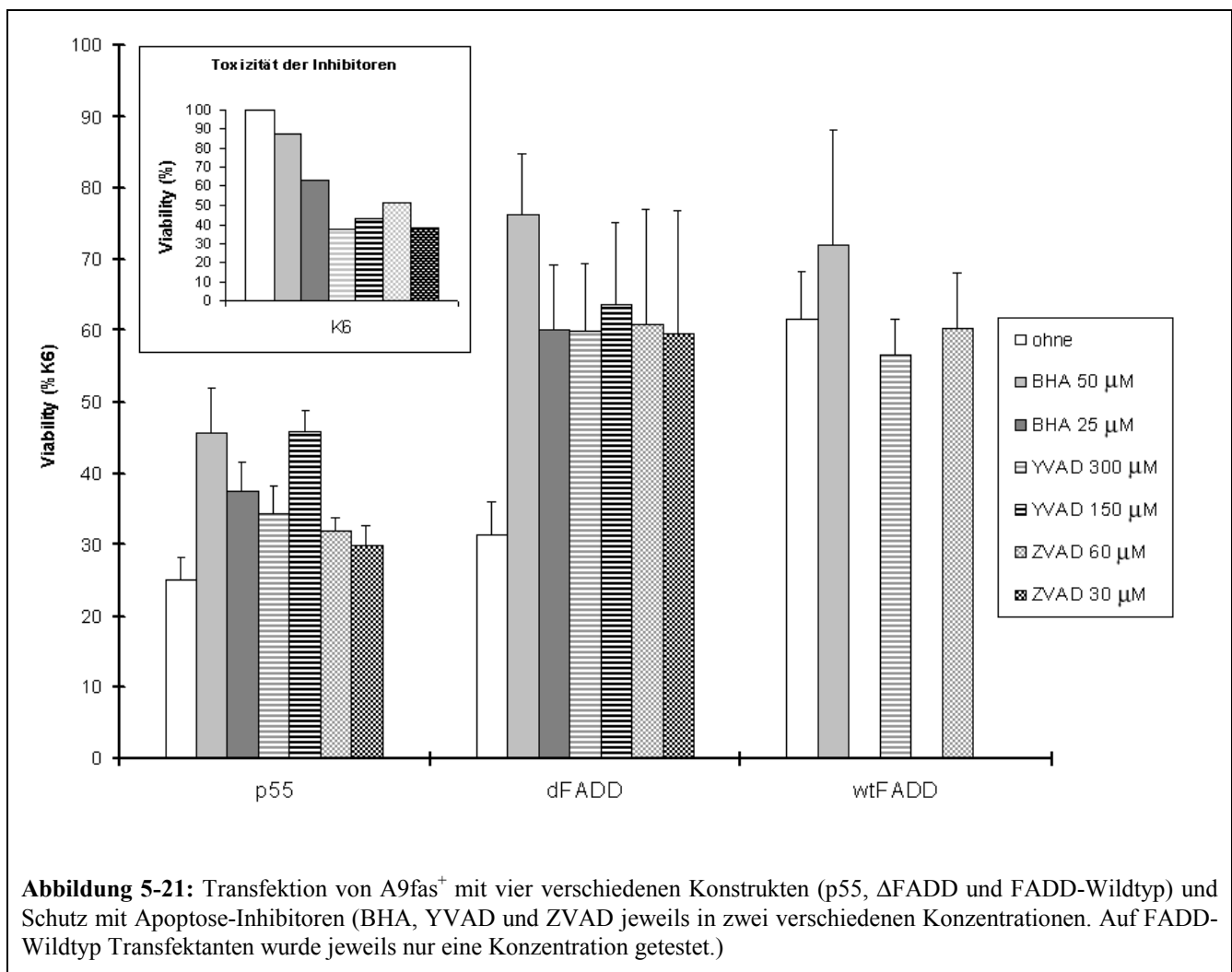
- BHA hemmt TNF-induzierte Apoptose (Abbildung 5-16), nicht aber Fas-induzierte (Abbildung 5-15)
- ZVAD und YVAD hemmen Fas-induzierte Apoptose (Abbildung 5-17 Abbildung 5-18), nicht aber TNF-induzierte (Abbildung 5-19 Abbildung 5-20)
- Diese Befunde zeigen eindeutig, dass ein Unterschied im Signalweg von Fas und TNF-Rezeptor besteht, der durch die derzeit postulierten Modelle der Ligandenaktivierung nicht zu erklären ist.

Mit diesen neuen Befunden ist ein weiteres Kriterium gegeben um genauer untersuchen zu können, wie Δ FADD das Zelltodsignal vermittelt. Ist die Δ FADD-vermittelte Toxizität durch BHA hemmbar, so spricht das für eine Aktivierung des in dieser Zelllinie benutzten Signalweges des TNFR1 (vgl. Abbildung 5-16, Abbildung 5-17), da nur TNF vermittelter Zelltod, nicht aber Fas vermittelter Zelltod gehemmt wird. Ist die Toxizität hingegen durch YVAD/ZVAD hemmbar so ähnelt der von Δ FADD vermittelte Effekt eher dem Fas-Signalweg (vgl. Abbildung 5-17 bis Abbildung 5-20), da diese Inhibitoren nur Fas vermittelten Zelltod, nicht aber TNF vermittelten Zelltod hemmen.

Zu diesem Zweck mussten Zellen transfiziert werden und während der Expression der verschiedenen Konstrukte mit den Inhibitoren behandelt werden. Dieses Experiment erwies sich als technisch sehr schwierig, da sich herausstellte, dass alle benutzten Inhibitoren mit zunehmender Inkubationszeit toxisch wirken. Der Konflikt besteht darin, dass die Inkubationszeit nicht beliebig verkürzt werden kann, da zum einen genügend Zeit zur Expression gegeben werden muss, zum anderen der inhibitorische Effekt möglichst mit Beginn der Expression einsetzen sollte. Das heißt, unter der Vorgabe minimaler Inkubationszeit um die Toxizität der Inhibitoren zu minimieren, muss ein Kompromiss zwischen genügend langer Expressionszeit und möglichst früh einsetzender Hemmung der Apoptose gefunden werden. Als geeigneter Kompromiss zwischen beiden Anforderungen ergab sich folgendes Vorgehen: die Zellen wurden nach Standardprotokoll transfiziert, und anschließend 8h in Standardmedium inkubiert. Daraufhin wurde das Medium

ersetzt und die verschiedenen Inhibitoren, bzw. Kontrollmedium ohne Wirkstoff zugegeben. Nach weiterer Inkubation über 17h erfolgte die Auswertung mittels CPRG-Assay. Die Ergebnisse aus über 300 einzelnen Transfektionen sind in Abbildung 5-21 dargestellt. Aufgetragen sind die Überlebensraten in Prozent im Vergleich zur Kontrolle, sowie eine Standardabweichung. Hierzu wurden die Zellen mit K6 als nichttoxischem Konstrukt transfiziert und genauso wie die anderen Transfektanten weiterbehandelt. Aus dem Insert in der Grafik lässt sich entnehmen, dass auch hier die eingesetzten Apoptose-Inhibitoren deutlich toxisch wirken. Bei der Auswertung wurde diejenige K6-Transfektante als 100% Bezugswert herangezogen, die mit derselben Konzentration des Inhibitors inkubiert wurde, wie die Transfektante deren Überlebensrate berechnet werden sollte.

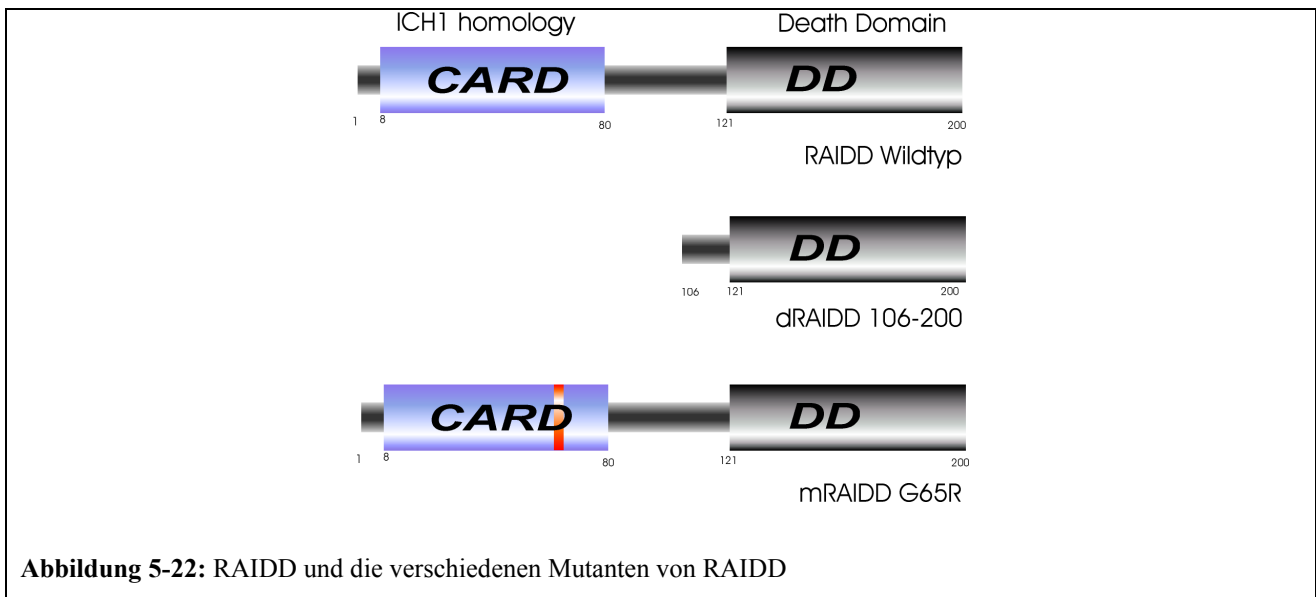
Es zeigen sich für die transfizierten Konstrukte ohne Hemmung ähnliche Toxizitäten, wie in Abbildung 5-11 dargestellt, was darauf hindeutet, dass Transfektion und Expression trotz veränderter Inkubationszeit ausreichend funktionierten. Auch hier zeigt p55 die höchste Toxizität, gefolgt von Δ FADD und wtFADD. Dem Diagramm zu entnehmen ist, dass BHA in der Lage ist Δ FADD



vermittelten Zelltod wirksam zu hemmen. Die Effekte von p55 und wtFADD hingegen können nicht oder nur sehr schwach blockiert werden. Eine Aussage über die Wirkung von ZVAD und YVAD ist aufgrund der hohen Eigentoxizität dieser Substanzen nur eingeschränkt möglich.

5.5 Klonierung von RAIDD, Δ RAIDD und RAIDDmut

Um zu untersuchen, ob Δ FADD über Rekrutierung anderer Death-Domain-Proteine Apoptose induziert, wurde die cDNA für RAIDD kloniert. Humane RAIDD cDNA (IMAGE I.D. 24032) kloniert in den Vektor Lafmid BA wurde käuflich erworben und nach Verifizierung durch Sequenzierung in den Vektor pBSIISK+ gemäß Standardprotokollen umklont. In diesem Vektor wurde eine



Punktmutation eingefügt, die zum Austausch der Aminosäure in Position 65 von G zu R führte (siehe Abbildung 5-22). Diese Aminosäure in der *Caspase-recruiting-domain* (CARD) ist als essentiell für die Ankoppelung von Caspasen beschrieben [167]. Das mutierte Insert wurde in den Vektor pcDNAHis umklont. Des weiteren wurde eine Deletionsmutante von RAIDD hergestellt. Dazu wurde das für die Aminosäuren 106-200 codierende Teilstück mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem Vektor pBSIISK+ herausgeschnitten und in den Vektor pcDNAHis3.1 eingefügt. Schließlich wurden alle neuen Konstrukte durch Sequenzierung überprüft. Die Proteine sind in Abbildung 5-22 dargestellt. Somit stehen zwei Konstrukte zur Verfügung, die RAIDD vermittelte Apoptose blockieren könnten. RAIDD als Wildtyp sollte wie beschrieben [166] nach Überexpression Apoptose induzieren.

Zunächst wurden die neuen Konstrukte in SV80 und A9 Zellen zur Expression gebracht und auf ihre Toxizität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-23 und Abbildung 5-24 dargestellt.

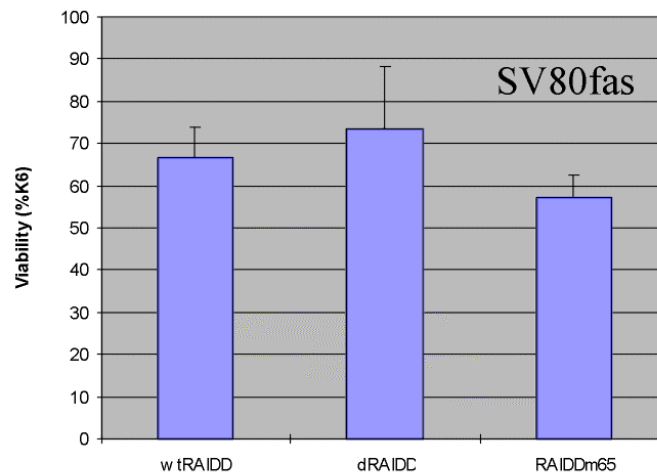


Abbildung 5-23: Toxizität der verschiedenen RAIDD Konstrukte in SV80fas⁺

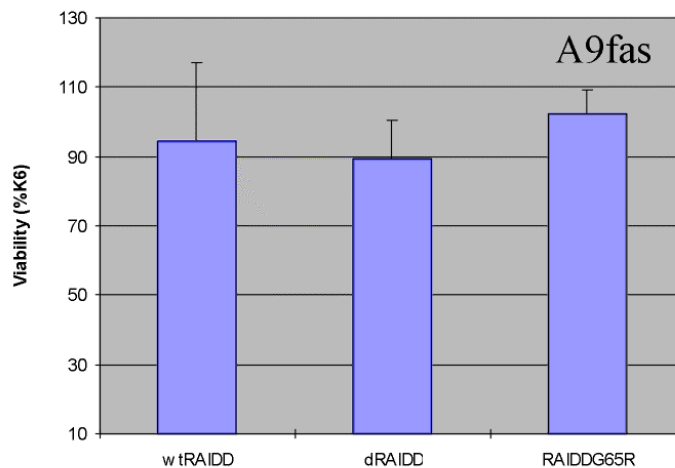


Abbildung 5-24: Toxizität der verschiedenen RAIDD Konstrukte in A9fas⁺

Keines der Konstrukte, auch nicht RAIDD-Wildtyp, erwies sich in den Experimenten als eindeutig toxisch, weder in SV80fas noch in A9fas. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass keines der RAIDD Konstrukte in der Lage ist nach Überexpression in SV80fas vor TNF oder Fas induzierter Apoptose zu schützen (vgl. Abbildung 5-25, Abbildung 5-26). Auch in A9fas lässt sich kein Schutz vor TNF oder Fas induzierter Apoptose nachweisen (vgl. Abbildung 5-28, Abbildung 5-27).

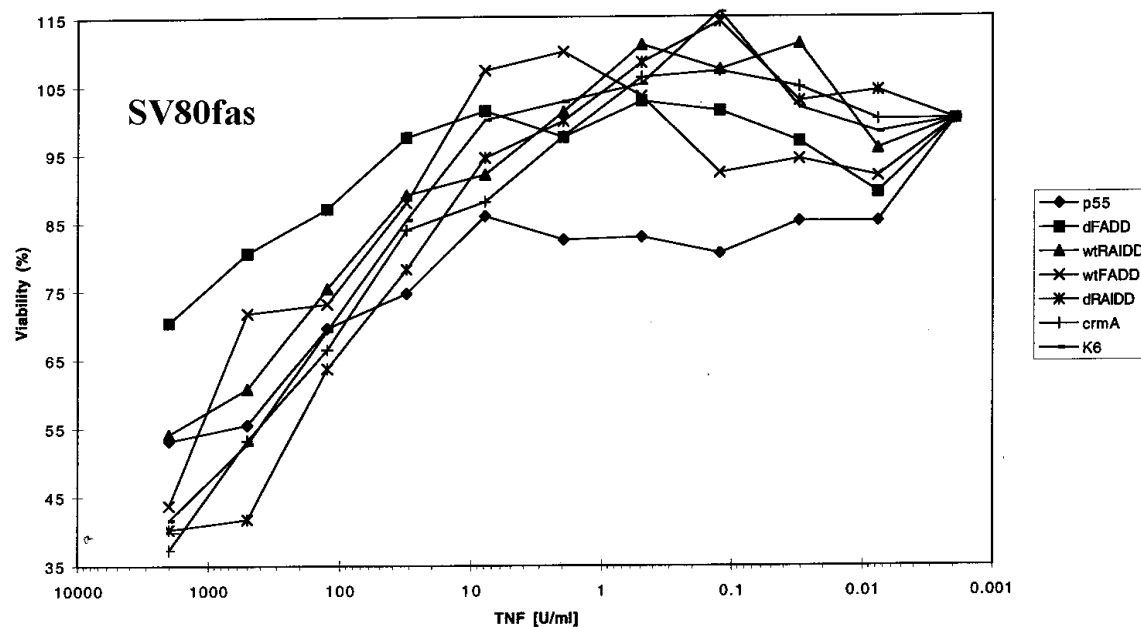


Abbildung 5-25: Stimulation verschiedener SV80 Transfektanten mit TNF.

Legende: p55 (◆), K6 (—), Δ FADD (■), wtFADD (×), wt RAIDD (▲), dRAIDD (✱), crmA (+)

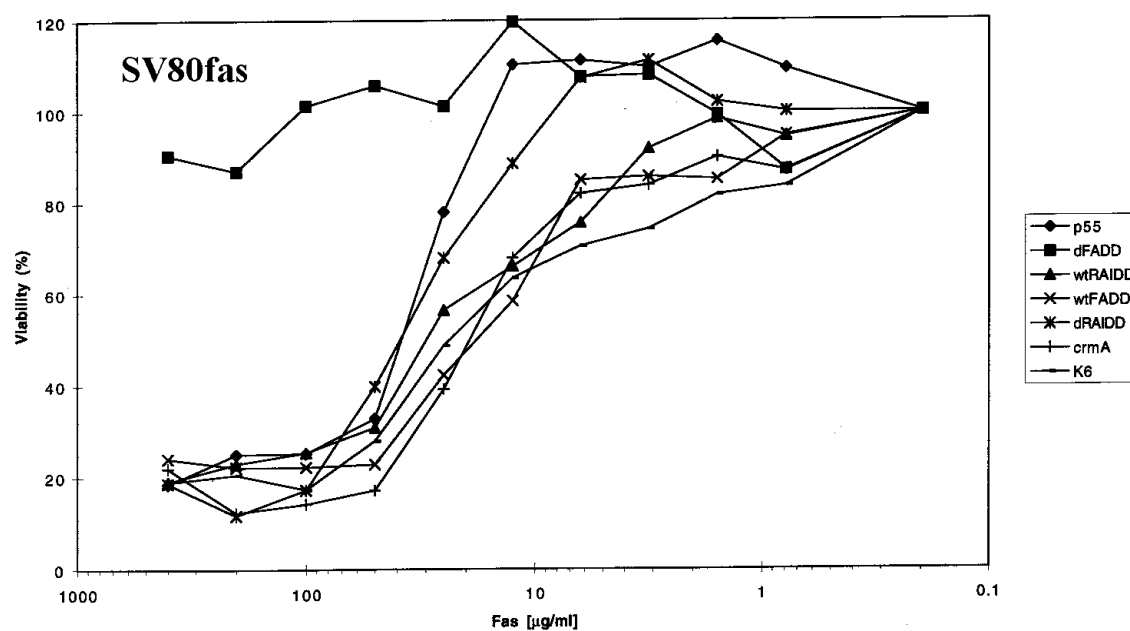


Abbildung 5-26: Stimulation verschiedener SV80 Transfektanten mit Fas.

Legende: p55 (◆), K6 (—), Δ FADD (■), wtFADD (×), wt RAIDD (▲), dRAIDD (✱), crmA (+)

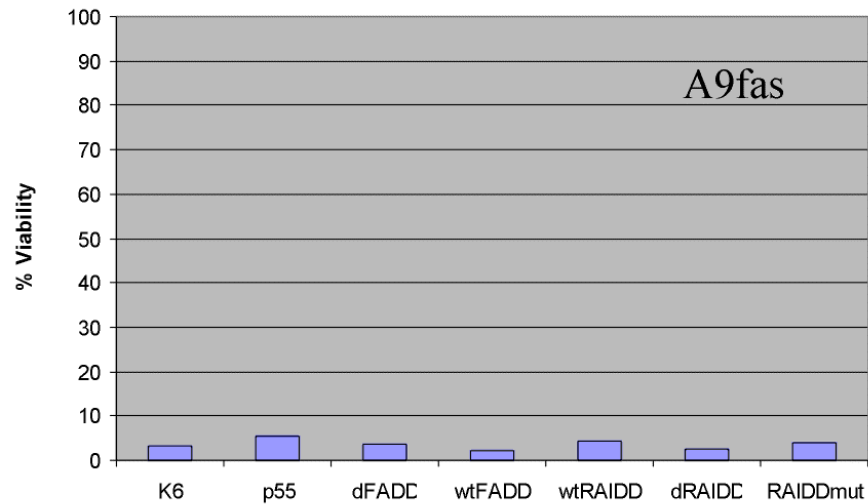


Abbildung 5-27: Stimulation verschiedener A9fas Transfektanten mit Fas

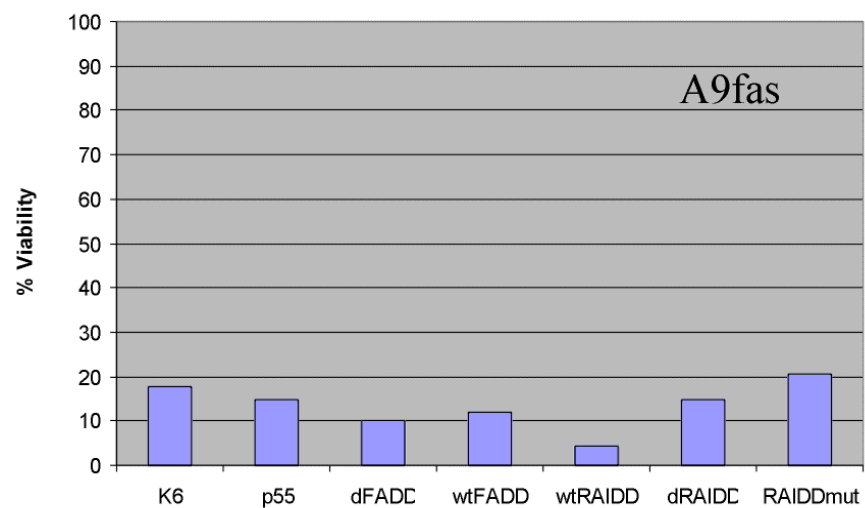


Abbildung 5-28: Stimulation verschiedener A9fas Transfektanten mit TNF

Im folgenden Experiment wurde Δ FADD zusammen mit den verschiedenen Mutanten von RAIDD – der Deletionsmutante Δ RAIDD und dem Konstrukt mit der Punktmutation RAIDDm65 - exprimiert. Es sollte untersucht werden, ob eine dieser Konstrukte von RAIDD in der Lage ist Zell-tod vermittelt durch Δ FADD, Wildtyp FADD oder p55 zu hemmen. Dazu wurden A9 Zellen jeweils

mit drei Konstrukten gleichzeitig transfiziert: zum einen β -Gal + Δ FADD + eine Mutante von RAIDD, zum anderen diente als nichttoxische Kontrolle β -Gal + K6 + CD14. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-29 dargestellt.

Es zeigte sich, dass weder RAIDD-Wildtyp noch eine der Mutanten in der Lage waren, die von FADD oder Δ FADD ausgehende Toxizität zu hemmen. Auch die durch Expression von p55 ausgelöste Toxizität konnte nicht gehemmt werden.

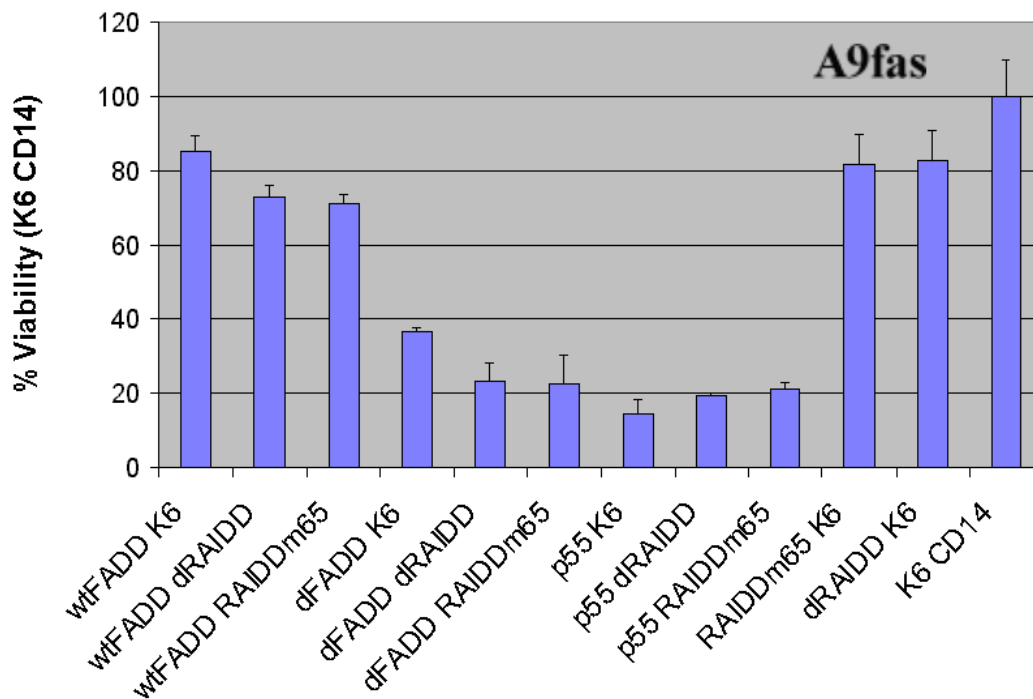


Abbildung 5-29: Coexpression von FADD, Δ FADD und p55 mit den zwei verschiedenen Mutanten von RAIDD in A9fas. Aufgetragen ist die relative Überlebensrate im Vergleich zu der nichttoxischen Kontrolle K6 + CD14.

5.6 Klonierung von crmA

CrmA ist ein Gen des Kuh-Pockenvirus, das nach Expression in Säugetierzellen Apoptose über Hemmung der Caspasen effektiv blockieren kann [174],[175-179]. Im folgenden sollte überprüft werden, ob crmA in der Lage ist, Δ FADD vermittelte Toxizität zu hemmen. CrmA in dem Vektor p1843 wurde von David J. Pickup, University of Durham, North Carolina, USA zur Verfügung gestellt. Zur Expression in A9 und SV80 Zellen wurde crmA in pcDNAHis umklont und anschließend durch Sequenzierung verifiziert. Es zeigte sich in einer Vielzahl von Transfektionsexperimenten, dass dieses Konstrukt nicht in der Lage ist Fas oder TNF vermittelte

Apoptose zu hemmen. In Experimenten zur Cotransfektion von Δ FADD und crmA konnte kein Effekt auf die Toxizität von Δ FADD nachgewiesen werden.

5.7 Messung der Caspase Aktivität

Die Caspase Aktivität sollte bestimmt werden, um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob Δ FADD über Aktivierung oder Hemmung eines Signalweges toxisch wirkt. Sollte Δ FADD einen apoptotischen Signalweg anstoßen, so müsste die Caspasenaktivität erhöht sein. Wirkt Δ FADD auf andere Weise toxisch, z.B. durch Blockierung eines Signalweges, dann müsste die Caspasenaktivität unverändert oder gar vermindert sein. Um dies zu überprüfen sollte die Caspasenaktivität in den verschiedenen Transfektanten gemessen werden.

Zunächst wurde die Caspasenaktivität nach Stimulation der nicht-transfizierten Zellen mit α Fas und TNF getestet. Abbildung 5-30 zeigt die Ergebnisse, dargestellt ist die relative Caspasenaktivität

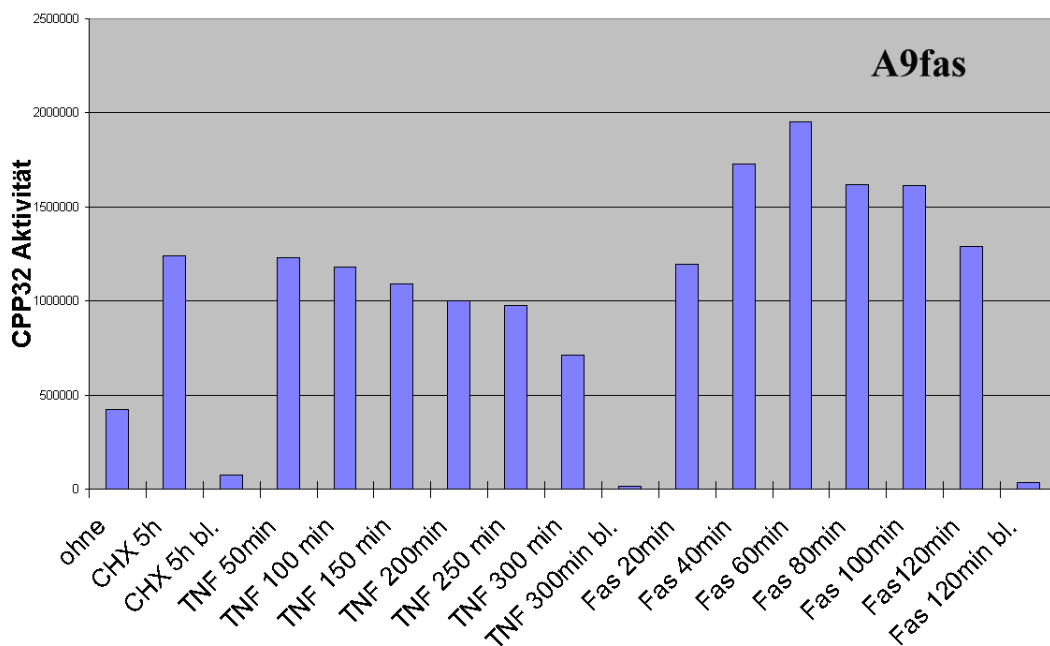


Abbildung 5-30: Caspasenaktivität in A9fas nach Stimulierung mit TNF und Fas. Ohne = ohne Stimulation, nur Medium, CHX = nur Cycloheximid, kein Stimulus, bl. = Aktivität durch DEVD-CHO blockiert. Aufgetragen ist die relative Caspasenaktivität.

der stimulierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Rezeptoraktivierung. Die Zellen wurden mit 5000U/ml TNF α bzw. 500ng/ml α Fas unter Cycloheximid stimuliert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen, die in normalem Medium wuchsen, sowie als Negativkontrolle Zell-Lysate,

die mit dem Caspaseinhibitor DEVD-CHO behandelt wurden. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Caspasenaktivität nach Stimulation von Fas. Nach Stimulation von TNFR1 kam es zu einer deutlich geringeren Aktivierung der Caspasen, vergleichbar etwa mit der, die allein durch Behandlung mit Cycloheximid hervorgerufen wird. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in SV80 Zellen gefunden.

In ähnlicher Weise sollte die Caspasenaktivität in den mit verschiedenen Konstrukten transfizierten Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen nach Standardprotokoll transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion die Zellen geerntet und der Assay zur Bestimmung der Caspasenaktivität durchgeführt. Um Schwankungen zu eliminieren, die durch gering unterschiedliche Zellzahlen bei den einzelnen Bestimmungen auftreten könnten wurde zunächst die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben mit Hilfe eines Bradford Assays bestimmt. Zur Auswertung wurden die einzelnen Messwerte auf einheitliche Proteinkonzentrationen bezogen.

Abbildung 5-31 zeigt die Ergebnisse verschiedener Transfektionen. Dargestellt ist die relative Caspasenaktivität bezogen auf einheitliche Proteinkonzentrationen für die einzelnen transfizierten Konstrukte, gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion. Durch dieses Experiment sollte der optimale Zeitpunkt nach Transfektion zur Messung der Caspasenaktivität ermittelt werden. Man sieht, dass zu frühen Zeitpunkten nach Transfektion eine bei allen Transfektanten er-

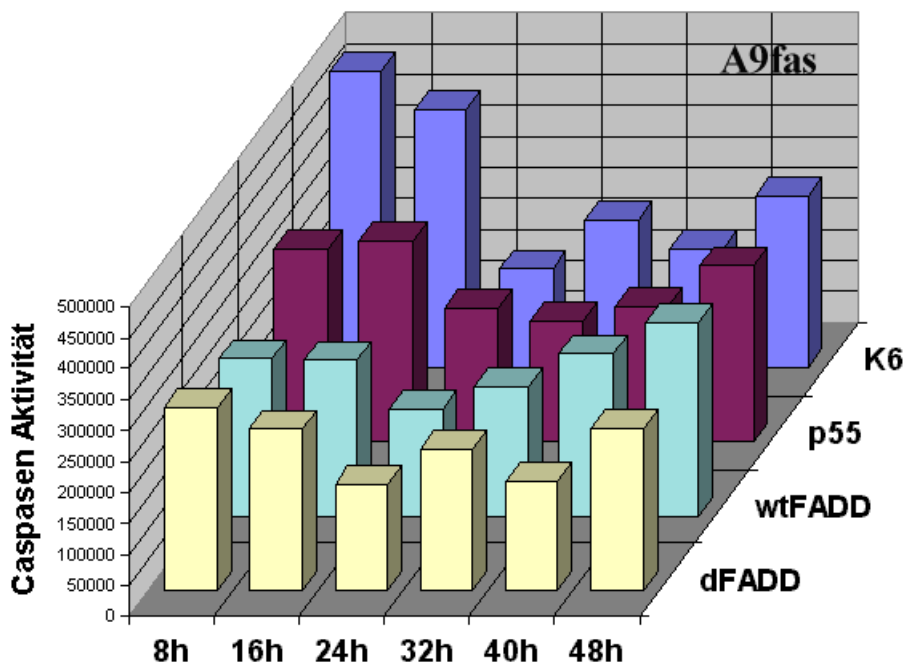


Abbildung 5-31: Caspasenaktivität der A9fas⁺ Transfektanten zu verschiedenen Zeiten nach Transfektion

höhte Caspasenaktivität zu beobachten ist. Darauf schließt sich bei allen Transfektanten eine Abnahme der Aktivität an, gefolgt von einem geringem Anstieg der Aktivität zu späten Zeiten nach Transfektion. Ein eindeutiger Unterschied zwischen den einzelnen Transfektanten konnte zu keiner Zeit beobachtet werden.

Abbildung 5-32 zeigt die Auswertung mehrerer Transfektionen mit anschließender Messung der Caspasenaktivität. Um unterschiedliche Messungen vergleichen zu können, wurde die Caspasenaktivität auf den jeweiligen Wert der K6 Kontrolle bezogen. Ein eindeutiger Effekt der transfizierten Konstrukte auf die Caspasenaktivität konnte hier nicht nachgewiesen werden.

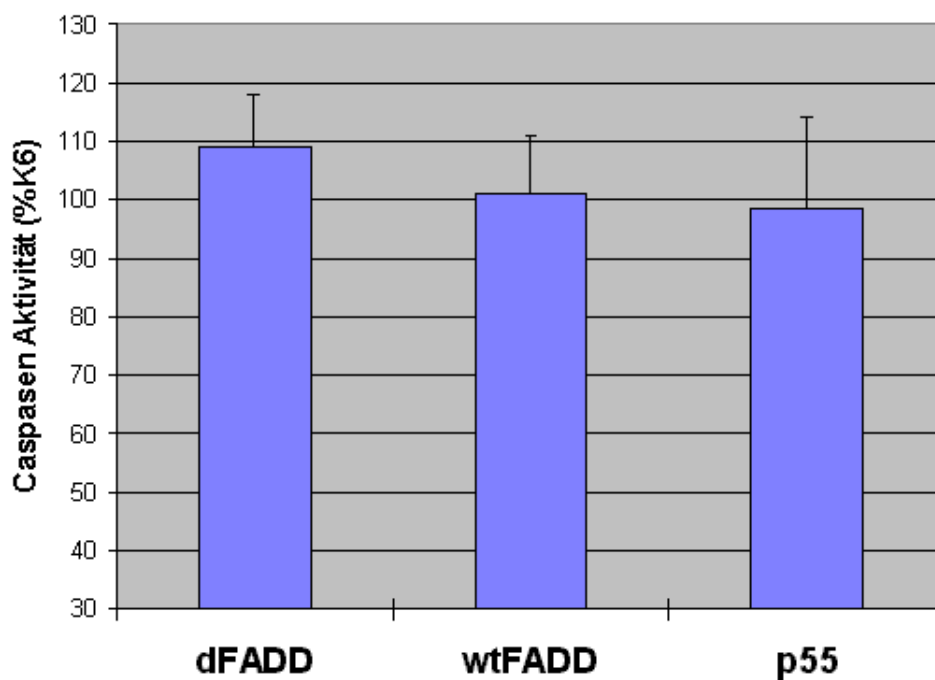
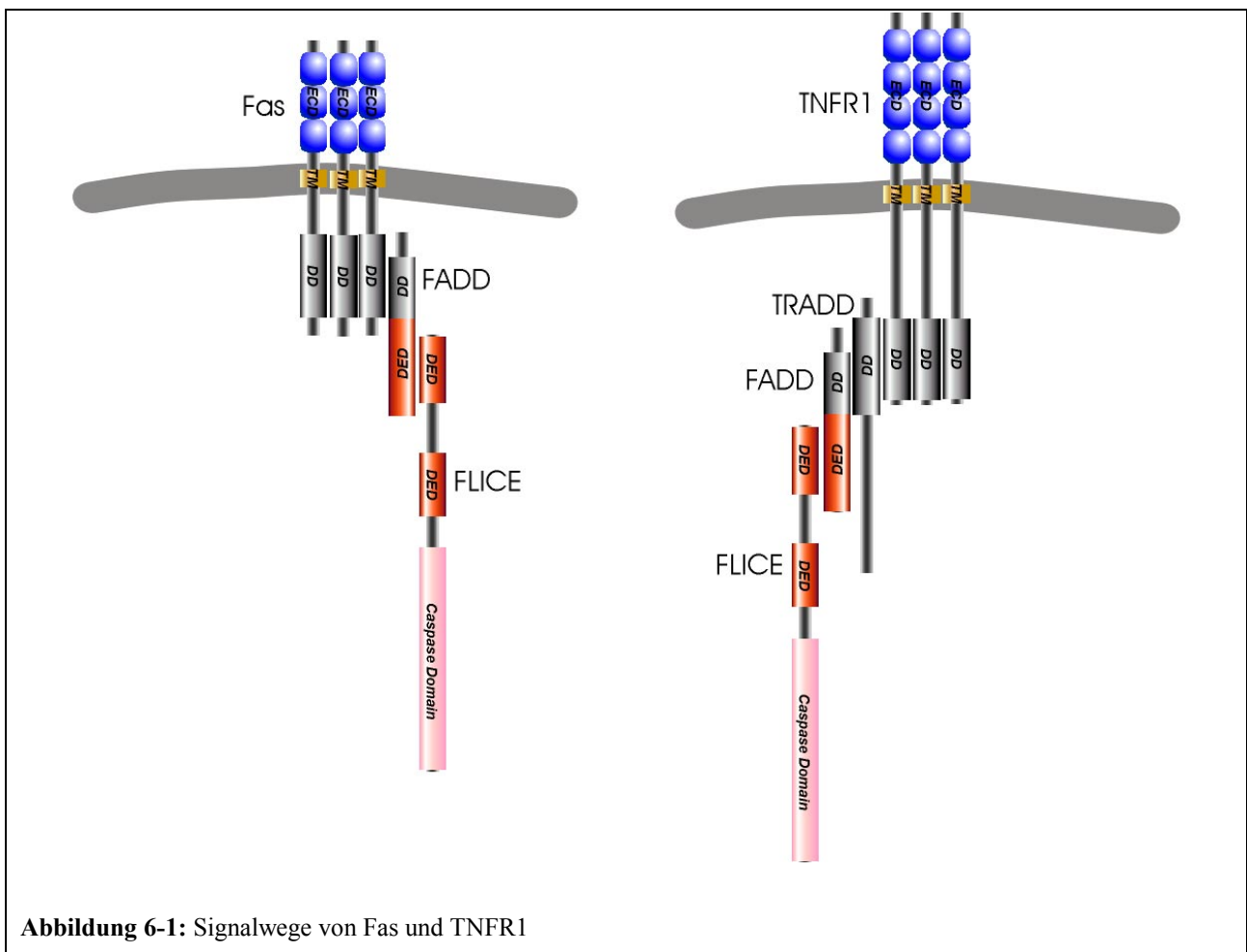


Abbildung 5-32: Caspasenaktivität in A9fas Transfektanten

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Signalweg der beiden Zelltodrezeptoren TNF-Rezeptor1 und Fas in verschiedenen Zelllinien untersucht.

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits zwei Signalwege von TNF und Fas beschrieben worden. Beide Rezeptoren benutzen in diesem Modell Adapterproteine, die das Signal weitergeben, wobei sich der Apoptosesignalweg nur um das von p55TNFR benutzte TRADD unterschied.. Bei beiden Rezeptoren ist FADD als gemeinsames Signalprotein im Signalweg gekoppelt (Abbildung 6-1).



Voruntersuchungen zeigten, dass in A9 Zellen TNF induzierter Zelltod im Gegensatz zu Fas vermitteltem Zelltod durch bestimmte mitochondriale Inhibitoren hemmbar ist (vgl. Abbildung 2-1) [154].

Es sollte deshalb untersucht werden, ob in A9 Zellen ein von FADD unabhängiger Signalweg besteht. Dazu wurde das neu beschriebene Protein FADD kloniert, und eine Mutante hergestellt welche nur noch aus der „Death Domain“ besteht und den Signalweg auf eine dominant negative Weise unterbrechen kann.

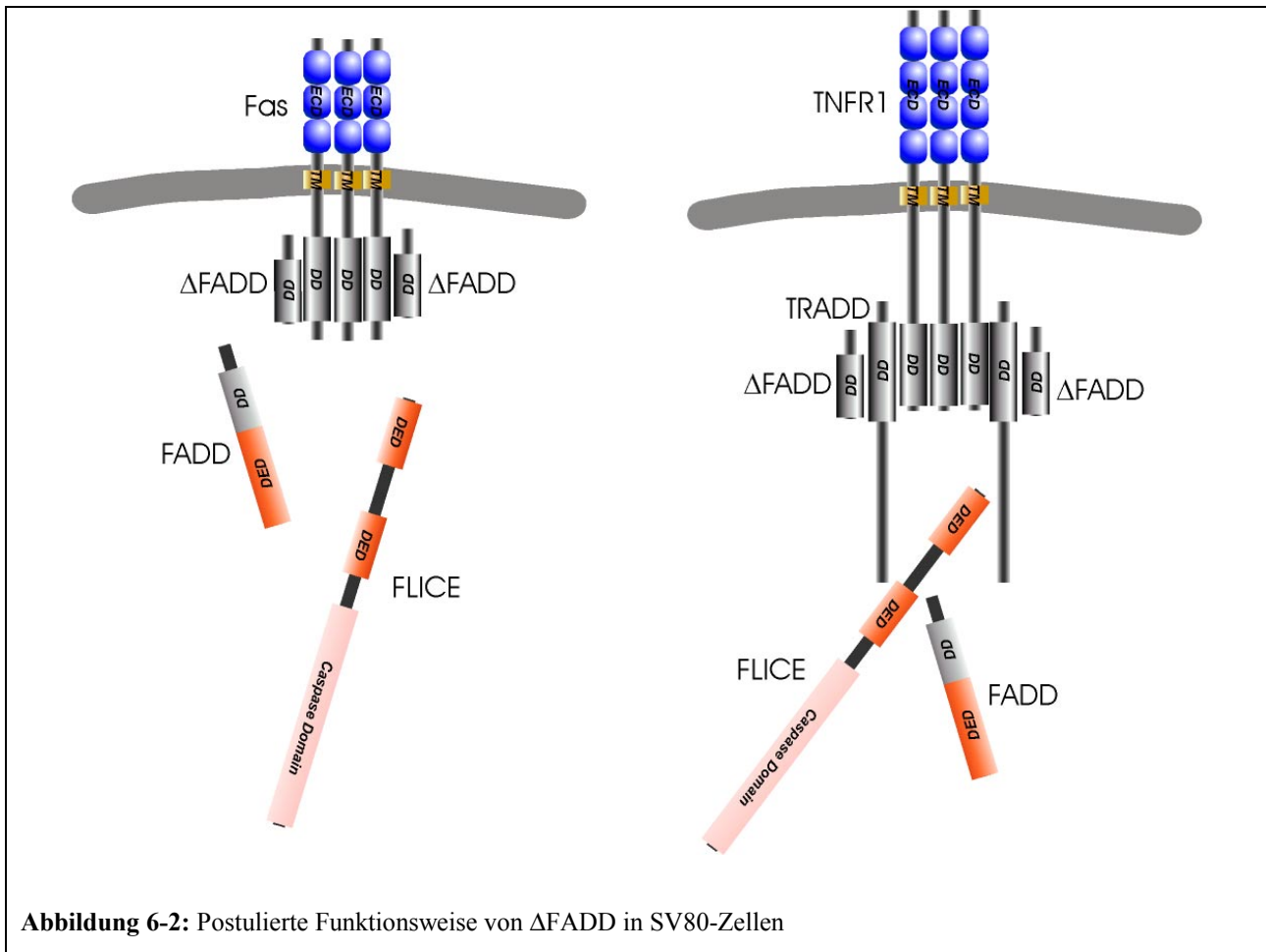


Abbildung 6-2: Postulierte Funktionsweise von Δ FADD in SV80-Zellen

Die Funktion der beiden Konstrukte konnte nach transients Transfektion in SV80 Zellen überprüft werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Death Domain von FADD die Bindung des Proteins an den Rezeptor vermittelt. Alleinige Expression dieser Domäne (als Δ FADD) sättigt die an dem Rezeptor vorhandenen Bindungen ab und blockiert damit den Rezeptor. Aktivierung des Rezeptors durch Ligandbindung kann nun keine Apoptose mehr auslösen (Abbildung 6-2). Diese Mutante wirkt also in einer dominant negativen Weise auf den Signalweg. Wird hingegen das gesamte FADD Molekül exprimiert, kommt es auch ohne Rezeptoraktivierung zum Zelltod. Die zweite funktionelle Domäne von FADD, die „Death Effektor Domain“ ist offensichtlich verantwortlich für die Auslösung des Zelltodsignals. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es Zellen gibt, in denen Fas und TNFR1 tatsächlich einen weitgehend identischen intrazellulären Signalweg benutzen, der FADD als Signalmolekül einbezieht.

In gleicher Weise sollte nun überprüft werden, ob einer der beiden Zelltodwege in A9-Zellen FADD als Signalmolekül benutzt. Dazu sollte nur die „Death Domain“ von FADD (entspricht Δ FADD) in A9-Zellen exprimiert werden, und untersucht werden welcher der beiden Rezeptoren dadurch blockiert werden kann. Es zeigte sich, dass in A9 Zellen die alleinige Expression der FADD „Death Domain“ Zelltod auslöste. Dieses Ergebnis war unerwartet und konnte mit den

bisherigen Vorstellungen über die Signalvermittlung nicht erklärt werden. Die ursprüngliche Frage, ob die Blockierung des FADD Signalwegs zur Hemmung der Apoptose führt, lässt sich nicht beantworten, wenn Δ FADD als Konstrukt zur Blockierung des Zelltodsignalwegs selbst Zelltod auslöst. Aus dieser neuen Situation ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. bewirkt Δ FADD über Rekrutierung anderer Death-Domain-Proteine eine Auslösung der Apoptose?
2. kann die Toxizität von Δ FADD mit Hemmstoffen der Apoptose blockiert werden?
3. besteht ein Unterschied in der Art des Zelltodes der durch Fas, TNFR1 oder Expression von Δ FADD ausgelöst wird?

6.1 Kann Δ FADD über Rekrutierung anderer Death-Domain-Proteine Apoptose auslösen?

Eine mögliche Erklärung der Toxizität von Δ FADD ist, dass die Signalweitergabe in A9 Zellen nicht allein von FADD abhängig ist. Das Signal könnte über andere Proteine weitergegeben werden, die auch über eine Death Domain an den Rezeptor binden. Ein solches Molekül ist RAIDD. Es besitzt eine Death Domain und eine weitere Domäne, die direkt Caspasen aktivieren kann. Es ist vorstellbar, dass Δ FADD nach Expression an den Rezeptor bindet, aber nicht die Rekrutierung von RAIDD verhindert, sondern durch Komplexierung mehrerer Rezeptoren sogar erst die Bindung und Aktivierung von RAIDD möglich macht. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurde RAIDD kloniert und verschiedene Mutanten hergestellt, die eine intakte Death Domain besitzen, aber Defekte in derjenigen Domäne besitzen welche die Caspasen aktiviert. Werden nun Δ FADD und diese Mutanten von RAIDD zusammen exprimiert, sollte die Möglichkeit ausgeschlossen sein, dass Δ FADD über Rekrutierung von RAIDD Zelltod auslöst. In Experimenten in denen beide Deletionsmutanten exprimiert wurden zeigte sich eine unverändert hohe Zelltodrate, wie sie auch nach alleiniger Expression von Δ FADD zu beobachten war. Diese Ergebnisse könnten gegen eine Beteiligung von RAIDD an dem Δ FADD-vermittelten Zelltod sprechen. Es könnte angemerkt werden, dass es nicht gewährleistet sei, dass Δ FADD und die RAIDD-Mutanten zur gleichen Zeit und in gleicher Menge exprimiert werden. Δ FADD könnte nach Transfektion noch vor RAIDD exprimiert werden, und so ungehindert den toxischen Effekt ausüben. Denkbar ist auch, dass Δ FADD in wesentlich höherem Maß exprimiert wird als die RAIDD Mutanten, und dadurch der Schutz der RAIDD-Mutanten ungenügend ist. Gegen diese Überlegung spricht jedoch, dass beide

Gene in den selben Expressionsvektor kloniert wurden, was eine vergleichbar hohe Expressionsrate ermöglicht. Des weiteren zeigten die Experimente, dass auch die alleinige Expression von RAIDD als Wildtyp keinen Zelltod auslösen kann. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse gegen eine Beteiligung von RAIDD bei der Weitergabe eines Zelltodsignals in A9-Zellen.

6.2 Kann die Toxizität von Δ FADD mit Hemmstoffen der Apoptose blockiert werden?

Es stellt sich die Frage ob der Effekt, den Δ FADD in A9 Zellen vermittelt durch Aktivierung der Apoptose-Maschinerie, d.h. der Caspasen, erfolgt, oder über andere, nicht näher bekannte Mechanismen. Deshalb wurde versucht, den von Δ FADD ausgelösten Zelltod durch Hemmstoffe der Apoptose zu unterbinden. Dazu wurde der in späten Phasen des Zelltodprogramms eingreifende Hemmstoff BHA, sowie die Caspase-Inhibitoren YVAD und ZVAD eingesetzt um die Apoptose in frühen Stadien zu unterbrechen.

Die zelltodvermittelnde Wirkung von Δ FADD ließ sich in Experimenten durch BHA teilweise blockieren, die Wirkung des intakten Moleküls FADD hingegen ließ sich kaum durch BHA hemmen. Vergleichbar dazu konnte beobachtet werden, dass TNF-induzierter Zelltod, nicht aber Fas-induzierter Zelltod durch BHA gehemmt wurde. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass Δ FADD und FADD das Zelltodsignal über unterschiedliche Wege vermitteln.

Eine längere Inkubation der mit FADD oder Δ FADD transfizierten Zellen mit den Caspase-Inhibitoren YVAD und ZVAD führte per se zum Zelltod. Eine Aussage über die Wirkung auf den von FADD oder Δ FADD vermittelten Zelltod lässt sich aus diesen Experimenten nicht machen.

Es zeigte sich, dass die Caspase-Inhibitoren YVAD und ZVAD in A9-Mausfibroblasten nur schwach gegen Fas induzierte Apoptose schützen und für TNF induzierte Apoptose sogar sensibilisieren. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den Befunden von Vercammen et al. 1998 [180], die zeigen konnten, dass ZVAD-fmk in der Mausfibroblasten Zelllinie L929 die Sensibilität gegenüber TNF-induzierter Apoptose steigert, sowie mit Befunden Lüschen et al. in NIH3T3 Zellen und von Hueber et al. [181, 182]. Bei längerer Inkubation können diese Inhibitoren sogar ohne Stimulus Zelltod auslösen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass aktivierte Caspasen für das Überleben bestimmter Zellen von Bedeutung sein können, was auch Untersuchungen von Boone et al. zeigen [183]. Sie stellten die Hypothese auf, dass Caspasen an einem Überwachungssystem für beschädigte Mitochondrien [184] beteiligt sind. Fällt diese Überwachungsfunktion durch Blockade

der Caspasen weg, könnten sich beschädigte Mitochondrien durch Freisetzung freier Sauerstoffradikale in einem selbstverstärkendem Mechanismus ansammeln. Weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Hemmung von Caspasen zu erhöhter Bildung von Sauerstoffradikalen und so zum Zelltod führt [180, 185]. Drosin et al. konnten inzwischen eine Caspase identifizieren, die ein antiapoptotisches Signal vermittelt [186].

Des weitem liegt die Vermutung nahe, dass Fas und TNFR in A9 Zellen das apoptotische Signal über unterschiedliche Mechanismen vermitteln, wobei TNFR möglicherweise einen bisher unbekannten Signalweg benutzt, der caspasenunabhängig ist.

6.3 Besteht ein Unterschied in der Art des Zelltodes der durch Fas, TNFR1 oder Expression von Δ FADD ausgelöst wird?

Es wird postuliert, dass die beiden Rezeptoren unterschiedliche Zelltodprogramme aktivieren. Vercammen et al. [185] beschreiben die Morphologie der sterbenden Zellen in L929-Zellen nach Stimulation von Fas oder TNFR1. Sie konnten zeigen, dass der Zelltod ausgelöst über TNFR1 die Charakteristika der Nekrose aufweist, wohingegen Fas induzierter Zelltod die klassischen Merkmale der Apoptose zeigt. Die intrazellulären Veränderungen, die zur Nekrose führen sind gegenwärtig noch schlecht verstanden. Leist et al. [187] schlugen ein Model vor, nach dem niedrige intrazelluläre ATP Konzentrationen den nekrotischen Zelltod fördern, wogegen bei hohen ATP Konzentrationen der apoptotische, caspasenabhängige Signalweg bevorzugt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien eine entscheidende Rolle im nekrotischen Prozess spielen. So schützt das Entfernen der Mitochondrien L929 Zellen vor nekrotischem Zelltod [188]. Die Aktivierung des TNF Rezeptors führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale aus Mitochondrien [189]. BHA kann diesen Prozess unterbinden und so TNF abhängigen Zelltod verhindern [189]. Dies ist mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen konsistent, dass BHA vor TNF induziertem Zelltod schützt, nicht aber vor Fas induziertem Zelltod.

Um zusätzliche Unterschiede in den Zelltodprogrammen, die über Fas, TNFR1 oder Expression von Δ FADD ausgelöst werden zu untersuchen wurde die Rolle der Caspasen weiter untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Caspasenaktivität nach Stimulation von Fas deutlich ansteigt, nach Stimulation mit TNF jedoch deutlich weniger, vergleichbar mit dem Anstieg, der durch alleinige Behandlung mit Cycloheximid erreicht werden kann, wie auch Vercammen et al.

[185] zeigen konnten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der TNF vermittelte Zelltod in A9, anders als Fas vermittelter, ohne zusätzliche Caspasenaktivierung abläuft.

Um die Rolle aktivierter Caspasen bei FADD induziertem Zelltod genauer zu untersuchen, wurde die Caspasenaktivität nach Transfektion mit Δ FADD und FADD gemessen. Eine Veränderung der Caspasenaktivität nach Transfektion mit Δ FADD und FADD konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass nach Transfektion die Expression in den einzelnen Zellen zu unterschiedlichen Zeiten startet. Wird zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Transfektion die Caspasenaktivität bestimmt, kann man keine einheitliche Tendenz feststellen, da sich viele Zellen in unterschiedlichen Stadien der Apoptose befinden und dadurch Veränderungen in der Caspasenaktivität gemittelt werden. Ergebnisse von Boone et al. [183] legen jedoch nahe, dass FADD mit intakter DED einen caspasenabhängigen Zelltodweg auslöst, Δ FADD dagegen einen caspasenunabhängigen.

Zusammenfassend lassen sich aus dieser Arbeit folgende Unterschiede in den Zelltodprogrammen festhalten, die auch durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen gestützt werden:

- BHA ist in der Lage Zelltod zu hemmen, der über den TNF Rezeptor ausgelöst wurde. TNF induzierter Zelltod ist also auf eine intakte mitochondriale Funktion angewiesen. Er geht nicht mit einer erhöhten Caspasenaktivität einher.
- BHA ist nicht in der Lage Zelltod zu hemmen, der über Fas ausgelöst wurde. Fas Zelltod ist somit unabhängig von intakter mitochondrialer Funktion. Er geht mit erhöhter Caspasenaktivität einher.
- BHA ist in der Lage Zelltod zu hemmen, der durch Expression von Δ FADD ausgelöst wurde. Δ FADD induzierter Zelltod ist also, wie TNFR induzierter Zelltod auf eine intakte mitochondriale Funktion angewiesen.
- BHA nicht ist in der Lage Zelltod zu hemmen, der durch Expression von FADD ausgelöst wurde. FADD induzierter Zelltod ist also, wie Fas induzierter Zelltod nicht auf eine intakte mitochondriale Funktion angewiesen

Die Befunde sprechen dafür, dass Δ FADD und FADD über unterschiedliche Wege Zelltod auslösen, wobei der Δ FADD vermittelte Zelltod ein ähnliches Muster bei der Hemmbarkeit zeigt wie Zelltod ausgelöst durch TNF.

TNF und Fas vermitteln in A9 Fibroblasten das apoptotische Signal über unterschiedliche Mechanismen. Fas benötigt zur Auslösung der Apoptose aktivierte Caspasen. Der Signalweg von TNF ist unabhängig von aktivierten Caspasen. In keinem der Signalwege ist RAIDD involviert.

Δ FADD und FADD können in A9 Zellen Zelltod auslösen. Dabei ist der Signalweg, der durch die beiden Proteine angestoßen wird unterschiedlich. Δ FADD scheint nicht über die Aktivierung von Caspasen Zelltod auszulösen. Die „Death Domain“ von FADD alleine ist also in der Lage einen bisher unbekannten Signalweg eines Zelltodprogramms zu aktivieren, der unabhängig von Caspasen ist.

Aus diesen Ergebnissen kann ein hypothetisches Model zur Signaltransduktion in A9 Zellen erstellt werden (vgl. Abbildung 6-3). Demnach können via Fas zwei verschiedene Zelltodprogramme gestartet werden. Einerseits ein Weg, der vermutlich über Rekrutierung von FADD Caspasen aktiviert und zu den morphologischen Veränderungen der Apoptose führt. Andererseits ein von Caspasen unabhängiger Weg, der über Veränderungen in den Mitochondrien zu Freisetzung von Sauerstoffradikalen und daraufhin zu den morphologischen Veränderungen der Nekrose führt. Die Entscheidung, welche der beiden Programme abläuft hängt von der Aktivierung von Caspasen und deren Rekrutierung an den Signalkomplex ab. Wird die Rekrutierung von Caspase-8 an den aktivierten Fas Rezeptorkomplex durch Δ FADD gehemmt, kann der nekrotische Signalweg gestartet werden [183]. Eine Bifurkation in einen nekrotischen und einen apoptotischen Signalweg scheint also auf Ebene von FADD zu existieren.

Der in A9 Zellen von TNFR1 aktivierte Signalweg ist unabhängig von einer Caspasenaktivierung. Er ist dagegen auf die Generierung von freien Radikalen in den Mitochondrien angewiesen, die durch BHA blockiert werden kann. Ob bei diesem Signalweg FADD beteiligt ist, kann nicht sicher beurteilt werden. Für eine Beteiligung von FADD am TNFR Signalweg spricht die Tatsache, dass TNF induzierter Zelltod durch ZVAD deutlich gefördert werden kann und die Produktion von freien Sauerstoffradikalen deutlich ansteigt [183]. Demnach wird der antinekrotische Effekt von Caspase-8, die sich im aktivierten Rezeptorkomplex zusammen mit FADD befindet durch ZVAD gehemmt. Durch Wegfall der Hemmung von Caspase-8 auf den nekrotischen Signalweg, kann dieser effektiver ausgeführt werden [183], was zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber TNF führt.

Wie das nekrotische Signal über TNFR und FADD weitergegeben wird ist derzeit ebenso unklar, wie die genaue Rolle, die Caspasen bei der Steuerung des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes spielen.

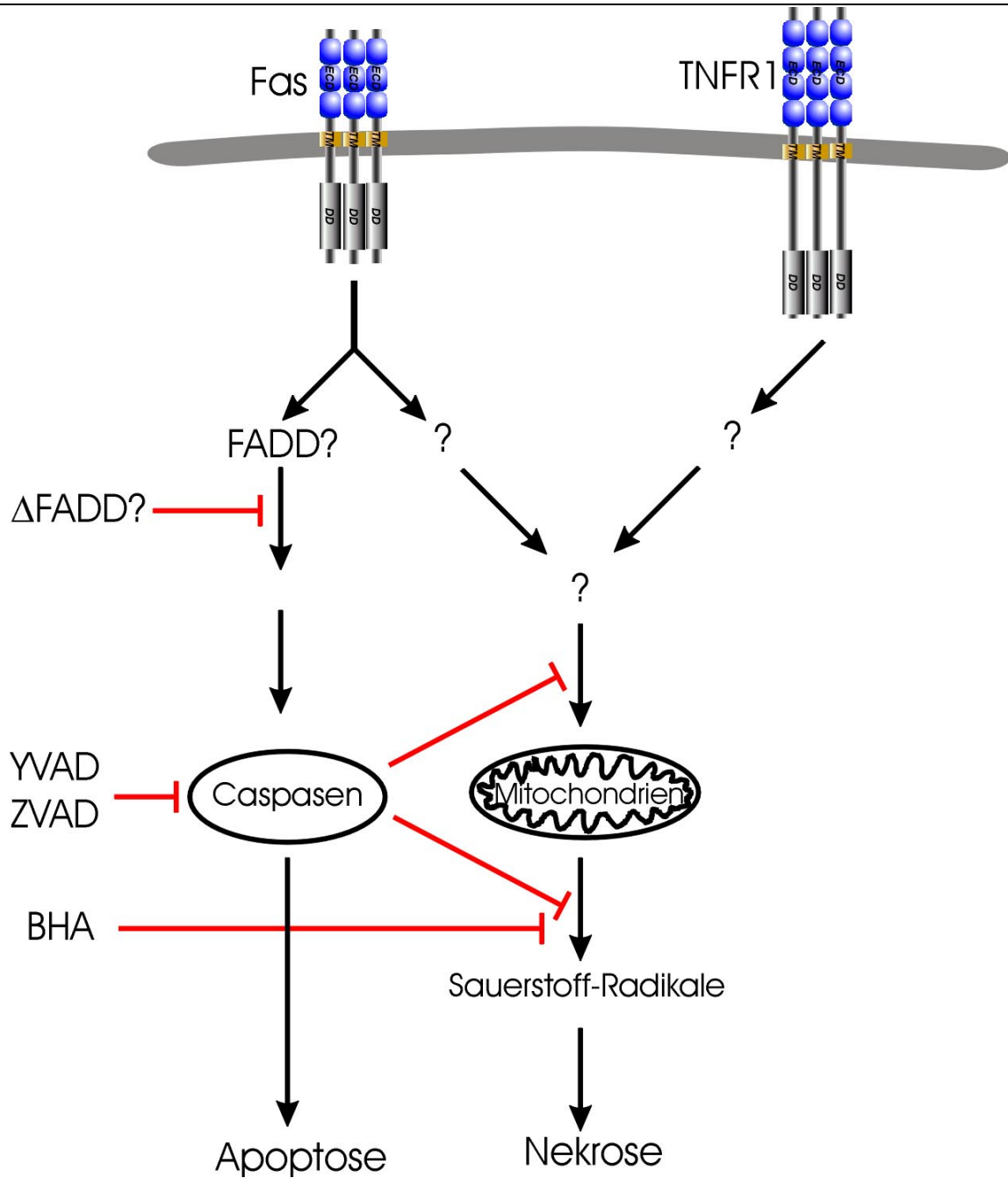


Abbildung 6-3: Schema einer potentiellen Signaltransduktion in A9. Erläuterungen siehe Text.

7 Anhang

7.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, auf welchem Wege die beiden Zelltodrezeptoren TNFR1 und Fas Apoptose in den Zelllinien A9 und SV80 ausführen. Ausgangspunkt waren widersprüchliche Erkenntnisse über die Signalwege von TNFR1 und Fas. So war in der Literatur beschrieben, daß TNFR1 und Fas die gleichen intrazellulären Signalmoleküle benutzen um Apoptose auszulösen. Als diese Signalmoleküle wurden FADD, TRADD und FLICE identifiziert. Ergebnisse aus unserem Labor zeigten jedoch auf, daß in A9 Zellen der durch Fas oder TNFR1 ausgelöste Zelltod unterschiedliche Signalwege beschreiten musste, da sich der durch TNFR1 ausgelöste Zelltod bezüglich der Hemmbarkeit durch verschiedene Inhibitoren der Apoptose deutlich von dem durch Fas ausgelösten Zelltod unterschied.

Es sollte untersucht werden, ob in SV80 und A9 Zelllinien FADD als gemeinsames Signalprotein beider Zelltodrezeptoren benutzt wird, oder bereits auf dieser Ebene ein Unterschied festzustellen ist. Dazu wurde FADD kloniert, und die Mutante Δ FADD von FADD hergestellt, die in der Lage ist, den bisher bekannten Signalweg von FADD in einer dominant negativen Weise zu hemmen. FADD und Δ FADD wurden in A9 und SV80 Zellen zur Expression gebracht. In SV80 Zellen führte Überexpression von FADD wie erwartet zu Zelltod, Expression von Δ FADD schützte nach Stimulation des TNFR1 oder Fas wie erwartet vor Zelltod. Expression von FADD in A9 Zellen führte zu Zelltod. Überraschenderweise führte jedoch auch Expression von Δ FADD in A9 zu Zelltod. Es war unerwartet, daß die Mutante, die den bisher bekannte Signalweg von FADD blockieren sollte, selbst Zelltod auslösen kann. Um die Art der Wirkung dieser Mutante Δ FADD weiter zu charakterisieren wurde versucht, den durch Δ FADD vermittelten Zelltod durch verschiedene Klassen von Hemmstoffe der Apoptose zu inhibieren. Zum einen Apoptoseinhibitoren, die über Hemmung der Caspasen wirken, zum anderen solche, die durch Hemmung der Atmungskette Apoptose unterbinden. Des weiteren wurde das Signalmolekül RAIDD und verschiedene dominant negative Mutanten kloniert, um zu untersuchen, ob Δ FADD in der Lage ist weitere Signalproteine zu aktivieren und so Zelltod auszulösen.

Aufgrund der Ergebnisse kann der Schluß gezogen werden, daß in A9 Zellen rezeptorvermittelter Zelltod über zwei verschiedene Mechanismen ausgeführt werden kann. Der

eine Weg benutzt FADD und eine aktivierte Caspasenkaskade um Zelltod auszulösen. Wird dieser Weg jedoch blockiert, zum Beispiel durch Blockade des Signalweges mittels Δ FADD oder Caspaseninhibitoren, dann wird ein alternativer Weg gestartet, der unabhängig ist von FADD und aktivierten Caspasen und zum Zelltod führt.

7.2 Literaturverzeichnis

1. Virchow, R.C., AB., *Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology*. 1859, New York: Dover Publications.
2. Flemming, W., *Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel*. Arch Anat Entwgesch, 1885: p. 221 - 224.
3. Graper, L., *Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung*. Archive Zellforschung, 1914. **12**: p. 373 - 394.
4. Glucksmann, A., *Cell deaths in normal vertebrate ontogeny*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1951. **26**: p. 59 - 86.
5. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
6. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
7. Chautan, M., et al., *Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway*. Curr Biol, 1999. **9**(17): p. 967-70.
8. Afford, S. and S. Randhawa, *Apoptosis*. Mol Pathol, 2000. **53**(2): p. 55-63.
9. McDonald, G.B., et al., *Intestinal and hepatic complications of human bone marrow transplantation. Part I*. Gastroenterology, 1986. **90**(2): p. 460-77.
10. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
11. Wu, J., et al., *Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 461-8.

12. Kotler, D.P., S.C. Weaver, and J.A. Terzakis, *Ultrastructural features of epithelial cell degeneration in rectal crypts of patients with AIDS*. Am J Surg Pathol, 1986. **10**(8): p. 531-8.
13. Vaux, D.L. and A. Strasser, *The molecular biology of apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2239-44.
14. Lockshin, R.Z., Z. Tilly, J.L., *When Cells Die*. 1998, New York: Wiley-Liss.
15. Raff, M.C., et al., *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. Science, 1993. **262**(5134): p. 695-700.
16. Fraser, A., N. McCarthy, and G.I. Evan, *Biochemistry of cell death*. Curr Opin Neurobiol, 1996. **6**(1): p. 71-80.
17. Grigg, J.M., et al., *Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs*. Lancet, 1991. **338**(8769): p. 720-2.
18. Buttke, T.M. and P.A. Sandstrom, *Oxidative stress as a mediator of apoptosis*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 7-10.
19. Yamada, T. and H. Ohyama, *Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis)*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1988. **53**(1): p. 65-75.
20. Schwall, R.H., et al., *Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro*. Hepatology, 1993. **18**(2): p. 347-56.
21. Sachs, L. and J. Lotem, *Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy*. Blood, 1993. **82**(1): p. 15-21.
22. Hayes, M.P., G.A. Berrebi, and P.A. Henkart, *Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 933-46.
23. Cohen, I.R., *Physiological basis of T-cell vaccination against autoimmune disease*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 2**: p. 879-84.
24. Ettinger, R., et al., *Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4⁺ T cells responding to a bacterial superantigen*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4302-8.
25. Itoh, N., et al., *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991. **66**(2): p. 233-43.
26. Oehm, A., et al., *Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10709-15.
27. Loetscher, H., et al., *Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 351-9.

28. Schall, T.J., et al., *Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 361-70.
29. Nophar, Y., et al., *Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor*. Embo J, 1990. **9**(10): p. 3269-78.
30. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
31. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-62.
32. Heller, R.A., et al., *Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6151-5.
33. Loetscher, H., *Purification and structural properties of two distinct TNF receptors on human cells*. Immunol Ser, 1992. **56**: p. 161-87.
34. Hess, S., et al., *CD40 function in nonhematopoietic cells. Nuclear factor kappa B mobilization and induction of IL-6 production*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4588-95.
35. Camerini, D., et al., *The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 3165-9.
36. Durkop, H., et al., *Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease*. Cell, 1992. **68**(3): p. 421-7.
37. Kwon, B.S. and S.M. Weissman, *cDNA sequences of two inducible T-cell genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(6): p. 1963-7.
38. Schulze-Osthoff, K., P.H. Krammer, and W. Droge, *Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death*. Embo J, 1994. **13**(19): p. 4587-96.
39. Smith, C.A., et al., *A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins*. Science, 1990. **248**(4958): p. 1019-23.
40. Stamenkovic, I., E.A. Clark, and B. Seed, *A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas*. Embo J, 1989. **8**(5): p. 1403-10.
41. Tartaglia, L.A., et al., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 845-53.
42. Itoh, N. and S. Nagata, *A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 10932-7.
43. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.

44. Watanabe, K., et al., [*Phase III trial of 99mTc-rhenium colloid for lymphoscintigraphy*]. Kaku Igaku, 1992. **29**(8): p. 979-90.
45. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara, *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1747-56.
46. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg, *Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 243-69.
47. Wang, J., et al., *Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II*. Cell, 1999. **98**(1): p. 47-58.
48. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Cell, 1995. **81**(6): p. 935-46.
49. Kindler, V., et al., *The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection*. Cell, 1989. **56**(5): p. 731-40.
50. Hsu, H., et al., *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
51. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors*. Immunol Today, 1992. **13**(5): p. 151-3.
52. Rothe, J., et al., *Tumor necrosis factor receptors--structure and function*. Immunol Res, 1992. **11**(2): p. 81-90.
53. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 411-52.
54. Vandevoorde, V., G. Haegeman, and W. Fiers, *TNF-mediated IL6 gene expression and cytotoxicity are co-inducible in TNF-resistant L929 cells*. FEBS Lett, 1992. **302**(3): p. 235-8.
55. Tartaglia, L.A., et al., *The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9292-6.
56. Heller, R.A., et al., *The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity*. Cell, 1992. **70**(1): p. 47-56.
57. Dhein, J., et al., *Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens*. J Immunol, 1992. **149**(10): p. 3166-73.
58. Banner, D.W., et al., *Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation*. Cell, 1993. **73**(3): p. 431-45.
59. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.

60. Cleveland, J.L. and J.N. Ihle, *Contenders in FasL/TNF death signaling*. Cell, 1995. **81**(4): p. 479-82.
61. Boldin, M.P., et al., *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain*. J Biol Chem, 1995. **270**(14): p. 7795-8.
62. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
63. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4961-5.
64. Stanger, B.Z., et al., *RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death*. Cell, 1995. **81**(4): p. 513-23.
65. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
66. Varfolomeev, E.E., et al., *A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1271-5.
67. Yang, X., et al., *Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1067-76.
68. Sato, T., et al., *FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas*. Science, 1995. **268**(5209): p. 411-5.
69. Okura, T., et al., *Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin*. J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4277-81.
70. Cifone, M.G., et al., *Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal*. Embo J, 1995. **14**(23): p. 5859-68.
71. Schutze, S., et al., *TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown*. Cell, 1992. **71**(5): p. 765-76.
72. Eischen, C.M., C.J. Dick, and P.J. Leibson, *Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis*. J Immunol, 1994. **153**(5): p. 1947-54.
73. Meinhardt, G., J. Roth, and G. Totok, *Protein kinase C activation modulates pro- and anti-apoptotic signaling pathways*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(11): p. 824-33.
74. Zhuang, S., J.T. Demirs, and I.E. Kochevar, *Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation*. Oncogene, 2001. **20**(46): p. 6764-76.
75. Gomez-Angelats, M. and J.A. Cidlowski, *Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44944-52.

76. Ngan, B.Y., et al., *Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation*. N Engl J Med, 1988. **318**(25): p. 1638-44.
77. Korsmeyer, S.J., et al., *Bcl-2: B cell life, death and neoplasia*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **166**: p. 203-7.
78. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-6.
79. Wang, H.G., U.R. Rapp, and J.C. Reed, *Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria*. Cell, 1996. **87**(4): p. 629-38.
80. Hengartner, M.O. and H.R. Horvitz, *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2*. Cell, 1994. **76**(4): p. 665-76.
81. Hengartner, M.O. and H.R. Horvitz, *Activation of C. elegans cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 318-20.
82. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
83. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
84. Cartron, P.F., et al., *Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 95-100.
85. Huang, D.C. and A. Strasser, *BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death*. Cell, 2000. **103**(6): p. 839-42.
86. Strasser, A., et al., *The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 541-8.
87. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
88. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
89. Condorelli, F., et al., *Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(9): p. 3025-36.
90. Lutter, M., et al., *Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 754-61.
91. Zha, J., et al., *Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1761-5.

92. Boyd, J.M., et al., *Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins.* Oncogene, 1995. **11**(9): p. 1921-8.
93. Chittenden, T., et al., *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions.* Embo J, 1995. **14**(22): p. 5589-96.
94. Chittenden, T., et al., *Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak.* Nature, 1995. **374**(6524): p. 733-6.
95. Kiefer, M.C., et al., *Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak.* Nature, 1995. **374**(6524): p. 736-9.
96. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature.* Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
97. Boldin, M.P., et al., *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death.* Cell, 1996. **85**(6): p. 803-15.
98. Muzio, M., G.S. Salvesen, and V.M. Dixit, *FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens.* J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2952-6.
99. Kaufmann, M., et al., *Identification of a basic surface area of the FADD death effector domain critical for apoptotic signaling.* FEBS Lett, 2002. **527**(1-3): p. 250-4.
100. 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, 1996. **85**(6): p. 817-27.
101. Vincenz, C. and V.M. Dixit, *Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling.* J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6578-83.
102. Hu, S., et al., *A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis.* J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 9621-4.
103. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.* Embo J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
104. Fernandes-Alnemri, T., et al., *In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7464-9.
105. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspases: intracellular signaling by proteolysis.* Cell, 1997. **91**(4): p. 443-6.
106. Stennicke, H.R. and G.S. Salvesen, *Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8.* J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25719-23.
107. Zhou, Q., et al., *Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases.* J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7797-800.

108. Lazebnik, Y.A., et al., *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. Nature, 1994. **371**(6495): p. 346-7.
109. Nicholson, D.W., et al., *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 37-43.
110. Enari, M., H. Hug, and S. Nagata, *Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis*. Nature, 1995. **375**(6526): p. 78-81.
111. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
112. Susin, S.A., et al., *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 381-94.
113. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
114. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
115. Verhagen, A.M., et al., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins*. Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
116. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
117. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
118. Zou, H., et al., *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
119. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3179-84.
120. Mignotte, B. and J.L. Vayssiere, *Mitochondria and apoptosis*. Eur J Biochem, 1998. **252**(1): p. 1-15.
121. Bossy-Wetzel, E. and D.R. Green, *Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier*. Mutat Res, 1999. **434**(3): p. 243-51.
122. Fearnhead, H.O., *Cell-free systems to study apoptosis*. Methods Cell Biol, 2001. **66**: p. 167-85.
123. Jiang, X. and X. Wang, *Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31199-203.
124. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 2001. **15**(22): p. 2922-33.

125. Kuida, K., et al., *Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 368-72.
126. Kuida, K., et al., *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9*. Cell, 1998. **94**(3): p. 325-37.
127. Cecconi, F., et al., *Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development*. Cell, 1998. **94**(6): p. 727-37.
128. Yoshida, H., et al., *Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development*. Cell, 1998. **94**(6): p. 739-50.
129. Honarpour, N., et al., *Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility*. Dev Biol, 2000. **218**(2): p. 248-58.
130. Honarpour, N., et al., *Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9683-7.
131. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
132. Liu, Z., et al., *Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1004-8.
133. Wu, G., et al., *Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1008-12.
134. Miramar, M.D., et al., *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16391-8.
135. Liu, X., et al., *DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis*. Cell, 1997. **89**(2): p. 175-84.
136. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
137. Liu, X., et al., *The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8461-6.
138. Zhang, J., et al., *Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12480-5.
139. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
140. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.

141. Zha, J., et al., *BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24101-4.
142. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
143. Harada, H., et al., *Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A*. Mol Cell, 1999. **3**(4): p. 413-22.
144. Korsmeyer, S.J., et al., *Death and survival signals determine active/inactive conformations of pro-apoptotic BAX, BAD, and BID molecules*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 343-50.
145. Lindsten, T., et al., *The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1389-99.
146. Nechushtan, A., et al., *Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1265-76.
147. Cheng, E.H., et al., *Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases*. Science, 1997. **278**(5345): p. 1966-8.
148. Samejima, K., P. Villa, and W.C. Earnshaw, *Role of factors downstream of caspases in nuclear disassembly during apoptotic execution*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. **354**(1389): p. 1591-8; discussion 1598-9.
149. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
150. Buendia, B., A. Santa-Maria, and J.C. Courvalin, *Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 11): p. 1743-53.
151. Kawahara, A., et al., *Fas-induced DNA fragmentation and proteolysis of nuclear proteins*. Genes Cells, 1998. **3**(5): p. 297-306.
152. Bokoch, G.M., *Caspase-mediated activation of PAK2 during apoptosis: proteolytic kinase activation as a general mechanism of apoptotic signal transduction?* Cell Death Differ, 1998. **5**(8): p. 637-45.
153. Widmann, C., S. Gibson, and G.L. Johnson, *Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 7141-7.
154. Rensing-Ehl, A., et al., *Fas/Apo-1 activates nuclear factor kappa B and induces interleukin-6 production*. J Inflamm, 1995. **45**(3): p. 161-74.
155. Todaro, G.J., H. Green, and M.R. Swift, *Susceptibility of human diploid fibroblast strains to transformation by SV40 virus*. Science, 1966. **153**(741): p. 1252-4.

156. Littlefield, J., *Three degrees of guanylic acid-inosic acid pyrophosphorylase deficiency in mouse fibroblasts*. Nature, 1964. **203**(9): p. 1142-44.
157. Sambrook, J.F., EF. Maniatis, T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
158. Pagano, R. and T.E. Thompson, *Spherical lipid bilayer membranes: electrical and isotopic studies of ion permeability*. J Mol Biol, 1968. **38**(1): p. 41-57.
159. Kohler, H.B., et al., *Involvement of reactive oxygen species in TNF-alpha mediated activation of the transcription factor NF-kappaB in canine dermal fibroblasts*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **71**(2): p. 125-42.
160. Thornberry, N.A., et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
161. Lazebnik, Y.A., et al., *Characterization of the execution phase of apoptosis in vitro using extracts from condemned-phase cells*. J Cell Sci Suppl, 1995. **19**: p. 41-9.
162. Novick, D., et al., *Monoclonal antibodies to the soluble human IL-6 receptor: affinity purification, ELISA, and inhibition of ligand binding*. Hybridoma, 1991. **10**(1): p. 137-46.
163. Kozak, M., *Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles*. Microbiol Rev, 1983. **47**(1): p. 1-45.
164. Boldin, M.P., et al., *Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects*. J Biol Chem, 1995. **270**(1): p. 387-91.
165. Grimm, S., B.Z. Stanger, and P. Leder, *RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10923-7.
166. Duan, H. and V.M. Dixit, *RAIDD is a new 'death' adaptor molecule*. Nature, 1997. **385**(6611): p. 86-9.
167. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp, *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 155-6.
168. Ahmad, M., et al., *CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP*. Cancer Res, 1997. **57**(4): p. 615-9.
169. Garcia-Calvo, M., et al., *Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32608-13.
170. McCarthy, N.J., et al., *Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak*. J Cell Biol, 1997. **136**(1): p. 215-27.

171. Yu, R., S. Mandlekar, and A.T. Kong, *Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(2): p. 431-7.
172. Faraco, P.R., et al., *Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 385-92.
173. Miao, J.Y., et al., *Suppression of apoptosis by inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in vascular endothelial cells*. Endothelium, 1997. **5**(4): p. 231-9.
174. Ray, C.A., et al., *Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Cell, 1992. **69**(4): p. 597-604.
175. Tewari, M., et al., *CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 22705-8.
176. Tewari, M. and V.M. Dixit, *Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3255-60.
177. Miura, M., R.M. Friedlander, and J. Yuan, *Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8318-22.
178. Bertin, J., et al., *Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1172-6.
179. Pickup, D.J., et al., *Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(20): p. 7698-702.
180. Vercammen, D., et al., *Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1477-85.
181. Hueber, A.O., et al., *A dominant negative Fas-associated death domain protein mutant inhibits proliferation and leads to impaired calcium mobilization in both T-cells and fibroblasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10453-62.
182. Luschen, S., et al., *Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of fas-associated death domain protein (FADD)/caspase signaling. Requirement of cell cycle progression*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24670-8.
183. Boone, E., et al., *Structure/Function analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37596-603.
184. Lemasters, J.J., et al., *Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy*. Biofactors, 1998. **8**(3-4): p. 283-5.
185. Vercammen, D., et al., *Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 919-30.

186. Droin, N., et al., *Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 7039-47.
187. Leist, M., et al., *Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1481-6.
188. Schulze-Osthoff, K., et al., *Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF*. Embo J, 1993. **12**(8): p. 3095-104.
189. Goossens, V., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8115-9.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Robert H.G. Wilke
 Geburtsdatum: 21.01.1974
 Geburtsort: München
 Familienstand: ledig
 Eltern: Wulf-Dieter Wilke, Dipl. Forstwirt und Dr. med. Adelheid Wilke, Ärztin
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1980 – 1984 Grundschule Weiden i.d. ObPf
 1984 – 1993 Johann-Andreas-Schmeller Gymnasium Nabburg

Studium:

1993 – 1995 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
 1995 – 1999 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
 1999 – 2000 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München
 Juni 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 - Studium Medizintechnik an der Technischen Universität München, sowie an der Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Rom Italien

Arbeitsstelle:

2000 – 2002 AiP und Assistenzarzt an der Augenklinik der Ludwig-Maximilian-Universität München

7.4 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Gerd Riethmüller als Leiter des Instituts für Immunologie für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Hartmut Engelmann, Ph.D. in dessen Arbeitsgruppe meine Arbeit angefertigt wurde. Er hat es hervorragend verstanden auch schwierige Zeiten, die bei experimenteller Arbeit auftreten mit Geduld und neuen Ideen zu überbrücken und mir trotzdem sehr viel Raum zu selbständigem Arbeiten zu lassen. Unter seiner Führung herrschte eine besonders partnerschaftliche und wissenschaftlich kompetente Atmosphäre, die es mir ermöglichte viele molekular- und zellbiologische Arbeitsweisen zu erlernen.

Dabei ist besonders Frau Christine Federle zu danken, die stets tatkräftig und freundlich bei Problemen zu Seite stand. Ohne ihre Mithilfe wäre es nicht möglich gewesen hunderte Transfektionsexperimente durchzuführen.

Frau Dr. Eva Gottfried verdanke ich mein Wissen über Zellkulturen und Transfektionsmethoden, Herrn Dr. Ullrich Grunwald die Grundlagen molekularbiologischen Arbeitens.