

Die Bedeutung von Bid für Apoptose und Proliferation in der murinen Leber

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Diplom-Humanbiologe Sven Schüngel
geboren am 13.03.1978 in Herford

2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter H. Müller

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med Arndt Vogel

Tag der Promotion: 04.08.2010

Zusammenfassung

Das BH3-only-Protein Bid ist ein entscheidender Mediator der CD95/Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose in Hepatozyten. Aktivierung des Fas-Rezeptors führt zur Induktion von zwei verschiedenen intrazellulären Mechanismen und der Unterteilung von Typ I- (direkter Signalweg) und Typ II-Zellen (mitochondrialer Signalweg). Während in Typ I-Zellen eine direkte Initiation der Effektor-Caspasen erfolgt, ist in Typ II-Zellen eine amplifizierende, Mitochondrien-assoziierte Signalkaskade in die apoptotische Reaktion involviert. Bid fungiert dabei als Bindeglied zwischen direktem und mitochondrialem Signalweg und trägt essenziell zur Freisetzung pro-apoptotischer, die Reaktion verstärkender Faktoren bei.

Der monoklonale anti-CD95/Fas-Antikörper Jo₂ vermag eine Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose auszulösen und dient so als experimenteller Apoptose-Stimulator. Injiziert man Bid^{-/-}-Mäusen Jo₂, ist im Kontrast zu WT-Tieren eine Resistenz des Lebergewebes gegenüber dem Apoptosereiz nachweisbar. Dies belegt die Relevanz von Bid für die apoptotische Signaltransduktion und ist konform mit der Einordnung von Hepatozyten als Typ II-Zellen.

Da *in vitro* Studien mit physiologischem FasL hingegen keinen Unterschied der apoptotischen Reaktion in Typ I- und Typ II-Zellen aufzeigen, ist es fraglich, ob der Antikörper Jo₂ tatsächlich das physiologische FasL-Signalverhalten widerspiegeln kann.

Behandelt man Bid-defiziente Mäuse mit MegaFasL, einem hexameren Konstrukt des physiologischen sFasL, das als starker Apoptose-Induktor gilt, führt dies zu einer massiven Leberschädigung und zum Tod der Mäuse. Da aufgrund des fehlenden Bid-Proteins eine Aktivierung der mitochondrialen Signalkaskade nicht möglich ist, zeigt dies, dass vielmehr die Stärke des Apoptose-Stimulus den Apoptose-Signalmechanismus bestimmt und Hepatozyten sowohl als sogenannte Typ II- wie auch als Typ I-Zellen reagieren können.

Des Weiteren werden zur Untersuchung der Rolle von Bid im Rahmen der Fas-Rezeptor-Stimulation in der Literatur bekannte Apoptose-Resistenz-Modelle wie z.B. eine Leberteilesektion, eine Gallengangsligatur und die Suramin-Behandlung hinzugezogen. Während Jo₂ nicht in der Lage ist, diese Resistenzen zu überwinden, induziert MegaFasL trotz Leberteilesektion bzw. Suramin-Behandlung eine apoptotische Reaktion in WT-Mäusen. Die zusätzliche Bid-Defizienz in Bid^{-/-}-Mäusen hingegen hält, bei gleicher Behandlung, eine Resistenz auch gegenüber dem starken MegaFasL-Stimulus aufrecht und bestätigt die Funktion des Bid-Proteins als eine Art Sensibilisator gegenüber Apoptose-Stimuli.

Analysen mit nicht-phosphorylierbaren Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen demonstrieren ferner keinen Einfluss des Phosphorylierungsstatus im Rahmen der Apoptose-Anfälligkeit gegenüber Jo₂.

Schließlich wird eine potentielle Funktion von Bid im Rahmen der Proliferation und Zellzyklus-Regulation mittels Proliferationsinduktion durch Leberteilesektion untersucht. Dies lässt jedoch weder einen Unterschied zwischen WT- und Bid^{-/-}-Mäusen noch einen Einfluss der Phosphorylierbarkeit des Bid-Proteins erkennen und zeigt, dass Bid keinen Einfluss auf die Regenerationsprozesse nach Leberteilesektion hat.

Schlüsselwörter: Bid, Apoptose-Resistenz, MegaFasL

Abstract

The BH3-only protein Bid is a critical mediator of CD95/Fas-receptor-induced hepatocellular apoptosis. Activation of Fas-receptor is followed by induction of two distinct intracellular apoptosis pathways, which implicate the differentiation of cells into type I (direct signaling) and type II cells (mitochondrial signaling), respectively. While type I cells are capable of directly activating effector caspases, type II cells require the mitochondrial amplification loop to execute apoptosis. In this context, the BH3-only protein Bid imparts the apoptotic signal from cell surface to mitochondria causing the subsequent release of pro-apoptotic factors.

The monoclonal anti-CD95/Fas antibody Jo₂ induces Fas-receptor-mediated apoptosis, and thus, is used as an artificial apoptosis-stimulus. Whereas injection of Jo₂ induces critical liver failure in wild-type mice, Bid^{-/-} mice are protected against hepatocellular apoptosis. This allocates the relevance of Bid and matches with the consideration of hepatocytes as type II cells.

As there is no difference in the apoptotic reaction of so-called type I and type II cells after FasL treatment *in vitro*, the representation of the physiological situation by Jo₂ is, however, questioned.

Remarkably, treatment of Bid-deficient mice with MegaFasL, which represents a strong apoptosis-trigger, induces severe liver damage and subsequent death of mice. However, due to the absence of Bid, activation of mitochondrial signaling is blocked in Bid^{-/-}-mice, revealing that the strength of the Fas-trigger rather determines apoptosis signaling and the reaction of hepatocytes as so-called type I or type II cells, respectively.

Moreover, additional known apoptosis-resistance-models, such as partial hepatectomy, bile duct ligation and suramin pretreatment, are introduced to further examine the role of Bid in line with Fas-receptor stimulation. Whereas Jo₂ is not able to overcome the preset resistance in the different models, MegaFasL induces an apoptotic reaction in WT-mice despite partial hepatectomy and suramin treatment, respectively. On the other hand, the additional lack of Bid in Bid^{-/-}-mice maintains the resistance also against the strong trigger MegaFasL, confirming the role of Bid as a regulator and sensitizer of apoptotic stimuli.

Analyzing non-phosphorylatable Bid^{S61A/S78A}KI-mice and their sensitivity against Jo₂ reveals no influence of the phosphorylation status of Bid with respect to the apoptotic reaction.

Finally, a potential function of Bid associated with cell cycle regulation is monitored following induction of hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. However, no difference is detectable, neither between WT- and Bid^{-/-}-mice nor when comparing WT and non-phosphorylatable Bid^{S61A/S78A}KI-mice, contradicting an association of Bid in the proliferative regeneration after partial hepatectomy.

Keywords: Bid, apoptosis-resistance, MegaFasL

Die vorgelegte Doktorarbeit wurde in den Forschungslaboratorien der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Schüngel S, Buitrago-Molina LE, Nalapareddy P, Lebofsky M, Manns MP, Jaeschke H, Gross A, Vogel A. 2009. The strength of the Fas ligand signal determines whether hepatocytes act as type 1 or type 2 cells in murine livers. *Hepatology*, 50, 1558-1566.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zelltod	1
1.2	Apoptose.....	2
1.2.1	Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie.....	2
1.2.2	Aktivierung der Caspasen.....	4
1.2.3	Typ I- und Typ II-Zellen oder direkter und mitochondrialer Signalweg	7
1.3	Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine.....	10
1.3.1	Bid, ein BH3-only-Protein	11
1.4	Regulation der Aktivität von Bid.....	13
1.4.1	Transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation.....	13
1.4.2	Post-translationale Regulation und Modifikation.....	14
1.5	Funktion von Bid in der Apoptose	16
1.6	Nicht-apoptotische Funktion von Bid	17
1.7	Ziel und Konzept der Arbeit.....	18
2	MATERIAL	20
2.1	Versuchstiere	20
2.2	Proben, die für die Analysen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.....	20
2.2.1	Kontrolle der Fas-Rezeptor-spezifischen Aktivierung der MegaFasL-induzierten Apoptose und der Abhängigkeit von Caspasen	20
2.2.2	Relevanz des Phosphorylierungsstatus von Bid für die Resistenz gegenüber Jo ₂ -induzierter Apoptose und der Proliferationskapazität von Hepatozyten	21
2.3	Reagenzien zur Behandlung der Tiere	21
2.4	Chemikalien	22
2.5	Kitsysteme, Lösungen und Enzyme	22
2.6	Verbrauchsmaterialien	24
2.7	Antikörper.....	24
2.7.1	Primäre Antikörper	24
2.7.2	Sekundäre Antikörper	25
2.8	Oligonukleotide.....	25
2.9	Geräte	26
2.10	Software	27
3	METHODEN	28
3.1	In vivo Mausmodelle	28
3.1.1	Bid ^{-/-} -Mausstamm.....	28
3.1.2	Experimentelle Apoptose-Modelle.....	28
3.1.2.1	Induktion der Fas-Death-Rezeptor-vermittelten Apoptose.....	28
3.1.2.2	Induktion der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose	29
3.1.3	Experimentelle Apoptose-Resistenz-Modelle.....	29
3.1.3.1	Teilresektion der Leber.....	30
3.1.3.2	Gallengangsligatur	30

3.1.3.3	Suramin-Behandlung.....	30
3.1.4	Experimentelles Proliferations-Modell	31
3.1.5	Probengewinnung.....	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1	DNA-Isolation aus Mausegewebe	32
3.2.2	Bid-Genotypisierung.....	32
3.3	Biochemische Methoden	33
3.3.1	Blutserumanalysen.....	33
3.3.2	Präparation des Gesamtzellysats	33
3.3.3	Subzelluläre Trennung der mitochondrialen und cytosolischen Proteinfraction.....	34
3.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.....	34
3.3.5	Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	35
3.3.6	Western Blot-Verfahren/Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	36
3.3.7	Ponceau S-Rot-Färbung von PVDF-Membranen	36
3.3.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	36
3.3.9	Caspase-Aktivitätsassays.....	38
3.4	Histologische Untersuchungen	39
3.4.1	Paraffineinbettung	39
3.4.2	Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung.....	39
3.4.3	TUNEL-Immunhistochemie.....	39
3.4.4	Nachweis der Zellproliferation mittels BrdU.....	40
3.4.5	Nachweis der Zellproliferation mittels Ki67.....	41
3.4.6	Immunhistochemie für aktivierte Caspase-3.....	42
3.5	Statistische Analysen.....	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Die Rolle von Bid für die Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose	44
4.1.1	Die Rolle von Bid in Jo ₂ -induzierter Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose	44
4.1.2	Die Rolle von Bid in MegaFasL-induzierter Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose.....	46
4.1.3	Kontrolle der Bedeutung des Fas-Rezeptors und der Caspase-Aktivität für die Wirkung von MegaFasL.....	50
4.1.4	Die Rolle von Bid für die TNF-Rezeptor-vermittelte und LPS/GalN-induzierte Apoptose.....	52
4.2	Die Rolle von Bid im Rahmen der Apoptose-Resistenz	54
4.2.1	Untersuchung bezüglich der Wirkung von Jo ₂ infolge induzierter Apoptose-Resistenz in WT-Mäusen.....	54
4.2.2	Vergleich der Wirkung von MegaFasL infolge induzierter Apoptose-Resistenz in WT-Mäusen und Bid ^{-/-} -Mäusen	57
4.2.3	Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung von Bid auf das Jo ₂ -Apoptose-Resistenz-Modell.....	61
4.3	Die Rolle von Bid für die Zellproliferation der Leber	63
4.3.1	Untersuchung des Einflusses von Bid auf die Regeneration des Lebergewebes nach partieller Leberresektion.....	63
4.3.2	Einfluss der Phosphorylierung von Bid auf die Proliferation von Hepatozyten	68
5	DISKUSSION	71

5.1	Die Stärke des Fas-Liganden bestimmt, ob Hepatozyten als Typ I- oder Typ II-Zellen auf Apoptose reagieren.....	71
5.1.1	Bid-defiziente Mäuse sind vor Jo ₂ -Antikörper-induzierter Apoptose geschützt.....	71
5.1.2	MegaFasL induziert Apoptose in Bid-defizienten Mäusen.....	72
5.1.3	Die MegaFasL-induzierte Apoptose ist spezifisch abhängig vom Fas-Rezeptor und wird von Caspasen vermittelt	74
5.1.4	Bid hat keinen Einfluss auf die TNF-Rezeptor vermittelte Apoptose	75
5.2	Bid ist entscheidend für die Sensitivität gegenüber Apoptose	76
5.2.1	Die Apoptose-Sensitivität gegenüber Fas-Triggern in Apoptose-Resistenz-Modellen wird durch Bid erhöht.....	76
5.2.2	Die Sensitivität gegenüber Jo ₂ -induzierter Apoptose wird nicht vom Status der Phosphorylierung von Bid beeinflusst	79
5.3	Bid und die Phosphorylierung von Bid haben keinen Einfluss auf die Leberregeneration nach Leberteilresektion.....	79
5.4	Schlussfolgerung	80
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	82
7	TABELLENVERZEICHNIS	84
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	85
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
10	PUBLIKATIONSLISTE	100
11	LEBENS LAUF.....	101

1 Einleitung

In hochentwickelten Organismen unterliegt die Regulation von programmiertem Zelltod und Zellwachstum einem empfindlichen Gleichgewicht und ist ein lebenswichtiger Mechanismus. Wird dieses Gleichgewicht gestört, können pathophysiologische Veränderungen bis hin zu Karzinomen die Folge sein (Evan and Vousden, 2001). In diesem Zusammenhang fungiert die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine (engl.: **B-cell Lymphoma-2**) als wichtiger Regulator, um dieses Gleichgewicht zu wahren. Insbesondere dem Bcl-2-Familie-zugehörigen Protein Bid (**BH3-interacting domain death agonist**), das den Fokus dieser Arbeit darstellt, wird eine essentielle Rolle in der Apoptose zugeschrieben (s. 1.3.1). Neben dieser Funktion vermag Bid zudem eine Rolle in nicht-apoptischen Mechanismen, wie der Reaktion auf DNA-Schäden und der Regulation des Zellzyklus, zu spielen (Bai et al., 2005, Kamer et al., 2005, Zinkel et al., 2005) (s. 1.5 und 1.6).

1.1 Zelltod

Zum Erhalt der Homöostase der Gewebe in vielzelligen Organismen und um Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse möglich zu machen, ist es essentiell ein ausgeglichenes Verhältnis von Zelltod und Zellwachstum aufrecht zu erhalten. So ist es wichtig, dass kranke, geschädigte, entartete oder autoreaktive Zellen entfernt werden können. Im menschlichen Körper werden jede Sekunde ca. 100.000 neue Zellen gebildet und eine vergleichbare Anzahl wird durch Zelltodprozesse, insbesondere durch Apoptose, eliminiert (Vaux and Korsmeyer, 1999). Als bedeutendste Zelltodarten unterscheidet man Apoptose und Nekrose (Kroemer et al., 2009).

Apoptose wird auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet, da ihr ein zellulär regulierter Signaltransduktionsmechanismus unterliegt (Kroemer et al., 2009). Nekrose hingegen wird im Allgemeinen als pathologischer Zelltod, verursacht durch externe Noxen, betrachtet (Golstein and Kroemer, 2007).

Die Apoptose (griech.: *απόπτωση*, apo: „weg“, ptosis: „Fall“) stellt das kontrollierte Selbstmordprogramm einer Zelle dar und kann sowohl aufgrund von intrazellulären Veränderungen als auch extern vermittelt durch Rezeptoren induziert werden (s. 1.2). Dabei zeichnet sich der Ablauf der Apoptose durch charakteristische morphologische Merkmale aus: Zu Beginn einer apoptotischen Reaktion rundet sich die betroffene Zelle ab und bewirkt so eine Abgrenzung vom umgebenden Zellverband. Die Zelle schrumpft weiter und eine Karyopyknose (Chromatinkondensation und Kernschrumpfung) wird hervorgerufen. Durch die Aktivierung von Caspasen (engl.: **cysteiny-l-aspartate specific protease**) werden Zellorganellen und Bestandteile des Cytoskeletts abgebaut. Im späten Stadium der Apoptose kommt es zu einer Fragmentierung des Zellkerns sowie zur Ausbildung von Ausstülpungen der Zellmembran (engl.: *blebbing*). Schließlich zerfällt die Zelle in Membran-umschlossene Vesikel (engl.: *budding*), die Teile des Cytosols, Chromatin-Fragmente und Bestandteile von Organellen enthalten. Diese apoptotischen Körperchen werden dann von Phagozyten, jedoch ohne Induktion einer

Entzündungsreaktion, abgebaut. Kennzeichnend für die Apoptose ist die Integrität der Zellmembran, die bis zur Bildung der apoptotischen Körperchen bestehen bleibt (Kerr et al., 1972, Strasser, 2005, Youle and Strasser, 2008, Kroemer et al., 2009).

Im Gegensatz zum vornehmlich physiologischen Zelluntergang, der Apoptose, stellt die Nekrose (griech.: νέκρωσις, „Absterben“) den in der Regel pathologischen Zelluntergang dar. Die Nekrose ist morphologisch definiert durch ein Anschwellen der Organellen wie auch der kompletten Zelle. Dies wird verursacht durch einen frühen Verlust der Membran-Integrität und nachfolgendes ungehindertes Einströmen extrazellulärer Ionen bzw. Flüssigkeit, die die Schwellung und das finale Zerreißen der Plasmamembran bedingen. Dadurch werden alle in der Zelle befindlichen Bestandteile unkontrolliert freigesetzt und eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. (Majno and Joris, 1995, Golstein and Kroemer, 2007). Neben dem pathologischen Verlauf der Nekrose gibt es aber auch Beispiele, in denen Nekrose an einer kontrolliert ablaufenden, physiologischen Zellelimination beteiligt ist (Oppenheim et al., 2001). So führt die Integration von BNIP3, ein BH3-only Protein, in die Mitochondrienmembran z.B. zur Induktion programmierter Nekrose (Vande Velde et al., 2000).

1.2 Apoptose

Die Apoptose stellt den wohl wichtigsten programmierten Zelltodmechanismus in vielzelligen Organismen dar und wird von einer Reihe von Enzymen kaskadenartig aktiviert (Kerr et al., 1972, Leist and Jaattela, 2001). Die wichtigsten dieser Enzyme sind dabei die Caspasen, eine Gruppe von Proteasen, die die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum tragen und Proteine spezifisch C-terminal nach einem Aspartat-Rest spalten können (Lavrik et al., 2005) (s. 1.2.2). Die Aktivierung der Caspasen erfolgt entweder durch intrazelluläre Signale (z.B. infolge von DNA Schädigung) oder extern über Ligandenbindung (z.B. TNF- α oder FasL) an sogenannte „Todesrezeptoren“ der TNF-Rezeptor-Superfamilie.

1.2.1 Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie

Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind Typ I-Transmembranproteine. Diese werden grundsätzlich durch sechs ligandenspezifische und ca. 40 Aminosäuren (AS) lange, cysteinreiche Domänen (CRD; engl.: cysteine-rich domain) charakterisiert. Als solche besitzen sie einen membranständigen Bereich, einen intrazellulären C-Terminus und eine extrazelluläre N-terminale Ligandenbindungsdomäne. Die Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie im Speziellen besitzen zusätzlich noch eine cytoplasmatische Sequenz von ungefähr 80 AS, die als Todesdomäne (DD, engl.: death domain) bezeichnet wird und essentiell für die Interaktion mit anderen DD-enthaltenen Proteinen und die Initiierung der Apoptose ist (s. Abbildung 1) (Nagata, 1997, Ashkenazi and Dixit, 1998, Locksley et al., 2001).

Zu den wichtigsten Todesrezeptoren gehören der Fas-Rezeptor (Fas/CD95/APO-1) und der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1/p55/CD120a), die beide infolge ihrer Aktivierung den

programmierten Zelltod bewirken können. Im Gegensatz zu Fas fungiert der TNF-R1 allerdings nur in zweiter Instanz als Todesrezeptor und ist primär mit der Induktion von Entzündungsreaktionen, der Stimulation der Cytokin-Produktion und Überlebensmechanismen assoziiert. So führt eine Aktivierung des TNF-R1 erst bei gleichzeitiger Hemmung von Transkriptionsfaktoren und damit verbundenen Überlebensfunktionen, z.B. durch den Transkriptionshemmer Galactosamin (GalN), zu einer Induktion der Apoptose (Galanos et al., 1979, Hishinuma et al., 1990, Wajant, 2003).

Die Aktivierung der Todesrezeptoren geschieht im Normalfall über Bindung eines passenden Liganden der TNF-Proteinfamilie, welche als Typ II-Transmembranproteine z.B. von Immunzellen exprimiert werden. Diese Liganden besitzen dabei neben ihrer membranständigen Region einen intrazellulären N-Terminus und eine extrazelluläre C-terminalen Domäne. Sie liegen allerdings nicht nur Membran-assoziiert vor, sondern können nach proteolytischer Spaltung auch als lösliches Signalmolekül existieren. Die lösliche Form der Liganden ist in der Regel jedoch schwächer apoptogen als das Membran-gebundene Protein (Schneider et al., 1998, Shudo et al., 2001, Grell et al., 1998).

Während der Fas-Rezeptor weitestgehend von allen Geweben, wie auch der Leber, exprimiert wird (Cascino et al., 1995, Galle and Krammer, 1998), wird der Fas-Ligand (FasL/CD95L) vornehmlich an der Plasmamembran aktivierter T-Zellen gebildet (Suda et al., 1993, Tanaka et al., 1996). FasL ist der einzige bekannte physiologische Ligand des Fas-Rezeptors und weist eine Membran-assoziierte homotrimerische Struktur auf, kann aber durch Metalloproteinasen geschnitten werden und geht so in seine lösliche Form (sFasL, engl.: **s**oluble **FasL**) über (Tanaka et al., 1996, Schneider et al., 1998). Als solche besteht er nur noch aus der extrazellulären Domäne und kann durch Bindung an Fas Apoptose induzieren (Nagata, 1999).

Neben den physiologischen Liganden von Fas wurden ferner synthetische Liganden entwickelt, die den Rezeptor zu binden vermögen und eine apoptotische Reaktion auslösen. So wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den Fas-Rezeptor in der Maus generiert, für den schließlich die Stimulation der Apoptose nachgewiesen wurde. Dieser als Jo₂ benannte anti-Fas/CD95-Antikörper zeigt zudem vornehmlich Wirkung auf Hepatozyten und leitet in diesen Zellen effektiv die Apoptose ein (Ogasawara et al., 1993).

Der TNF-R1 wird in geringem Maß ubiquitär auf allen Zellen exprimiert. Der physiologische Ligand für TNF-R1 ist TNF- α (auch TNF) und wird wie der FasL ebenfalls als Homotrimer gebildet (Carswell et al., 1975, Tang et al., 1996, Black et al., 1997).

Die Ligandenbindung an einen Todesrezeptor bedingt die Oligomerisierung des Rezeptors und eine damit einhergehende lokale Assoziation der intrazellulär lokalisierten DDs (Boldin et al., 1995). Dies wiederum führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes und leitet die intrazelluläre Rekrutierung verschiedener Adapterproteine ein. Fas sowie TNF-R1 können nach Oligomerisierung das Adapterprotein FADD (engl.: **F**as-**a**ssociated protein with **d**eath **d**omain) über ihre eigene DD binden. Zur Bindung an den TNF-R1 bedarf es zusätzlich jedoch noch der Assoziation des TRADD (engl.: **T**NF **r**eceptor-**a**ssociated protein with **d**eath **d**omain) (Chinnaiyan et al., 1996, Kischkel et al., 2000). Die Adapterproteine assoziieren spezifisch über

ihre DD an die Rezeptoren (s. Abbildung 1) (Huang et al., 1996). Neben der DD besitzt FADD zusätzlich eine N-terminale Todes-Effektordomäne (DED, engl.: **d**eath **e**ffector **d**omain), mit der wiederum weitere Enzyme über entsprechend korrespondierende DED gebunden werden können (Eberstadt et al., 1998). Zu diesen Effektoren gehören vorwiegend Caspase-8 und cFlip_L. Die cFlip-Proteine (engl.: **c**ellular **F**LICE [**F**as-associated death-domain-like **I**L-1 β -**c**onverting **e**nzyme]/Caspase-8-like **i**nhibitory **p**rotein) weisen eine starke Homologie zu Procaspase-8 auf, besitzen selbst allerdings keine Proteaseaktivität. Die Expression von cFlip kann als sogenannte kleine (cFlip_s) oder als große Splice-Variante (cFlip_L) erfolgen, wobei im Speziellen cFlip_L der proteolytischen Domäne von Caspase-8 gleicht, jedoch inaktiv vorliegt. Beide cFlip Varianten besitzen jeweils zwei DEDs, die ihnen die Interaktion sowohl mit dem DISC als auch mit Caspase-8 ermöglichen. Als inaktive, dominant-negative Regulatoren hat die Assoziation von cFlip-Proteinen eine Hemmung der Apoptose zur Folge (Hu et al., 1997, Irmeler et al., 1997). Hingegen wurde für cFlip_L unter physiologischen Bedingungen auch ein unterstützender Effekt durch Bildung von Heterodimeren mit Procaspase-8 nachgewiesen, was wiederum zu einer Aktivitätssteigerung der Caspase-8 beiträgt. Die cFlips haben somit eine ambivalente Rolle in der Beeinflussung der Apoptose am DISC (Chang et al., 2002).

Der schließlich formierte Komplex, bestehend aus Fas bzw. TNF-R1, TRADD und/oder FADD sowie Procaspase-8 und cFlip_L, wird als DISC (engl.: **d**eath-**i**nducing **s**ignaling **c**omplex) bezeichnet und stellt einen essentiellen Ausgangspunkt der apoptotischen Signalweiterleitung dar (s. 1.2.2) (s. Abbildung 1).

1.2.2 Aktivierung der Caspasen

Caspasen werden generell als Zymogene, sogenannte Procaspasen, exprimiert. Diese Procaspasen bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer großen (20 kDa/p20) und einer kleinen Untereinheit (10 kDa/p10) (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Abhängig von der Struktur ihrer Prodomäne lassen sich die Caspasen in funktionelle Gruppen einteilen. Dabei gliedern sie sich in eine inflammatorische Gruppe und zwei apoptotische Gruppen auf. Die inflammatorische Gruppe wird von Caspasen dargestellt, die eine große Prodomäne besitzen, welche in den meisten Fällen eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD, engl.: **c**aspase **r**ecruitment **d**omain) enthält. Die apoptotische Gruppe der Caspasen lässt sich in die am Anfang der Apoptose-Kaskade stehenden Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8 und -9) und die nachgeschalteten Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6 und -7) einteilen. Die Initiator-Caspasen haben ebenfalls eine lange Prodomäne und können entweder eine DED (z.B. Caspase-8) oder eine CARD (z.B. Caspase-9) enthalten (Muzio et al., 1996, Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Effektor-Caspasen besitzen eine sehr kurze Prodomäne ohne spezifische Rekrutierungsstruktur und sind auf die Aktivierung durch andere Caspasen angewiesen.

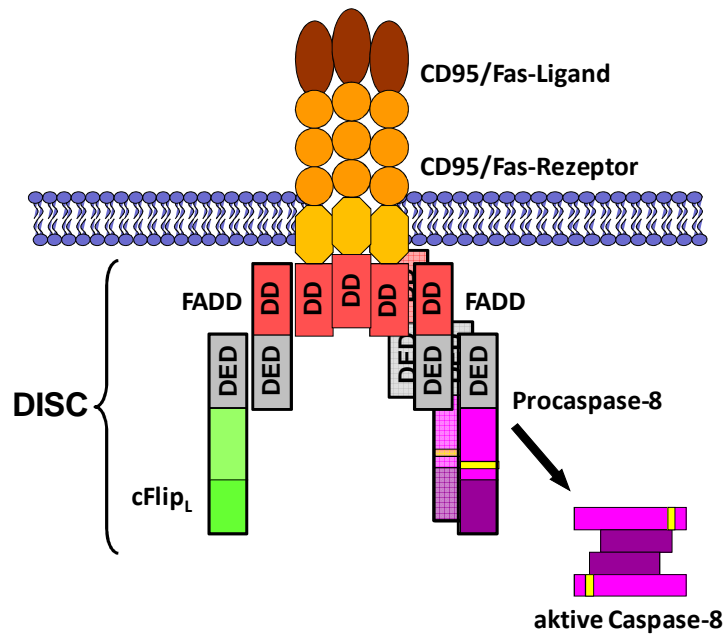


Abbildung 1: Fas-Rezeptor und DISC

Die Bindung durch FasL (braun) an den Fas-Rezeptor (orange) bedingt die Oligomerisierung des Rezeptors und die lokale Assoziation intrazellulärer DDs (engl.: **d**eath **d**omains)(rot). Dies leitet die Rekrutierung des Adapterproteins FADD (rot, grau) ein, welches spezifisch über seine DD an die cytoplasmatische DD des Fas-Rezeptors bindet. FADD besitzt zudem eine N-terminale DED (engl.: **d**eath **e**ffector **d**omain)(grau), mit der es weitere Enzyme mit korrespondierender DED binden kann. Zu diesen Effektoren gehören Caspase-8 (lila/rosa, grau) mit seinem proteolytisch aktiven Zentrum (gelb) sowie cFlip_L (grün, grau). Dieser Komplex wird als DISC bezeichnet und ist essentiell für die weitere Signaltransduktion der Apoptose.

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch Abspaltung der Prodomäne sowie des Bereiches zwischen der p20 und p10 Untereinheit. Dies hat zur Folge, dass die große und die kleine Untereinheit zweier identischer, gespaltenen Caspasen zu einer aktiven heterotetrameren Caspase (p20₂-p10₂) assoziieren. Diese Heterotetramere bestehen aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten, die jeweils mit gegenläufiger Orientierung aneinander gelagert sind und je ein katalytisch aktives Zentrum besitzen (s. Abbildung 2) (Lavrik et al., 2005). Mit dem aktiven Zentrum können die Caspasen sehr spezifisch ein aus 4 AS bestehendes Motiv erkennen, welches sie C-terminal, in der Regel nach Aspartat (D), schneiden (Thornberry et al., 1997). So wird z.B. durch Caspase-3 das Motiv DEXD und durch Caspase-8 und -9 die Sequenz (L/V)EXD geschnitten (X steht dabei für eine beliebige AS). Bemerkenswerterweise tragen die Initiator-Caspasen zwischen ihren beiden Untereinheiten das eigene AS-Erkennungsmotiv und könnten sich somit durch lokale Nähe gegenseitig aktivieren (Lavrik et al., 2005).

Im Rahmen der apoptotischen Signaltransduktion führt die Oligomerisierung des Fas-Rezeptors und die intrazelluläre Assoziation des DISC zu einer Rekrutierung und Ansammlung von Procaspase-8 in lokaler Nähe.

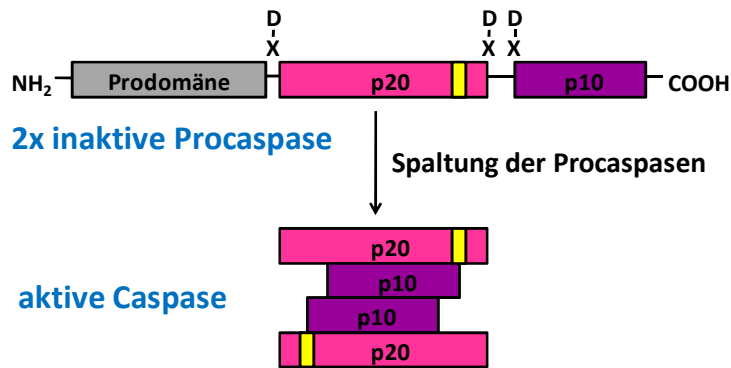


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Caspase-Aktivierung

Die Spaltung der Procaspase an spezifischen Aspartat-Schnittstellen (D-X) führt zur Eliminierung der Prodomäne und zu einer Assoziation eines aktiven Caspase-Heterotetramers (p20₂-p10₂). Dieses besteht aus zwei p20- und p10-Untereinheiten, die mit gegenläufiger Orientierung aneinander gelagert sind. Das aktive Zentrum innerhalb der p20-Untereinheit wurde gelb dargestellt. Abbildung nach (Lavrik et al., 2005).

Die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 am DISC wird in drei theoretischen Modellen diskutiert. Das erste Modell wird als „*induced-proximity model*“ bezeichnet und beschreibt einen Prozess, bei dem sich die lokal rekrutierten Caspasen durch die direkte Nachbarschaft gegenseitig prozessieren und damit aktivieren (Salvesen and Dixit, 1999). Das zweite Modell wird „*proximity-induced dimerisation model*“ genannt und schlägt eine durch lokale Nähe bedingte Dimerisierung und Aktivierung vor, bei der die jeweiligen Caspasen jedoch schon in ihrer prozessierten Form vorliegen. Das dritte „*induced-conformation model*“ schildert eine Aktivierung der Caspasen bedingt durch Konformationsänderungen, wobei infolge der Bindung der Caspasen an das FADD-Adapterprotein das aktive Zentrum freigelegt wird und es so zur Aktivierung kommt (Chao et al., 2005). Die am DISC aktivierte und ins Cytosol freigesetzte Caspase-8 bedingt den weiteren Verlauf des apoptotischen Signalwegs (s. 1.2.3).

Aktive Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8 und -9) führen nachfolgend zu einer Aktivierung der Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6 und -7), wobei zwei verschiedene Signaltransduktionsmechanismen unterschieden werden (s. 1.2.3). Aktivierte Effektor-Caspasen wiederum bewirken die Spaltung zahlreicher cytoplasmatischer und nukleärer Proteine. Unter diesen Caspase-Substraten befinden sich z.B. Regulatoren der Apoptose wie Bcl-2, Bcl-x_L (engl.: **B**-**c**ell **l**ymphoma-extra **large**), IAPs (engl.: **I**nhibitors of **A**poptosis) und cFlip_L, aber auch die in Überlebensfunktionen involvierte Serin/Threonin-Kinase Akt oder der Transkriptionsfaktor NFκB, wodurch ein Übermaß pro-apoptotischer Signale induziert wird (Levkau et al., 1999, Bachelder et al., 2001, Degterev et al., 2003). Des Weiteren werden Struktur-Proteine wie Fodrin, Gelsolin, nukleäre Laminine, Intermediärfilamente und Adhäsionsproteine geschnitten, die unter anderem die für apoptotische Zellen typische Morphologie bestimmen (s. 1.1) (Rao et al., 1996, Kothakota et al., 1997, Ku et al., 1997, Schmeiser et al., 1998). Auch DNA-Reparaturproteine wie ATM, Rad51, DNA-PK oder Zellzyklus-assoziierte Proteine wie cdc27, Wee1 und CDK-

Inhibitoren wie p21 und p27 stellen Substrate der Effektor-Caspasen dar und tragen so letztlich in der Summe zur Vermittlung des Zelltods bei (Janicke et al., 1996, Levkau et al., 1998, Zhou et al., 1998, Hotti et al., 2000, Zong et al., 2004).

1.2.3 Typ I- und Typ II-Zellen oder direkter und mitochondrialer Signalweg

Die am DISC aktivierte Initiator-Caspase-8 assoziiert mit den nachfolgenden Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7), kann diese prozessieren und induziert so auf direktem Weg den Zelltod. In manchen Zellen reicht der Stimulus der Caspase-8 allein allerdings nicht aus, um Apoptose einzuleiten, und eine Verstärkung des am Rezeptor generierten Signals ist erforderlich. Man unterscheidet aufgrund dessen zwischen Typ I-Zellen, bei denen Apoptose auf direktem Weg ausgelöst werden kann, und Typ II-Zellen, die wiederum einer Mitochondrien-assoziierten Amplifikationsschleife zur Induktion des Zelltods bedürfen (s. Abbildung 4) (Scaffidi et al., 1998). Während auf die direkte Aktivierung der Effektor-Caspasen bereits im vorherigen Kapitel eingegangen wurde, soll hier der Fokus auf den sogenannten Typ II-Zellen liegen.

Bei der Regulation des mitochondrialen Verstärkungsmechanismus spielt die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine eine besondere Rolle (s. 1.3). Das BH3-only-Protein Bid (engl.: **B**H3-**i**nteracting domain **d**eath agonist) fungiert dabei als Verbindungsglied zwischen direktem (Typ I-) und mitochondrialem (Typ II-) Apoptosesignalweg, da es durch Caspase-8 gespalten und so aktiviert werden kann (Gross et al., 1999) (s. 1.3.1). Das aktivierte, geschnittene Bid, tBid (engl.: **t**runcated **B**id), transloziert darauf zum Mitochondrium und bewirkt dort zusammen mit Bax (engl.: **B**cl-2-**a**ssoziiated **X** protein) und Bak (engl.: **B**cl-2 homologous **a**ntagonist/**k**iller) die Erzeugung einer Membranpermeabilisierung (MOMP, engl.: **m**itochondrial **o**uter **m**embrane **p**ermeabilization) (Eine detaillierte Erklärung der Induktion der mitochondrialen Membranpermeabilisierung durch tBid ist in Kapitel 1.5 dargestellt). Infolge der MOMP kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, Smac/Diablo (engl.: **s**econd **m**itochondrial-derived **a**ctivator of **c**aspase/**d**irect **I**AP **b**inding protein with a **l**ow pI), Apaf-1 (engl.: **A**poprotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor-**1**), Omi/HtrA2 (engl.: Omi/**h**igh **t**emperature **r**equirement **A**2) und anderen pro-apoptischen Faktoren wie z.B. Endonuklease G (s. Abbildung 4) (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Gross et al., 1999, van Loo et al., 2001, Saelens et al., 2004).

Sobald die Cytochrom C-Konzentration im Cytosol der Zelle steigt, kommt es zur Bildung des Apoptosoms. Bei dem Apoptosom handelt es sich um einen Proteinkomplex aus Apaf-1, Cytochrom C und dATP/ATP, der essentiell für die Aktivierung der Procaspase-9 und somit weiterer Effektor-Caspasen ist.

Apaf-1 liegt im inaktiven Zustand gebunden an dATP vor und kann so weder oligomerisieren noch Procaspase-9 binden. Assoziiert nun Cytochrom C an Apaf-1, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Freilegung der N-terminalen Region des Proteins induziert und die Hydrolyse von dATP zu dADP bedingt. In der Regel lagern sich darauffolgend sieben Apaf-1/Cytochrom C-Komplexe zu einer Rad-Struktur zusammen, in deren Mittelpunkt sich die Procaspase-9-Bindungsstellen, die sogenannten CARD, befinden. Ein funktionsfähiges, aktives

Apoptosom formt sich jedoch nur bei Verfügbarkeit weiterer dATP/ATP-Moleküle und assoziiert andernfalls lediglich zu inaktiven Aggregaten (s. Abbildung 3) (Kim et al., 2005, Yu et al., 2005).

Sobald sich ein aktives Apoptosom gebildet hat, können durch die proteolytische Aktivität der Initiator-Caspase-9, die Effektor-Caspasen aktiviert werden, was im Folgenden die Spaltung cytoplasmatischer und nukleärer Proteine nach sich zieht und so den Zelltod vermittelt (s. 1.2.2).

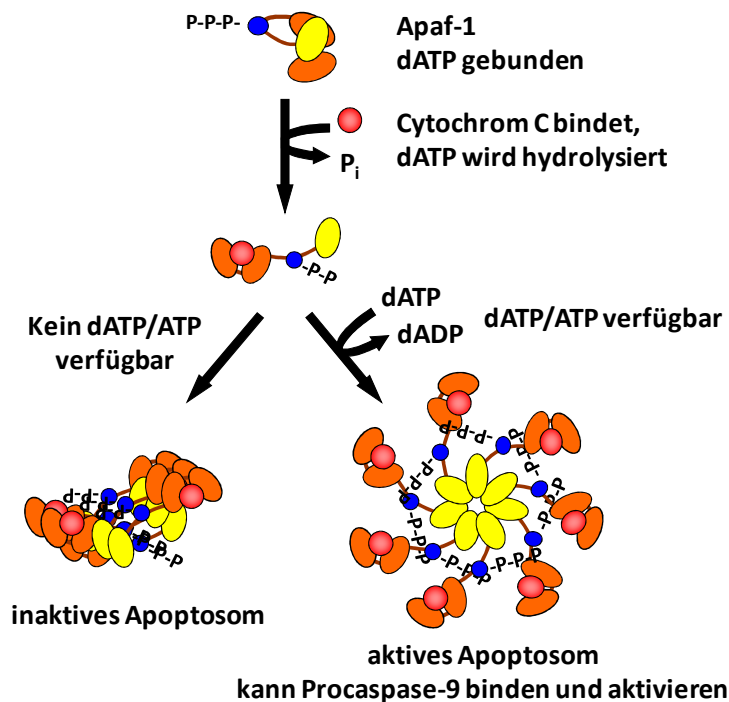


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bildung des Apoptosoms

Apaf-1 ist im inaktiven Zustand an dATP assoziiert und kann in diesem Zustand nicht oligomerisieren und Procaspase-9 binden. Wenn im Zuge der Apoptose Cytochrom C aus dem Mitochondrium ausgeschüttet wird, kann dies begleitet von der Hydrolyse des dATP an Apaf-1 binden. Im Falle von zusätzlich verfügbarem dATP/ATP, wird das dADP durch dATP ausgetauscht, und es kommt zur Bildung eines funktionstüchtigen Apoptosoms. Aktive Apoptosomen binden Procaspase-9 und aktivieren diese. Sollte kein dATP verfügbar sein, kommt es zur Formierung inaktiver Aggregate ohne nachfolgende Procaspase-9-Aktivierung. Abbildung nach (Kim et al., 2005, Yu et al., 2005).

Caspase-9 und die Effektor-Caspasen können jedoch an IAPs (engl.: **I**nhibitors of **A**poptosis) assoziiert sein, wodurch ihre Funktion inhibiert wird.

Die IAPs sind eine Familie von funktionell und strukturell verwandten Proteinen, welche als Inhibitoren der Apoptose fungieren. Mitglieder dieser Familie sind z.B. XIAP (engl.: **x**-linked **IAP**), cIAP1 und cIAP2 (engl.: **c**ellular **IAP1** and **2**). Proteine der IAP-Familie besitzen als charakteristisches Merkmal mindestens eine BIR-Domäne (engl.: **b**aculoviral **IAP** **r**epeat) sowie eine C-terminale Zinkfinger-RING-Domäne (engl.: **r**eally **i**nteresting **n**ew **g**ene). Mittels BIR-Domäne sind die IAPs in der Lage an Caspase-3, -7 oder -9 zu binden und die Aktivität der

Caspase entweder über Blockierung der Substratbindungsstelle (bei Caspase-3 und -7) zu hemmen oder eine Inhibition der Aktivität durch Konformationsänderung (bei Caspase-9) zu bewirken (Roy et al., 1997, Takahashi et al., 1998, Deveraux and Reed, 1999).

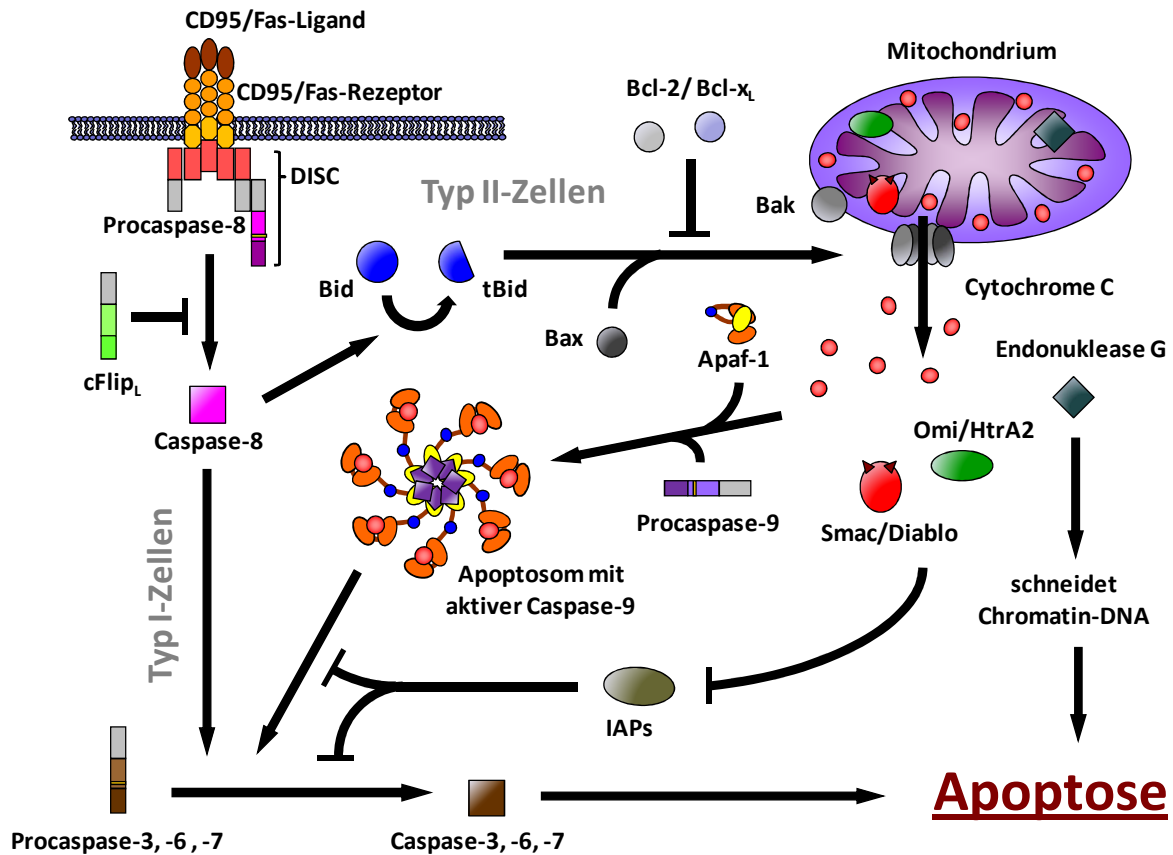


Abbildung 4: Typ I- und Typ II-Apoptose-Signaltransduktionsmechanismus

Infolge einer Ligandenbindung (CD95/Fas-Ligand) an den CD95/Fas-Rezeptor wird die Apoptose durch Assoziation des DISC und Rekrutierung sowie Aktivierung der Procaspase-8 initialisiert. Die am DISC aktivierte Initiator-Caspase-8 kann in Typ I-Zellen direkt mit Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) interagieren, diese aktivieren und so unmittelbar den Zelltod einleiten. In Typ II-Zellen ist hingegen eine Amplifikation des Signals über den mitochondrialen Signalweg erforderlich, um Apoptose zu induzieren. Bid, ein pro-apoptisches BH3-only-Protein der Bcl-2-Familie, fungiert in Typ II-Zellen als Verbindungsglied des am Rezeptor generierten Signals zum Mitochondrium. Es kann durch Caspase-8 gespalten und aktiviert werden (tBid). tBid transloziert zum Mitochondrium und bewirkt dort zusammen mit Bax und Bak eine Membranpermeabilisation, durch die es zur Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren wie Cytochrom C, Smac/Diablo, Apaf-1, Omi/HtrA2 und Endonuklease G kommt. Cytochrom C assoziiert im Folgenden mit Apaf-1, initialisiert die Formierung des Apoptosoms, führt zur Bindung und Aktivierung von Procaspase-9 und so zur Potenzierung des am Rezeptor generierten Apoptose-Stimulus. Smac/Diablo und Omi/HtrA2 sind IAP-Inhibitoren, die die anti-apoptische Wirkung der IAPs blockieren, die insbesondere die Aktivität der Effektor-Caspasen-3, -7 und -9 inhibieren können. Endonuklease G schneidet nach Freisetzung auf Caspase-unabhängigem Weg, Chromatin-DNA und unterstützt so die Apoptose. Bcl-2 und Bcl-x_L haben eine inhibierende Wirkung auf die Initiation der Membranpermeabilisation.

Um eine pro-apoptotische Wirkung während der Apoptose zu verstärken muss somit gewährleistet sein, dass die IAPs selbst inhibiert werden. Dabei kommt den IAP-Inhibitoren Smac/Diablo und Omi/HtrA2 eine wichtige Rolle zu, die zusammen mit Cytochrom C nach Membran-Permeabilisation aus den Mitochondrien freigesetzt werden (Saelens et al., 2004). Smac/Diablo und Omi/HtrA2 besitzen beide ein IAP-Bindemotiv (IBM, engl.: **I**AP **b**inding **m**otif) am N-Terminus. Das IBM interagiert mit der BIR-Domäne der IAPs, wodurch Smac/Diablo und Omi/HtrA2 in der Lage sind die Bindungsstelle der Caspasen an den IAPs kompetitiv zu blockieren und so die proteolytisch aktiven Caspasen von ihren Inhibitoren freizusetzen (Liu et al., 2000, Wu et al., 2000, Du et al., 2000, Yang et al., 2003). Neben dieser antagonistischen Funktion besitzt Omi/HtrA2 zudem eine Serin-Proteaseaktivität und vermag einige IAPs zu spalten und damit irreversibel zu inaktivieren (Srinivasula et al., 2003, Yang et al., 2003).

Durch den mitochondrialen Signalweg, die Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium, der damit einhergehenden Inaktivierung anti-apoptotischer Proteine bzw. insbesondere der so geförderten Formierung des Apoptosoms, kommt es im Gegensatz zum direkten Signalmechanismus zu einer Potenzierung des am Rezeptor generierten Apoptose-Stimulus.

1.3 Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine

Die Bcl-2-ähnlichen Proteine bekamen ihren Namen aufgrund des ersten entdeckten Mitglieds dieser Familie. Das *bcl-2* Gen wurde 1985 während der Erforschung der t(14; 18)-Chromosomen-Translokation des folliculären B-Zell-Lymphoms entdeckt (Tsujiimoto et al., 1985, Bakhshi et al., 1985). Durch die Translokation wird *bcl-2* unter den Promotor der schweren Kette der Immunglobuline gestellt und damit überexprimiert (Cleary et al., 1986). Die Konsequenz dieser Überexpression ist eine gesteigerte Hemmung der Apoptose und eine erhöhte Tumorzinzidenz (Vaux et al., 1988).

Im Laufe der Zeit wurden weitere Bcl-2-ähnliche Proteine entdeckt, die je nach Funktion in pro- und anti-apoptotische Familienmitglieder unterteilt werden können (Adams and Cory, 1998). Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier konservierte **B**cl-2-**H**omologiedomänen (BH) mit α -helikaler Struktur. Aufgrund dieser BH-Domänen werden drei Subgruppen unterschieden (Tsujiimoto and Shimizu, 2000) (s. Abbildung 5). Die erste Subfamilie umfasst anti-apoptotische Proteine, die in den meisten Fällen alle vier BH-Domänen besitzen (BH1-4). Zu ihr gehören unter anderem Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w und Mcl-1. Die zweite Gruppe weist lediglich drei Bcl-2-Homologiedomänen auf (BH1-3). Diese pro-apoptotische Gruppe wird hauptsächlich durch Bax und Bak repräsentiert. Die letzte der drei Gruppen ist ebenfalls pro-apoptotischer Art, die zugehörigen Proteine tragen jedoch nur die BH3-Domäne. Mitglieder dieses Bcl-2-Familianteils nennt man darum auch BH3-only-Proteine, zu denen z.B. Bid, Bim, Bad, Bik, Noxa und Puma gehören. Sie weisen im Allgemeinen bis auf die BH3-Domäne keine Übereinstimmungen zu den restlichen Bcl-2-ähnlichen Familienmitgliedern auf (Danial, 2007). Das Verhältnis zwischen pro-

und anti-apoptotischen Bcl-2-Familien-Proteinen entscheidet dabei über die Sensitivität einer Zelle gegenüber Apoptose-Reizen (Oltvai et al., 1993). Damit zählen die Proteine der Bcl-2-Familie zu den wichtigsten Regulatoren der Apoptose.

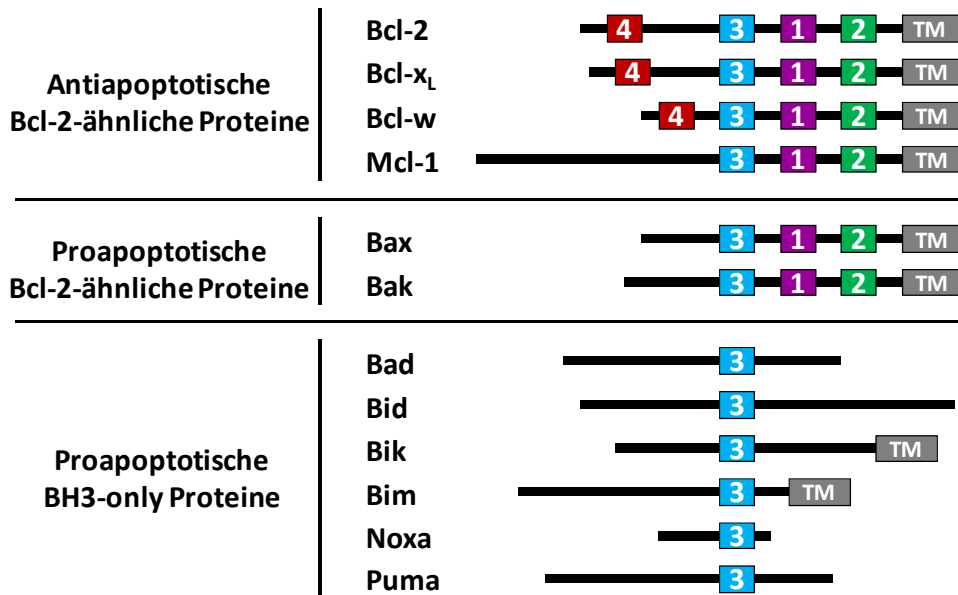


Abbildung 5: Einteilung und Struktur der Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine

Schematische Darstellung ausgewählter Mitglieder der Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine. Proteine dieser Familie besitzen bis zu vier Bcl-2-Homologiedomänen (BH1 bis BH4) und sind in drei Subgruppen unterteilbar. Die erste Gruppe umfasst anti-apoptotisch wirkende Proteine, die drei bis vier BH-Domänen (BH1-4) tragen. Die zweite Gruppe wird von Proteinen mit pro-apoptotischer Aktivität und drei BH Domänen (BH1-3) repräsentiert. Die letzte Gruppe setzt sich aus den sogenannten BH3-only-Proteinen zusammen, die einzig die BH3 Domäne aufweisen und ebenfalls pro-apoptotisch wirken. Die homologen Domänen sind farbig und mit einer entsprechenden Nummer dargestellt (BH1=1, lila; BH2=2, grün; BH3=3, hellblau; BH4=4, rot). Einige der Proteine besitzen zudem Transmembran-Domänen (TM). Die Abbildung wurde schematisiert und modifiziert nach (Youle and Strasser, 2008).

1.3.1 Bid, ein BH3-only-Protein

Das Mediatorprotein Bid (engl.: **B**H3-**i**nteracting domain **d**eath agonist), dem eine bedeutende Rolle bei der Stimulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs zukommt, gehört zur Gruppe der BH3-only-Proteine (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Chou et al., 1999, McDonnell et al., 1999). Die genomische Struktur des humanen und murinen *bid* ist phylogenetisch hoch konserviert (Wang et al., 1996, Esposti, 2002). Zwischen Maus und Mensch besteht nach Translation des Proteins eine 72,3 %ige Homologie des 195 Aminosäuren langen und 22 kDa schweren Proteins (Wang et al., 1996, Sax et al., 2002).

A)

		H1	H2				
1	(Hu)	mdcevnngss	lrdecitnll	vfgflqscsd	nsfrreldal	ghelpvlapq	wegydelqtd
1	(Mu)	mdsevsnsgg	lgakhitd1l	vfgflqssgc	trqelevlgr	elpvqaywea	dledelqtdg
			H3	H4			
61	(Hu)	gnrsshrlg	rieadsesqe	diirniarhl	aqvgdsmdrs	ippglvngla	lqlrntsrse
61	(Mu)	qasrsfnqg	riepdsesqe	eiirniarhl	aqigdemdhn	iqptlvrqla	aqfmngslse
		H5	H6	H7			
121	(Hu)	edrnrdlata	leqllqaypr	dmekektmlv	lal1lakva	shtpsllrdv	fhttvnfinq
121	(Mu)	edkrnclaka	ldevktafpr	dmendkamli	mtmlakva	shapsllrdv	fhttvnfinq
		H8					
181	(Hu)	nlrtyvrsla	rngmd				
181	(Mu)	nlfsvvrnlv	rnemd				

B)

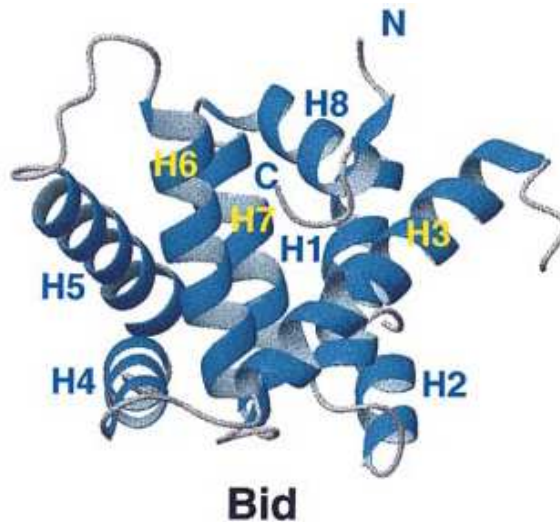


Abbildung 6: Aminosäure-Sequenz und Tertiär-Struktur von Bid

A) Dargestellt ist die 195 Aminosäuren (AS)-lange Sequenz des humanen (Hu) und murinen (Mu) Bid Proteins. Die Struktur von Bid setzt sich aus acht α -Helices (H1-H8) zusammen, die ca. 60 % des gesamten Proteins ausmachen. AS 1-12 und AS 43-77 bilden unstrukturierte Schleifen und sind für post-translationale Modifikationen zugänglich. Die farbliche Darstellung ist wie folgt definiert: Homologiedomänen = orange Balken, unstrukturierte Schleifen = grau unterlegt, BH3-Domäne = gelb unterlegt, hydrophobe AS der BH3-Domäne = rote Buchstaben, AS der hydrophoben Spalte = blaue Buchstaben, Schnittstelle Caspase-3 und -8 = blau markiert, Myristoylierungsstelle und weitere Schnittstelle Capase-8 = dunkelblau markiert, Schnittstelle Granzym B = hellgrün markiert, Schnittstelle Calpain = rot markiert, Schnittstelle Cathepsin = dunkelrot markiert, Ubiquitinylierungsstellen = grüne Buchstaben, Phosphorylierungsstellen der Casein-Kinase 1 und 2 = schwarz markiert, Phosphorylierungsstellen von ATM und ATR = orange Buchstaben. Abbildung modifiziert nach (Chou et al., 1999).

B) Tertiär-Struktur von Bid: Dargestellt ist die tertiäre Struktur des 22 kDa großen Proteins Bid. Bid besteht aus acht α -Helices (H1-H8). H6 und H7 bilden die zentrale hydrophobe Helix-turn-Helix-Struktur und verlaufen antiparallel. H1 bis H5 und H8 sind amphipatisch und flankieren die zentralen hydrophoben Helices. H3 enthält die 16 AS große BH3-Domäne, die für die BH-3-only-Proteine der Bcl-2-ähnlichen Superfamilie typisch ist. Die ungeordneten und flexiblen Schleifen AS 1-12 und AS 43-77 wurden nicht dargestellt. Abbildung nach (Chou et al., 1999).

Während BH3-only-Proteine in der Regel, außer der BH3-Domäne, keine strukturellen Ähnlichkeiten mit den weiteren Subfamilien der Bcl-2-ähnlichen Proteine aufweisen, nimmt Bid in dieser Hinsicht eine Sonderrolle ein (McDonnell et al., 1999, Chou et al., 1999). Die Proteine der Bcl-2-Familie gleichen sich sowohl in der Aminosäure-Sequenz als auch in der Sekundär-Struktur. So besitzen sie ebenso wie Bid eine zentrale hydrophobe Helix-turn-Helix-Struktur, welche außen von Paaren amphipathischer α -Helices flankiert wird (Muchmore et al., 1996, Suzuki et al., 2000, Petros et al., 2001, Moldoveanu et al., 2006). Bid besteht insgesamt aus acht α -Helices (H1-H8), die ca. 60 % des gesamten Proteins ausmachen (s. Abbildung 6). H6 und H7 verlaufen antiparallel und stellen die zentrale hydrophobe Einheit der Struktur dar (Yin, 2006). Durch die Reste L¹⁰⁵, Y¹⁴⁰, V¹⁵⁰, L¹⁵¹ und L¹⁵⁴ wird eine hydrophobe Spalte geformt, die der von multi-BH-Domänen-Proteinen gleicht und ein weiterer Hinweis für die homologe Evolution von Bid und den zentralen Bcl-2-ähnlichen Familienmitgliedern ist (Aouacheria et al., 2005). Die restlichen sechs Helices (H1-5, H8) sind amphipatisch und umgeben die zentrale Helix-turn-Helix-Struktur. H3 enthält die 16 AS große BH3-Domäne und ist über hydrophobe Wechselwirkungen an H1 und H8 assoziiert. Vor H1 (AS1-12) und zwischen H2 und H3 befinden sich unstrukturierte Schleifen, wobei die größere dieser Schleifen (AS 43-77) für post-translationale Modifikationen und die Aktivierung von Bid zugänglich ist (Yin, 2006) (s. 1.4). Die BH3-Domäne in Helix 3 ist essentiell für die pro-apoptotische Wirkung von Bid und gewährleistet die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit anderen multi-BH-Domänen-Proteinen (Cosulich et al., 1997, Wang et al., 1996, Kelekar and Thompson, 1998). So konnte für Bak, eine Bcl-2-ähnliches Protein der Gruppe 2, eine Interaktion der BH3-Domäne mit der hydrophoben Spalte von Bcl-x_L nachgewiesen werden (Sattler et al., 1997). Obwohl Bid keine BH1- und BH2-Domäne besitzt, weist es eine zu Bak homologe Struktur auf, und mittels rechnergestützter Modellerstellung wurde ebenfalls eine Bildung von Heterodimeren zwischen Bid und Bcl-x_L prognostiziert (Chou et al., 1999, Suzuki et al., 2000). Dabei sind die entscheidenden hydrophoben Reste (I⁸², I⁸⁶, L⁹⁰ und M⁹⁷) der BH3-Domäne von Bid so nach außen gerichtet, dass sie ideal in die hydrophobe Spalte von z.B. Bcl-x_L passen (Chou et al., 1999).

1.4 Regulation der Aktivität von Bid

Unter Normalbedingungen sind die Bcl-2-ähnlichen Proteine so reguliert, dass sich ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Familienmitgliedern einstellt (Adams and Cory, 1998). Die Regulation der Aktivität von Bid bzw. der BH3-only-Proteine erfolgt dabei sowohl auf transkriptionelle, post-transkriptionelle oder post-translationaler Ebene (s. 1.4.1 und 1.4.2).

1.4.1 Transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation

Auf transkriptioneller Ebene kann Bid sowohl positiv als auch negativ reguliert werden. Als positiver Bid-Regulator wurde dabei z.B. p53 identifiziert, das mit p53-binding-Elementen, die

6,6 kb und 20kb upstream auf dem Bid-Gen lokalisiert sind, interagiert. Eine p53-Überexpression führte so zu einer gesteigerten Konzentration der Bid mRNA (Sax et al., 2002). Eine negative Bid-Regulation konnte hingegen im Rahmen der akuten promyelozytären Leukämie gezeigt werden (Parrado et al., 2004). Dabei wird im akuten Krankheitsstadium die Bid-Expression transkriptionell durch PLZF (engl.: **p**romyelo**cytic l**eukemia **z**ink **f**inger) stark supprimiert. Interessanterweise wurde entsprechend durch die Deletion von Bid in einem Bid-Knockout-Mausmodell eine chronische myelomonozytäre Leukämie induziert (Zinkel et al., 2003).

Die Regulation der BH3-only-Proteine auf post-transkriptioneller Ebene ist bisher wenig erforscht. Anhand des BH3-only-Proteins Bim wurde die Bedeutung von AU-reichen Elementen in der 3'-nichttranslatierten Region der mRNA untersucht. Abhängig von niedrigen Cytokin-Leveln kann Hsc70 (engl.: **h**eat-**s**hock **c**ognate protein **70**) an diese AU-reichen Elemente binden und so die Stabilität der mRNA erhöhen. Dies wiederum fördert die Bim-Expression und führt in Konsequenz zu gesteigerter Apoptose (Matsui et al., 2007). Hingegen hat die Expression eines micro-RNA (miRNA)-Clusters, der auf dem humanen Chromosom 13 codiert ist, eine inhibierende Wirkung. Die miRNA liegt z.B. in Lymphomen, aber auch anderen Krebsarten, überexprimiert vor und korreliert mit der Hemmung der Translation des pro-apoptischen Bim-Proteins (Xiao et al., 2008).

1.4.2 Post-translationale Regulation und Modifikation

Auf post-translationaler Ebene ist die Aktivierung von Bid im Rahmen der Apoptose vor allem durch Caspasen reguliert. Caspase-8, als Initiator-Caspase der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose (Fas, TNF-R1), spielt hierbei eine besondere Rolle (s. 1.2). So wird Bid nach Fas-Rezeptor-Aktivierung von Caspase-8 in der unstrukturierten Schleife zwischen H2 und H3 geschnitten (s. Abbildung 6) (Li et al., 1998). Das Schneiden von Bid führt dabei zu einer Konformationsänderung im Protein, wodurch die BH3-Domäne freigelegt wird. Das so entstandene tBid (engl.: **t**runcated **B**id) interagiert mit Bax und Bak und leitet nachfolgend die Freisetzung von apoptogenen Faktoren (z.B. Cytochrom C und Apaf-1) aus dem Mitochondrium ein (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Kim et al., 2000, Wei et al., 2000) (s. 1.2.3). Des Weiteren kann Bid durch die Effektor-Caspase-3 an derselben Stelle (D⁵⁹) gespalten werden, die auch von Caspase-8 geschnitten wird, während Caspase-7 und -6 keine Wirkung auf die Aktivität von Bid haben (Bossy-Wetzel and Green, 1999, Slee et al., 2000). Infolge der Spaltung von Bid durch Caspase-8 wird die Aminosäure G⁶⁰ zum neuen N-terminalen Ende des Proteins, das wiederum durch N-Myristoylierung einer weiteren post-translationalen Modifikation unterzogen wird (Zha et al., 2000). Bid kann darüber hinaus von anderen Proteasen wie Granzym B, Calpainen und Catepsinen gespalten und aktiviert werden, um Apoptose auszulösen. Granzym B, eine Serin-Protease, wird z.B. von T-Killerzellen freigesetzt und kann entweder direkt Caspase-3 aktivieren oder aber Bid in der unstrukturierten Schleife zwischen H2 und H3 schneiden, das dann aktiviert vorliegt und die Apoptose-Signalkaskade auslöst (Barry et al., 2000, Sutton et al., 2000, Lord et al., 2003, Waterhouse et al., 2005, Bots and Medema, 2006). Calpaine, sind Ca²⁺-abhängige

Cystein-Proteasen und reagieren ihrem Namen entsprechend sensibel auf Ca^{2+} -Konzentrationsschwankungen in Zellen. So können Calpaine Bid z.B. im Zuge von Gewebe-Reperfusion nach Ischämie in der unstrukturierten Schleife zwischen H2 und H3 (G⁷⁰, R⁷¹) schneiden und dadurch Apoptose initiieren (Chen et al., 2001, Mandic et al., 2002). Catepsine sind Proteasen, die hauptsächlich in Lysosomen gespeichert sind und aus ihnen freigesetzt werden können, wobei der Mechanismus der Freisetzung bisher noch unklar ist (Reiners et al., 2002, Cirman et al., 2004, Conus and Simon, 2008). Catepsine können Bid direkt schneiden und dadurch den mitochondrialen Apoptosesignalweg aktivieren (Stoka et al., 2001, Reiners et al., 2002). Den Catepsinen wird dabei eine wichtige Rolle als Rückkopplungs- und Verstärkungsmechanismus zugeschrieben, da sie erst nachfolgend von Bid aktiviert werden, schließlich aber Bid vorgeschaltet agieren (Guicciardi et al., 2005).

Während Bid ein sehr stabiles und langlebiges Protein ist, hat tBid lediglich eine Halbwertszeit von ca. 1,5 h. Jedoch konnte die Lebensdauer von tBid durch Hemmung des Ubiquitinylierungs-Proteasom-Systems signifikant verlängert werden (Breitschopf et al., 2000). Ebenso wurden höhere Proteinlevel von Bim und Noxa nach Proteasom-Inhibition detektiert, was nahelegte, dass die Aktivität von BH3-only-Proteinen möglicherweise auch über Ubiquitinylierung und den Abbau durch das Proteasom reguliert wird (Nikrad et al., 2005, Fernandez et al., 2005). Ein genauerer Mechanismus ist bisher allerdings nicht geklärt.

Eine weitere wichtige post-translationale Modifikation der BH3-only-Proteine stellt die Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen dar. Die Wirkung der Phosphorylierung auf die apoptotische Wirkung der jeweiligen Proteine kann dabei sehr unterschiedlich ausfallen. So hemmt die Phosphorylierung von Bad die pro-apoptotische Aktivität (Zha et al., 1996, Zhou et al., 2000), während Ca^{2+} -abhängige Protein-Phosphatasen, wie Calcineurin, Bad dephosphorylieren und so pro-apoptotisch wirken können (Wang et al., 1999). Die Phosphorylierung von Bik kann im Gegensatz zu Bad pro-apoptotisch wirken, da Bik im phosphorylierten Zustand besser an anti-apoptotische Bcl-2-ähnliche Proteine bindet und diese so hemmt (Verma et al., 2001). Bid kann in der unstrukturierten Schleife zwischen H2 und H3 durch Casein-Kinase 1 und 2 (CK1/CK2, engl.: casein kinase 1/2) an S⁶¹ und S⁶⁴ im murinen bzw. an T⁵⁹ im humanen Protein phosphoryliert werden und verliert damit die Anfälligkeit gegen eine Caspase-8-Spaltung (Desagher et al., 2001, Degli Esposti et al., 2003) (s. Abbildung 6), wodurch der Bid-Phosphorylierung in diesem Fall ein anti-apoptotischer Effekt zukommt. Überdies stellt Bid ein Substrat für die mit der DNA-Schädigung assoziierten Kinasen ATM und ATR (engl.: Atm- and Rad3-related) dar (Kamer et al., 2005, Zinkel et al., 2005). ATM und ATR sind Serin/Threonin-Kinasen, die spezifisch durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert werden und Bid an S⁶¹ und S⁷⁸ phosphorylieren. Infolge dieser Phosphorylierung konnte die Induktion eines S-Phase-Arrests beobachtet werden, was eine mögliche Funktion von Bid im Rahmen der Zellzyklus-Kontrolle aufzeigt (Kamer et al., 2005) (s. 1.6).

1.5 Funktion von Bid in der Apoptose

Bid wird im Allgemeinen als pro-apoptotisches BH3-only-Protein der Bcl-2-Familie angesehen. Im Verlauf der Apoptose besteht die Funktion der BH3-only-Proteine, insbesondere von Bid, darin, Sensoren für verschiedene Todesreize darzustellen und sie zum Mitochondrium weiterzuleiten. Infolge einer Aktivierung führen Bid und weitere BH3-only-Proteine zusammen mit Bax und Bak zur Initiierung der mitochondrialen Membranpermeabilisierung (MOMP). Der genaue Mechanismus ist dabei bisher noch nicht im Detail geklärt, es existieren jedoch zwei Modelle, die versuchen die Zusammenhänge darzustellen (Letai et al., 2002, Chen et al., 2005).

Im indirekten Modell wird postuliert, dass Bax und Bak stets assoziiert mit anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie vorliegen. Infolge ihrer Aktivierung interagieren die BH3-only-Proteine mit diesen anti-apoptotischen Bindungspartnern, wodurch wiederum Bax und Bak freigesetzt werden (Willis et al., 2007). Fraglich an diesem Modell ist jedoch, dass im gesunden Zustand alle pro-apoptotischen Proteine bzw. im Rahmen der Apoptose-Induktion alle anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie an BH3-only-Proteine gebunden sein müssten.

Im direkten Modell stellen die BH3-only-Proteine direkte Aktivatoren von Bax und Bak dar. Die BH3-only-Proteine werden in diesem Zusammenhang in zwei Subklassen unterteilt. Demnach gibt es „Aktivatoren“ und „Sensibilisatoren“ (oder „Derepressoren“), die als Antwort auf Todesreize innerhalb der BH3-only-Proteine miteinander kooperieren (Letai et al., 2002). Die „Aktivatoren“, zu denen z.B. Bid, Bim und Puma gehören, führen direkt zur Freisetzung von apoptogenen Faktoren aus dem Mitochondrium (Kim et al., 2006). Die „Sensibilisatoren“ wie Bad, Bmf oder Noxa wirken hingegen nicht direkt auf das Mitochondrium bzw. die Cytochrom C-Freisetzung, sondern binden an anti-apoptotische Proteine und verlagern so das Gleichgewicht zu den „Aktivatoren“ (Kim et al., 2006). Sie können dabei sowohl BH3-only-Proteine als auch Bax und Bak unterstützen (Willis et al., 2005, Certo et al., 2006, Uren et al., 2007). Anti-apoptotische Bcl-2-ähnliche Proteine der BH1-4-Subfamilie, wie z.B. Bcl-x_L, wirken diesem Prozess entgegen und können die Aktivität der pro-apoptotischen Proteine hemmen (Billen et al., 2008). Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen zeigten, dass anti-apoptotische BH1-4-Proteine eine nahezu universelle Bindungsfähigkeit von BH3-only-Proteinen haben (Chen et al., 2005). Hingegen weisen die BH3-only-Proteine wie Bid eine sehr spezifische Bindungsaffinität auf und interagieren vornehmlich mit den BH1-3-Proteinen Bax bzw. Bak (Wang et al., 1996). Die Fähigkeit der Bcl-2-Familien-Proteine miteinander zu interagieren und Heterodimere zu bilden ist dabei die Basis für die Regulation des Gleichgewichts zwischen Leben und Tod (Adams and Cory, 1998).

Todesreize im Rahmen der Apoptose führen generell zu einer gesteigerten Aktivität verschiedener Proteasen (Caspasen, Granzym B, Calpaine und Cathepsine) (s. 1.4). Diese Proteasen schneiden Bid, welches daraufhin als aktiviertes tBid zum Mitochondrium transloziert. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Bid auch im ungeschnittenen Zustand Apoptose induzieren kann, dennoch zeigt tBid eine deutlich höhere Affinität und stärkere Interaktion mit Bax und Bak (Wang et al., 1996, Kim et al., 2000). Interagiert tBid mit Bax und Bak, vollzieht sich innerhalb der Proteine eine Konformationsänderung, die in einer stabilen Einlagerung und

Oligomerisierung in der äußeren Mitochondrienmembran resultiert (Eskes et al., 2000, Wei et al., 2000). Bak ist konstitutiv in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Wei et al., 2000, Cheng et al., 2003). Bax hingegen liegt im inaktiven Zustand im Cytosol bzw. locker an die äußere Mitochondrienmembran assoziiert vor. Während der Apoptose transloziert Bax zum Mitochondrium, um sich dort in die Membran einzulagern. Dabei ist die Translokation zum Mitochondrium unabhängig von tBid, die Einlagerung in die Membran erfolgt allerdings ausschließlich nach Aktivierung von Bid (Wei et al., 2001, Zhao et al., 2001). Die Interaktion zwischen Bid und Bax geschieht dabei spezifisch über die BH3-Domäne und führt zur Oligomerisierung und dem Einbau von Bax in die äußeren Mitochondrienmembran (Desagher et al., 1999, Zhao et al., 2001).

In vivo Experimente haben gezeigt, dass Bax- und Bak-doppelt-defiziente Mäuse resistent gegenüber FasL-induzierter Apoptose sind (Wei et al., 2001, Kuwana et al., 2005). Eine vergleichbare Apoptose-Resistenz zeigt sich auch bei Bid-defizienten Mäusen (Yin et al., 1999). Eine apoptotische Reaktion, die durch BH3-only-Proteine vermittelt wird, ist somit sowohl abhängig von Bid als auch von Bax und Bak. Wie Bid im Detail mit Bax und Bak interagiert und wie es zur Porenbildung und Erzeugung der mitochondrialen Membranpermeabilisierung kommt, bedarf noch weiterer Erforschung.

1.6 Nicht-apoptotische Funktion von Bid

Neben der gut definierten pro-apoptotischen Funktion von Bid gibt es auch Hinweise, dass Bid eine pro-proliferative Funktion haben kann und als DNA-Schadens-Sensor fungieren kann (Bai et al., 2005, Zinkel et al., 2005). Auch eine Reihe anderer Bcl-2-Familien-Proteine, wie z.B. Bcl-2, Bcl-x_L, Bax und Bad, übernehmen Funktionen im Rahmen der Proliferationsregulation (Cory et al., 2003). So treten sowohl T-Zellen als auch Mausembryo-Fibroblasten Bid-defizienter Mäuse im Gegensatz zu denen von WT-Kontrolltieren verzögert in den Zellzyklus ein (Bai et al., 2005). Des Weiteren zeigten diese Studien eine verlangsamte Tumorentstehung nach Gabe des Kanzerogens Diethylnitrosamin sowie einen verzögerten Proliferationsstart von Hepatozyten infolge einer partiellen Leberteilresektion als Stimulus, die darüber hinaus mit einer verminderten Expression von Cyclin E einherging. Die Signaltransduktionswege, die in diesem Zusammenhang durch Bid beeinflusst werden, sind noch nicht näher erforscht. Die reduzierten Cyclin E-Proteinlevel könnten jedoch auf einen Einfluss von Bid auf die prä-S-Phase hinweisen (Bai et al., 2005). Tragen Zellen während der Proliferation DNA-Schäden davon bzw. sind sie Replikationsstress ausgesetzt, akkumulieren sie aufgrund des S/G₂-Kontrollpunkts in der S-Phase. Diese Akkumulation ist jedoch in Bid-defizienten Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen nicht nachweisbar, was auf eine Rolle des Bid-Proteins in der Kontrolle des S-Phase-Arrests bzw. im Rahmen von DNA-Reparaturmechanismen hindeutet (Kamer et al., 2005, Zinkel et al., 2005).

Bemerkenswerterweise konnte Bid, das eigentlich als Apoptose-Mediator im Cytosol und am Mitochondrium lokalisiert ist, auch als Substrat der Serin/Threonin-Kinasen ATM und ATR

identifiziert werden, die Bid an S⁶¹ und S⁷⁸ phosphorylieren (Zinkel et al., 2005). So belegen *in vivo* Untersuchungen mit nicht-phosphorylierbaren Bid-Mutanten, dass diese Zellen viel sensibler auf eine Apoptose-Induktion durch DNA-schädigende Substanzen wie den Topoisomerase II-Hemmer Etoposid reagieren als die der WT-Kontrollen (Kamer et al., 2005). Der genaue Mechanismus, wie Bid den S-Phase-Arrest einleitet, ist jedoch noch nicht geklärt.

1.7 Ziel und Konzept der Arbeit

Zellen werden aufgrund unterschiedlicher intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen infolge der Fas-Rezeptor-Aktivierung in Typ I- (direkter Signalweg) und Typ II-Zellen (mitochondrialer Signalweg) unterteilt. Dabei führt ein Fas-Trigger in Typ I-Zellen über die Initiator-Caspase-8 direkt zur Aktivierung von Effektor-Caspasen, während in Typ II-Zellen eine über die Mitochondrien vermittelte Amplifikationsschleife benötigt wird, um Apoptose auszulösen. Das Bcl-2-ähnliche BH3-only-Protein Bid fungiert dabei als entscheidender Mediator zwischen direktem und mitochondrialem Apoptose-Signalweg.

In vivo Experimente an Bid-defizienten Mäusen weisen eine Resistenz von Hepatozyten gegenüber dem anti-CD95/Fas-Antikörper Jo₂ als Apoptose-Stimulus nach, weshalb Leberzellen folglich als Typ II-Zellen charakterisiert sind. *In vitro* Studien mit dem physiologischen FasL zeigen dagegen keine Unterschiede in der apoptotischen Reaktion verschiedener Zelltypen. Sie stellen somit die Fähigkeit des Antikörpers Jo₂, die physiologischen Gegebenheiten wiederzuspiegeln, in Frage.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen haben das Ziel, einen Beitrag zur weiteren Klärung der Steuerungsvorgänge der apoptotischen Reaktionen zu liefern.

Daher sollen zuerst Bid^{-/-}-Mäuse wie auch die entsprechenden WT-Kontrollen neben Jo₂ insbesondere mit MegaFasL behandelt und ihre Reaktion auf die beiden Stimuli untersucht werden. MegaFasL ist ein hexameres Konstrukt des physiologischen sFasL, das einen deutlich stärkeren Apoptose-Trigger darstellt.

Des Weiteren soll in Hinsicht auf einen apoptotischen Effekt des MegaFasL die Rezeptor-vermittelte Apoptose näher analysiert bzw. eine potentielle Involvierung weiterer Todesrezeptoren, wie des TNF-Rezeptors, erforscht werden. Dazu soll einerseits Fas-Rezeptor-defizienten Mäusen entsprechend Jo₂ bzw. MegaFasL injiziert und andererseits die TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose im *in vivo* Modell durch Applikation von LPS/GalN induziert werden. Ferner soll die Abhängigkeit der intrazellulären Signaltransduktion anhand der Gabe eines Caspase-Inhibitors bestimmt werden.

Ergänzend dazu soll die apoptotische Wirkung von Jo₂ bzw. MegaFasL anhand von drei weiteren, bereits in der Literatur beschriebenen *in vivo* Apoptose-Resistenz-Modellen und zwar Leberteilresektion, Gallengangligatur und Suramin-Behandlung verglichen werden.

Schließlich soll der Effekt der beiden Apoptose-Stimulatoren Jo₂ und MegaFasL auf WT- bzw. auf nicht-phosphorylierbare Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse analysiert werden. Denn auch die post-translational Phosphorylierung des Bid-Proteins repräsentiert einen potentiellen Mechanismus

zur Apoptose-Inhibition, da Phosphatreste Spaltung und Aktivierung von Bid durch Caspase-8 hemmen.

Abschließend soll dem Hinweis nachgegangen werden, dass Bid, neben seiner Funktion als Mediator des Apoptose-Signals, auch ein Substrat der Kinasen ATM und ATR darstellt und möglicherweise in die Zellzyklus-Regulation involviert ist. Dazu soll ein potentieller Einfluss von Bid auf die hepatozelluläre Proliferation nach Stimulation durch Leberteilresektion sowohl in WT- und Bid^{-/-}-Mäusen als auch in den nicht-phosphorylierbaren Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Versuchstier	Herkunft
C57BL/6J (Kontrollmäuse)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57BL/6-Bid ^{tm1535JK} (Bid-defiziente Mäuse)	Diese Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Stanley J. Korsmeyer (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Etablierung einer eigenen Zucht zur Verfügung gestellt (Yin et al., 1999).
B6.MRL-Tnfrsf6 ^{lpr} /J (Fas-Rezeptor-defiziente Mäuse)	Proben dieser Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Hartmut Jaeschke (University of Kansas Medical Center, Kansas City, USA) zur Verfügung gestellt (s. 2.2.1).
Bid ^{S61A/S78A} KI (Mäuse mit nicht-phosphorylierbarer Bid-Mutation)	Proben dieser Tiere sowie von WT-Wurfgeschwistern in einem gemischten Hintergrund wurden freundlicherweise von Dr. Atan Gross (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt (s. 2.2.2).

2.2 Proben, die für die Analysen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden

Die in diesem Teilabschnitt beschriebenen Experimente wurden im Labor von Dr. Hartmut Jaeschke (University of Kansas Medical Center, Kansas City, USA) (s. 2.2.1) und Dr. A. Gross (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) (s. 2.2.2) durchgeführt. Die im Verlauf der Experimente gewonnenen Proben wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Arbeit analysiert und ausgewertet.

2.2.1 Kontrolle der Fas-Rezeptor-spezifischen Aktivierung der MegaFasL-induzierten Apoptose und der Abhängigkeit von Caspasen

Um zu prüfen, ob die in dieser Arbeit untersuchte Apoptose spezifisch durch den Fas-Rezeptor aktiviert wird, wurden Fas-Rezeptor-defiziente *lpr*-Mäuse (B6.MRL-Tnfrsf6^{lpr}/J) und vergleichbare WT-Kontrollen (C57Bl/6J) mit MegaFasL behandelt.

Apoptose wurde dabei, vergleichbar mit den in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Apoptose-Untersuchungen, mit MegaFasL durchgeführt und sowohl mit 0,05 µg/g (LD) als auch mit 0,08 µg/g (HD) MegaFasL stimuliert. Als Negativkontrolle (C) diente eine Scheinbehandlung mit 0,9 % NaCl-Lösung. Die Tiere wurden nach 2 h zur Probenentnahme euthanasiert.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die nach MegaFasL-Behandlung gezeigte Apoptose spezifisch von Caspasen abhängig ist. Um dies zu testen wurden WT-Mäusen (C57Bl/6J) 20 min vor Injektion des Mega FasL 10 µg/g eines Pan-Caspase-Inhibitors (Z-VD-fmk) i.p. gespritzt. Die MegaFasL-Behandlung erfolgte auch hier (analog zu Kap.3.1.2.1) mit 0,05 µg/g (LD) sowie mit 0,08 µg/g (HD). Als Kontrolle wurden Tiere ohne Caspase-Inhibitor scheininjiziert.

Für die Analysen dieser Arbeit wurden gefrorene Serumproben, schockgefrorenes Gewebe und in Paraffin eingebettetes Lebergewebe für histologische Untersuchungen bereitgestellt.

2.2.2 Relevanz des Phosphorylierungsstatus von Bid für die Resistenz gegenüber Jo₂-induzierter Apoptose und der Proliferationskapazität von Hepatozyten

Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse weisen eine nicht-phosphorylierbare Mutation von Bid auf (Schüngel et al., 2009). Proben dieser Tiere dienten zur Analyse der Bedeutung der Phosphorylierung von Bid für die Jo₂-induzierte Apoptose im Apoptose-Resistenz-Modell. Diese Analyse wurde in drei verschiedenen experimentellen Ansätzen durchgeführt: Teilresektion der Leber (s. 3.1.3.1), Gallengangsligatur (s. 3.1.3.2), Suramin-Behandlung (s. 3.1.3.3). In allen drei Apoptose-Resistenz-Modellen wurden Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen und Wildtyp-Wurfgeschwistern 0,5 µg/g des CD95/Fas-Antikörpers (Klon: Jo₂) injiziert (s. 3.1.2.1). Zur Kontrolle wurden die Tiere mit 0,9 %-NaCl-Lösung scheinbehandelt.

Weitere Proben dieser Tiere dienten zur Analyse der proliferativen Kapazität der Hepatozyten in der murinen Leber. Hierzu wurde den Versuchstieren 2/3 der Leber entnommen (s. 3.1.4) und die Zell- und Geweberegeneration im zeitlichen Verlauf analysiert (Mitchell and Willenbring, 2008). Dazu wurden Tiere 0, 3, 6, 24, 32, 37, 42, 48, 60 und 120 h nach dem operativen Eingriff zur Probenentnahme euthanasiert. Für die Analysen dieser Arbeit wurden schockgefrorene Gewebeproben für Western Blot-Analysen und Paraffingewebepräparate für histologische Untersuchungen ausgehändigt.

2.3 Reagenzien zur Behandlung der Tiere

Reagenz	Firma
aufgereinigter Maus anti-CD95 (Fas)-Antikörper (Klon: Jo ₂)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
h-ACRP30, h-FasL (MegaFasL)	Apoxis SA, Lausanne, Schweiz
Ketamin	Dr. E. Graeub AG, Bern, Schweiz
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Suramin Natriumsalz	Fluka/Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylazin/Rompun	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
β-D-Galactosaminpentaacetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.4 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Qualitätsstufe *'pro analysis'* der Firmen Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Mallinckrodt Baker (Griesheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (München, Deutschland) verwendet. Darüber hinaus wurden spezielle Chemikalien folgender Firmen bezogen:

Chemikalie	Firma
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Fluka/Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BrdU (5´Bromo-2´deoxyridin)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propansulfonat)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Citrat (wasserfrei)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
D-Manitol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PIPES (1,4-Piperazinyl Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin)	Fluka/Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Xylen	Mallinckrodt Baker Deutschland, Griesheim, Deutschland

2.5 Kitsysteme, Lösungen und Enzyme

Produkt	Firma
30 % Acrylamid-/Bisacrylamid Stammlösung (w/v)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
30 % H ₂ O ₂ -Lösung (w/v)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ac-DEVD-AMC, Caspase-3-Substrat	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ac-DEVD-CHO, Caspase-3-Inhibitor	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Ac-IETD-AFC, Caspase-8-Substrat	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ac-IETD-CHO, Caspase-8-Inhibitor	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Antikörperverdünnungsmedium	Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Labs/Axxora Deutschland, Lörrach, Deutschland
Caspase-Glo 9 Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dNTPs	GeneCraft, Münster, Deutschland
Eosin Y-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Formaldehyd-Lösung, 3,5-3,7%, gepuffert	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Gel Star Nucleic Acid Gel Stain	Cambrex Profarmaco, Mailand, Italien
GoTaq 5x-Green Reactionbuffer	Promega, Mannheim, Deutschland
GoTaq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
GVA Eindeckmedium	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Histostain-Plus Kit (AEC, Broad Spectrum)	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Histostain-Plus Kit (HRP, Broad Spectrum), (enthält broad spectrum antibody plus und HRP-streptavidin plus)	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein isotone Natriumchloridlösung, 0,9 %	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (10x) (Phosphate Buffered Saline)	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S Rot Färbelösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trockenmilchpulver/Magermilchpulver	TSI, Zeven, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
VECTASHIELD-Eindeckmedium	Vector Labs/Axxora Deutschland, Lörrach, Deutschland
Western-Lightning ECL-Enhanced Chemiluminescence Substrat	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Zell-Lyse-Puffer 1 (10x)	Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Zell-Lyse-Puffer 2 (1x)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ziegen-Serum (10%)	Zymed/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Deckgläschen	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland
Faden, Ethicon Mersilene (FS-2, 3-0)	Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland
Faden, Ethicon Vicryl Plus (RB-1 plus, 5-0)	Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland
Hyperfilm-ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
Paraffin, tissuwax	Medite Medizintechnik, Nunningen, Schweiz
Paraplast	Medite Medizintechnik, Nunningen, Schweiz
PVDF-Membranen	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Super Frost plus Glas-Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland
Wärmematte, MUL T PAD (33x46cm)	GayMar Industries, Orchard Park, USA
Whatman Chromatographie-Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Firma
anti-Actin (C-11)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Ki67 Antigen	Vector Labs/Axxora Deutschland, Lörrach, Deutschland
anti-Bax (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Bcl-x	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
anti-Bid	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-Caspase-8 (1G12)	Alexis Biochemicals/Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti-c-Flip	Stressgene/Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti-cIAP1	Abcam, Cambridge, England
anti-c-Jun (60A8)	Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-geschnittene Caspase-3 (Asp175)	Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-Cyclin A (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Cyclin B1 (H-433)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Cyclin D1 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Cyclin E (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

anti-Cytochrome C (H-104)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Fas (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Mcl-1	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
anti-Bromo-deoxyuridine (clone BU-1)	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
anti-PCNA (FL-261)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-Smac/Diablo	Abcam, Cambridge, England
anti-Stat 3-p (Tyr705)	Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany
anti-Stat-3	Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Firma
Biotin-konjugierter sekundärer Antikörper (von der Ziege anti-Kaninchen-IgG)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Biotin-konjugierter sekundärer Antikörper (von der Ziege anti-Maus-IgG)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HRP-konjugierter sekundärer Antikörper (vom Esel anti-Ziege-IgG)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
HRP-konjugierter sekundärer Antikörper (von der Ziege anti-Kaninchen-IgG)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
HRP-konjugierter sekundärer Antikörper (von der Ziege anti-Ratte-IgG)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

2.8 Oligonukleotide

Alle PCR-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen.

Name	Sequenz
Bid allgemein:	5'-TGT CCC ACA CTT CCG AAA TGT C-3'
Bid wildtyp:	5'-CAG ACA TCT CGC CCA AAT AGG-3'
Bid mutiert:	5'-TGC TAC TTC CAT TTG TCA CGT CCT-3'

2.9 Geräte

Gerät	Firma
Alexa 350 Filter	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Alexa 488 Filter	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Badgefäß 006T	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Chirurgische Schere (grade, stumpf/stumpf)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einhängethermostat E100 Ecoline Staredition	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Glashomogenisator A, 2 ml	Kontes Glass Co., Vineland, USA
Glashomogenisator B, 2 ml	Kontes Glass Co., Vineland, USA
Graefe Pinzette (gebogen, gezahnt)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Histokinette, Leica TP 1020	Leica Biosystems Nussloch, Nussloch, Deutschland
Inkubations-/Inaktivierungswasserbad Typ 1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Leica DFC 320, Hell-/Dunkelfeldkamera	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DFC 350 FX, monochrome Fluoreszenzkamera	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DM 4000 B, Digitalmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer RCT basic IKA safety control	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Mastercycler ep gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini-PROTEAN II Elektrophoresezelle	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Mini-PROTEAN Trans-Blot elektrophoretische Transferzelle	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Olympus AU-400	Olympus, Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments, Kelheim, Deutschland
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Rasierer, Wella Contura	Wella AG, Darmstadt, Deutschland
REAX Reagenzglas Schüttel- und Mischgerät	Heidolph Instruments, Kelheim, Deutschland
Rotoationsmikrotom HM 340 E	Microm International/Thermo Fischer Scientific, Walldorf, Germany
SpectraMax Gemini EM Spektrofluorometer	Molecular Devices/Analytical Technologies, Ismaning, Deutschland
Spektrophotometer µQuant	BioTek Instruments Deutschland, Bad Freidrichshall, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material

Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultra-Turrax T25 basic (Shredder S 25 N-8 G)	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Wolframcarbid-Irisschere (gerade, scharf/scharf)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.10 Software

Programm	Firma
Microsoft Office, Excel	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
SoftMax Pro 4.8	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Graph Pad Prism	Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA
Software KC4 Version 3.4 Rev. 12	BioTek Instruments Deutschland, Bad Freidrichshall, Deutschland
Leica QWin Standard	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

3 Methoden

3.1 In vivo Mausmodelle

3.1.1 Bid^{-/-}-Mausstamm

Als Versuchstiere für die Experimente dieser Arbeit dienten männliche Bid-defiziente Labormäuse des Stammes C57BL/6-Bid^{tm1535JK} (Yin et al., 1999) im Alter von ungefähr 6 bis 8 Wochen. In Anlehnung an die Nomenklatur-Richtlinien des „International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice“ werden Sie als Bid^{-/-} bezeichnet. Entsprechende C57Bl/6 Wurfgeschwister, in dieser Arbeit als Bid^{+/+} bzw. WT (Wildtyp) benannt, dienten als Kontrolltiere.

Um die Zucht des Bid^{-/-}-Mausstammes zu etablieren, wurden Bid^{-/-}-Mäuse mit WT-Mäusen verpaart. Die aus diesen Verpaarungen entstandenen heterozygoten Mäuse wurden wiederum miteinander verpaart, sodass für den experimentellen Ansatz WT- und Bid^{-/-}-Wurfgeschwister gleichen Alters zur Verfügung standen.

Die Mäuse wurden in den Räumen des „Zentralen Tierlaboratoriums und Instituts für Versuchstierkunde“ der Medizinischen Hochschule Hannover generiert und betreut. In den Haltungsräumen herrschten sterile Standardversuchsbedingungen mit einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus sowie konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung der Tiere sowie alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden unter Einhaltung der Gesetze des Landes Niedersachsen und der Regierung von Israel durchgeführt.

3.1.2 Experimentelle Apoptose-Modelle

3.1.2.1 Induktion der Fas-Death-Rezeptor-vermittelten Apoptose

Zur Induktion von Apoptose im *in vivo* Mausmodell wurde der membranständige Fas-Death-Rezeptor durch Applikation aktivierender Agentien stimuliert. Den Mäusen wurde anti-CD95/Fas-Antikörper (Klon: Jo₂) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Außerdem wurden die Tiere i.p. mit MegaFasL behandelt, das eine hexamere Form des zellassoziiert vorkommenden löslichen Fas-Liganden (sFasL) darstellt (Schneider et al., 1998).

Für Jo₂ wurde eine tödliche Dosis von 0,5 µg/g des Antikörpers für WT-Mäuse ermittelt. Bei den Bid^{-/-}-Mäusen hingegen konnte die Verabreichung bis zu einer lethalen Dosis von 200 µg/g Körpergewicht gesteigert werden. Jo₂-injizierte Mäuse wurden 6 h nach Versuchsbeginn, aber spätestens kurz vor dem Tod der Tiere durch Apoptose, zur Probenentnahme euthanasiert (s. 3.1.5).

Für die Behandlung mit MegaFasL wurde bei den WT-Mäusen eine tödliche Dosis von 0,05 µg/g ermittelt, für die Bid^{-/-}-Mäuse reichte jedoch, im Gegensatz zur Behandlung mit Jo₂, schon eine

lethale Dosis von 0,08 µg/g aus. Die Gewebeproben der MegaFasL-injizierten Mäuse wurden 1 h und 3 h nach Injektion infolge einer Euthanasie der Tiere gewonnen (s. 3.1.5).

Sowohl Jo₂ als auch MegaFasL wurden zur Injektion auf die entsprechend dem Körpergewicht benötigte Menge in einem injizierbaren Volumen von 200 µl 0,9 % isotoner NaCl-Lösung verdünnt. Als Kontrollen dienten Tiere, die nur mit 0,9 % isotoner NaCl-Lösung behandelt wurden.

Im Rahmen der MegaFasL-Experimente wurde WT- und Bid^{-/-}-Mäusen darüber hinaus eine identische Konzentration von 0,08 µg/g MegaFasL injiziert, um die Überlebensrate beider Gruppen zu ermitteln und direkt vergleichen zu können. Nach Injektion von MegaFasL wurde protokolliert, wie lange es dauerte, bis die Tiere starben. Die so erhaltenen Werte wurden mittels der Statistiksoftware Graph Pad Prism graphisch dargestellt und ausgewertet.

3.1.2.2 Induktion der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose

Des Weiteren wurde die Bedeutung von Bid für die TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose (Leist et al., 1994) durch simultane Applikation einer Kombination von 0,5 µg/g Lipopolisaccharid (LPS) und 700 µg/g Galactosamin (GalN) untersucht (Galanos et al., 1979, Hishinuma et al., 1990). LPS ist ein Endotoxin, welches von gram negativen Bakterien gebildet wird. LPS kann in Gegenwart des leberspezifischen Transkriptionsinhibitors GalN zu einem gesteigerten Untergang von Hepatozyten führen (Kaufmann et al., 2009). Die genauen Mechanismen, wie LPS/GalN die Hepatozyten tötet, sind bisher unklar. Allerdings spielt TNF-α eine eindeutige Rolle in diesem Prozess (Pfeffer et al., 1993, Rothe et al., 1993). Tiere dieses Experiments wurden 6 h nach Injektion zur Probengewinnung euthanasiert (s. 3.1.5). Anschließend wurden die entnommenen Proben des Versuchs makroskopisch und histologisch (H&E, TUNEL) untersucht. Des Weiteren wurden die Aktivität von Caspase-3 im Aktivitätsassay und die Expression von Caspase-9 und geschnittener Caspase-3 im Western Blot begutachtet.

3.1.3 Experimentelle Apoptose-Resistenz-Modelle

Um die Apoptose-induzierende Wirkung von Jo₂ und MegaFasL etwas detaillierter zu untersuchen, wurde die Applikation der beiden Fas-Death-Rezeptor-aktivierenden Agentien mit drei verschiedenen experimentellen Ansätzen der Apoptose-Resistenz kombiniert.

Die WT- und Bid^{-/-}-Mäuse dieser Versuche wurden zwischen 8 und 11 Uhr vormittags operiert. Zu Beginn wurden die Tiere zunächst unabhängig von der Operation (s. 3.1.3.1, 3.1.3.2) mit einer Lösung aus 10 % Ketamin (v/v) und 0,04 % Xylazin (v/v) in einer Konzentration von 10 - 12 µl/g in 0,9 % isotoner NaCl-Lösung narkotisiert. Vor Beginn der Operationen wurde gewartet, bis die Tiere keinen Zwischenzereflex mehr zeigten. Währenddessen wurden die Augen der Mäuse mit einer kleinen Menge Bepanthen Augen- und Nasensalbe bestrichen und damit gegen Austrocknung geschützt. Anschließend wurde die Bauchhöhle longitudinal entlang des Rippenbogens eingeschnitten. Dazu wurde eine ca. 4-5 cm² große Fläche im Bereich des

Rippenbogens frei rasiert. Zum Einschneiden der Oberhaut wurde eine chirurgische Standardschere (gerade, scharf/stumpf) verwendet. Die Operationen wurden gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.1.3.1 und 3.1.3.2 durchgeführt. Nach den Operationen wurden sowohl die innere als auch die äußere Haut separat voneinander mit einer medizinischen Naht verschlossen (Faden: Mersilene). Anschließend wurden die Tiere bis zu Ihrem Erwachen auf eine 37 °C warmen Wärmematte (MUL T PAD) gebettet und ihr Zustand überwacht. Die Wärmematte wurde dabei durch ein Thermostat (Ecoline Staredition E100) gespeist.

6 h nach der in den Teilabschnitten 3.1.3.1 bis 3.1.3.3 erwähnten Jo₂ und MegaFasL Behandlung bzw. kurz bevor die Tiere der Behandlung erlagen, wurden die Mäuse zur Probengewinnung euthanasiert (s. 3.1.5). Bid^{-/-}-Mäuse wurden nicht mit Jo₂ behandelt, da Sie schon unter normalen Bedingungen keine Reaktion auf eine solche Behandlung zeigten.

Als Gesund-Kontrollen dienten nicht-behandelte oder operierte Tiere, welche nur einer Scheinbehandlung mit 0,9 % isotoner NaCl-Lösung unterzogen wurden. Als Apoptose-Kontrollen dieser Experimente dienten mit Jo₂ bzw. MegaFasL behandelte Mäuse ohne eine der hier beschriebenen Vorbehandlungen.

3.1.3.1 Teilresektion der Leber

Als erstes Apoptose-Resistenz-Modell wurde eine Teilresektion von 2/3 der Leber durchgeführt (Mitchell and Willenbring, 2008). Für die Resektion der Leber wurde eine Wolframcarbid Irisschere (gerade, scharf/scharf) verwendet. Der linke laterale und der mittlere Leberlappen wurden während der Operation durch eine Ligatur mit einem antibakteriell beschichteten Vicryl Plus Faden abgebunden und nacheinander entfernt. 24 h nach dem operativen Eingriff wurde den Mäusen 0,5 µg/g Jo₂ (WT) bzw. 0,05 µg/g MegaFasL (WT) oder 0,08 µg/g (Bid^{-/-}) MegaFasL injiziert.

3.1.3.2 Gallengangsligatur

Als zweites Apoptose-Resistenz-Modell wurde an den Versuchstieren eine Gallengangsligatur durchgeführt (Kurosawa et al., 1997). Der Ductus Choledochus, der Hauptgallengang, wurde dafür mittels eines nichtresorbierbaren Mersilene Fadens doppelt ligiert und mit einer Wolframcarbid Irisschere (gerade, scharf/scharf) durchtrennt. In Folge dieser Behandlung kommt es zu einem Rückstau der Galle in die Leber und damit zu einer Cholestase. In einem fortgeschrittenen Stadium der Cholestase, 14 d nach der Behandlung, bekamen die gallengangsligierten Tiere eine Applikation von 0,5 µg/g Jo₂ (WT) bzw. 0,05 µg/g MegaFasL (WT) oder 0,08 µg/g (Bid^{-/-}) MegaFasL verabreicht.

3.1.3.3 Suramin-Behandlung

Als drittes Apoptose-Resistenz-Modell diente die Behandlung der Versuchstiere mit Suramin. Suramin ist ein Naphthyl-Harnstoff-Derivat. Bereits 2004 konnte gezeigt werden, dass eine

Behandlung mit Suramin mit einer deutlichen Hemmung der Apoptose in Leberzellen verbunden ist (Eichhorst et al., 2004). Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde den Versuchstieren simultan zu einer Injektion von 0,5 µg/g Jo₂ (WT) bzw. 0,05 µg/g MegaFasL (WT) oder 0,08 µg/g (Bid^{-/-}) MegaFasL, 5 mg Suramin in 200 µl 0,9 % isotoner NaCl-Lösung injiziert.

3.1.4 Experimentelles Proliferations-Modell

Im Rahmen der Untersuchung der Bedeutung von Bid für die proliferative Kapazität der Hepatozyten in der murinen Leber wurde den Versuchstieren 2/3 der Leber entnommen und die Zell- und Geweberegeneration im zeitlichen Verlauf analysiert (Mitchell and Willenbring, 2008). Das operative Verfahren, welches für diese Untersuchungen verwendet wurde, war identisch mit dem in Teilabschnitt 3.1.3.1 beschriebenen speziellen Prozedere der 2/3 Leberteilresektion. Die für die Apoptose-Resistenz-Modelle benötigte Injektion Jo₂ bzw. MegaFasL fand hier natürlich keine Anwendung.

Zu vordefinierten Zeitpunkten nach 0, 3, 6, 10, 24, 32, 36, 37, 42, 46, 48, 72 und 120 h wurden die Tiere zur Probenentnahme (s. 3.1.5) euthanasiert. Entsprechend 2 h vor diesen Zeitpunkten wurde den Mäusen 100 µg/g 5'-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU) i.p. verabreicht. BrdU diente dabei als Proliferationsmarker, da es während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von dTTP in neu synthetisierte DNA eingebaut wurde (s. 3.4.4).

3.1.5 Probengewinnung

Zur Gewebepräparation wurden die Tiere mittels einer Lösung aus 10 % Ketamin (v/v) und 0,04 % Xylazin (v/v) (ca. 10 µl/g Maus) in 0,9 % isotoner Natriumchlorid-Lösung betäubt. Das Gewicht der Maus wurde für statistische Zwecke festgestellt. Der Bauchraum der Tiere wurde mit einer chirurgischen Standardschere (gerade, scharf/stumpf) eröffnet. Die Leber wurden jeweils vorsichtig mit einer Wolframcarbid Irisschere (gerade, scharf/scharf) herausgelöst und schnellstmöglich entnommen, fotografiert, zu einem Teil für molekularbiologische Untersuchungen entweder direkt eingesetzt (s. 3.3.3) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur späteren Weiterverarbeitung (s. 3.3.2) gelagert. Weitere Teile der Lebern wurden über Nacht in 3,7 % neutral-gepufferter, mit Methanol (v/v) stabilisierter Formaldehyd-Lösung für histologische Untersuchungen eingelegt (s. 3.4.1). Direkt nach Entnahme der Leber wurde durch zervikale Dislokation der endgültige Tod der Tiere sichergestellt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Isolation aus Mausgewebe

Lysepuffer:	10 mM Tris/HCl	TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl
	400 mM NaCl		1 mM EDTA
	2 mM EDTA		pH 8,0
	2 % (w/v) SDS		
	pH 8,2		

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde ein ca. 3 mm langes Stück einer Maus-Schwanzspitze über Nacht bei 56 °C in Lysepuffer zusammen mit 50 U/ml Proteinase K verdaut. Zur anschließenden Inaktivierung der Proteinase K wurde 5 min bei 96 °C inkubiert. Durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung und Zentrifugation (10 min, 16100 x g, Raumtemperatur (RT)) wurden die Proteine ausgefällt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der DNA mit Isopropanol versetzt und zentrifugiert (10 min, 16100 x g, RT). Das resultierende Pellet wurde einmal mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 150 µl TE-Puffer gelöst. Für die PCR wurde die DNA in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

3.2.2 Bid-Genotypisierung

PCR-Ansatz (50 µl):	10 µl	5x Green GoTaq Reaktions Puffer
	30,6 µl	H ₂ O
	2 µl	2 mM dNTPs
	2 µl	Primer Bid allgemein
	1 µl	Primer Bid wildtyp
	2 µl	Primer Bid mutiert
	0,4 µl	GoTaq DNA-Polymerase
	1 µl	DNA-Probenverdünnung (1:10 gemäß 3.2.1)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die Primer „Bid allgemein“, „Bid wildtyp“ und „Bid mutiert“, wie in Abschnitt 2.8 definiert, in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt. Die Amplifikation der DNA wurde im „Mastercycler ep gradient“ wie folgt durchgeführt:

1 Zyklus:	Denaturierung	94 °C	3 min
30 Zyklen:	Denaturierung	94 °C	30 s
	Hybridisierung	55 °C	30 s
	Polymerisation	72 °C	30 s
Kühlen:		4 °C	∞

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt auf einem 1 %-igem Agarose Gel, welches 2 μ l Gel Star Nucleic Acid Gel Stain pro 100 ml enthielt, aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Dabei zeigten sich die Banden der Amplifikate wie in Abbildung 7 dargestellt.

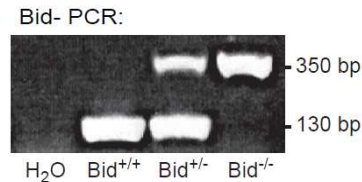


Abbildung 7: Beispiel des Bandenverlaufs einer Bid-Genotypisierung für Bid^{+/+}, Bid^{+/-} und Bid^{-/-}

Unter Verwendung der in Kapitel 2.8 gelisteten Primer zeigten die Amplifikation der Bid-PCR für Bid^{+/+} (WT) im 1 %-igen Agarose Gel eine Bande im Bereich von ca. 130 bp. Für Bid^{-/-} wurde eine Bande bei ca. 350 bp detektiert, während Bid^{+/-} je eine Bande im Bereich von ca. 130 bp und 350 bp zeigten. H₂O-Proben ohne DNA dienten als Negativkontrolle und wiesen keine Bande auf.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Blutserumanalysen

Die zur Verfügung gestellten Serumproben (s. 2.2.1) wurden im „Olympus AU400 Labor-Chemie System“ automatisch auf ihre Konzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) untersucht. Die so erhaltenen Werte wurden anschließend mit Hilfe des „Microsoft Excel-Programms“ ausgewertet und graphisch dargestellt.

3.3.2 Präparation des Gesamtzellysats

Für die Präparation der Gesamtproteinfraktion aus Lebergewebe wurde zu einem ca. 50 mg schweren Leberstück des bei -80 °C gelagerten Gewebes 300 μ l eiskalter 1x Zell-Lyse-Puffer gegeben. Dabei wurden Proteinproben, die für Western Blot-Analysen verwendet werden sollten, mittels 1x Zell-Lyse-Puffer der Firma Cell Signaling unter Zusatz des „Complete Protease Inhibitor Cocktails“, der auch Phosphatase-inhibierend wirkt, lysiert. Hingegen wurden Proteinproben, die für Caspase-Aktivitäts-Assays eingesetzt werden sollten, in 1x Zell-Lyse-Puffer 2 der Firma BD Biosciences homogenisiert. Hier wurde der Zell-Lyse-Puffer der Firma BD Bioscience verwendet, da er keine Chelatoren (EDTA und EGTA) enthielt. Das gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe eines Dispergiergeräts (ULTRA-TURRAX[®] T25 basic) bei 4 °C geschreddert. Zum weiteren Aufbrechen der Gewebestrukturen wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und jeweils bei 37 °C im Wasserbad wieder angetaut. Die Gewebs- und Zelltrümmer wurden schließlich 10 min bei 16100 x g in der Kühlzentrifuge bei

4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Quantifizierung der Proteinkonzentration (s. 3.3.4) in ein neues Probengefäß überführt.

3.3.3 Subzelluläre Trennung der mitochondrialen und cytosolischen Proteinfraktion

Puffer A:	225 mM Mannitol	Puffer B:	395 mM Saccharose
	75 mM Saccharose		0,1 mM EGTA
	0,1 mM EGTA		10 mM HEPES-KOH, pH 7,4
	1 mg/ml BSA		
	10 mM HEPES-KOH, pH 7,4		
	1 Complete Protease Inhibitor		
	Cocktail Tablette/50 ml		

Zur Isolation der mitochondrialen Proteine wurde ca. die Hälfte einer frisch geernteten Leber in einem auf Eis stehenden Glashomogenisator mittels zweier verschieden starker Pistills (10x Glashomogenisator-Pistill Typ A, 10x Glashomogenisator-Pistill Typ B) in 2 ml Puffer A homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zur Freigabe des Glashomogenisators in ein frisches 2 ml Probengefäß überführt. Nach Abzentrifugieren (10 min, 600 x g, 4 °C) des Debris, wurde der Überstand in ein neues 2 ml Probengefäß überführt, mit Puffer A auf 2 ml aufgefüllt und abermals abzentrifugiert (10 min, 13000 x g, 4 °C). Der nun wieder in ein neues Probengefäß abgenommene Überstand, stellte die cytosolische Proteinfraktion dar und wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Das Mitochondrien enthaltende Pellet wurde zum Reinigen in 2 ml Puffer B resuspendiert und erneut zentrifugiert (8 min, 13000 x g, 4 °C). Das so entstandene Pellet enthielt die reine mitochondriale Proteinfraktion, wurde in 200 µl 1x Zell-Lyse-Puffer der Firma Cell Signaling (mit Zusatz des Complete Proteaseinhibitors) aufgenommen und ebenfalls bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Laemmli-Puffer (4x):	0,5 M Tris
	40 % Glycerol (v/v)
	12 % SDS (w/v)
	0,08 % Bromphenol Blau (w/v)
	20 % β-Mercaptoethanol (v/v)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels der von Marion M. Bradford entwickelten Methode (Bradford, 1976), bei der der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) in sauren Lösungen mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Verhältnis von ungebundener kationischer Form des Farbstoffs (Absorptionsmaximum 470 nm) zur an Proteine gebundenen

anionischen Sulfonatform (Absorptionsmaximum 595 nm) (Compton and Jones, 1985). Die Verschiebung des Absorptionsmaximums kann dabei photometrisch gemessen werden.

Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurde CBBG in Form des Protein Assay Dye Reagens der Firma Bio-Rad verwendet. 80 µl des Reagens wurden mit 20 µl einer 1:3000 Verdünnung der isolierten Proteinhomogenate (s. 3.3.2) gemischt und die optische Dichte bei 595 nm im Spektrophotometer µQuant bestimmt. Anschließend wurden die jeweiligen Proteinproben mit Laemmli-Puffer und 1x Zell-Lysis-Puffer der Firma Cell Signaling auf eine Konzentration von 10 µg/µl verdünnt.

3.3.5 Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

1x Elektrophoresepuffer:		Trenngel (10 %):	
25 mM Tris		6,6 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid
0,19 M Glycin		5 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,1 % SDS (w/v)		0,2 ml	10 % SDS (w/v)
		8,2 ml	dH ₂ O
Sammelgel:		Trenngel (12 %):	
1,3 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid	8 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,5	5 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,1 ml	10 % SDS (w/v)	0,2 ml	10 % SDS (w/v)
6 ml	dH ₂ O	6,8 ml	dH ₂ O

Die SDS-PAGE (engl.: **s**odium **d**odecyl**s**ulfate **p**oly**a**crylamide **g**el **e**lectrophoresis) wurde als diskontinuierliche Gelelektrophorese mit unterschiedlichem pH-Wert und Ionenstärke in Trenn- und Sammelgel sowie unterschiedlicher Konzentrations- und Pufferzusammensetzung nach dem von Ulrich K. Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die SDS-PAGE erfolgte, je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine, mit einer Acrylamidkonzentration des Trenngels von 10 % oder 12 %. Das Trenngel wurde nach Zugabe von 150 µl APS (**A**mmonium**p**ersulfat) und 50 µl TEMED (**T**etramethylethylend**i**amin) zwischen zwei Glasplatten gegossen und 1 h zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Das Sammelgel wurde nach Zugabe von 100 µl APS und 30 µl TEMED oberhalb des Trenngels aufgetragen und 30 min auspolymerisiert. In den oberen Gelrand wurde zur Aussparung der Auftragstaschen ein Probenkamm eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte mit 10 µl (100 µg) Proteinextrakt (s. 3.3.4) bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA in 1x Elektrophoresepuffer und wurde nach ungefähr 1 h 45 min beendet, sobald der im Auftragspuffer (s. 3.3.4) enthaltene Farbmarker Bromphenolblau die untere Kante der Gelmatrix erreicht hatte.

3.3.6 Western Blot-Verfahren/Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Transfer-Puffer: 25 mM Tris, pH 8,3
192 mM Glycin

Der elektrophoretische Transfer aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (**P**oly**v**inyliden**d**ifluorid-Membran) erfolgte als Tank-Blot-Verfahren nach der Vorschrift von Burnette (Burnette, 1981). Dieser Transfer ermöglichte den Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern. Nach der SDS-PAGE (s. 3.3.5) wurde das Trenngel zusammen mit einer zugeschnittenen und in Methanol getränkten PVDF-Membran zwischen zwei Chromatographie-Filterpapier-Lagen gelegt und in die Western-Transfer-Apparatur eingefügt. Der Transfer erfolgte 1 h lang mit einer Spannung von 100 Volt in der eisgekühlten und mit Transfer-Puffer gefüllten Kammer.

3.3.7 Ponceau S-Rot-Färbung von PVDF-Membranen

Um die Qualität der Proteinauftrennung durch die SDS-PAGE (s. 3.3.5) sowie den Transfer auf die PVDF-Membranen bewerten zu können, wurden die Membranen mit Ponceau S-Rot gefärbt. Dazu wurden die Membranen circa 1 min in Ponceau S-Rot Färbelösung eingelegt und anschließend vorsichtig mit dH₂O so lange gewaschen, bis man die Proteinbanden deutlich sehen konnte.

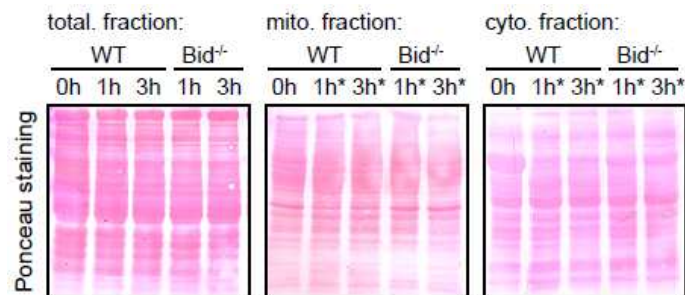


Abbildung 8: Beispiele für Ponceau S gefärbte PVDF Membranen

Um die Qualität der Proteinauftrennung sowie den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran zu beurteilen, wurde das (in Kap. 3.3.7) beschriebene Ponceau Rot-Färbe-Verfahren angewandt. Als Beispiel sind Membranen des in Kap. 4.1.2 gezeigten MegaFasL-Experiments dargestellt.

3.3.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

TBST: 50 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
0,1 % Tween 20 (v/v)

Der immunologische Nachweis von Proteinen auf der PVDF-Membran (s. 3.3.6) erfolgte mit spezifischen Antikörpern (s. Tabelle 1) und entsprechenden mit Meerrettichperoxidasegekoppelten sekundären Antikörpern (s. Tabelle 2). Um unspezifische Bindungen der Antikörper möglichst gering zu halten, wurden die Membranen vor der Antikörperinkubation für 30 min bei Raumtemperatur in 5 % Trockenmilch (TM) (w/v) in TBST inkubiert. Die Inkubation mit der primären Antikörperlösung (Antikörperverdünnung in 5 % TM (w/v) in TBST oder in 5 % BSA (w/v) in TBST) erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Laborschüttler. Am nächsten Tag wurden die PVDF-Membranen gewaschen (3x 10 min, TBST) und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Antikörperverdünnung in 5 % TM (w/v) in TBST). Nach erneutem Waschen (3x 10 min, TBST) wurden die immunreaktiven Proteine unter Anwendung eines Chemilumineszenz-Kitsystems (Western-Lightning-ECL) auf der Membran nachgewiesen. Das emittierte Licht der Reaktion aus Meerrettichperoxidase und Chemilumineszenz-Substrat konnte dabei mit Hilfe eines photosensitiven Films (Hyperfilm ECL) visualisiert werden.

Tabelle 1: Primäre Antikörper für den Proteinnachweis auf PVDF-Membranen

Spezifität	Verdünnung	Medium	kDa	Ursprung
anti-Actin (C-11)	1:2000	5% TM	43	Ziege
anti-Bax (N-20)	1:500	5% TM	23	Kaninchen
anti-Bcl-x	1:1000	5% TM	26	Kaninchen
anti-Bid	1:1000	5% TM	22	Ziege
anti-Caspase 8 (1G12)	1:1000	5% TM	55/18	Ratte
anti-c-Flip	1:1000	5% TM	58/30	Kaninchen
anti-cIAP1	1:500	5% TM	72	Kaninchen
anti-c-Jun (60A8)	1:500	5% BSA	48/43	Kaninchen
anti-cl. Caspase-3 (Asp175)	1:1000	5% TM	19/17	Kaninchen
anti-Cyclin A (C-19)	1:500	5% TM	60	Kaninchen
anti-Cyclin B1 (H-433)	1:500	5% TM	55	Kaninchen
anti-Cyclin D1 (M-20)	1:500	5% TM	37	Kaninchen
anti-Cyclin E (M-20)	1:500	5% TM	55	Kaninchen
anti-Cytochrome C (H-104)	1:200	5% TM	15	Kaninchen
anti-Fas (M-20)	1:500	5% TM	48	Kaninchen
anti-Mcl-1	1:1000	5% TM	35	Kaninchen
anti-PCNA (FL-261)	1:500	5% TM	35	Kaninchen
anti-Smac/Diablo	1:1000	5% BSA	20	Kaninchen
anti-Stat 3-p (Tyr705)	1:1001	5% BSA	86/79	Kaninchen
anti-Stat-3	1:1002	5% BSA	86/80	Kaninchen

Tabelle 2: Sekundäre Meerrettichperoxidase-gekoppelte Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Medium
vom Esel anti-Ziege IgG-HRP	1:2000	5% TM
von der Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP	1:2000	5% TM
von der Ziege anti-Ratte IgG-HRP	1:2000	5% TM

3.3.9 Caspase-Aktivitätsassays

Caspase-3-Puffer:	40 mM HEPES	Caspase-8-Puffer:	20 mM PIPES
	20 % Glycerol (v/v)		100 mM NaCl
	4 mmol DTT		10 mM DTT
	pH 7,4		1 mM EDTA
			0,1 % CHAPS (w/v)
			10 % Saccharose (w/v)
			pH 7,2

Um die Aktivität der Aspartat-spezifischen Cysteinproteasen, der sogenannten Caspasen zu messen, wurde ein Assay auf Basis der Spaltung eines nicht fluoreszierenden bzw. nicht lumineszierenden Caspase-Substrats zu einem fluoreszierenden bzw. lumineszierenden Produkt durchgeführt. Die Stärke der Fluoreszenz bzw. Lumineszenz verhält sich dabei proportional zur Aktivität der Caspasen.

Zur Durchführung der Assays wurden jeweils 50 µg des in 1x Zell-Lyse-Puffer (BD Biosciences) angesetzten Proteins benutzt (s. 3.3.2). Um die Aktivität von Caspase-3 zu ermitteln, wurde das Proteinlysate mit 200 µl Caspase-3-Assay-Puffer und 5 µl fluorogenem Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC) versetzt. Die Negativkontrolle enthielt zusätzlich 5 µl Caspase-3-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO).

Zur Messung der Caspase-8-Aktivitäten wurden entsprechend 50 µg Protein mit 200 µl Caspase-8-Assay-Puffer und 5 µl fluorogenem Caspase-8-Substrat (Ac-IE'ID-AFC) gemischt. Zu dem Kontrollansatz wurden 5 µl Caspase-8-Inhibitor (Ac-IE'ID-CHO) zugegeben.

Für die Detektion der Caspase-9-Aktivität wurde ein Kitsystem der Firma Promega (Caspase-Glo-9-Assay) verwendet. Dieses enthielt ein luminogenes Caspase-9-Substrat, einen speziellen Puffer sowie einen Caspase-9-Inhibitor (Z-LLL-CHO, Synonym: MG-132). Substrat und Assay-Puffer und ggf. Inhibitor wurden gemäß Hersteller-Angaben gemischt, mit 50 µg des Proteinlysats versetzt und mit 1x Zell-Lyse-Puffer (BD Biosciences) auf 200 µl ergänzt.

Alle Probenansätze wurden in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten pipettiert und gemessen.

Die Detektion der emittierten Fluoreszenz erfolgte im Fluoreszenz Spektrometer „Spectra Max, Gemini EM“. Die Messungen wurden für die Proben als Dreifach- und für die Inhibitor-Negativkontrollen als Doppelbestimmung durchgeführt und als „arbiträre Einheiten“ (engl.: arbitrary units) dargestellt. Die Fluoreszenz des Caspase-3-Assays ($\lambda_{\text{Exc}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$) und des Caspase-8-Assays ($\lambda_{\text{Exc}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 500 \text{ nm}$) wurde nach 1 h Inkubation bei 37°C

gemessen. Die Lumineszenz der Caspase-9-Reaktion wurde nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur erfasst.

3.4 Histologische Untersuchungen

3.4.1 Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung der in 3,7 % Formaldehyd-Lösung (v/v) eingelegten Gewebeproben erfolgte mit Hilfe einer Histokinette. Dabei wurde das Gewebe über Nacht automatisch durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30 min 50 % Ethanol (v/v), 30 min 70 % Ethanol (v/v), 30 min 90 % Ethanol (v/v), 2 x 30 min 100 % Ethanol, 2 x 30 min Xylen) in 3 x 30 min 60°C warmes Paraplast überführt. Im weiteren Verfahren wurden die Proben in metallene Förmchen gelegt, mit Paraffin in Blöcke gegossen und auf einer -8°C kalten Kühlplatte ausgehärtet. Im Anschluss an die Einbettung wurden für immunhistochemische Färbungen an einem Rotationsmikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet.

3.4.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit von Mayer's Hämalaun gehört zu den Routinemethoden und dient als Übersichtsfärbung der Histologie. Durch den Farbstoff Hämalaun werden mit diesem Verfahren basophile Strukturen, insbesondere der Zellkern und die darin enthaltene DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum (rER), blau-violett gefärbt. Eosin als saurer Farbstoff färbt acidophile Strukturen der Gewebeschnitte rot, darunter vor allem die Zellplasmaproteine und extrazelluläre faserige Komponenten (z.B. Kollagenfasern).

Die Paraffingewebeschnitte wurden für diese Färbung entparaffiniert (2x 5 min Xylene) und rehydriert (2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol (v/v), 5 min 70 % Ethanol (v/v), 5 min dH₂O), 15 sec. mit Hämatoxylinlösung gefärbt und anschließend zur Farbentwicklung in warmem Wasser gebläut. Die Gegenfärbung erfolgte 2 min mit gesäuertem Eosin Y. Die Histologien wurden nach kurzem Waschen (dH₂O) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (10 sec. 70 % Ethanol (v/v), 5 min 96 % Ethanol (v/v), 2x 5 min 100 % Ethanol, 2x 5 min Xylene) entwässert und anschließend mit GVA-Eindeckmedium und einem Deckgläschen fixiert.

3.4.3 TUNEL-Immunhistochemie

Citratpuffer: 10 mM Citrat	Natrium-Citratpuffer: 0,1 % Natrium-Citrat (w/v)
0,05 % Tween 20 (v/v)	0,1 % Triton-X 100 (v/v)
pH 6	1x PBS

Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen, welche die DNA fragmentieren. Die dabei freigelegten Hydroxylgruppen (3'-OH Gruppen) am Ende der DNA-

Bruchstücke können durch das Enzym TdT (engl.: **t**erminal **d**esoxynucleotid **t**ransferase) mit markierten Nukleotiden gekennzeichnet und so für die Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde das „*In Situ* cell death detection Kit“ der Firma Roche verwendet, bei dem Fluorescein-markierte dUTPs zum Einsatz kommen. Die TUNEL-Methode (engl.: **T**dT-mediated dUTP-biotin **n**ick **e**nd labeling) wurde 1992 das erste Mal als spezifische Nachweismethode für Apoptose beschrieben (Gavrieli et al., 1992). Allerdings werden mittels TUNEL-Methode DNA-Doppelstrangbrüche detektiert, die nicht nur in apoptotischen Zellen, sondern z.B. auch in nekrotischen Zellen auftreten können (Grasl-Kraupp et al., 1995).

Für die TUNEL-Färbung wurden 2 µm Paraffin-Gewebeschnitte entparaffiniert (2x 5 min Xylen) und rehydriert (2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol (v/v), 5 min 70 % Ethanol (v/v), 5 min dH₂O). Es folgte eine Demaskierung der Epitope durch Inkubation der Gewebe in Citratpuffer in der Mikrowelle (5 min 750 Watt, 15 min 150 Watt). Nach 10-minütigem Abkühlen des Puffers bei RT wurden die Histologien in PBS gewaschen (2x 5 min), 30 min mit Proteinase K (20 µg/ml in PBS) permeabilisiert und nochmals in PBS gewaschen (2x 5 min). Anschließend wurden die Schnitte mit 3,7 % Paraformaldehyd (w/v) fixiert, erneut in PBS gewaschen (2x 5 min) und nun mittels Natriumcitratpuffer 30 min permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen (2x 5 min, PBS) wurde jeder Gewebeschnitt 1,5 h mit 50 µl einer 1:10 Verdünnung des TUNEL-Reagenzes (*In Situ* Cell death detection Kit) lichtgeschützt inkubiert. Die Histologien wurden mit VECTASHIELD-Eindeckmedium, welches DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) enthielt, konserviert. Die eingebauten Fluorescein-markierten dUTPs bzw. die DAPI-Färbung konnte im Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM 4000 B) mit einem Alexa488-Filter bzw. mit einem Alexa350-Filter detektiert und ausgewertet werden.

3.4.4 Nachweis der Zellproliferation mittels BrdU

Citratpuffer:	10 mM Citrat	PBST:	1x PBS
	0,05 % Tween 20 (v/v)		0,05 % Tween 20 (v/v)
	pH 6		

BrdU (5'-Brom-2'-deoxyuridin) ist das synthetisch hergestellte Analogon zu Thymidin bzw. Desoxyuridin und kann während der Zellproliferation in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingliedert werden. Somit dient BrdU als ein Marker für die Zellteilung, der mit spezifischen Fluoreszenz- bzw. Peroxidase-markierten Antikörpern nachgewiesen werden kann.

Die Versuchstiere bekamen im Rahmen der Proliferationsuntersuchungen 2 h vor den definierten Todeszeitpunkten BrdU verabreicht (s. 3.1.4).

Um BrdU in Histologien nachzuweisen, wurden die 2 µm-Paraffin-Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert (2x 5 min Xylen) und rehydriert (2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol (v/v), 5 min 70 % Ethanol (v/v), 5 min dH₂O). Es folgte eine Demaskierung der Epitope durch Inkubation der Gewebe in Citratpuffer im vorgeheizten Wasserbad (30 min, 98°C). Nach 15-

minütigem Abkühlen des Puffers bei RT wurden die Gewebeschnitte 1 h in 2 M HCl denaturiert und gründlich in dH₂O gewaschen (3x 5 min). Zum Absättigen unspezifischer Reaktionen wurden die Schnitte zunächst 15 min in 3 % H₂O₂/Methanol (v/v) inkubiert, in dH₂O gewaschen (3x 5 min) und dann für 30 min mit 5 % normalem Ziegen Serum (v/v) in PBST inkubiert. Die primäre Antikörperreaktion erfolgte über Nacht bei 4 °C mit einer 1:200 Verdünnung des anti-BrdU-Antikörpers in 5 % normalem Ziegen Serum (v/v) in PBST. Am nächsten Tag wurde mit PBST gewaschen (3x 5 min) und mit einer 1:200 Verdünnung des sekundären biotinylierten anti-Maus Antikörpers (von der Ziege) in 5 % Ziegen-Serum (v/v) in PBST für 30 min inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit HRP-Streptavidin Plus Reagenz und die Induktion der Farbreaktion (>5 min) mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol). Der Meerrettichperoxidase wurde dabei durch das AEC-Reagenz Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Die freierwerdenen Protonen oxidierten das Chromogen AEC zu seinem braunroten Endprodukt unter Bildung von Wasser. Schließlich wurden die Histologien nach wiederholtem Waschen (5 min, dH₂O), dem Gegenfärben mit Hämatoxylin (15 s) und nochmaligem Waschen (5 min, dH₂O) mit GVA-Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingedeckt. Die gefärbten Gewebe wurden lichtmikroskopisch betrachtet und ausgewertet.

3.4.5 Nachweis der Zellproliferation mittels Ki67

EDTA-Puffer:	1 mM EDTA	PBST:	1x PBS
	10 mM Tris		0,05 % Tween 20 (v/v)
	0,05 % Tween 20 (v/v)		

Das Protein Ki67 (auch bekannt als MKI67) ist ein im Nukleus von Zellen vorkommendes Protein und spezifisch mit dem Vorgang der Proliferation assoziiert (Scholzen and Gerdes, 2000). In der Interphase des Zellzyklus ist Ki67 diffus im gesamten Zellkern nachweisbar, während es in der Mitose an der Oberfläche von Chromosomen lokalisiert vorliegt. Ki67 dient als Marker für alle aktiven Phasen des Zellzyklus und ist in der G₁, S, G₂ und M Phase, nicht aber in der G₀ Phase detektierbar. Benannt wurde das Protein nach der Stadt der ursprünglichen Antikörper-Generierung (**K**iel, Deutschland) sowie nach der Position des Klons auf der entsprechenden 96-well Platte (Position **67**) (Gerdes et al., 1983).

Um Ki67 im histologischen Präparat nachzuweisen, wurden 2 µm dicke Paraffin-Gewebeschnitte entparaffiniert (2x Xylen, 5 min) und rehydriert (2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol (v/v), 5 min 70 % Ethanol (v/v), 5 min dH₂O). Die Epitope wurden mittels EDTA-Puffer für 35 min bei 98 °C im Wasserbad demaskiert und die Gewebeschnitte im Puffer anschließend 15 min bei RT heruntergekühlt. Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen folgte nach einem Waschschrift mit PBST (2x 5 min) zunächst ein Peroxidaseblock für 10 min mittels 3 % H₂O₂ in Methanol (v/v). An das Waschen mit dH₂O (3x 5 min) schlossen sich ein Avidinblock sowie ein Biotinblock für jeweils 15 min mit den im Avidin/Biotin Blocking Kit enthaltenen Block-Lösungen an. Beiden Inkubationen folgte je ein Waschschrift mit PBST (3x 5 min).

Unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers wurden darüber hinaus durch eine 30-minütige Inkubation mit 5 % normalem Ziegen Serum in PBST abgesättigt. Der anti-Ki67-Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung in 2 % normalem Ziegen Serum (v/v) in PBST 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBST (3x 5 min) wurden für die sekundäre Antikörperreaktion 50 µl des im Histostain-Plus Kit enthaltenen „broad spectrum antibody plus“ für 30 min aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit PBST (3x 5 min) konnte schließlich die Kopplung der Meerrettichperoxidase über das HRP-Streptavidin-Plus-Reagenz des gleichen Kitsystems für 15 min erfolgen. Unter Sichtkontrolle wurde dann mittels AEC-Reagenz (>5 min) die Farbreaktion durchgeführt. Nach wiederholtem Waschen mit dH₂O (5 min), nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin und nochmaligem Waschen (5 min, dH₂O) folgte das Eindecken der Histologien mit GVA-Eindeckmedium und einem Deckgläschen. Die gefärbten Gewebe konnten schließlich lichtmikroskopisch betrachtet und ausgewertet werden.

3.4.6 Immunhistochemie für aktivierte Caspase-3

Citratpuffer:	10 mM Citrat	TBST:	50 mM Tris, pH 7,5
	0,05 % Tween 20 (v/v)		150 mM NaCl
	pH 6		0,1 % Tween 20 (v/v)
			50 mM Tris, pH 7,5

Um die gespaltene bzw. aktivierte Effektor-Caspase-3 im Gewebe immunhistochemisch nachzuweisen, wurden 2 µm dicke Paraffin-Gewebeschnitte entparaffiniert (2x Xylen, 5 min) und rehydriert (2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol (v/v), 5 min 70 % Ethanol (v/v), 5 min dH₂O). Die Epitope wurden durch Inkubation mit Citratpuffer in der Mikrowelle demaskiert. Dafür wurde der Citratpuffer zunächst 3 min bei 750 Watt in der Mikrowelle vorgekocht. Die Gewebeschnitte wurden in den heißen Puffer transferiert und 5 min bei 750 Watt sowie 10 min bei 150 Watt weiter erhitzt und schließlich 30 min bei RT heruntergekühlt. Nach dem Waschen mit dH₂O (3x 5 min), einem Peroxidaseblock für 15 min mit 3 % H₂O₂ (v/v) in Methanol, erneutem Waschen mit dH₂O (3x 5 min) und einem Ziegen-Serumblock für 1 h mit 5 % normalem Ziegen Serum (v/v) in TBST, wurden die Gewebeschnitte über Nacht mit einer 1:100 Verdünnung des primären „anti-geschnittenen Caspase-3 (Asp 175)-Antikörpers“ in Antikörperverdünnungsmedium bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dem Waschen mit TBST (3x 5 min) der sekundäre Biotin-konjugierte anti-Kaninchen Antikörper in einer 1:200 Verdünnung in Antikörperverdünnungsmedium für 30 min aufgetragen, wiederholt mit TBST gewaschen (3x 5 min) und schließlich mit 50 µl des HRP-Streptavidin-Plus-Reagenz für 15 min inkubiert. Es folgten ein Waschschriff mit PBST (3x 5 min) sowie die Induktion der Farbreaktion durch das AEC-Reagenz. Unter Sichtkontrolle wurde die braunrote Färbung (>5 min) entwickelt und dann mit dH₂O abgestoppt. Anschließend wurden die Histologien für weitere 5 min mit dH₂O gewaschen und mit GVA-Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingedeckt. Auf eine Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin wurde verzichtet, da die starke

Hämatoxylinfärbung bei ersten Färbeversuchen eine Identifizierung der spezifischen cytoplasmatischen Caspase-Färbungen sehr erschwert hatte. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch betrachtet und fotografiert.

3.5 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit Ergebnissen von Experimenten mit n=3 Tieren durchgeführt und mindestens einmal wiederholt. Für kritische Zeitpunkte wurden die Versuche mit bis zu n=9 Tieren durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit der Analysefunktion von Microsoft Office Excel. Die in den Experimenten gesammelten Daten wurden gruppenweise ausgewertet und als Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (\pm SD) dargestellt. Unter Verwendung des Student's T-Tests wurden Ergebnisse als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit * $p < 0,05$ war.

Zur Darstellung und Analyse von Überlebenskurven wurde das Biostatistikprogramm GraphPad Prism verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle von Bid für die Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose

4.1.1 Die Rolle von Bid in Jo₂-induzierter Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose

Um die Funktion von Bid für die Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurde sowohl WT-Mäusen als auch Bid^{-/-}-Mäusen eine geringe Dosis von 0,5 µg/g des anti-CD95/Fas-Antikörpers Jo₂ in physiologischer Salzlösung (low dose (LD) Jo₂) verabreicht. Als Kontrollversuch dienten Mäuse, denen reine physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde, um Effekte der Injektion auf die Leber bzw. die Hepatozyten ausschließen zu können.

Während die Jo₂-Dosis für die WT-Mäuse bereits tödlich war und sie ungefähr vier bis sechs Stunden nach der Injektion starben, zeigten Bid^{-/-}-Mäuse keine bemerkenswerte Reaktion auf die Jo₂-Behandlung. Die Präparation der Lebern der behandelten Tiere gab anschließend weiteren Aufschluss über die Wirkung von Jo₂ auf die jeweilige Tiergruppe. Im makroskopischen Bild (s. Abbildung 9, Macro) wiesen die Lebern der mit Jo₂-injizierten WT-Tiere eine tiefdunkelrote bis schwarze Verfärbung auf (WT: LD Jo₂), während die mit reiner 0,9 %igen NaCl-Lösung injizierten Kontrolltiere eine für gesunde Lebern typische rosige Farbe präsentierten. Bezeichnend war das unauffällige Lebergewebe der Bid^{-/-}-Mäuse (Bid^{-/-}: LD Jo₂), das trotz der Jo₂-Injektion dem Gewebe der unbehandelten Kontrolltiere glich (WT: C).

Anhand der H&E-gefärbten histologischen Präparate (s. Abbildung 9, H&E) der Jo₂-behandelten WT-Mäuse wurde, übereinstimmend mit dem makroskopischen Bild der Lebern, der Zerfall des Gewebes deutlich, und es zeigten sich Areale mit verstärkter Erythrozyteninfiltration. Eine vergleichbare Veränderung der Gewebsstruktur wurde bei den Bid^{-/-}-Mäusen nicht detektiert. Die immunhistochemische Analyse mittels TUNEL machte darüber hinaus eine gesteigerte DNA-Defragmentierung infolge der Jo₂-Behandlung in den WT-Lebergeweben deutlich (s. Abbildung 9, TUNEL). Diese Defragmentierung, die charakteristisch für eine Induktion des apoptotischen Prozesses ist, konnte bei den Jo₂-behandelten Bid^{-/-}-Tieren ebenfalls nicht nachgewiesen werden und entsprach den Kontrolltieren.

Um herauszufinden, ob Bid^{-/-}-Mäuse auch gegen höhere Jo₂-Konzentrationen resistent sind, wurden ihnen um bis zu 10fach gesteigerte Dosen des Antikörpers injiziert (Bid^{-/-}: HD Jo₂). Die präparierten Lebergewebe dieser Tiere wiesen sowohl im makroskopischen Bild, als auch in den H&E-Übersichtsfärbungen kaum Gewebsveränderungen auf. Vereinzelt konnten apoptotische Zellen als teilweise aus dem Gewebeverband gelöst und mit intensiverer eosinophiler Färbung erkannt werden. Durch die TUNEL-Färbung ließ sich darüber hinaus eine sehr geringe, aber doch vermehrte Anzahl positivgefärbter Zellen detektieren.

Während WT-Mäuse bereits infolge einer geringen Dosis von 0,5 µg/g Jo₂ deutliche Anzeichen der Apoptose zeigten und innerhalb von sechs Stunden starben, überlebten Bid^{-/-}-Mäuse auch die

Behandlung mit einer 10fach höheren Konzentration, und nur geringe apoptotische Ereignisse waren zu detektieren.

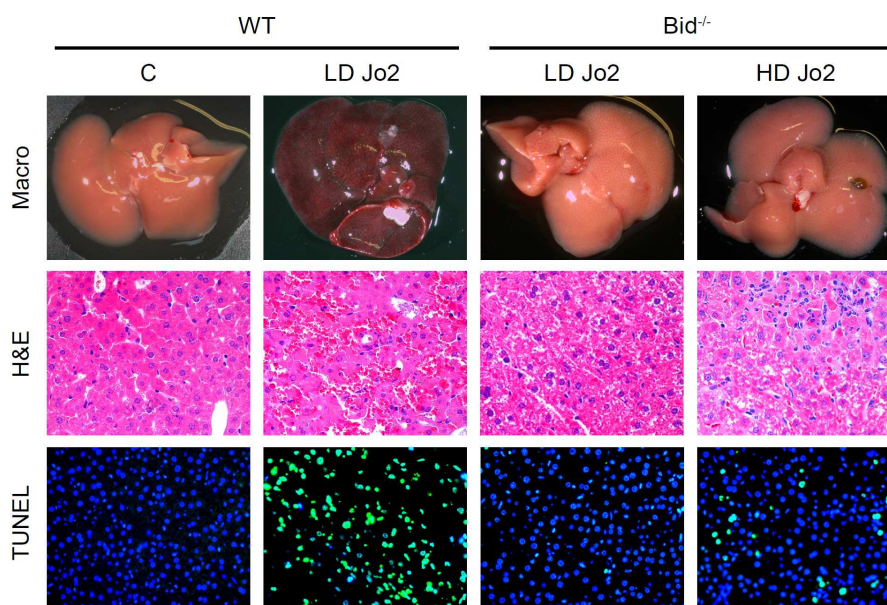


Abbildung 9: Histologische Untersuchungen Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen nach Apoptose-Stimulation mit dem Antikörper Jo₂

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit einer geringen Dosis von 0,5 µg/g des CD95/Fas-Antikörpers Jo₂ (LD Jo₂) oder zur Kontrolle (C) mit 0,9 % iger NaCl-Lösung behandelt. Die Tiere wurden nach 6 h oder kurz vor ihrem Tod euthanasiert. Des Weiteren wurde Bid^{-/-}-Mäusen eine 10-fach höhere Dosis von bis zu 100 µg (ca. 5 µg/g) Jo₂ (HD Jo₂) injiziert. Die Lebern der mit Jo₂ behandelten WT-Tiere zeichneten sich im makroskopischen Bild (Macro) durch eine dunkelrote bis schwarze Verfärbung aus. In der H&E-Färbung (H&E) war deutlich die Zerstörung des Gewebes zu erkennen, die mit einer massiven Hämorrhagie einherging. Die TUNEL-Analyse demonstrierte eine für apoptotische Zellen typische DNA-Defragmentierung, die in den Jo₂-behandelten WT-Tieren deutlich auffiel. Während die WT-Mäuse stark sensitiv auf die Jo₂-Injektion reagierten, glichen die Bid^{-/-}-Mäuse eher den Kontrolltieren und auch eine 10fach höhere Konzentration des Antikörpers erzielte nicht die vergleichbare Wirkung.

Diese phänotypischen Ergebnisse stellen bereits deutliche Hinweise auf eine fortgeschrittene Apoptose in Jo₂-injizierten WT-Mäusen dar. Im Folgenden wurde nun der unterschiedliche Effekt von Jo₂ auf WT- bzw. Bid^{-/-}-Mäuse anhand der enzymatischen Aktivität der Caspasen auf Signaltransduktionsebene untersucht. Dabei wurde in den Leberzelllysaten der jeweiligen Tiergruppe zum einen die Aktivität der Initiator-Caspasen-8 bzw. -9 zum anderen der Effektor-Caspase-3 mittels fluoreszierender Substrate gemessen.

Die Ergebnisse der Messungen (Abbildung 10) zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren eine stark erhöhte Aktivität aller drei Caspasen in WT-Mäusen (WT, LD) infolge der Jo₂-Behandlung. Während sich die Basisexpression der Caspasen in den WT- und Bid^{-/-}-Kontrollen nicht unterschied, konnte in den Jo₂-injizierten Bid^{-/-}-Mäusen allerdings auch keine Induktion der Bid-vorgeschalteten Initiator-Caspase-8 noch der später in der Signalkaskade

auftretenden Caspase-9 bzw. -3 detektiert werden. Infolge der Injektion der HD J_{O_2} -Konzentration wurde zwar eine Induktion der Caspase-8 nachgewiesen, allerdings war die Aktivität in den mit geringer J_{O_2} -Dosis behandelten WT-Tieren dennoch signifikant höher.

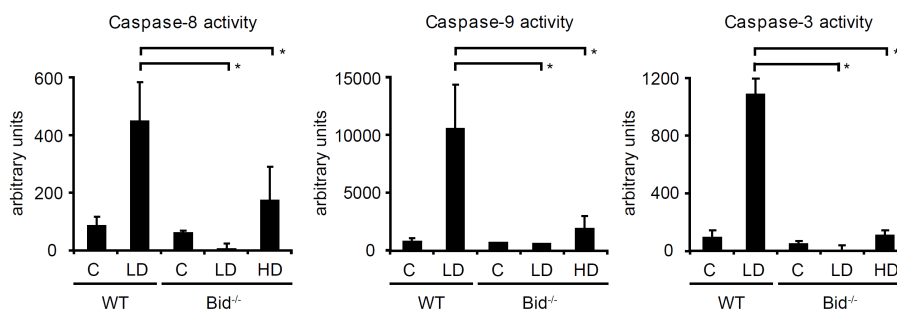


Abbildung 10: Caspase-Aktivität in Lebern Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen nach Apoptose-Stimulation durch J_{O_2} -Antikörper.

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit 0,5 µg/g J_{O_2} (LD) oder zur Kontrolle (C) mit 0,9 % iger NaCl-Lösung behandelt. Die Tiere wurden nach 6 h oder kurz vor Ihrem Tod euthanasiert. Des Weiteren wurde Bid^{-/-}-Mäusen eine 10fach höhere Konzentration von 100 µg/g J_{O_2} (HD) injiziert. Caspase-Aktivitätsassays wurden basierend auf der Fluoreszenzinduktion der Caspase-Substrate DEVD (Caspase-3-Substrat), IETD (potentielles Caspase-8-Substrat) und LEHD (potentielles Caspase-9-Substrat) durchgeführt. Eine signifikant erhöhte Caspase-Aktivität aller Caspasen konnte in den apoptotischen Lebern der WT-Tiere nachgewiesen werden. Proben Bid-defizienter Mäuse zeigten jedoch keine gesteigerte Caspase-Aktivität bei gleicher J_{O_2} -Konzentration (LD). Nur eine 10fach höhere J_{O_2} -Dosis (HD) hatte einen Anstieg der Initiator-Caspase-8 und eine leicht verstärkte Caspase-9- und Caspase-3-Aktivität in den Bid^{-/-}-Mäusen zur Folge. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war (* $p < 0,05$).

4.1.2 Die Rolle von Bid in MegaFasL-induzierter Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose

Da es sich bei dem anti-CD95/Fas-Antikörper J_{O_2} um einen sehr schwachen Fas-Liganden (FasL) handelt und in der Literatur bereits diskutiert wurde, dass die Bildung eines Fas-Trimer oft nicht genügt, um Apoptose auszulösen, sondern ein membrangebundener oder multimerer FasL erforderlich für die Apoptose-Induktion ist, wurde im nächsten Schritt der Effekt eines deutlich stärkeren Fas-Liganden als Apoptose-Induktor untersucht (Schneider et al., 1998).

Für diese Experimente wurde eine künstlich synthetisierte hoch potente Form des Fas-Liganden, MegaFasL, eingesetzt. Bei MegaFasL handelt es sich um ein hexamerer Konstrukt aus zwei trimeren FasL, die mit der Kollagendomäne von humanem ACRP30/Adiponectin fusioniert wurden (Holler et al., 2003, Greaney et al., 2006).

Um die Wirkung von MegaFasL auf WT- und Bid^{-/-}-Mäuse zu testen, wurde eine für WT-Mäuse tödliche Dosis von 0,05 µg/g gespritzt und nach 1 und 3 h wurden Proben zur Analyse entnommen.

Im makroskopischen Bild der Lebern ließ sich, vergleichbar mit J_{O_2} -behandelten WT-Tieren, eine deutlich dunkelrote bis schwarze Verfärbung des Gewebes erkennen (Abbildung 11, Macro). Der stark geschädigte Zustand des Lebergewebes und das Einsetzen einer Hämorrhagie bestätigte

sich auch in der H&E-Übersichtsfärbung (s. Abbildung 11, H&E). Dabei sind vereinzelt aus dem Gewebeverband gelöste, stärker eosinophil gefärbte apoptotische Hepatozyten zu erkennen. Anhand der TUNEL-Untersuchungen war darüber hinaus eine signifikant erhöhte Anzahl TUNEL-positiver und damit DNA-geschädigter Zellen sichtbar.

Im Gegensatz zu den WT-Mäusen zeigten Bid-defiziente Tiere nach Behandlung mit 0,05 µg/g MegaFasL, ebenso wie bei der Jo₂-Injektion, keine Anzeichen von Apoptose (s. Abbildung 11, Bid^{-/-}, LD MegaFasL). Hingegen reichte in diesem Fall eine nicht einmal doppelt so starke MegaFasL-Dosis von 0,08 µg/g aus, um in den Bid^{-/-}-Mäusen schließlich doch eine massive apoptotische Reaktion auszulösen (s. Abbildung 11, Bid^{-/-}: HD MegaFasL). In den histologischen Leberpräparaten der entsprechend behandelten Tiergruppe (s. Abbildung 11: H&E und TUNEL: Bid^{-/-}, HD MegaFasL) konnten eine stärkere Hämorrhagie und mehr TUNEL-positive Zellen detektiert werden als in den mit 0,05 µg/g MegaFasL behandelten WT-Mäusen, was auf die Potenz des MegaFasL hinweist.

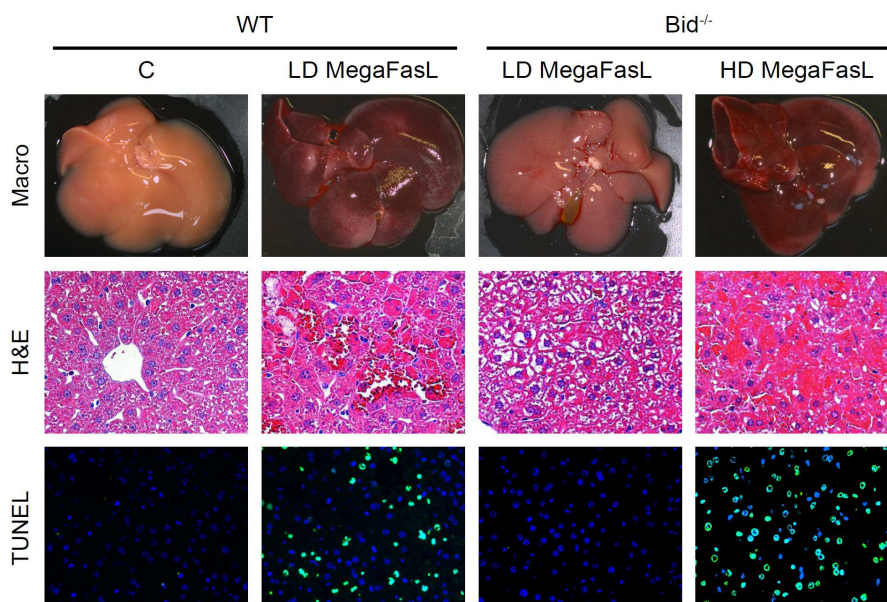


Abbildung 11: Histologische Untersuchungen Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen nach Apoptose-Stimulation mit MegaFasL.

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit 0,05 µg/g MegaFasL (LD MegaFasL) oder zur Kontrolle (C) mit 0,9 % iger NaCl-Lösung behandelt. Des Weiteren wurden Bid^{-/-}-Mäusen 0,08 µg/g MegaFasL (HD MegaFasL) injiziert. Die Probenahme erfolgte 1 h und 3 h nach der Injektion. Im makroskopischen Bild (Macro) sieht man eine dunkelrote bis schwarze Verfärbung der Lebern der WT-Tiere nach LD MegaFasL-Behandlung bzw. bei den Bid^{-/-}-Tieren nach Verabreichung von HD MegaFasL. In der H&E-Färbung (H&E) ist bei der jeweiligen Mausgruppe zudem eine prominente Gewebeerzstörung und Hämorrhagie zu erkennen. Damit einhergehend wurde mittels TUNEL-Färbung (TUNEL) eine Vielzahl von Zellen mit DNA-Schädigungen im Lebergewebe der entsprechend behandelten Tiere detektiert. Die Leberpräparate der Bid^{-/-}-Mäuse, die mit LD MegaFasL injiziert wurden, wiesen weder Veränderungen der Gewebestruktur noch TUNEL-positive Zellen auf und waren in ihrem Erscheinungsbild vergleichbar mit den WT-Kontrollmäusen.

Analog zu den Jo_2 -Injektionsexperimenten wurde der Effekt von MegaFasL ebenfalls auf molekularer Ebene untersucht, und außerdem wurden die Enzymaktivitäten von Caspase-8, -9 und -3 nach 0,05 $\mu\text{g/g}$ (LD) und 0,08 $\mu\text{g/g}$ MegaFasL (HD) Behandlung ermittelt (s. Abbildung 12). In den Zelllysaten von LD MegaFasL-injizierten WT-Tieren konnte im Vergleich zu mit 0,9 %iger NaCl-Lösung scheinbehandelten Kontrollen (C) eine starke Induktion der Aktivitäten aller drei Caspasen nachgewiesen werden.

In den Lysaten Bid-defizienter Mäuse löste lediglich die Injektion von 0,08 $\mu\text{g/g}$ MegaFasL (HD) die Aktivierung der Caspasen aus, nicht jedoch LD MegaFasL. Dabei war der enzymatische Umsatz der Initiator-Caspase-8 vergleichbar mit den LD MegaFasL-behandelten WT-Mäusen. Auch Caspase-3 zeigte, wenn auch weniger ausgeprägt, eine induzierte Aktivität. Die anscheinend deutlich gesteigerte Aktivität von Caspase-9 in den Bid^{-/-}-Proben nach HD MegaFasL-Behandlung ist jedoch kritisch zu betrachten. In Anbetracht der geringen Aktivierung der Caspase-9 nachgeschalteten Effektor-Caspase-3 ist das benutzte artifizielle LEHD-Substrat möglicherweise nicht spezifisch für Caspase-9, sondern kann gegebenenfalls auch von weiteren Caspasen umgesetzt werden.

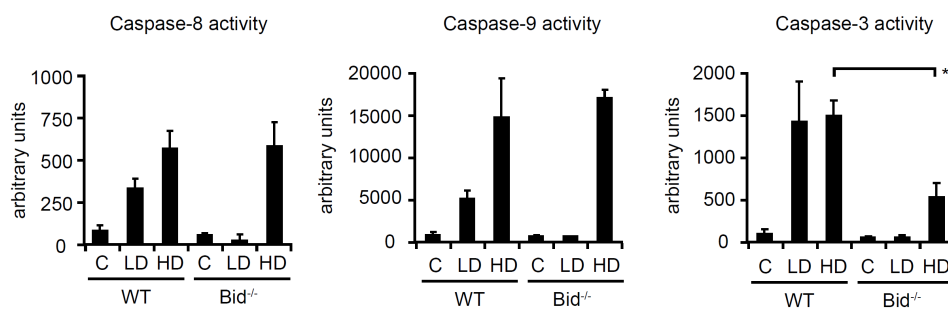


Abbildung 12: Untersuchung der Caspase-Aktivität in Lebern Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren nach Apoptose-Stimulation durch MegaFasL.

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit 0,05 $\mu\text{g/g}$ (LD) MegaFasL, mit 0,08 $\mu\text{g/g}$ (HD) MegaFasL oder zur Kontrolle (C) mit 0,9 %iger NaCl-Lösung behandelt. Die Tiere wurden nach 3 h euthanasiert. Caspase-Aktivitätsassays wurden unter Verwendung der Substrate DEVD (Caspase-3-Substrat), IETD (potentielles Caspase-8-Substrat) und LEHD (potentielles Caspase-9-Substrat) durchgeführt. Eine deutlich erhöhte Aktivität aller Caspasen konnte in den stark apoptotischen Lebern der LD MegaFasL-behandelten WT-Tiere sowie der Bid^{-/-}-Tiere nach HD MegaFasL-Behandlung nachgewiesen werden. Proben der Bid^{-/-}-Mäuse zeigten keine Reaktion auf eine LD MegaFasL-Injektion. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war (* $p < 0,05$).

Weiterhin wurde die Wirkung von MegaFasL auf WT- und Bid^{-/-}-Mäuse anhand der Überlebensrate der Tiere pro Zeit verglichen. Beide Mausgruppen wurden mit 0,08 $\mu\text{g/g}$ MegaFasL behandelt und nachfolgend beobachtet. Der prozentuale Anteil der überlebenden Tiere ist in Abbildung 13 dargestellt. In diesem Experiment zeigte sich, dass Bid^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren, nach Behandlung mit derselben Dosis MegaFasL, im Durchschnitt mit einer Verzögerung von ca. 3 h sterben (s. Abbildung 13).

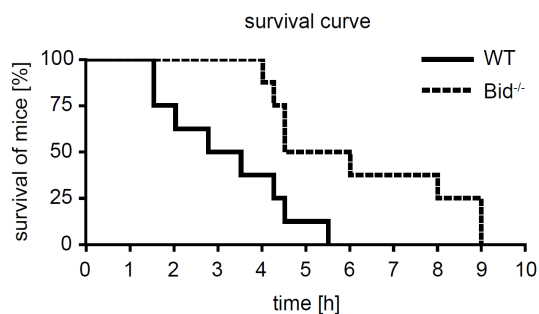


Abbildung 13: Überlebenskurve von Bid^{-/-}- und WT-Mäusen nach Behandlung mit MegaFasL

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit 0,08 µg/g MegaFasL behandelt. Das Überleben der Tiere wurde prozentual gegen die Zeit aufgetragen. WT-Mäuse wurden mit einer durchgezogenen Linie dargestellt, Bid^{-/-}-Mäuse durch eine gestrichelte Linie. Bid-defiziente Mäuse starben nach gleicher Behandlung im Schnitt ca. 3 h später als WT-Kontrollen.

Für eine detailliertere Untersuchung der in die Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose involvierten Signaltransduktionsmechanismen in Bid^{-/-}-Mäusen, wurden im Folgenden verschiedene potentiell für die Apoptose relevante Proteine mittels Western Blot analysiert (s. Abbildung 14).

Zunächst wurde der korrekte genetische Hintergrund der entsprechenden Tiere anhand der Expression des Bid-Proteins belegt, wobei Bid in den Knockout-Tieren nicht detektiert werden konnte. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass es keinen Unterschied in der Proteinexpression des Fas-Rezeptors zwischen WT- und Bid^{-/-}-Mäusen gibt. Ebenfalls unabhängig von der Bid-Expression waren die Proteinlevel von c-Flip, Bcl-x_L, Mcl-1, Bax und cIAP1 bei Analyse des Gesamtzelllysats (s. Abbildung 14). Durch eine Fraktionierung in mitochondriale und cytosolische Proteine zeigte sich hingegen eine deutlich erhöhte Konzentration von mitochondrial-assoziiertem Bax in den WT-Mäusen infolge der Behandlung mit LD wie auch mit HD MegaFasL. In der cytosolischen Fraktion der WT-Proben wurde ein erhöhtes Vorkommen von Cytochrome C und Smac detektiert, die im Rahmen des fortgeschrittenen Apoptose-Prozesses ins Cytosol der Zelle ausgeschüttet werden. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen war auch eine erhöhte Konzentration geschnittener Caspase-3 (17, 19 kDa) sowie ein Anstieg des geschnittenen Caspase-8-Fragments bei 43 kDa vornehmlich in den WT-Mäusen nachweisbar.

Die mitochondrialen Bax-Proteinlevel in Bid^{-/-}-Tieren blieben jedoch von der MegaFasL-Behandlung unberührt. Darüber hinaus konnte in den Bid-defizienten Tieren weder nach LD noch nach HD MegaFasL-Injektion cytosolisches Cytochrom C bzw. Smac nachgewiesen werden. Unabhängig von der injizierten MegaFasL-Dosis wurden allerdings 3 h nach Behandlung der Bid^{-/-}-Mäuse geschnittene Fragmente von Caspase-3 anhand der Westernblots detektiert. Auch die enzymatische Spaltung von Caspase-8 konnte in den Bid^{-/-}-Tieren belegt werden, jedoch nur nach HD MegaFasL-Behandlung. Im Kontrast zu den aktivierten Caspasen gab es allerdings keine Anzeichen für die Induktion des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs.

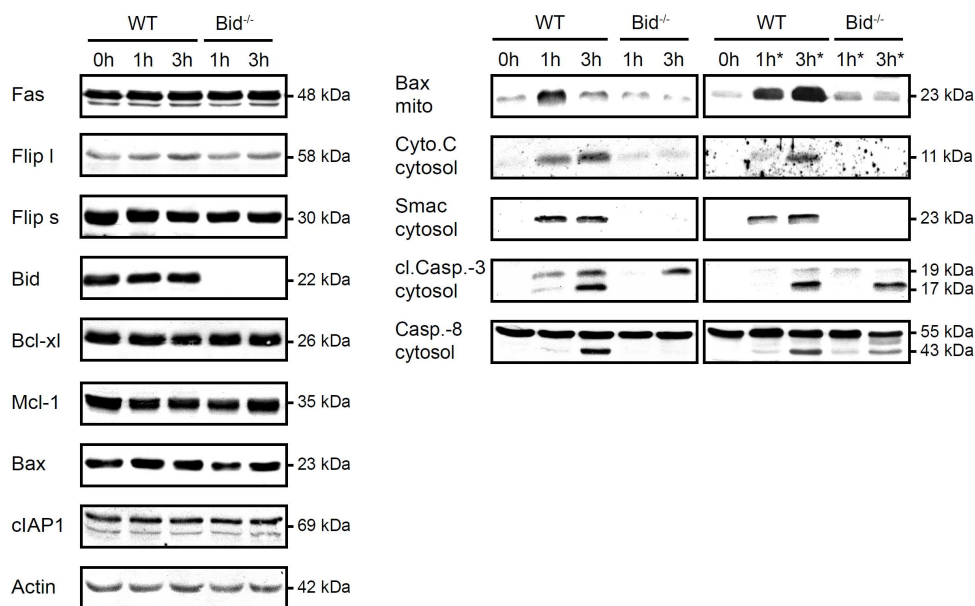


Abbildung 14: Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach MegaFasL-Behandlung

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit 0,05 µg/g und mit 0,08 µg/g (*) MegaFasL behandelt und 1 h oder 3 h nach Injektion sowie zum Zeitpunkt 0 h als Kontrolle euthanasiert. Western Blot-Analysen der Gewebekomponenten wurden für Fas, Flip I, Flip s, Bid, Bcl-x_L, Mcl-1, Bax, cIAP durchgeführt. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Aktin und zeigte eine gleichbleibend starke Expressionsbande. In der mitochondrialen Proteinfraction wurden darüber hinaus die Proteinlevel von Bax analysiert, und die cytosolische Fraction diente dem definierten Nachweis von Cytochrome C, Smac/Diablo, Caspase-8 und geschnittener Caspase-3.

4.1.3 Kontrolle der Bedeutung des Fas-Rezeptors und der Caspase-Aktivität für die Wirkung von MegaFasL

Die vorangegangenen Ergebnisse haben gezeigt, dass Bid-defiziente Mäuse keine der für WT-Kontrollen typischen Reaktionen auf die Behandlung mit Jo₂-Antikörpern aufweisen und vollständig resistent auch gegenüber hohen Dosen des Antikörpers zu sein scheinen (s. 4.1.1). Im Gegensatz dazu war das MegaFasL-Protein zumindest in hohen Dosen in der Lage, Apoptose in den Bid^{-/-}-Mäusen zu induzieren, wobei eine Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs mit Bax und Cytochrom C nicht detektiert werden konnte (s. 4.1.2).

Um nun zu prüfen, ob es sich bei der dargestellten MegaFasL-Sensibilität wirklich um eine durch den Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose handelt bzw. ob in dem nachgeschalteten Signaltransduktionsmechanismus tatsächlich Caspasen involviert sind, wurden Proben von Fas-Rezeptor-defizienten *lpr*-Mäusen (B6.MRL-*Tnfrsf6*^{lpr}/J) analysiert.

Die *in vivo* Experimente für diese Untersuchungen wurden im Labor von Dr. Hartmut Jaeschke (University of Kansas Medical Center, Kansas City, USA) durchgeführt. *Lpr*-Mäuse und WT-Kontrolliere wurden parallel zu den vorherigen Versuchen mit 0,05 µg/g (LD MegaFasL) und 0,08 µg/g (HD MegaFasL) MegaFasL oder zur Kontrolle (C) mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt und nach 2 h euthanasiert. Entsprechende Proben des Lebergewebes dienten der Analyse der apoptotischen Prozesse durch die histologische Bestimmung der Anzahl

TUNEL-positiver Zellen bzw. durch die Messung der Caspase-3-Aktivität. Serumproben wurden zur Testung der Alanin-Aminotransferase (ALT)-Konzentrationen genommen.

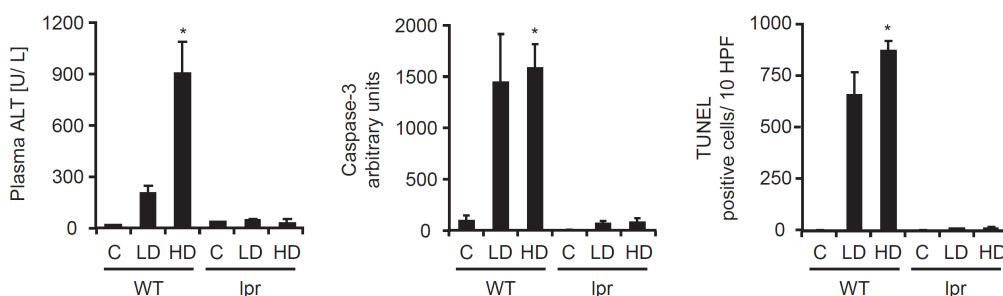


Abbildung 15: Untersuchungen zur Induktion von Apoptose mit MegaFasL in *lpr*-Mäusen

lpr-Mäuse und WT-Mäuse gleichen Alters wurden mit 0,05 µg/g (LD) und 0,08 µg/g (HD) MegaFasL behandelt. Kontrolltiere (C) bekamen 0,9 % iger NaCl-Lösung verabreicht. Serum-ALT-Werte, Caspase-3-Aktivität und die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurden aus den Proben bestimmt, die den Tieren 2 h nach Injektion entnommen wurden. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 % betrug (* $p < 0,05$).

Anhand der Caspase-3-Aktivität sowie der Anzahl TUNEL-positiver Zellen im histologisch gefärbten Leberpräparat wurde bestätigt, dass die WT-Kontrollen nach MegaFasL-Behandlung vergleichbar zu den vorherigen Experimenten Anzeichen einer fortgeschrittenen Apoptose zeigen (s. Abbildung 15). Darüber hinaus waren die hohen Plasma-ALT-Werte ein Anzeichen für das Vorhandensein einer sekundären Nekrose (s. Abbildung 15). Demgegenüber zeigten *lpr*-Mäuse keinerlei Anhaltspunkte für eine Schädigung des Lebergewebes infolge der MegaFasL-Injektion, und es ließen sich weder apoptotische Zellen durch TUNEL noch aktive Caspase-3 nachweisen. Auch die ALT-Konzentration im Plasma war zu vernachlässigen.

Die Daten bestätigten somit, dass der apoptose-auslösende Effekt von MegaFasL spezifisch über den Fas-Rezeptor vermittelt werden muss.

Nachdem Fas als extrazellulärer Rezeptor für MegaFasL identifiziert wurde, sollte nun der intrazelluläre Mechanismus der MegaFasL-induzierten Apoptose, und dabei insbesondere die Abhängigkeit von den Caspase-Aktivitäten, detaillierter untersucht werden. Die zu Grunde liegenden *in vivo* Experimente wurden ebenfalls durch das Labor von Dr. Jaeschke vorbereitet. Dazu wurde WT-Mäusen 20 min vor der Behandlung mit LD bzw. HD MegaFasL zunächst 10 µg/g eines pan-Caspase-Inhibitors (Z-VD-fmk) injiziert (Jaeschke et al., 2000). Als Kontrolle wurde den LD und HD MegaFasL-behandelten Tieren zusätzlich die Trägerflüssigkeit (0,9 %ige NaCl-Lösung (V)) injiziert.

Anhand der nachfolgenden biochemischen und histologischen Analysen der entsprechenden Proben wurde verdeutlicht, dass der pan-Caspase-Inhibitor (CI) die Apoptose-Antwort auf MegaFasL in diesem Versuchsmodell nahezu vollständig unterdrückte (s. Abbildung 16). Die gemessenen Parameter ALT-Konzentration, Caspase-3-Aktivität und auch TUNEL-positive

Zellen waren im Vergleich zu den Kontrolltieren (V), bei denen eine reguläre Apoptose-Reaktion ausgelöst wurde, kaum zu detektieren.

Damit wurde deutlich, dass die MegaFasL-vermittelte Apoptose spezifisch über den Fas-Rezeptor induziert wird und die involvierte intrazelluläre Signalkaskade abhängig von der proteolytischen Aktivität der Caspasen ist. Eine Erhöhung der MegaFasL-Dosis hatte keinen Effekt auf die Signalinduktion infolge einer Caspase-Inhibition.

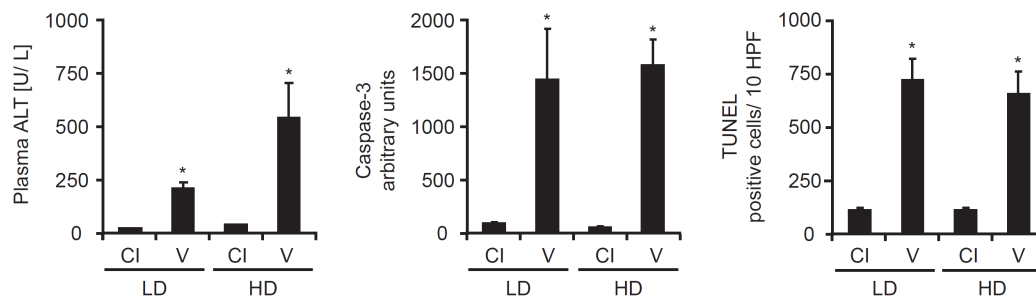


Abbildung 16: Einfluss eines pan-Caspase-Inhibitors auf MegaFasL-induzierte Apoptose

WT-Mäuse wurden mit 0,05 µg/g (LD) und 0,08 µg/g (HD) MegaFasL behandelt. 20 min vor der MegaFasL-Injektion bekamen die Tiere 10 µg/g des pan-Caspase-Inhibitors (CI) Z-VD-fmk verabreicht. Als Kontrolle dienten Tiere, die eine Scheininjektion mit 0,9 % NaCl-Lösung (V) erhalten hatten. Plasma-ALT-Werte, Caspase-3-Aktivität und die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurden aus den Proben bestimmt, die den Tieren 2 h nach Injektion entnommen wurden. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 % betrug (* $p < 0,05$).

4.1.4 Die Rolle von Bid für die TNF-Rezeptor-vermittelte und LPS/GalN-induzierte Apoptose

Neben dem Fas-Rezeptor kann der Zelltod auch über andere Rezeptoren, wie den TNF-Rezeptor, ausgelöst werden (Leist et al., 1994). Um nun die Rolle von Bid in der TNF-Rezeptor-induzierten Apoptose zu ermitteln, wurde im *in vivo* Modell die Sekretion von TNF- α als Ligand des TNF-Rezeptors durch die Applikation einer Kombination aus Lipopolysaccharid (LPS) mit D-Galaktosamin (GalN) stimuliert. Eine mit dieser Behandlung einhergehende Induktion der Apoptose bzw. insbesondere eines massiven Sterbens von Hepatozyten ist bereits in der Literatur publiziert (Galanos et al., 1979, Hishinuma et al., 1990, Kaufmann et al., 2009).

Sowohl WT-Mäusen als auch den Bid-defizienten Tieren wurden 0,5 µg/g LPS und 700 µg/g GalN in Kombination injiziert. Die Analyse der Lebergewebe im makroskopischen Bild bestätigte eine starke apoptotische Reaktion der WT-Tiere anhand der typischen dunkelroten Verfärbung des Gewebes (s. Abbildung 17). Gleichermäßen zeigten jedoch auch die Bid^{-/-}-Mäuse eine Hämorrhagie durch eine tiefrote Färbung des Lebergewebes an.

In Übereinstimmung mit den makroskopischen Befunden konnte ebenso in H&E gefärbten histologischen Präparaten beider Mausgruppen ein diffuses und von Erythrozyten-Infiltrationen durchzogenes Gewebesbild beobachtet werden (s. Abbildung 18). Ferner ließen sich anhand der TUNEL-Färbung zahlreiche TUNEL-positive, DNA-fragmentierte Zellen infolge der

LPS/GalN-Behandlung nachweisen (s. Abbildung 18). Des Weiteren wurde die Expression aktiver Caspase-3 mittels Immunhistologie untersucht. Während die Präparate der unbehandelten Kontrollen keine aktivierte Caspase-3 aufwiesen, fielen sowohl in den WT- als auch Bid^{-/-}-Mäusen nach LPS/GalN-Injektion beträchtliche Areale stark positiver Färbung auf (s. Abbildung 18).

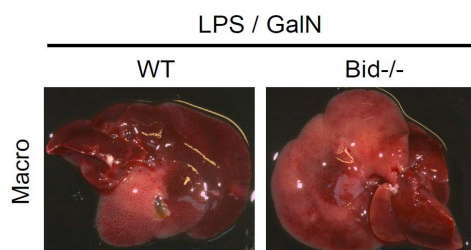


Abbildung 17: Makroskopisches Bild des Lebergewebes LPS/GalN-behandelter Mäuse

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) und Galaktosamin (GalN) behandelt und 6 h später euthanasiert. Sowohl die Lebern der WT-Tiere als auch der Bid-defizienten Mäuse zeigten typische Anzeichen starker Apoptose wie die tiefrote Färbung des Gewebes infolge der Hämorrhagie.

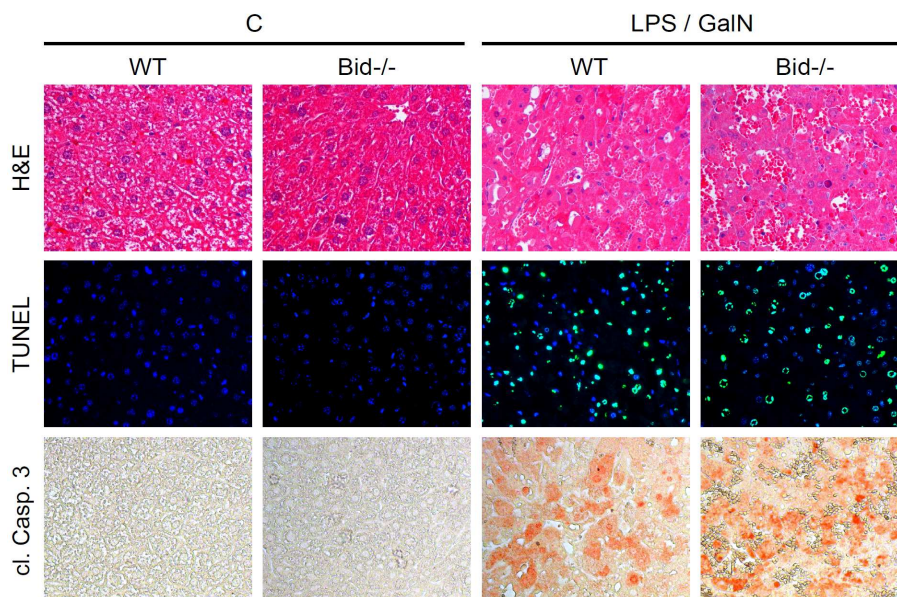


Abbildung 18: Histologische Untersuchungen von WT- und Bid^{-/-}-Gewebepräparaten nach Induktion der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose durch LPS/GalN

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) und Galaktosamin (GalN) behandelt. Als Kontrolle (C) wurde den entsprechenden Tiergruppen nur 0,9 % ige NaCl-Lösung injiziert. Proben wurden 6 h nach Apoptose-Induktion entnommen. Die H&E-Färbung präsentierte sowohl in den WT- als auch Bid^{-/-}-Mäusen eine massive Zerstörung des Lebergewebes mit Erythrozyteninfiltration (Hämorrhagie) infolge der LPS/GalN-Behandlung. Auch immunhistochemische TUNEL-Untersuchungen wiesen eine deutlich erhöhte Anzahl positiver Zellen mit geschädigter DNA in den LPS/GalN-injizierten Tieren nach. Überdies konnte anhand eines histologischen Nachweises geschnittene, aktive Caspase-3 (cl. Casp.3) in ausgedehnten Bereichen des Lebergewebes demonstriert werden, während weder WT- noch Bid^{-/-}-Kontrollen Anzeichen einer apoptotischen Reaktion darstellten.

Weitere Untersuchungen der Aktivität der Effektor-Caspase-3 anhand der Spaltung und Aktivierung des fluoreszierenden Caspase-3-Substrates DEVD bekräftigten die vorherigen Ergebnisse. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen belegten die biochemischen Aktivitätsassays eine signifikant erhöhte Caspase-3-Aktivität infolge der LPS/GalN-Injektion sowohl in den WT-Mäusen als auch in den Bid^{-/-}-Mäusen. Die Analyse der Proteinlevel der aktiven Caspase-3 mittels Western Blot bestätigte in beiden LPS/GalN-behandelten Mausgruppen eine Induktion der geschnittenen Caspase-3-Fragmente im Vergleich zu den mit 0,9%iger NaCl-Lösung scheinbehandelten Kontrollmäusen. Allerdings zeigte sich das Signal der aktiven Caspase-3 nach LPS/GalN in den Bid^{-/-}-Tieren etwas geringer als bei den WT-Mäusen. Demgemäß konnte gezeigt werden, dass Bid keinen Einfluss auf die LPS/GalN-induzierte und TNF-Rezeptor-vermittelte Apoptose hat und die verminderte apoptotische Reaktion in Bid^{-/-}-Mäusen nicht allgemeiner Art ist, sondern vielmehr in Zusammenhang mit dem Fas-Rezeptor steht.

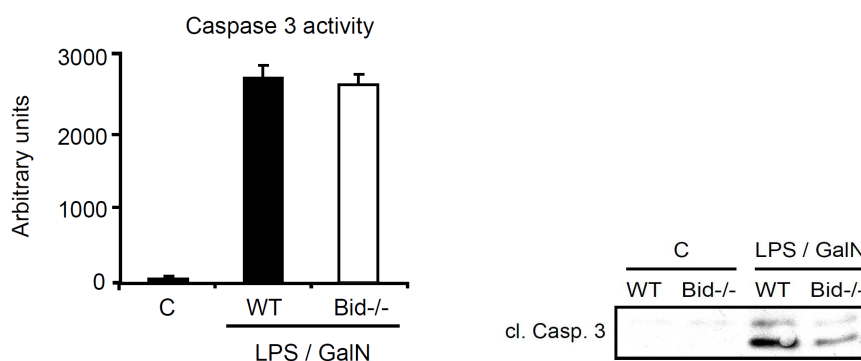


Abbildung 19: Aktivität von Caspase-3 in Gewebehomogenaten von WT- und Bid^{-/-}-Tieren nach Induktion der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose durch LPS/GalN

WT- und Bid^{-/-}-Mäuse wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) und Galaktosamin (GalN) behandelt und zur Kontrolle (C) mit 0,9 % iger NaCl-Lösung injiziert. Proben wurden 6 h nach Apoptose-Induktion entnommen. Die LPS/GalN-Injektion führte sowohl in WT- als auch in Bid^{-/-}-Proben zu signifikant gesteigerten Caspase-3 Aktivitäten im Vergleich zu den Kontrollen. Im Western Blot konnten ebenfalls Fragmente der aktiven Caspase-3 infolge LPS/GalN-Behandlung detektiert werden. Das Signal in Proben von Bid^{-/-}-Mäusen fiel etwas schwächer aus als in den WT-Tieren, war im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen jedoch in beiden Gruppen nach LPS/GalN verstärkt.

4.2 Die Rolle von Bid im Rahmen der Apoptose-Resistenz

4.2.1 Untersuchung bezüglich der Wirkung von Jo₂ infolge induzierter Apoptose-Resistenz in WT-Mäusen

Während die vorherigen Experimente eine Resistenz gegenüber Jo₂-vermittelter Apoptose in den Bid^{-/-}-Mäusen zeigten, wurden im Folgenden weitere bereits in der Literatur bekannte *in vivo* Apoptose-Resistenz-Modelle der Analyse hinzugezogen. Dies umfasste erstens die Behandlung

mit Suramin, zweitens eine partielle Resektion der Leber und drittens eine Gallengangsligatur (Desbarats and Newell, 2000, Eichhorst et al., 2004, Osawa et al., 2005, Vogel et al., 2006).

Die genauen Mechanismen, die eine entsprechende Apoptose-Resistenz in den Modellen induzieren, sind bisher allerdings nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde nun WT-Mäusen sowohl nach einer 2/3-Leberteilesektion (P) als auch infolge einer Gallengangsligatur (B) bzw. Suramininjektion (S) eine tödliche Dosis von 0,5 µg/g (s. 3.1.3) des CD95/Fas-Antikörpers Jo₂ verabreicht. Als Negativkontrolle (C) wurde den Tieren eine 0,9 % ige NaCl-Lösung verabreicht, während entsprechend vorangegangener Experimente, mit 0,5 µg/g Jo₂ injizierte WT-Mäuse als Positivkontrollgruppe mitgeführt wurden. Im makroskopischen Erscheinungsbild der Lebern Jo₂-injizierter Tiere fiel auf, dass lediglich die Positivkontrollen die charakteristische dunkelrote Färbung einer apoptotischen Leber aufwiesen, während die Lebern der WT-Mäuse nach partieller Resektion und Suramin-Behandlung vergleichbar mit den scheinbehandelten Negativkontrollen waren (s. Abbildung 20). Das Lebergewebe gallengangsligierter Mäuse und einer so induzierten Cholestase, einem Rückstau von Gallenflüssigkeit, zeigte eine ausgeprägte Gelbfärbung (s. Abbildung 20).

Die H&E-Übersichtspräparate wie auch die DNA-Schädigungsnachweise mittels TUNEL-Analyse bestätigten die für die apoptotischen Positivkontrollen (C, Jo₂) bereits bekannten Ergebnisse (s. 4.1.1). In Übereinstimmung mit dem makroskopischen Bild wiesen weder die Histologien der partiell Leberresektierten Tiere noch der suraminbehandelten Mäuse Auffälligkeiten in den Histologien auf. Infolge der Gallengangsligatur stellten sich im histologischen Bild einige Läsionen, sogenannte Galleninfarkte, dar. Des Weiteren konnten einzelne TUNEL-positive Zellen in den Lebern des Teilresektions- bzw. Gallengangsligatur-Modells nach Jo₂-Behandlung detektiert werden. Während die Tiere infolge einer resektierten Leber bzw. eines Gallenflüssigkeitsrückstaus im Vergleich zu den Positivkontrollen deutlich geringere apoptotische Anzeichen erkennen ließen, zeigte sich die stärkste inhibierende Wirkung auf die Apoptose durch eine vorherige Suramininjektion. Die so behandelten WT-Mäuse waren nicht von den Negativkontrolltieren zu unterscheiden.

Eine Anwendung der hier dargestellten Apoptose-Resistenz-Modelle in Bid^{-/-}-Mäusen wurde nicht untersucht, da die vorherigen Analysen bereits unverkennbar gezeigt hatten, dass Bid^{-/-}-Tiere schon unter Normalbedingungen keine Reaktion gegenüber jeglichen Dosen des Antikörpers Jo₂ aufwiesen (s. 4.1.1).

Neben den phänotypischen Untersuchungen des Lebergewebes wurde die proteolytische Aktivität wie auch die Expression der aktivierten Caspase-3 in den entsprechenden Leberzellhomogenaten der Resistenzmodelle nach Jo₂-Behandlung gemessen, um einen Einblick in den assoziierten Signalmechanismus zu erlangen.

Dabei konnte bei allen drei Apoptose-Resistenz-Modellen zwar eine gewisse Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden, jedoch war diese proteolytische Aktivität signifikant reduziert gegenüber den apoptotischen WT-Kontrollmäusen (C, Jo₂) (s. Abbildung 21). Während dementsprechend auch die Proteinlevel der Caspase-3-Fragmente, als Indiz für aktivierte Caspase-3, in den

Gewebehomogenaten der Leber-teilresektierten (P) bzw. Suramin-behandelten (S) Mäuse unterhalb des Detektionsminimums lagen, konnte in den cholestatischen Lebern infolge der Gallengangligatur (B) eine Induktion der geschnittenen Caspase-3 aufgezeigt werden. Dies entsprach der ebenfalls etwas höheren Enzymaktivität in diesem Resistenzmodell (s. Abbildung 21).

Die biochemischen Analysen in Bezug auf die Effektor-Caspase-3 bestätigten somit die phänotypischen Ergebnisse und unterstrichen die antiapoptotische Wirkung der verschiedenen Modelle.

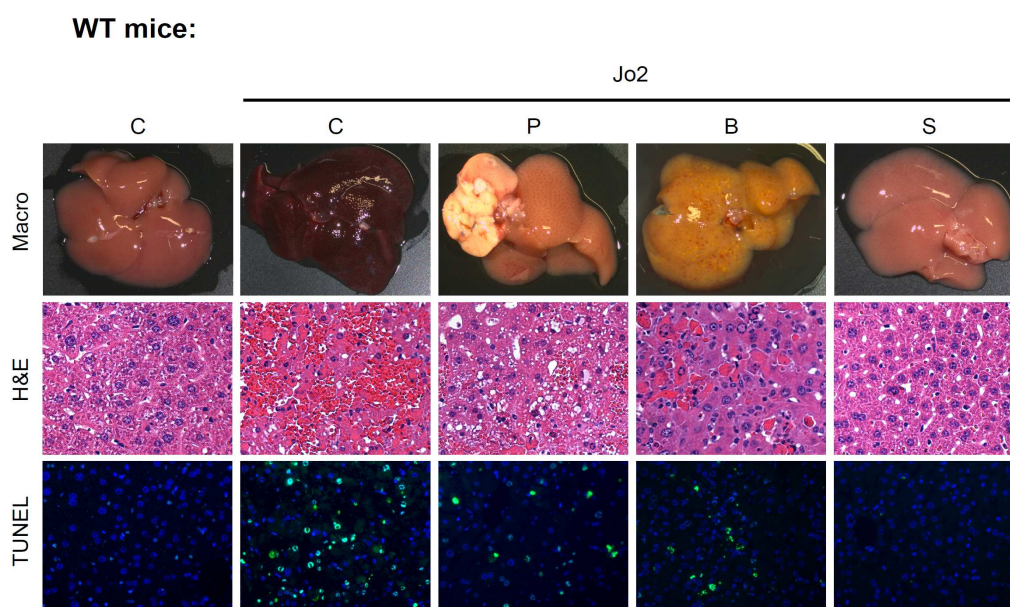


Abbildung 20: Histologische Untersuchungen von WT-Gewebepräparaten nach Apoptose-Induktion durch Jo₂ in Apoptose-Resistenzmodellen

WT-Mäuse wurden infolge einer partiellen Leberresektion (P), einer Gallengangligatur (B) und einer Suramininjektion (S) mit 0,5 µg/g Jo₂ behandelt. Als Positivkontrolle (C, Jo₂) dienten nichtvorbehandelte WT-Mäuse, denen ebenfalls 0,5 µg/g Jo₂ injiziert wurde. WT-Tiere, denen 0,9 % ige NaCl-Lösung verabreicht wurde, stellten die Negativkontrollgruppe dar. Proben wurden 6 h nach Apoptose-Induktion oder kurz vor dem Tod der Mäuse gesammelt. Die Positivkontrolle bestätigte im makroskopischen Bild (Macro) die dunkelrote bis schwarze Verfärbung apoptotischer Lebern (C, Jo₂). Eine gelbliche Verfärbung der Lebern fiel infolge der Jo₂-Behandlung nach Gallengangligatur auf (B). Hingegen glichen die Lebern der partiell Leber-resektierten (P) und Suramin-behandelten (S) Tiere eher denen der Negativkontrollen und zeigten keine Auffälligkeiten. Die H&E- und TUNEL-Färbungen unterstrichen die Zerstörung und Hämorrhagie in den Lebern der Jo₂-Apoptose-Kontrolltiere und demonstrierten multiple Zellen mit DNA-Schädigung (C, Jo₂). In Präparaten nach Leberteilresektion (P) bzw. Gallengangligatur (B) waren hingegen nur geringe Gewebeschäden und wenig TUNEL-positive Zellen zu finden. Die Ligatur der Gallengänge induzierte darüber hinaus Galleninfarkte, die sich in der H&E-Färbung widerspiegeln. Lebern Suramin-behandelter Tiere wiesen keine Anzeichen für Apoptose auf. Analog zu den Negativkontrollen ohne Vorbehandlung zeigten sich weder Veränderung der Gewebestruktur noch Zellen mit fragmentierter DNA.

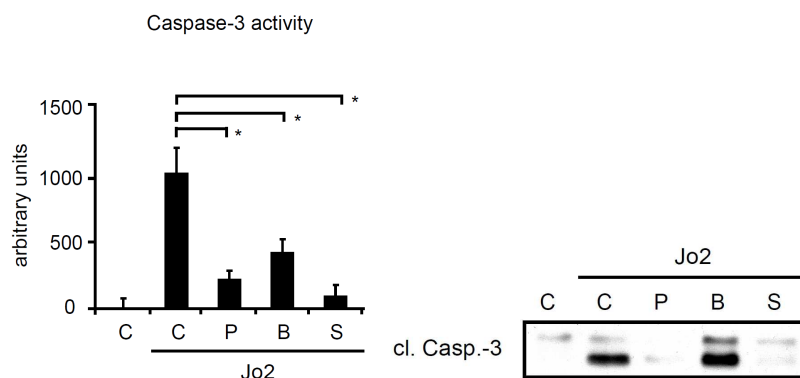


Abbildung 21: Analyse der Proteinlevel aktiver Caspase-3 sowie ihrer proteolytischen Aktivität in Gewebe-homogenaten von WT-Apoptose-Resistenz-Modellen nach Jo₂-Behandlung

WT-Mäuse wurden nach partieller Leberresektion (P), Gallengangsligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit 0,5 µg/g Jo₂ behandelt. Als Positivkontrolle (C, Jo₂) dienten nichtvorbehandelte WT-Mäuse, denen ebenfalls 0,5 µg/g Jo₂ injiziert wurde, während WT-Tiere, denen 0,9 % ige NaCl-Lösung verabreicht wurde, die Negativkontrollgruppe darstellten. 6 h nach Apoptose-Induktion oder kurz vor dem Tod der Mäuse wurden die Lebergewebe gewonnen. Die Caspase-Aktivitätsassays wurden unter Verwendung des Substrats DEVD (Caspase-3-Substrat) durchgeführt. Zur Detektion der aktiven Caspase-3 mittels Western Blot-Analyse wurde ein Antikörper, der spezifisch mit den geschnittenen Fragmenten von Caspase-3 (19/17 kDa) reagiert, eingesetzt. Die Caspase-3-Aktivität wie auch die Proteinlevel der Caspase-3-Fragmente waren in den Positivkontrollen (C, Jo₂) deutlich erhöht, wohingegen die proteolytische Aktivität bei allen drei Resistenzmodellen signifikant verringert war. Ähnlich verhielt es sich bei den Western Blot-Analysen, wobei das Signal für die geschnittene Caspase-3 in den Gallengangs-ligierten Mäusen vergleichbar mit den Positivkontrollen war. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war (*p<0,05).

4.2.2 Vergleich der Wirkung von MegaFasL infolge induzierter Apoptose-Resistenz in WT-Mäusen und Bid^{-/-}-Mäusen

Um die Bedeutung von Bid und des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs für die Apoptose-Resistenz tiefergehend zu erörtern, wurde zusätzlich zu den Untersuchungen mit Jo₂ (s. 4.2.1) die Apoptose-Sensitivität nach Behandlung mit MegaFasL in den bereits erwähnten drei Resistenzmodellen geprüft.

WT-Mäuse wurden gleichermaßen nach 2/3-Leberteilresektion (P), Gallengangsligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit der für WT-Mäuse tödlichen Dosis von 0,05 µg/g MegaFasL (s. 4.1.2) behandelt. Als positive (C, Jo₂) bzw. negative (C) Kontrolle wurde den Tieren entsprechend MegaFasL ohne Vorbehandlung bzw. 0,9 % ige NaCl-Lösung verabreicht.

Anhand des makroskopischen Bildes der Lebern konnten apoptotische Lebergewebe, wie schon in den vorangegangenen Kapiteln (s. 4.1.1, 4.1.2) beschrieben, durch eine deutlich dunkelrote bis schwarze Verfärbung identifiziert werden (s. Abbildung 22, Macro). Entgegen den Experimenten mit dem Jo₂-Antikörper, wurde sowohl für die partiell resektierten (P) als auch Suramin-behandelten (S) Mäuse Apoptose infolge der MegaFasL-Injektion nachgewiesen. Die Gallengangsligatur (B) und der damit einhergehende Rückstau der Gallenflüssigkeit führten zur Gelbfärbung der Leber.

Neben der in der H&E-Übersichtsfärbung prominenten Gewebeerstörung mit Hämorrhagie in den Positivkontrollen (C, MegaFasL), konnte, parallel zu den makroskopischen Aufnahmen, der Gewebeuntergang durch Apoptose ebenfalls nach 2/3-Leberteileresektion als auch nach Suramin-Vorbehandlung gezeigt werden (s. Abbildung 22, H&E). Die Lebern von Tieren nach Gallengangligatur wiesen im Vergleich dazu multiple Galleninfarkte und erweiterte Gallengänge auf, jedoch wurden in diesen Präparaten keine Anzeichen für Apoptose gemäß der MegaFasL-behandelten WT-Kontrollen detektiert.

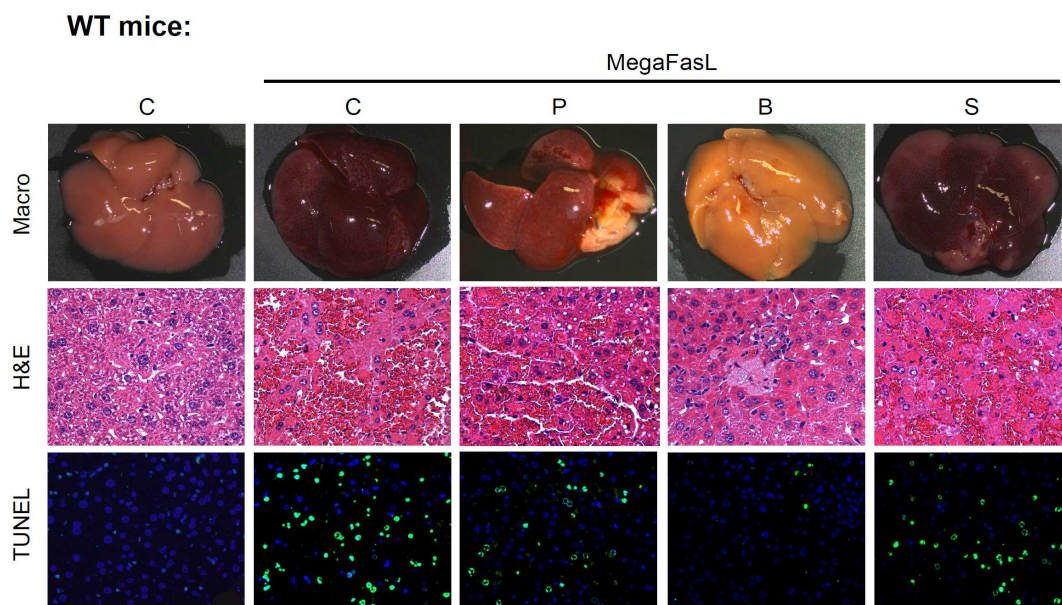


Abbildung 22: Histologische Untersuchungen von WT-Gewebepräparaten nach Apoptose-Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen

WT-Mäuse wurden nach partieller Leberresektion (P), Gallengangligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit 0,05 µg/g MegaFasL behandelt. Als Positiv- (C, MegaFasL) bzw. Negativkontrolle (C) wurde nichtvorbehandelten WT-Tieren entsprechend 0,5 µg/g MegaFasL bzw. 0,9 % ige NaCl-Lösung verabreicht. Alle Mäuse wurden 6 h nach Apoptose-Induktion oder kurz vor ihrem Tod zur Probenentnahme euthanasiert. Im makroskopischen Bild (Macro) kennzeichnete eine dunkelrote bis schwarze Verfärbung die apoptotischen Lebern (C, P, S), während infolge der Gallengangligatur eine gelbliche Verfärbung der Leber nachgewiesen wurde (B). Die H&E-Färbung (H&E) ließ eine deutliche Zerstörung und Hämorrhagie der apoptotischen Gewebepräparate (C, P, S) erkennen. Anhand von TUNEL-Färbungen (TUNEL) konnten multiple Zellen mit DNA-Schädigung in den Histologien der partiell Leberresektierten und Suramin-behandelten Tiere detektiert werden. In den Präparaten der Gallengangs-ligierten Mäuse waren nur geringe Gewebeschädigungen und TUNEL-positive Zellen zu sehen, jedoch zeichnete sich das Gewebe durch Galleninfarkte und erweiterte Gallengänge aus. Negativkontrollen ohne Behandlung wiesen weder Veränderungen der Gewebestruktur noch TUNEL-positive Zellen auf.

Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnten mittels TUNEL-Färbeverfahren sowohl nach partieller Leberresektion als auch nach Behandlung mit Suramin Zellen mit fragmentierter DNA detektiert werden. In Leberpräparaten nach Gallengangligatur war die Anzahl der Zellen mit DNA-Fragmentierung dagegen zu vernachlässigen. Im Gegensatz zur Behandlung mit dem

CD95/Fas-Antikörper Jo_2 wurde durch MegaFasL die Apoptose-Resistenz im Modell der Leberteilresektion und auch der Suramin-Behandlung überwunden. Die MegaFasL-Injektion führte zu signifikantem Zelltod in den Lebern dieser Tiere.

Darüber hinaus präsentierten Analysen der proteolytischen Aktivität der Effektor-Caspase-3, analog zu den histologischen Befunden, stark erhöhte Enzymaktivitäten trotz partieller Leberresektion oder Behandlung mit Suramin ohne signifikanten Unterschied zu MegaFasL-behandelten Positivkontrollproben (s. Abbildung 23, P, S, C). Die gemessene Caspase-3-Aktivität in gallengangligierten Lebern erschien im Vergleich dazu deutlich niedriger und war gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert. Scheinbehandelte Negativkontrollen demonstrierten erwartungsgemäß keine Caspase-3-Aktivität.

Die Westernblotanalyse richtete sich gegen die 17 und 19 kDa-Fragmente von Caspase-3, die infolge der zymogenen Spaltung und Aktivierung des Enzyms entstehen. In Übereinstimmung mit der vorhandenen Caspase-3-Aktivität ließen sich die entsprechenden Fragmente in allen Proben mit Ausnahme der Negativkontrolle nachweisen.

Entgegen den Ergebnissen nach Behandlung mit Jo_2 konnte MegaFasL als ein starker Apoptose-Induktor in WT-Tieren die Apoptose-Resistenz der dargestellten Modelle überwinden. Lediglich gallengangligierte WT-Mäuse behielten eine deutlich verminderte Caspase-3-Aktivität und Apoptose-Sensitivität bei.

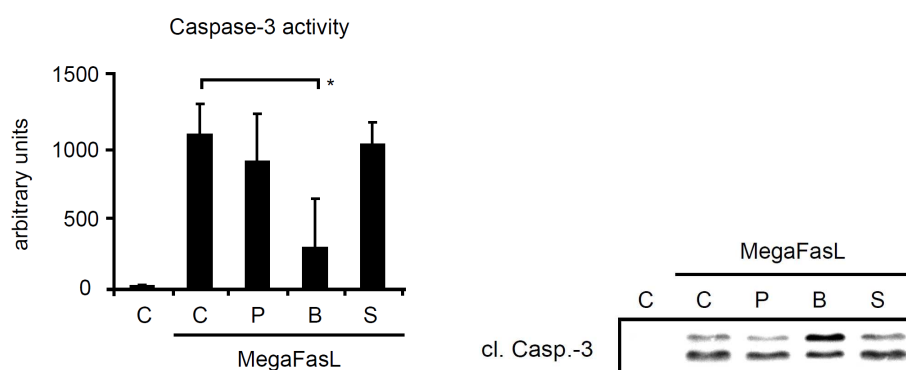


Abbildung 23: Caspase-3-Aktivität in Gewebehomogenaten von WT-Tieren nach Apoptose-Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen

WT-Mäuse wurden nach partieller Leberresektion (P), Gallengangligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit $0,05 \mu\text{g/g}$ MegaFasL behandelt. Als Positivkontrolle (C, MegaFasL) wurde nichtvorbehandelten Tieren MegaFasL und den Negativkontrollen $0,9\%$ ige NaCl-Lösung verabreicht. Proben wurden 6 h nach Apoptose-Induktion oder kurz vor dem Tod der Mäuse nach Euthanasie entnommen. Die Caspase-Aktivitätsassays wurden unter Verwendung des Substrats DEVD (Caspase-3 Substrat) durchgeführt. Für die Western Blot-Analyse wurde ein Antikörper spezifisch gegen die geschnittenen Caspase-3-Fragmente eingesetzt. Eine deutlich erhöhte Caspaseaktivität nach MegaFasL-Injektion konnte sowohl in den Positivkontrollen als auch nach partieller Leberresektion und Suramin-Behandlung nachgewiesen werden. Infolge der Gallengangligatur führte die MegaFasL-Behandlung zu einem deutlich geringeren Anstieg der proteolytischen Aktivität. Die aktiven Caspase-3-Fragmente konnten in allen mit MegaFasL-injizierten Mausgruppen detektiert werden. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% war ($*p < 0,05$).

Überdies wurde geprüft, ob MegaFasL, entsprechend den WT-Tieren, in Bid-defizienten Mäusen ebenfalls die Apoptose-Resistenz der zugrunde liegenden Modelle (partielle Leberresektion, Gallengangsligatur und Suramin-Behandlung) überwinden kann (s. Abbildung 24).

Dafür wurden Bid^{-/-}-Mäuse mit einer für sie tödlichen Dosis von 0,08 µg/g MegaFasL behandelt. Jedoch konnten, im Gegensatz zu der hoch apoptotischen Positivkontrolle (C, MegaFasL), nahezu keine Anzeichen für Apoptose in den Lebern der Resistenzmodell-Mäuse detektiert werden. Während das Lebergewebe MegaFasL-behandelter Bid-defizienter Mäuse (C, MegaFasL), analog zu den Untersuchungen in Teilabschnitt 4.1.2, eine deutliche Hämorrhagie und zahlreiche TUNEL-positive Zellen präsentierte, erschienen das makroskopische Bild und die H&E-gefärbten Präparate der vorbehandelten Bid^{-/-}-Mäuse (P, B, S) unauffällig. Lediglich eine geringe Zahl positiver Zellen konnte mittels TUNEL-Analyse identifiziert werden.

Anhand des Caspase-3-Aktivitätsassays und der Stärke der detektierten Banden aktiver Caspase-3-Fragmente im Western Blot, konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass die finale Aktivierung der Effektorcaspase-3 im Vergleich zu den MegaFasL-injizierten Bid^{-/-}-Positivkontrollen signifikant niedriger ausfiel (s. Abbildung 25).

Zusammenfassend wird bei diesen Ergebnissen deutlich, dass Bid essentiell für die Sensitivität gegenüber FasL-induzierter Apoptose ist. Zumindest für zwei der Resistenz-Modelle (partielle Leberresektion und Suramin-Behandlung) konnte gezeigt werden, dass WT-Mäuse sensibler gegenüber MegaFasL-induzierter Apoptose reagieren als Bid-defiziente Mäuse.

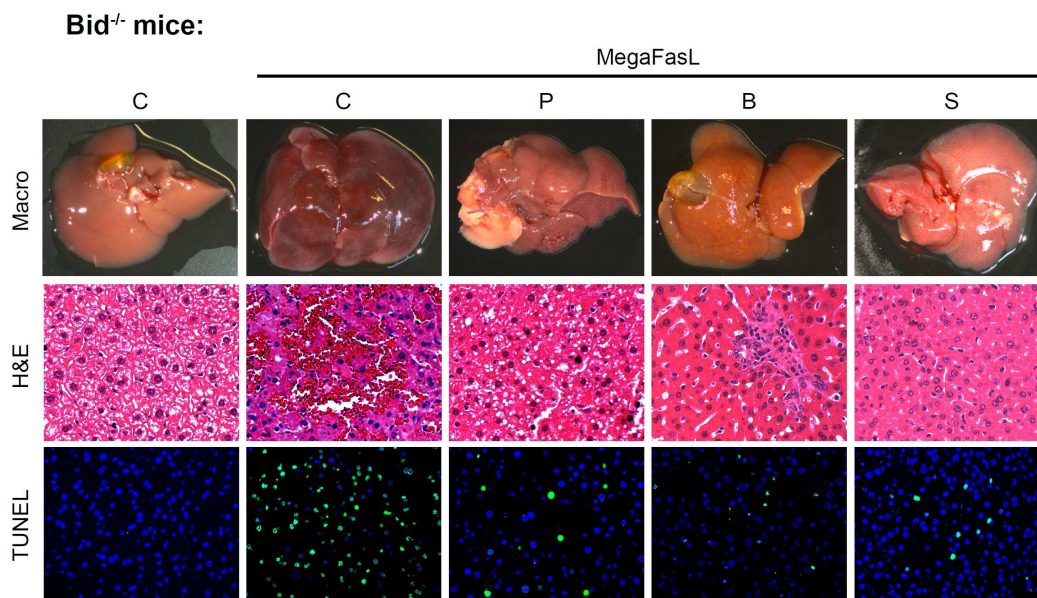


Abbildung 24: Histologische Untersuchungen von Bid^{-/-}-Gewebepräparaten nach Apoptose-Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen

Bid^{-/-}-Mäuse wurden nach 2/3-Leberteilresektion (P), Gallengangsligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit 0,08 µg/g MegaFasL behandelt. Mäuse, die mit 0,9 % iger NaCl-Lösung scheinbehandelt wurden, dienten als Negativkontrolle (C). Die Tiere wurden zur Probenentnahme 6 h nach MegaFasL-Injektion oder kurz vor ihrem Tod euthanasiert.

Das makroskopische Bild der Lebern (Macro) bestätigte die dunkelrote bis schwarze Färbung der apoptotischen Positivkontrolle (C, MegaFasL), wohingegen die cholestatischen Lebern nach Gallengangsligatur (B) gelblich erschienen. Das Lebergewebe nach partieller Resektion (P) bzw. Suramin-Behandlung (S) war vergleichbar mit der scheinbehandelten Negativkontrolle (C). Die H&E-Färbung (H&E) unterstrich eine deutliche Gewebeerstörung und Hämorrhagie infolge der Apoptose (C, MegaFasL), jedoch waren kaum Auffälligkeiten in den Präparaten der leberteilresektierten und suramininjizierten Bid^{-/-}-Mäuse zu erkennen. Mittels TUNEL-Färbung (TUNEL) ließen sich multiple Zellen mit DNA-Schädigung in der Positivkontrolle detektieren, wohingegen kaum Schädigung nach MegaFasL-Behandlung der Leber-resektierten und Suramin-behandelten Bid^{-/-}-Mäuse verzeichnet werden konnte. Im Präparat der Gallengangs-ligierten Bid^{-/-}-Mäuse waren geringe Gewebeschädigungen wie geweitete Gallengänge und Galleninfarkte zu sehen, aber nur wenige TUNEL-positive Zellen. Die Negativkontrollen wiesen weder Veränderung der Gewebestruktur noch TUNEL-positive Zellen auf.

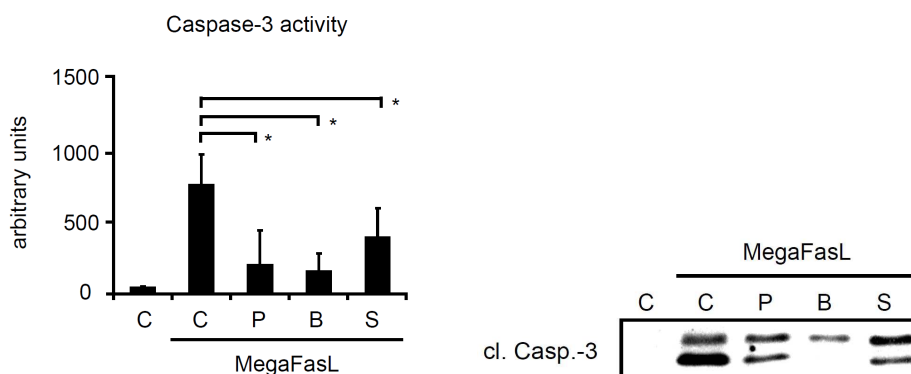


Abbildung 25: Aktivität von Caspase-3 in Gewebehomogenaten von Bid^{-/-}-Tieren nach Apoptose-Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen

Bid^{-/-}-Mäuse wurden nach partieller Leberresektion (P), Gallengangsligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit 0,08 µg/g MegaFasL oder als Positiv- (C, MegaFasL) bzw. Negativkontrolle (C) nur mit MegaFasL bzw. 0,9 % iger NaCl-Lösung behandelt. 6 h nach der Apoptose-Induktion wurden die Tiere euthanasiert und die Proben entnommen. Der Caspaseaktivitätsassay wurde unter Verwendung des Substrats DEVD (Caspase-3-Substrat) durchgeführt. Für die Western Blot-Analyse wurde ein Antikörper spezifisch gegen die geschnittenen aktiven Fragmente von Caspase-3 (17 kDa und 19 kDa) eingesetzt. Eine signifikant erhöhte Caspaseaktivität nach MegaFasL-Injektion konnte nur in der Positivkontrolle (C, MegaFasL) nachgewiesen werden. Die Proben der vorbehandelten Bid^{-/-}-Mäuse (P, B und S) zeigten lediglich geringe proteolytische Aktivität. Auch die Proteinlevel der aktiven Caspase-3-Fragmente waren weniger stark induziert als in den Positivkontrollmäusen. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war (*p<0,05).

4.2.3 Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung von Bid auf das Jo₂-Apoptose-Resistenz-Modell

Mehrere Forschungsergebnisse und Publikationen haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von Bid einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung dieses Proteins haben kann (Desagher et al., 2001, Degli Esposti et al., 2003, Vogel et al., 2006). Um nun die Bedeutung der Bid-Phosphorylierung für die Jo₂-induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden gemäß den vorangegangenen Experimenten, nicht-phosphorylierbare Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse mit einer tödlichen Dosis von 0,5 µg/g des anti-CD95/FasL-Antikörpers Jo₂ behandelt. Die tödliche Dosis für Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse war dabei die gleiche wie für WT-Mäuse (s. 4.2.1). Vor der Jo₂-Injektion

wurden die Tiere darüber hinaus einer partiellen Leberresektion (P), einer Gallengangsligatur (G) oder Suramin-Behandlung (S) unterzogen. Negativkontrollen (C) wurden mit 0,9 % iger NaCl-Lösung scheinbehandelt und Positivkontrollen entsprechend ohne medikamentöse bzw. operative Vorbehandlung mit Jo_2 injiziert.

In Übereinstimmung mit den in Kapitel 4.2.1 gezeigten Ergebnissen waren die Lebern der $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Positivkontrollen hoch apoptotisch und wiesen deutliche Anzeichen einer Hämorrhagie auf. Das Parenchym war geschädigt und eine große Anzahl DNA-fragmentierter Zellen war im TUNEL-Präparat prominent. Hingegen konnten in den Proben der $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Apoptose-Resistenz-Modell-Tiere weder Hämorrhagie oder Gewebeschädigung entdeckt werden noch apoptotische bzw. TUNEL-positive Zellen. Lebern Gallengangs-ligierter $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäuse wiesen ferner geweitete Gallengänge in Folge der rückgestauten Gallenflüssigkeit auf.

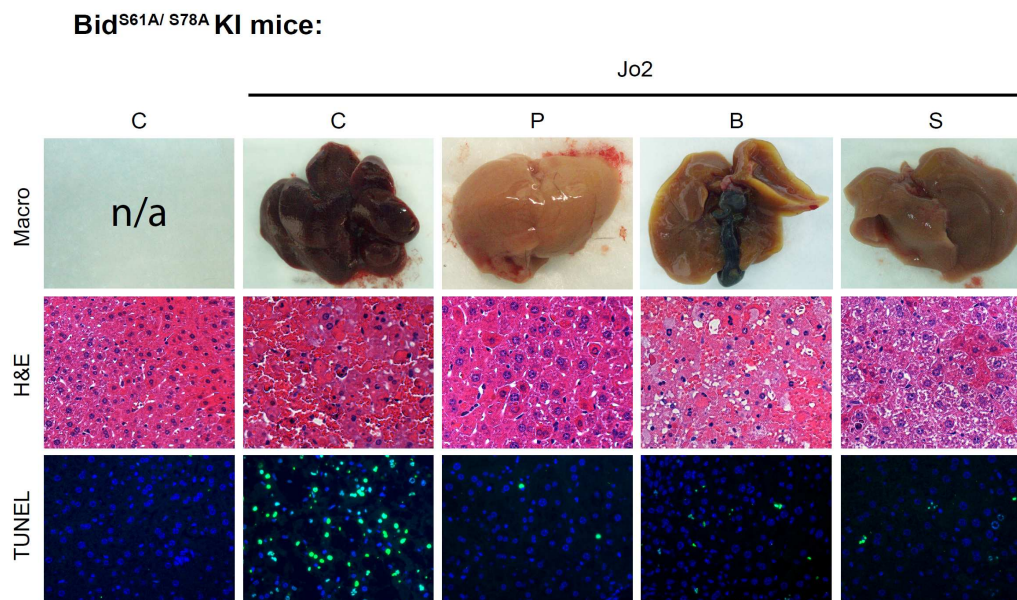


Abbildung 26: Histologische Untersuchungen von $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Gewebepräparaten nach Apoptose-Induktion durch Jo_2 in Apoptose-Resistenz-Modellen

$\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäuse wurden nach 2/3-Leberteilresektion (P), Gallengangsligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit $0,5 \mu\text{g/g}$ Jo_2 behandelt. Als Negativkontrolle (C) wurde den Mäusen eine 0,9 % ige NaCl-Lösung verabreicht, während nicht-vorbehandelte Jo_2 -injizierte $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäuse als Positivkontrolle mitgeführt wurden. Proben wurden 6 h nach Apoptose-Induktion oder kurz vor dem Tod der Tiere gesammelt. Nur die apoptotischen Lebern der $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäuse ohne Vorbehandlung (C) präsentierten im makroskopischen Bild (Macro) eine dunkelrote bis schwarze Verfärbung, die charakteristische Gewebeerzörung sowie multiple Zellen mit DNA-Schädigung. Die Jo_2 -Behandlung nach partieller Leberresektion (P) und Suramininjektion (S) induzierte lediglich geringe Gewebeschäden und die Histologien nach Gallengangsligatur (B) zeichneten sich durch Galleninfarkte aus. Auch TUNEL-positive Zellen ließen sich in allen drei Apoptose-Resistenz-Modellen kaum nachweisen. Die Negativkontrollen zeigten weder Veränderungen der Gewebestruktur noch Zellen mit DNA-Fragmentierung.

Zieht man darüber hinaus die Ergebnisse der Caspase-3-Aktivitätsassays sowie den Nachweis geschnittener, aktiver Caspase-3-Fragmente mittels Western Blot hinzu, sieht man, dass die proteolytische Aktivität der Caspase-3 unabhängig vom jeweiligen Apoptose-Resistenz-Modell signifikant niedriger ist als in den Positivkontrollen und auch die aktiven 17 kDa bzw. 19 kDa Caspase-3-Fragmente geringer exprimiert vorliegen. (s. Abbildung 27). So bestätigt sich die fortwährende Resistenz der zugrunde liegenden Modelle gegenüber Jo_2 -induzierter Apoptose trotz Nicht-Phosphorylierbarkeit von Bid.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Jo_2 -behandelten WT-Mäuse (s. 4.2.1) zeigt sich, dass es offensichtlich keinen Unterschied in der Sensibilität der WT- und der $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäuse gegenüber dem anti-CD95/Fas-Antikörper Jo_2 gibt und dass trotz Inhibition der Bid-Phosphorylierung die Resistenz der einzelnen Modelle aufrecht erhalten bleibt.

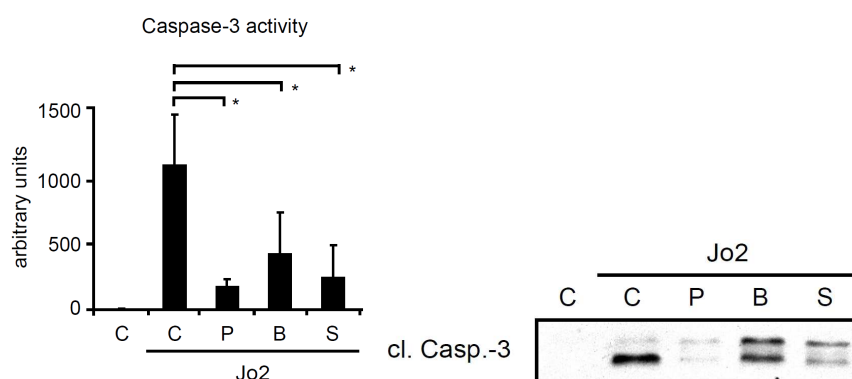


Abbildung 27: Caspase-3-Aktivität in Gewebehomogenaten von $\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäusen nach Apoptose-Induktion durch Jo_2 in Apoptose-Resistenz-Modellen

$\text{Bid}^{\text{S61A/S78A}}$ KI-Mäuse wurden nach 2/3-Leberteilresektion (P), Gallengangsligatur (B) oder Suramininjektion (S) mit $0,5 \mu\text{g/g}$ Jo_2 behandelt. Tieren, die als positive (C, Jo_2) bzw. negative Kontrolle (C) dienten, wurden ohne weitere Vorbehandlung mit $0,5 \mu\text{g/g}$ Jo_2 bzw. mit 0,9 % iger NaCl-Lösung injiziert. Proben wurden 6 h nach Apoptose-Induktion oder kurz vor dem Tod der Mäuse entnommen. Der Caspase-3-Aktivitätsassay wurde unter Verwendung des Substrats DEVD (Caspase-3-Substrat) durchgeführt. Für die Western Blot-Analysen wurde ein spezifischer Antikörper gegen die geschnittenen, aktiven Fragmente der Caspase-3 eingesetzt. Eine deutlich erhöhte Caspaseaktivität nach Jo_2 -Injektion konnte nur in den Positivkontrollproben nachgewiesen werden. Nach partieller Leberresektion (P), Gallengangsligation (B) bzw. Suramininjektion (S) führte die Jo_2 -Behandlung nur zu einem geringen Anstieg der enzymatischen Aktivität und auch die Expression der aktiven Fragmente (17 kDa und 19 kDa) war weniger stark ausgeprägt als in den Positivkontrollen. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % war (* $p < 0,05$).

4.3 Die Rolle von Bid für die Zellproliferation der Leber

4.3.1 Untersuchung des Einflusses von Bid auf die Regeneration des Lebergewebes nach partieller Leberresektion

Neben der bisher untersuchten Funktion des Bid-Proteins im Rahmen der Apoptose, gibt es auch Hinweise auf eine Einflussnahme von Proteinen der Bcl-2-Familie auf die Regulation der

Proliferation. (Vaux et al., 1988, McDonnell and Korsmeyer, 1991, Greider et al., 2002, Kamer et al., 2005, Zinkel et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Bid für die Leberregeneration anhand des Modells der partiellen Leberresektion erforscht. Dazu wurde WT- und Bid^{-/-}-Mäusen operativ 2/3 ihrer Leber entfernt. Im Folgenden wurden die operierten Mäuse während ihrer Regeneration zu definierten Zeitpunkten euthanasiert und Lebergewebeproben wurden zur Analyse entnommen. Zur Detektion proliferierender Zellen bekamen alle Tiere 2 h vor den entsprechenden Probenahme-Zeitpunkten BrdU i.p. verabreicht (s. 3.1.4).

Zunächst wurden mittels Western Blot die Bid-Expressionslevel der einzelnen Mausgruppen analysiert. Entsprechend ihrem Gen-Hintergrund zeigten Bid^{-/-}-Mäuse kein detektierbares Signal. Hingegen war bei den teilresektierten WT-Mäusen eine sukzessive Reduktion der Bid-Proteinlevel mit zunehmender Regenerationszeit nach Operation auffällig (s. Abbildung 28).

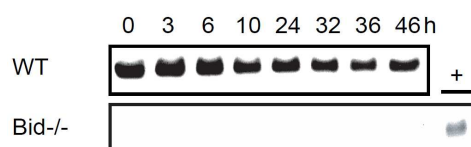


Abbildung 28: Western Blot-Analyse der Bid-Expression in Lebergewebehomogenaten von WT- und Bid^{-/-}-Mäusen nach 2/3-Leberteileresektion

Die Bid-Expression wurde in WT- und Bid^{-/-}-Proben zu verschiedenen Regenerationszeiten nach partieller Leberresektion überprüft. Während die Bid^{-/-}-Mäuse gemäß ihres Genotyps kein detektierbares Bid-Protein aufwiesen (die Positivkontrolle (+) bestätigte den Bid-Nachweis), verringerte sich die Bid-Expression in den teilresektierten WT-Mäusen, je länger ihre Regenerationsphase nach Operation war.

Eine Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte anhand H&E-gefärbter histologischer Präparate im 200fach vergrößerten mikroskopischen Bild. Dies ließ erkennen, dass die Anzahl der Zellen pro Sichtfeld sowohl für die WT-Mäuse als auch für Bid^{-/-}-Tiere umso weniger wurde, je mehr Zeit nach partieller Leberresektion vergangen war (s. Abbildung 29). Nach 36 bis 37 h fiel jedoch ein kurzfristiger Peak im Verlauf der sonst kontinuierlich fallenden Zellzahl auf.

Überdies wurden proliferativ aktive Zellen anhand der Proliferationsmarker BrdU bzw. Ki67 im histologischen Lebergewebepräparat kenntlich gemacht. Dies offenbarte ein Maximum an positiven proliferierenden Zellen 37 h nach 2/3-Leberteileresektion (s. Abbildung 30). Eine erhöhte Zahl BrdU- und Ki67-positiver Zellen war ferner zwischen 37 und 48 h festzustellen, während sich diese nach 72 h deutlich reduzierten. Zu den frühen Zeitpunkten, bis zu einer Regenerationszeit von 24 h, konnten keine proliferierenden Zellen im Lebergewebe nachgewiesen werden und eine erste Induktion der Proliferation war erst 32 h nach Leberteileresektion detektierbar (s. Abbildung 30). Es folgte neben dem qualitativen Nachweis proliferierender Zellen zudem eine quantitative Bestimmung durch Auszählung der BrdU- bzw. Ki67-positiven Zellen pro Sichtfeld (s. Abbildung 31 bzw. Abbildung 32). Dies bestätigt, dass ein Maximum proliferierender Zellen bei einer Regenerationszeit von 37 h existiert, wie es schon anhand der qualitativen histologischen Bilder aufgezeigt wurde. Stellt man diesen Peak des Proliferationsmarker-Nachweises dem Höchstpunkt der zuvor ausgezählten Gesamtzellzahl pro

Sichtfeld gegenüber (s. Abbildung 29), ergibt sich damit ein Höhepunkt der Geweberegeneration durch proliferativ aktive Zellen zu einem Zeitpunkt von ca. 37 h nach initialer Leberteilektomie.

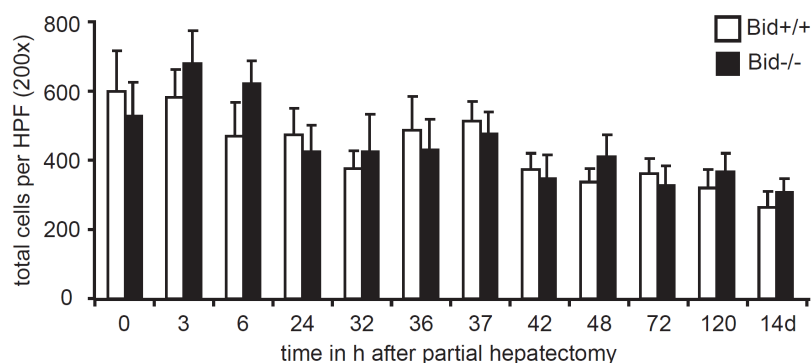


Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der Gesamtzellzahl pro Sichtfeld in Lebergewebshistologien von WT- und Bid^{-/-}-Proben nach partieller Leberteilektomie

Nach 2/3-Leberteilektomie wurde die Gesamtzellzahl pro Sichtfeld bei 200facher Vergrößerung der Gewebshistologien unter dem Mikroskop gezählt. Die Ergebnisse wurden im direkten Vergleich zwischen WT- und Bid^{-/-}-Mäusen graphisch dargestellt. Die Messung bezog sich auf Zeitpunkte zwischen 0 und 120 h bzw. 14 d. Während sich die Anzahl der Zellen zwischen WT- (Bid^{+/+}) und Bid^{-/-}-Tieren nicht signifikant unterschied, sah man im zeitlichen Verlauf eine fortschreitende Abnahme der Gesamtzellzahl pro Gewebesichtfeld. Auffallend ist ein zwischenzeitlicher Anstieg der Zellzahl bei Proben mit einer Regenerationszeit von 36 h und 37 h nach Operation.

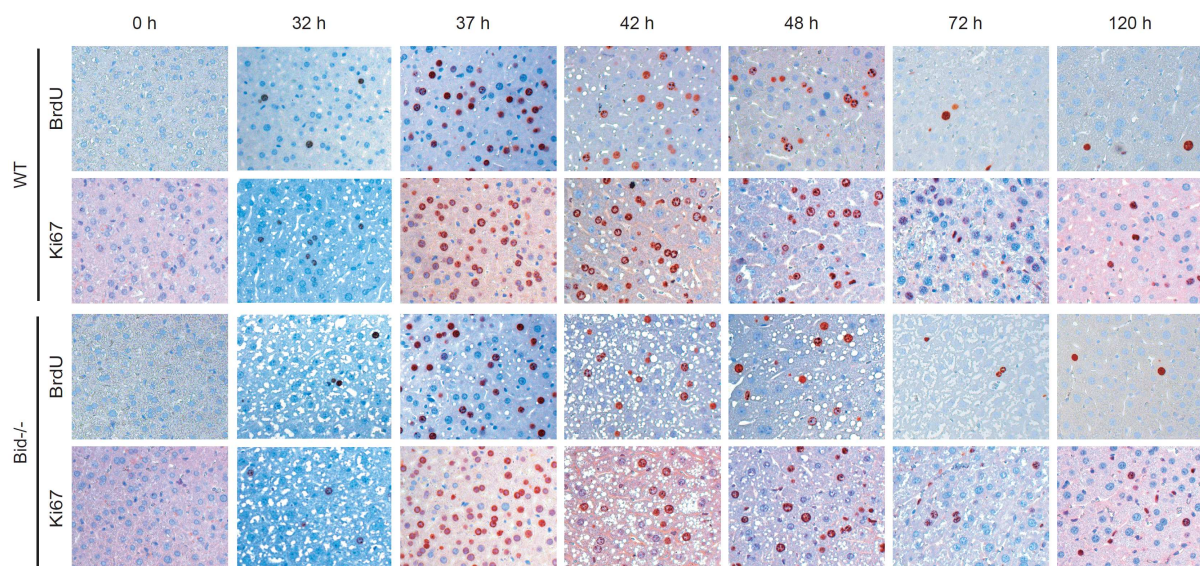


Abbildung 30: Histologische Untersuchungen von BrdU- und Ki67-gefärbten Leberpräparaten nach partieller Leberresektion an WT- und Bid^{-/-}-Mäusen

WT- und Bid^{-/-}-Gewebeproben wurden zu definierten Zeitpunkten nach 2/3-Leberteilektomie gesammelt, in Paraffinblöcke eingebettet und mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU bzw. Ki67 inkubiert. BrdU (100 µg/g), das als Thymidin-Analogon in neu synthetisierte DNA eingebaut wird, wurde den Tieren 2 h vor Euthanasie und Probengewinnung verabreicht. Beide Proliferationsmarker, sowohl BrdU als auch Ki67, präsentierten ein

vergleichbares Gesamtbild proliferativ aktiver Zellen über den zeitlichen Verlauf der Regeneration nach Leberteilektomie. Des Weiteren ließ sich kein Unterschied in der Anzahl proliferierender Zellen zwischen WT- und Bid^{-/-}-Präparaten feststellen. Für beide Mausgruppen konnte ein Maximum an BrdU- bzw. Ki67-positiven Zellen nach 37 h detektiert werden.

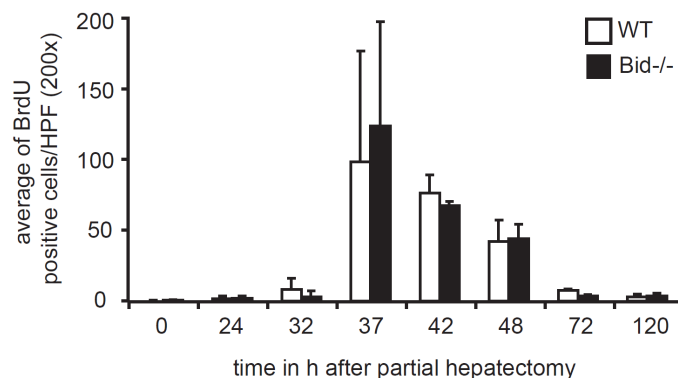


Abbildung 31: Quantitative Auswertung BrdU-positiver Zellen in WT- und Bid^{-/-}-Gewebepräparaten nach partieller Leberresektion

Die immunhistochemischen BrdU-Färbungen der Lebergewebepräparate definierter Regenerationszeiten nach Leberteilektomie wurden pro Sichtfeld bei einer 200fachen Vergrößerung im Mikroskop für WT- und Bid^{-/-}-Tiere ausgezählt und gegen die Zeit aufgetragen. WT- und Bid^{-/-}-Proben zeigten im Vergleich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl positiver Zellen. Ein deutliches Maximum an proliferativ aktiven Zellen wurde zum Zeitpunkt 37 h nach partieller Leberresektion nachgewiesen.

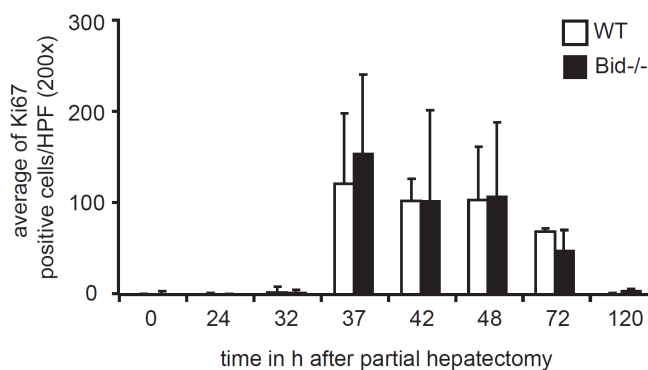


Abbildung 32: Quantitative Auswertung Ki67-positiver Zellen in WT- und Bid^{-/-}-Gewebepräparaten nach partieller Leberresektion

Die immunhistochemischen Ki67-Färbungen der Lebergewebepräparate definierter Regenerationszeiten nach Leberteilektomie wurden pro Sichtfeld bei einer 200fachen Vergrößerung im Mikroskop für WT- und Bid^{-/-}-Tiere ausgezählt und gegen die Zeit aufgetragen. WT- und Bid^{-/-}-Proben zeigten im Vergleich keine signifikanten Unterschiede der Anzahl Ki67-positiver Zellen. Ein Maximum an proliferativ aktiven Zellen wurde zum Zeitpunkt 37 h nach partieller Leberresektion nachgewiesen.

Im Zusammenhang mit den erlangten Erkenntnissen durch den Nachweis proliferierender Zellen im regenerierenden Gewebe nach partieller Leberresektion wurde im Folgenden die Expression verschiedener für die Zellzykluskontrolle essentielle Proteine wie Stat-3 (engl.: **s**ignal **t**ransducer and **a**ctivator of **t**ranscription **3**), p-Stat-3, c-Jun, PCNA (engl.: **p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) sowie Cyclin A, B, E und D1 mittels Western Blot (s. Abbildung 33) analysiert. Gesamtzelllysate

aus Lebergewebeproben, die WT- und Bid^{-/-}-Mäusen zu definierten Regenerationszeiten entnommen wurden, wurden nacheinander aufgetragen. Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen fielen keine Unterschiede der Proteinexpressionslevel bei Vergleich von WT- mit Bid^{-/-}-Tieren auf. So erfuhr der Transkriptionsfaktor c-Jun eine frühe Induktion bereits 3 h nach der Leberresektion. Ebenso wurde die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat-3 zwischen 3 h und 10 h stimuliert. Darauf folgte die Aktivierung des vornehmlich für die G1 Zellzyklusphase relevanten Cyclins D1 nach 24 h Regenerationszeit. Auch Cyclin E, das im Komplex mit CDK2 den Übergang von G1 in die S-Phase reguliert, wurde in den Bid^{-/-}-Mäusen nach 24 h verstärkt exprimiert. Dies war allerdings in den WT-Tieren nicht so deutlich zu erkennen. Schließlich wurde darüber hinaus 36 h bis 46 h nach Leberteilresektion Cyclin A als G2-Phase-assoziiertes Cyclin sowohl in WT- (Bid^{+/+}) als auch Bid^{-/-}-Mäusen induziert (s. Abbildung 33). Ebenfalls in diesem späten Stadium zeigte das an der DNA-Replikation beteiligte Protein PCNA eine erhöhte Expression in beiden Mausgruppen. Zusammenfassend bestätigte die sukzessive Stimulation verschiedener Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-assoziiierter Proteine eine Induktion der Proliferation und Geweberegeneration infolge der partiellen Leberteilresektion. Jedoch konnte kein Effekt des Bid-Proteins auf die proliferative Kapazität von Hepatozyten in gesunden Mäusen manifestiert werden.

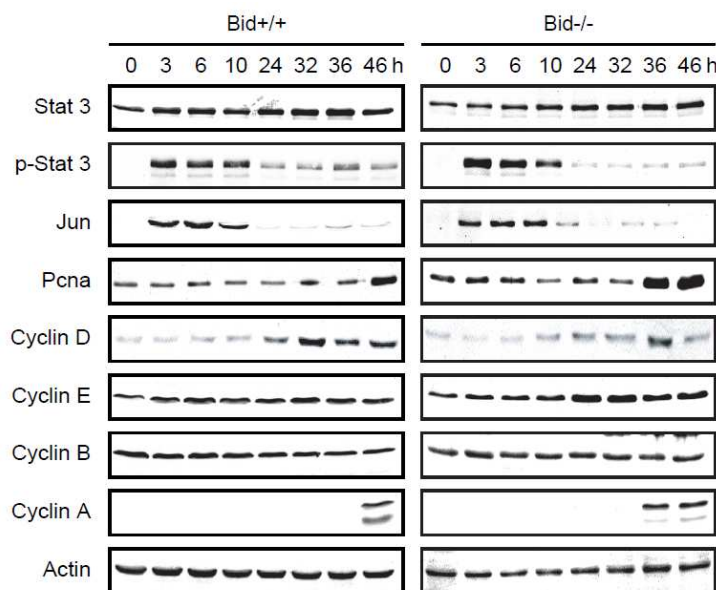


Abbildung 33: Western Blot-Analysen zellzyklusassoziierter Proteine in Gesamtzelllysaten von WT- und Bid^{-/-}-Leberproben zu definierten Zeitpunkten nach 2/3-Leberteilresektion

Expressionslevel verschiedener Proliferations-assoziiierter Proteine wurden in Gesamtzelllysaten von WT- (Bid^{+/+}) und Bid^{-/-}-Gewebeproben mittels Westernblotverfahren nach 2/3-Leberteilresektion untersucht. Die Gewebeproben wurden den Mäusen zu den angegebenen Regenerationszeitpunkten entnommen. Prinzipiell waren keine nennenswerten Unterschiede zwischen Bid^{-/-}- und WT-Tieren zu detektieren. Bereits 3-10 h nach Leberteilresektion konnte in beiden Mausgruppen eine Induktion der Transkriptionsfaktoren c-Jun (ca. 43/46 kDa) und phospho-Stat 3 (ca. 79/86 kDa) nachgewiesen werden. Dem folgte eine sukzessive Stimulation von Cyclin D1 (ca. 36 kDa), Cyclin E (ca. 50 kDa) und Cyclin A (ca. 60 kDa) sowie von PCNA (ca. 34 kDa). Actin diente als Ladungskontrolle.

4.3.2 Einfluss der Phosphorylierung von Bid auf die Proliferation von Hepatozyten

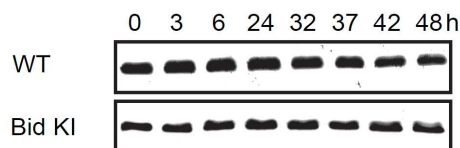


Abbildung 34: Western Blot-Analyse der Bid-Expression in Lebergewebehomogenaten von WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen nach 2/3-Leberteilektomie

Die Bid-Expression wurde in WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Proben (Bid KI) zu verschiedenen Regenerationszeiten nach partieller Leberresektion überprüft. Während Bid in Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen zeitlich unabhängig konstant exprimiert wurde, verringerten sich die Bid-Proteinlevel in den teilresektierten WT-Mäusen geringfügig, je länger ihre Regenerationsphase nach Operation war.

Parallel zu den Analysen der Bid^{-/-}-Mäuse wurde die Rolle der Phosphorylierung von Bid im Hinblick auf Leberregeneration und Hepatozyten-Proliferation untersucht. Während bereits gezeigt wurde, dass phosphoryliertes Bid im Rahmen von DNA-Schädigungen mit einem Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang assoziiert ist (Kamer et al., 2005, Zinkel et al., 2005), stellte sich die Frage, ob eine Nicht-Phosphorylierbarkeit von Bid in den Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen im Gegensatz dazu einen proliferationsfördernden Effekt haben könnte. Vergleichbar zu den in Kapitel 4.3.1 aufgeführten Experimenten wurden nicht-phosphorylierbare Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse einer partiellen Leberresektion unterzogen, um so die Teilung der Hepatozyten zur Gewebeerneuerung zu induzieren. Ebenfalls wurde zunächst der Bid-Expressionsstatus in den beiden Mausgruppen zu definierten postoperativen Regenerationszeitpunkten ermittelt (s. Abbildung 34). Diese Western Blot-Analysen demonstrierten, dass Bid sowohl in Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen als auch in WT-Tieren nahezu gleichbleibend, mit einer leichten Reduktion über die Zeit in den WT-Proben, exprimiert wurde.

Im Folgenden wurden die gewonnenen Leberproben auf Expression des Proliferationsmarkers Ki67 mittels immunhistologischer Färbung untersucht (s. Abbildung 35). Erste vereinzelte Ki67-positive und somit proliferativ aktive Zellen konnten ab einer Regenerationsphase von 37 h nach Operation detektiert werden. Diese nahmen sowohl in WT- als auch in Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen mit zunehmender post-operativer Erholungszeit zu und erreichten ein Maximum bei 48 h (s. Abbildung 35). Lebergewebe, das einer längeren Regenerationszeit ausgesetzt war (60 h bzw. 120 h), wies wiederum eine deutlich reduzierte Zahl sich teilender Zellen auf. Auch die quantitative Auswertung der Ki67-positiven Zellen in den Histologien bestätigte die meisten proliferierenden Zellen nach 48 h und keine signifikanten Unterschiede zwischen Bid^{S61A/S78A}KI- und den entsprechenden WT-Proben (s. Abbildung 36).

Stellt man diese Ergebnisse denen der Untersuchungen der Bid^{-/-}- und WT-Mäuse im C57Bl/6 Hintergrund (s. 4.3.1) gegenüber, fällt auf, dass der Proliferationspeak bei den Bid^{-/-}- und den entsprechenden WT-Tieren bereits nach 37 h nachgewiesen werden konnte, während sich

sowohl bei Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen als auch bei ihren WT-Wurfgeschwistern eine verzögerte Zellteilung mit einem Maximum nach 48 h detektieren ließ.

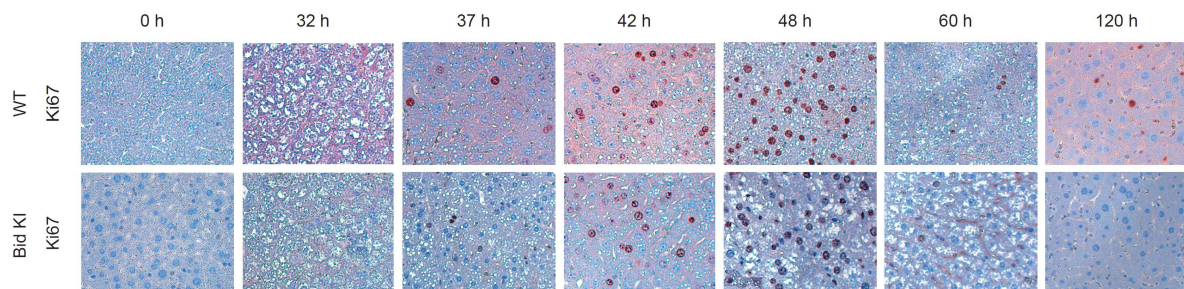


Abbildung 35: Histologische Untersuchung Ki67-gefärbter Leberpräparate nach partieller Leberresektion von WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen

WT- und Bid^{S61A/S78A}KI (Bid KI)-Gewebepräparate wurden zu definierten Zeitpunkten nach 2/3-Leberteilresektion gesammelt, in Paraffinblöcke eingegossen und mit einem spezifischen Antikörper gegen Ki67 inkubiert. Beim Vergleich der unterschiedlichen Regenerationszeitpunkte zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl Ki67-positiver proliferierender Zellen zwischen Bid^{S61A/S78A}KI- und den entsprechenden WT-Proben. Für beide Mausgruppen konnte ein Maximum an Ki67-positiven Zellen nach 48 h detektiert werden.

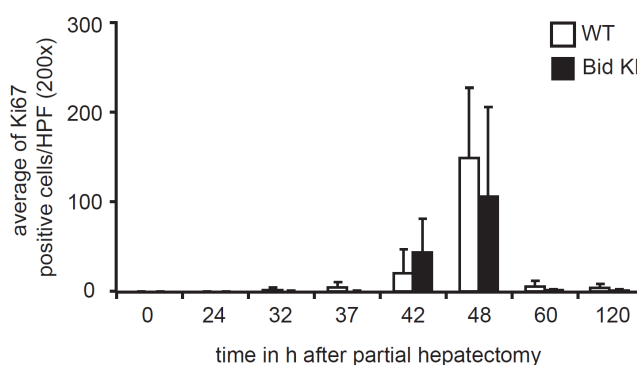


Abbildung 36: Quantitative Auswertung Ki67-positiver Zellen in WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Gewebepräparaten nach partieller Leberresektion

Die immunhistochemischen Ki67-Färbungen der Lebergewebepräparate definierter Regenerationszeiten nach Leberteilresektion wurden pro Sichtfeld bei einer 200fachen Vergrößerung im Mikroskop für WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse (Bid KI) ausgezählt und gegen die Zeit aufgetragen. Im direkten Vergleich der WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl Ki67-positiver Zellen. Ein Maximum an proliferativ aktiven Zellen wurde zum Zeitpunkt 48 h nach partieller Leberresektion nachgewiesen.

Entsprechend der Expressionsanalyse verschiedener proliferationsassoziiierter Proteine zur Ermittlung des Einflusses von Bid auf die Zellteilung (s. 4.3.1), wurden diese Proteine analog in nicht-phosphorylierbaren Bid^{S61A/S78A}KI-Mäusen und ihren entsprechenden WT-Kontrollen in Abhängigkeit von der Regenerationsphase nach Leberteilresektion untersucht (s. Abbildung 37). Auch in diesem Fall ergaben sich in Übereinstimmung mit den Ki67-Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen. Ferner bestätigte sich die schrittweise Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und Stat 3 sowie der für die

Zellzyklusprogression essentiellen Cycline (Cyclin D, E und A) und des PCNA, wie sie bereits in Bid^{-/-}- und zugehörigen WT-Tieren nachgewiesen werden konnte (s. 4.3.1). Demzufolge unterstrichen diese Resultate, dass auch der Phosphorylierungsstatus und die Aktivierung von Bid keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Hepatozyten in gesunden Mäusen hat.

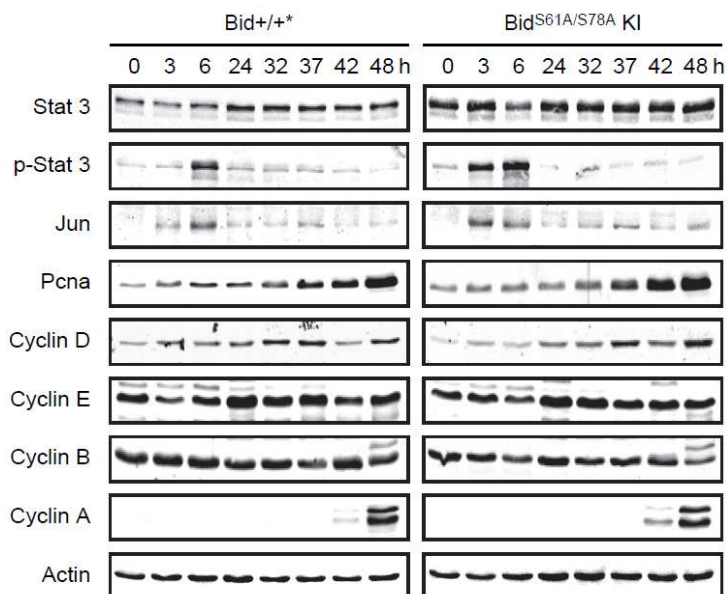


Abbildung 37: Western Blot-Analysen zellzyklusassoziierter Proteine in Gesamtzelllysaten von WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Leberproben zu definierten Regenerationszeitpunkten nach 2/3-Leberteileresektion

Expressionslevel verschiedener proliferationsassoziierter Proteine wurden in Gesamtzelllysaten von WT- und Bid^{S61A/S78A}KI-Gewebeproben mittels Westernblotverfahren nach 2/3-Leberteileresektion untersucht. Die Gewebeproben wurden den Mäusen zu den angegebenen Regenerationszeitpunkten entnommen. Im Allgemeinen waren keine nennenswerten Unterschiede zwischen Bid^{S61A/S78A}KI- und WT-Tieren zu detektieren. Als ein frühes Antwortsignal auf die Lebergewebsschädigung in beiden Mausgruppen fiel die Induktion der Transkriptionsfaktoren c-Jun (ca. 43/46 kDa) und phospho-Stat 3 (ca. 79/86 kDa) bereits nach 3-6 h auf. Dem folgten eine sukzessive Stimulation von Cyclin D (ca. 36 kDa), Cyclin E (ca. 50 kDa) und Cyclin A (ca. 60 kDa) sowie von PCNA (ca. 34 kDa). Actin diente als Ladungskontrolle.

5 Diskussion

5.1 Die Stärke des Fas-Liganden bestimmt, ob Hepatozyten als Typ I- oder Typ II-Zellen auf Apoptose reagieren

5.1.1 Bid-defiziente Mäuse sind vor Jo₂-Antikörper-induzierter Apoptose geschützt

Die Erforschung der Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose erlangte mit der Generierung und Isolation eines monoklonalen-anti-CD95/Fas-Antikörpers (Hybridomklon: Jo₂) neue Möglichkeiten. Dieser Antikörper ist in der Lage in Mäusen ein massives Leberversagen mit starker Hämorrhagie, deutlicher Karyopyknose und Kondensation des Cytoplasmas auszulösen (Ogasawara et al., 1993). Dabei ist die Karyopyknose und Kondensation des Cytoplasmas ein eindeutiges Merkmal für die Apoptose der betroffenen Zellen (Kroemer et al., 2009). Überdies reagieren insbesondere Hepatozyten der Leber im Kontrast zu anderen Organen und Geweben hoch sensitiv auf diese Antikörper-induzierte Apoptose und stellen ideale Studienobjekte zur Erforschung des apoptotischen Zelltods dar (Ogasawara et al., 1993).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden WT-Mäuse im C57Bl/6-Hintergrund mit einer Dosis von 0,5µg/g Jo₂ injiziert. Die so behandelten Mäuse erlagen der angegebenen Dosis Jo₂ innerhalb von 6 h durch massives Leberversagen. Histologische Analysen entnommener Lebern kritisch kranker Tiere wiesen eine massive Hämorrhagie sowie eine deutlich erhöhte Zahl DNA-geschädigter und somit TUNEL-positiv gefärbter Zellen auf.

Die durch eine intensive dunkelrote bis schwarze Färbung der Leber nachgewiesene Hämorrhagie ist vermutlich die Folge der starken Apoptose parenchymaler und nicht-parenchymaler Zellen, welche einen Strukturverlust des Lebergewebes bedingt. Infolge dieses Gewebsstrukturverlusts kommt es zur Zerstörung des Gefäßendothels und einer damit einhergehenden Einblutung in die Leber. Ähnliche phänotypische Eigenschaften des Lebergewebes wurden auch von Ogasawara et al. nach Jo₂-Behandlung charakterisiert (Ogasawara et al., 1993).

Die proteolytische Aktivität von Caspasen ist essentiell für die intrazelluläre Signaltransduktion der apoptotischen Reaktion (Lavrik et al., 2005). Auch nach Jo₂-Behandlung der WT-Mäuse wurde eine erhöhte Aktivität sowohl für die Initiator-Caspasen-8 und -9 als auch für die Effektor-Caspase-3 detektiert. Im Kontrast dazu zeigten Bid-defiziente Mäuse in demselben genetischen Hintergrund keine Reaktion auf die für WT-Mäuse tödliche Dosis des Jo₂-Antikörpers. Die Untersuchungen der histologischen Präparate dieser Tiere, welche im Vergleich zu den WT-Mäusen ebenfalls nach 6 h entnommen wurden, ließen keine Anzeichen der Apoptose oder sonstige Veränderungen des Gewebes erkennen, und messbare Caspase-Aktivitäten blieben aus. Auch eine bis zu 10-fach höhere Konzentration des Jo₂-Antikörpers vermochte nicht die Apoptose in Bid^{-/-}-Mäusen zu induzieren. Lediglich eine geringe Caspase-8-Aktivität und einzelne TUNEL-positive Zellen konnten nach Gabe dieser hohen Dosis Jo₂ beobachtet werden.

Ähnliche Daten wurden bereits in der Literatur beschrieben und resultierten schließlich in einer Klassifizierung von Hepatozyten als Typ II-Zellen (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Yin et al., 1999). Basierend auf der intrazellulären Signalkaskade, die im Rahmen der Apoptose induziert wird, werden Typ I-Zellen, bei denen die aktive Initiator-Caspase-8 direkt die Effektor-Caspase-3 aktivieren kann, von Typ II-Zellen unterschieden, bei denen hingegen der mitochondriale Signalweg, vermittelt über Bid, zur Verstärkung des apoptotischen Triggers benötigt wird (Li et al., 1998, Gross et al., 1999, Saelens et al., 2004). Fehlt Bid nun als eines der Schlüsselproteine dieses intrinsischen Amplifikations-Mechanismus, gelingt es nicht mittels Jo_2 die Apoptose über den Fas-Rezeptor zu induzieren. Die schwach erhöhte Caspase-8-Aktivität, die sich nach Behandlung mit der 10-fach höheren Dosis Jo_2 in den Bid-defizienten Mäusen detektieren ließ, könnte in einer geringfügigen Stimulation der Initiator-Caspase am DISC begründet sein, die jedoch nicht ausreicht, um direkt genügend Caspase-3 zu aktivieren und die Apoptose zu induzieren.

Während Bid in Hinsicht auf die mitochondriale Apoptose-Induktion ein entscheidender Faktor ist, kommt jedoch auch weiteren Proteinen des pro- und anti-apoptotischen Netzwerks eine essentielle Rolle im Rahmen dieses Signal-Transduktions-Mechanismus zu (Yin et al., 1999, Kaufmann et al., 2009). So bewirkt die Inhibition der pro-apoptotischen BH1-3-Proteine Bax und Bak eine zur Bid-Defizienz vergleichbare Apoptose-Resistenz in der Leber (Wei et al., 2001). Eine Überexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 bzw. Bcl-x_L schützt ebenfalls vor Jo_2 -induzierter Apoptose in Hepatozyten (Lacronique et al., 1996, de la Coste et al., 1999). Da Bid-defiziente Hepatozyten selbst nach einer hohen Konzentration des Jo_2 -Antikörpers nicht sterben und eine Reihe Bcl-2-ähnlicher Proteine einen deutlichen Effekt auf die Apoptose-Anfälligkeit dieser Zellen aufweisen, wurden Hepatozyten als Typ II-Zellen eingestuft. Gemäß dieser Klassifizierung sind Hepatozyten somit streng abhängig von der mitochondrialen Amplifikations-Signalkaskade, um den programmierten Zelltod auszulösen (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Yin et al., 1999).

5.1.2 MegaFasL induziert Apoptose in Bid-defizienten Mäusen

Nun stellte sich jedoch die Frage, ob der monoklonale anti-CD95/Fas-Antikörper Jo_2 die physiologische Situation der Apoptose-Induktion tatsächlich widerspiegelt. Es wurde gezeigt, dass eine schwache Ligandenbindung lediglich eine einfache Trimerisierung bzw. unvollständige Aggregation des Fas-Rezeptors auslöst und dass nachfolgend eine um ein Vielfaches verringerte Apoptose-Reaktion induziert wird als nach Assoziation von Membran-gebundenem FasL (Schneider et al., 1998).

Um die Wirkung eines stärkeren Liganden sowie die Relevanz von Bid und damit des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs in Hepatozyten näher zu untersuchen, wurde eine hexamere Form des sFasL eingesetzt, die als MegaFas-Ligand (MegaFasL) bezeichnet wird. MegaFasL stellt dabei ein Konstrukt dar, welches aus der Fusion des trimeren FasL mit der

Kollagendomäne des ACRp30/Adiponektin synthetisiert wurde (Holler et al., 2003, Greaney et al., 2006).

Die Behandlung von WT-Mäuse mit einer niedrigen Dosis des MegaFasL (engl.: **low dose**, LD, 0,05 µg/g) induzierte einen fulminanten Leberschaden und die Mäuse starben innerhalb kürzester Zeit. Doch auch MegaFasL konnte in dieser Konzentration keine apoptotische Reaktion in den Bid^{-/-}-Mäuse stimulieren, und die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen nach Jo₂-Gabe. Wurde die Dosis des Proteins allerdings nicht einmal um das Doppelte (engl.: **high dose**, HD, 0,08 µg/g) erhöht, wurde auch bei den Bid-defizienten Mäusen eine mit den WT-Tieren vergleichbare massive Leberschädigung ausgelöst. Die histologischen Analysen dieser Befunde präsentierten dabei sowohl in den WT- als auch in den Bid^{-/-}-Mäusen eine deutliche Hämorrhagie und zahlreiche TUNEL-positive Zellen. Somit vermochte eine leicht erhöhte Dosis des MegaFasL tatsächlich in beiden Mausgruppen, unabhängig von Bid und dem mitochondrialen Signalweg, eine hepatozelluläre Apoptose auszulösen.

Entsprechend den phänotypischen Anzeichen einer Apoptose ließen sich in WT-Tieren signifikant erhöhte Aktivitäten von Caspase-8, -9 und -3 nachweisen, wohingegen in Bid^{-/-}-Mäusen nach LD MegaFasL-Behandlung keine Aktivierung der Caspasen messbar war. Die Injektion von HD MegaFasL erzeugte allerdings in Bid^{-/-}-Mäusen eine mit WT-Tieren vergleichbare Aktivität der Initiator-Caspase-8, und auch Caspase-3 demonstrierte eine leicht erhöhte Proteaseaktivität. Während Caspase-8 dem Bid-Protein vorgeschaltet und somit unabhängig von dessen Expressionsstatus ist, wird Caspase-3 in Typ II-Zellen erst nach Formierung des Apoptosoms und Aktivierung von Caspase-9 stimuliert. Dies bedeutet jedoch, dass die Caspase-3-Aktivität in Hepatozyten abhängig von Bid und dem mitochondrialen Apoptose-Signalweg sein sollte. In Bid-defizienten Mäusen kann eine erhöhte Caspase-3-Aktivität allerdings nur direkt von Caspase-8 induziert werden. Dies wäre jedoch kontrovers zu der strikten Einordnung der Hepatozyten als Typ II-Zellen.

Einer Erläuterung bedarf zudem die Detektion von Caspase-9-Aktivitäten in Bid^{-/-}-Mäusen nach HD MegaFasL, denn eine Induktion von Caspase-9 erfordert zunächst die Formierung des Apoptosoms, die jedoch eng mit dem mitochondrialen Signalweg und dementsprechend mit Bid assoziiert ist. Vergleicht man darüber hinaus die Proteaseaktivitäten in WT-Tieren, fällt auf, dass schon eine geringe Caspase-9-Aktivität signifikante Caspase-3-Level zur Folge hatte. Vielmehr begründet sich die anscheinende Detektion der Caspase-9-Aktivität in einem unspezifischen Substrat, das für diesen *in vitro* Assay verwendet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass einzelne Caspasen überlappende Substratspezifitäten aufweisen und insbesondere das vermeintliche Caspase-9-Substrat LEHD sowohl von Caspase-8 als auch Caspase-3 geschnitten werden kann (McStay et al., 2008). Demzufolge kann die gemessene Aktivität von Caspase-9 als unspezifisch angesehen werden, und die direkte Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-8 rückt in den Vordergrund.

Um nun eine Aktivierung der MegaFasL-induzierten Apoptose ohne den mitochondrialen Signalweg weiter zu belegen, wurde die Expression verschiedener in die Apoptose-Signalkaskade involvierter Proteine in WT- und Bid^{-/-}-Mäusen verglichen. Totalproteinanalysen des Fas-

Rezeptors, der die Apoptose beeinflussenden cFlips, der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteine Bcl-x_L und Mcl-1 sowie des pro-apoptotischen Bax und des Apoptose-Inhibitors cIAP-1 zeigten jedoch keine Expressionsunterschiede zwischen WT- und Bid-defizienten Tieren. Wurden die Proteine hingegen in mitochondriale und cytosolische Fraktionen unterteilt, konnte in den WT-Tieren eine signifikante Akkumulation von Bax am Mitochondrium in Folge der MegaFasL-Behandlung detektiert werden. Im Cytosol der WT-Zellen wurde zudem ein Anstieg von Cytochrom C sowie auch Smac/Diablo nachgewiesen. Diese Beobachtungen sind konform zur Aktivierung des intrinsischen Verstärkungsmechanismus, wobei aktiviertes tBid zu einer Oligomerisierung von Bax am Mitochondrium führt. Dies wiederum ermöglicht infolge struktureller Veränderungen der Mitochondrienmembran die Freisetzung von Cytochrom C und Smac/Diablo ins Cytosol der Zelle (Korsmeyer et al., 2000, Wei et al., 2000).

Im Gegensatz dazu konnte in Proben von Bid^{-/-}-Tieren, unabhängig von der MegaFasL-Behandlung, weder Bax am Mitochondrium noch Cytochrom C oder Smac/Diablo im Cytosol nachgewiesen werden, was eine fehlende Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs in Bid-defizienten Mäusen bestätigte.

Des Weiteren belegten die Expressionsanalysen von Caspase-8 und -3 die Ergebnisse der entsprechenden Aktivitätsassays, und sowohl in WT-Tieren als auch in Bid^{-/-}-Mäusen wurde die Aktivierung anhand geschnittener Fragmente der beiden Caspasen nachgewiesen.

In vitro Experimente haben bereits gezeigt, dass Maus-Hepatozyten nach FasL-Stimulation eine Typ I-Apoptose entwickeln und dabei unabhängig von Bid-Spaltung bzw. Bax/Bak-Aktivierung und Cytochrom C-Freisetzung eine deutliche Effektor-Caspase-3-Aktivität demonstrieren. Auch eine Bcl-2-Überexpression hatte in diesem Zusammenhang keinen Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität der Zellen, was eine Involvierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs ausschließt. Somit können Hepatozyten *in vitro* sowohl Typ I- als auch Typ II-Apoptose entwickeln (Walter et al., 2008). Darüber hinaus konnte nun auch *in vivo* die Fähigkeit von Maus-Hepatozyten, die Apoptose auf direktem Weg auszulösen, bestätigt werden. Die MegaFasL-Behandlung Bid-defizienter Tiere induzierte dabei, entsprechend der publizierten *in vitro*-Daten, eine typische Typ-I-Apoptose. Somit reagieren Hepatozyten nicht exklusiv als Typ II-Zellen, wie es die Jo₂-Experimente suggerierten, sondern die Art des intrazellulären Apoptose-Signalwegs wird vielmehr von der Stärke des initialen Apoptose-Stimulus am Rezeptor bestimmt (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Yin et al., 1999).

5.1.3 Die MegaFasL-induzierte Apoptose ist spezifisch abhängig vom Fas-Rezeptor und wird von Caspasen vermittelt

Apoptose kann die Folge diverser externer und interner Ursachen sein und dabei neben dem Fas-Rezeptor prinzipiell auch von einer Reihe anderer Todesrezeptoren aktiviert werden (Jin and El-Deiry, 2005).

Um zu gewährleisten, dass die durch MegaFasL aktivierte Apoptose tatsächlich ausschließlich durch den Fas-Rezeptor vermittelt wird, wurden Proben von Fas-Rezeptor-defizienten und mit

LD und HD MegaFasL behandelten *lpr*-Mäusen (B6.MRL-*Tnfrsf6^{lpr}*/J) analysiert. Dabei zeigte sich eine völlige Repression der Apoptose unabhängig von der injizierten MegaFasL-Dosis. In WT-Tieren, denen eine entsprechende MegaFasL-Menge verabreicht wurde, wurde im Vergleich dazu eine starke apoptotische Reaktion mit signifikanten Effektor-Caspase-3-Aktivitäten und zahlreichen TUNEL-positiven Zellen detektiert. Diese Merkmale blieben in den *lpr*-Mäusen hingegen vollständig aus.

Die Relevanz der eng mit der Fas-Rezeptor-Aktivierung assoziierten Caspase-Stimulation im Rahmen der MegaFasL-induzierten Apoptose wurde mittels Injektion eines Pan-Caspase-Inhibitors (Z-VD-fmk) getestet (Jaeschke et al., 2000). Der Inhibitor wurde kurz vor der Behandlung der Mäuse mit LD oder HD MegaFasL injiziert und konnte die apoptotische Antwort unabhängig von der verabreichten MegaFasL-Dosis nahezu vollständig unterdrücken.

Somit zeigen diese Resultate, dass die durch MegaFasL-induzierte Apoptose spezifisch vom Fas-Rezeptor vermittelt wird und abhängig von der Caspase-Aktivität ist. Dies schließt einen alternativen Mechanismus, der aufgrund der Injektion des MegaFasL-Proteins zum Zelltod und Gewebeuntergang in der Leber führen kann, aus.

5.1.4 Bid hat keinen Einfluss auf die TNF-Rezeptor vermittelte Apoptose

Neben der Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose kann der Zelltod auch über andere Rezeptoren, wie den TNF-Rezeptor (TNF-R), ausgelöst werden (Leist et al., 1994). Der initiale Mechanismus zur Induktion der Apoptose über TNF-R1 ist, bis auf die zusätzlich benötigte Rekrutierung der TRADD zur Bildung des DISC, vergleichbar mit Fas (Chinnaiyan et al., 1996, Kischkel et al., 2000).

Die Aktivierung des TNF-R1 kann durch die simultane Gabe von LPS (**L**ipopolisaccharid) und GalN (**G**alactosamin) ausgelöst werden (Galanos et al., 1979, Hishinuma et al., 1990). LPS stimuliert die Produktion von TNF- α , dem TNF-R1-Liganden, durch Makrophagen, während GalN als leberspezifischer Transkriptioninhibitor fungiert und insbesondere die Überlebensfunktion des NF κ B-Signalwegs blockiert (Iimuro et al., 1998, Kaufmann et al., 2009). Aktivitätsassays und histologische Untersuchungen ließen keinen Unterschied zwischen WT- und Bid^{-/-}-Mäusen erkennen und demonstrierten, dass die Bid-Defizienz keinen Einfluss auf die TNF-R1-vermittelte Apoptose hat.

Somit ist der mitochondriale Apoptose-Signalweg bei Apoptose-Stimulation durch einen starken Trigger in Form von LPS/GalN bzw. TNF- α ebenso wie bei MegaFasL nicht essentiell für eine apoptotische Reaktion und den Tod der Hepatozyten.

5.2 Bid ist entscheidend für die Sensitivität gegenüber Apoptose

5.2.1 Die Apoptose-Sensitivität gegenüber Fas-Triggerern in Apoptose-Resistenz-Modellen wird durch Bid erhöht

Wird die Leber auf operativem oder chemisch-induziertem Weg geschädigt, wird innerhalb kürzester Zeit eine massive proliferative und regenerative Antwort der Hepatozyten initiiert. Dabei kommt es zur Ausschüttung einer Vielzahl von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und anabolen Hormonen, wobei eine große Zahl regenerationsassoziiertes Signalwege aktiviert wird (Michalopoulos, 2007). In Verbindung mit der regenerativen Antwort auf chronische oder akute Leberschädigungen tritt in vielen Fällen zudem eine Resistenz gegenüber Fas-Antikörper-induzierter Apoptose auf (Desbarats and Newell, 2000, Eichhorst et al., 2004, Osawa et al., 2005, Vogel et al., 2006). Die genauen Mechanismen, die dieser Resistenz zu Grunde liegen, sind bisher jedoch nicht vollständig geklärt.

Zur Untersuchung der Regenerationsprozesse sowie der Induktion der Apoptose-Resistenz macht man sich verschiedene *in vivo* Modelle zur Lebergewebsschädigung wie die partielle Leberresektion, die Gallengangsligatur oder die Gabe von Suramin zu Nutze (Desbarats and Newell, 2000, Eichhorst et al., 2004, Vogel et al., 2006). Es konnte in allen drei Modellen bestätigt werden, dass WT-Tiere, die jeweils einer dieser Vorbehandlungen unterzogen wurden, keine Sensitivität gegenüber Jo_2 -aktivierter Apoptose aufwiesen. Wurde der Apoptose-Stimulus hingegen durch das hexamere Protein MegaFasL induziert, wurde trotz Leberteilresektion und Suramin-Behandlung die Apoptose-Resistenz überwunden.

Lebergewebe besitzt die besondere Fähigkeit sich selbst in Folge von Schädigung schnell zu regenerieren. Während sich im normalen Gewebe mehr als 90 % der Hepatozyten im G_0/G_1 -Stadium des Zellzyklus befinden, treten nach partieller Leberteilresektion mehr als 70 % der Zellen in den Zellzyklus ein (Desbarats and Newell, 2000). So wird das gesamte Lebergewebe z.B. in der Maus innerhalb von 5-7 Tagen wiederhergestellt (Michalopoulos, 2007, Mitchell and Willenbring, 2008). Obwohl die genauen Mechanismen, die die Erneuerung des Gewebes und eine Progression des Zellzyklus steuern, nicht bekannt sind, gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Induktion der Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie insbesondere HGF (engl.: **h**epatocyte **g**rowth **f**actor) oder EGF (engl.: **e**pidermal **g**rowth **f**actor), durch die Hepatozyten (Skov Olsen et al., 1988, Lindroos et al., 1991, Michalopoulos, 2007). Diese unmittelbare Antwort auf eine Leberschädigung führt wiederum zur Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren MET/HGFR (engl.: N-**M**ethyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine HOS **T**ransforming gene/**h**epatocyte **g**rowth **f**actor **r**eceptor) bzw. EGFR (engl.: **e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor) und resultiert schließlich in einer Stimulation diverser proliferations-assoziiertes Proteine (Michalopoulos, 2010). Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit belegt werden (s. Abbildung 33 und Abbildung 37). So kam es nach partieller Leberresektion zu einem sehr schnellen Anstieg der Transkriptionsfaktoren c-Jun und Stat-3. Darauf folgte die sukzessive Aktivierung der Cycline D, E und A sowie des an der DNA-Replikation beteiligten PCNA. Des Weiteren wiesen sowohl der Einbau von BrdU wie auch die Detektion von Ki67 eine Vielzahl proliferierender Hepatozyten nach. Diese verstärkte

Expression zellzyklus-assoziiierter Proteine wird zudem unterstützt durch die Aktivierung des PI3K (engl.: **p**hospho**i**nositide **3**-**k**inase)/Akt-Signalwegs nach Bindung von HGF an MET (Xiao et al., 2001). Der Ser/Thr-Kinase Akt fällt dabei eine Schlüsselrolle in der Förderung des Zellwachstums als auch in der Inhibition der Apoptose zu (Schulze-Bergkamen et al., 2004, Garcia et al., 2010). Die proliferationssteigernde Wirkung von PI3K und Akt wird vornehmlich durch den Transkriptionsfaktor NF κ B (engl.: **n**uclear **f**actor **k**appa-light-chain-enhancer of activated **B** cells) vermittelt. Durch Phosphorylierung des NF κ B-Inhibitors I κ B α (engl.: **i**nhibitor of NF κ **B** **a**lpha) wird dieser der Degradation übergeben, wodurch NF κ B freigesetzt und aktiviert wird. Dies bewirkt wiederum die Expression einer Reihe anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-x_L und Mcl-1 (Tzung et al., 1997, Schulze-Bergkamen et al., 2004). Eine transkriptionelle Herunterregulation erfahren hingegen pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder wie Bim und Puma infolge der Aktivierung der Akt-Kinase (Kops and Burgering, 1999). Neben der Stimulation intrazellulärer Signalkaskaden weist Akt darüber hinaus die Fähigkeit zur direkten Phosphorylierung und Suppression der pro-apoptotischen Proteine Bad und Bax sowie einer Inhibition der Spaltung und Aktivierung von Bid auf (Datta et al., 1997, Nesterov et al., 2001, Gardai et al., 2004). So ruft die Aktivierung von MET durch HGF infolge der Leberteilresektion nicht nur eine erhöhte Expression Zellzyklus- und Proliferations-assoziiierter Proteine hervor, sondern führt vielmehr zu einer direkten Inaktivierung essentieller Komponenten des intrinsischen Zelltodmechanismus. Erfolgt nun mittels Jo₂ eine Stimulation des Fas-Rezeptors in leberteilresektierten WT-Mäusen, ist die essentielle intrazelluläre Verstärkung des extrinsischen Signals möglicherweise gehemmt, und die Mechanismen, die Proliferation und Überleben fördern, dominieren die Reaktion der Hepatozyten.

Suramin, ein „zytotoxisches“ polysulfoniertes Naphthyl-Harnstoffderivat, ist ein farbloses Analogon des Azofarbstoffs Trypanblau. Es wurde 1916 von den Chemikern Oskar Dressel und Richard Kothe der Bayer AG aufgrund der Erkenntnis entwickelt, dass Trypanblau und Trypanrot trypanosomizide Eigenschaften aufwiesen (Dressel and Oesper, 1961, La Rocca et al., 1990). Suramin wird seit den frühen 1920ern gegen die Schlafkrankheit und auch gegen Onchozerkose (Flussblindheit) eingesetzt und wird zudem als Therapeutikum gegen HIV und Krebs erprobt (Hawking, 1978, La Rocca et al., 1990, Mitsuya et al., 1984).

Eichhorst et al. wiesen 2004 eine deutliche Hemmung der durch Jo₂ bzw. LPS/GalN vermittelten Apoptose in Leberzellen nach Suramin-Behandlung nach. Die Suramin-Gabe hatte dabei signifikant reduzierte Caspase-8, -9 und -3 Aktivitäten sowie eine Inhibition der Cytochrom C-Ausschüttung zur Folge. Der genaue Mechanismus der Apoptose-Hemmung durch Suramin ist bislang allerdings nicht bekannt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Bildung des DISC durch Suramin nicht beeinträchtigt wird (Eichhorst et al., 2004).

Als drittes Leberschädigungsmodell wurde das Verfahren der Gallengangsligatur angewandt, welches ein gängiges Verfahren darstellt, um eine chronische Leberschädigung in Form der Cholestase zu simulieren. Dabei kommt es zu einem Rückstau von Galle in die Leber sowie zur Akkumulation toxischer Gallensalze, die dann strukturelle Veränderungen, inflammatorische

Reaktionen und eine finale Hepatotoxizität verursachen (Saito and Maher, 2000, Canbay et al., 2003, Nalapareddy et al., 2009).

Nicht alle Gallensalze sind jedoch leberschädigend, einige können sogar das Überleben der Hepatozyten fördern. Während die hydrophoben Gallensalze TLCS (engl.: **tauro**litho**ch**olate-3-**s**ulfate) und GCDC (engl.: **glyco**cheno**deoxy**cholate) Apoptose induzieren (Benz et al., 2000, Graf et al., 2002), wirken TUDC (engl.: **tauro**ursodeoxi**ch**olate) und TCDC (engl.: **tauro**cheno**deoxy**cholate) im Kontrast dazu anti-apoptotisch (Rodrigues et al., 1998, Benz et al., 2000). GCDC ist z.B. in der Lage, Apoptose über einen Fas-Rezeptor-abhängigen aber FasL-unabhängigen Weg zu induzieren (Faubion et al., 1999). Infolge des durch die hydrophoben Gallensalze verursachten oxidativen Stresses im Lebergewebe wird die Phosphorylierung des EGFR getriggert und eine Assoziation von EGFR mit CD95/Fas ist nachweisbar (Yerushalmi et al., 2001, Reinehr et al., 2003). Durch die Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR wird CD95/Fas phosphoryliert, was wiederum eine FasL-unabhängige Bildung des DISC initiiert (Reinehr et al., 2003). Die anti-apoptotische Wirkung von TCDC beruht demgegenüber auf einer Aktivität von NF κ B und wird über den PI3K-Signalweg induziert. Dies ist zudem assoziiert mit einer Hemmung des DISC, einer verminderten Aktivierung von Caspase-8 sowie einer Inhibition der Translokation von Bid zum Mitochondrium (Rust et al., 2000, Rust et al., 2005, Takikawa et al., 2001). Die Hemmung des DISC kann in diesem Fall auch über eine NF κ B geförderte Aktivität von anti-apoptotischen IAPs, wie cIAP und XIAP eingeleitet werden (Stehlik et al., 1998, Wang et al., 1998). Auch Akt wird nach Gallengangsligatur im Zuge der aufkommenden Apoptose-Resistenz aktiviert (Osawa et al., 2005). Akt kann in diesem Zusammenhang durch Phosphorylierung z.B. die Suppression von Bad und Bax sowie die Inhibition der Spaltung von Bid einleiten (Datta et al., 1997, Nesterov et al., 2001, Gardai et al., 2004). Des Weiteren kommt es nach Gallengangsligatur auch zu einer *de novo* Bcl-2-Expression, die ebenfalls zur Apoptose-Resistenz beitragen kann (Kurosawa et al., 1997). Die Summe der in diesem Modell durch Gallensalz-Akkumulation induzierten anti-apoptotischen Signalmechanismen scheint dabei so stark zu überwiegen, dass die pro-apoptotischen Signale durch den schwachen Apoptose-Trigger Jo₂ in den Mäusen unterdrückt wurde.

Um nun die Rolle von Bid und des mitochondrialen Apoptose-Signalmechanismus im Rahmen der drei gegen Jo₂-resistenten Modelle weiter zu untersuchen, wurden vorbehandelte WT- und Bid^{-/-}-Tiere mit MegaFasL, als starkem Apoptose-Stimulus, behandelt. Tatsächlich war das hexamere Protein, im Gegensatz zu Jo₂, in der Lage Caspase-3 und eine apoptotische Reaktion, zumindest nach Leberteilresektion und Suramin-Behandlung, in WT-Mäusen zu induzieren. Lediglich gallenwegsligierte WT-Mäuse blieben auch nach MegaFasL-Behandlung resistent gegenüber dem Apoptose-Reiz. Wird allerdings zusätzlich aufgrund einer Bid-Defizienz der mitochondriale Signalmechanismus blockiert, gelingt es trotz MegaFasL als starkem Apoptose-Induktor nicht, genügend Effektor-Caspase-3 zu aktivieren. Die Bid-defizienten Mäuse widerstanden der Apoptose-Induktion durch MegaFasL somit in allen drei Resistenz-Modellen. Damit stellt Bid einen entscheidenden Faktor im Rahmen der Amplifikation des am Fas-Rezeptor generierten Apoptose-Signals eines gegebenenfalls zu schwachen Stimulus dar.

5.2.2 Die Sensitivität gegenüber Jo₂-induzierter Apoptose wird nicht vom Status der Phosphorylierung von Bid beeinflusst

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von Bid einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des Proteins hat. So wurde anhand von *in vitro* Experimenten gezeigt, dass die Phosphorylierung an S⁶¹ und S⁶⁴ des Bid-Proteins durch CK1 und CK2 zu einer Blockade der Caspase-8 Schnittstelle an D⁵⁹ führt und phosphoryliertes Bid somit nicht mehr von Caspase-8 aktiviert werden kann (Bossy-Wetzels and Green, 1999, Desagher et al., 2001, Degli Esposti et al., 2003). In einer Studie an gallengangsligierten bzw. Suramin-behandelten und somit Jo₂-resistenten Mäusen korreliert die Apoptose-Resistenz der Tiere mit erhöhten CK1-Proteinleveln sowie einem gesteigerten Phosphorylierungsgrad von Bid. Jedoch konnte keine signifikante Modulation der Apoptose-Induktion durch NF κ B, durch einige Hitzeschock-Proteine, cFlips, IAPs sowie durch Faktoren des mitochondrialen Signalwegs (Cytochrome C, Caspase-9 und Bfl-1/A1) und auch keine Aktivierung von Bax und Bid nachgewiesen werden (Vogel et al., 2006). Um ferner zu überprüfen, ob überdies der Phosphorylierungsgrad von Bid an S⁶¹ und S⁷⁸ die Sensitivität der Mäuse gegenüber Jo₂-induzierter Apoptose beeinflusst, wurden nun Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse verwendet. Hypothetisch sollten diese nicht-phosphorylierbaren Bid-Mutanten anfälliger auf eine Jo₂-Injektion reagieren.

Im Vergleich zu den Jo₂-behandelten WT-Mäusen zeigten die Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse jedoch keine signifikanten Unterschiede in ihrer Anfälligkeit für den Apoptose-Stimulus Jo₂. Sowohl ohne Vorbehandlung als auch nach Leberteilresektion, Gallengangsligatur bzw. Suramin-Gabe ließen sich keine Unterschiede zwischen Bid^{S61A/S78A}KI- und WT-Tieren detektieren. Damit bestätigten diese *in vivo* Ergebnisse bereits in der Literatur beschriebene *in vitro* Experimente (Kamer et al., 2005) und unterstrichen, dass die Phosphorylierung von Bid an S⁶¹ und S⁷⁸ keinen Effekt auf die Spaltung durch Caspase-8 im Rahmen der Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose hat. Hingegen kommt aber diesen beiden Phosphorylierungsstellen eine wichtige Rolle nach DNA-Schädigung zu. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Bid durch ATM und/oder ATR mit einem Zellzyklus-Arrest von Hepatozyten assoziiert ist, wobei starke, nicht reparierbare DNA-Schäden direkt Apoptose auslösen (Kamer et al., 2005).

5.3 Bid und die Phosphorylierung von Bid haben keinen Einfluss auf die Leberregeneration nach Leberteilresektion

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit haben verdeutlicht, dass die Stärke des Fas-Liganden darüber entscheidet, ob Hepatozyten als Typ I- oder Typ II-Zellen reagieren. Damit bedingt Bid zwar die Apoptose-Sensitivität einer Zelle, ist jedoch nicht essentiell, um in Hepatozyten Apoptose auszulösen. Bid ist demnach insbesondere für die Amplifikation schwacher Apoptosereize zuständig (Cory et al., 2003). Entgegengesetzt der Funktion im Rahmen der Apoptose, wurde zudem nachgewiesen, dass Bid einen Einfluss auf die Proliferation hat (Bai et al., 2005).

Lebergewebe besitzt eine enorme Fähigkeit sich selbst in Folge von Schädigungen zu erneuern (Desbarats and Newell, 2000). Die Leberteileresektion dient dabei als *in vivo*-Modell eines Proliferationsstimulus und der Leberregeneration (Michalopoulos, 2007, Mitchell and Willenbring, 2008). So wurde sowohl die Expression als auch der Phosphorylierungsstatus von Bid in Bezug auf die hepatozytäre Proliferation nach partieller Leberresektion untersucht. Sowohl in WT- als auch in Bid^{-/-}-Mäusen wurde ein Maximum proliferierender Zellen 37 h nach Leberteileresektion detektiert. Nicht-phosphorylierbare Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse sowie die entsprechenden WT-Wurfgeschwister präsentierten eine maximale Anzahl sich teilender Zellen nach 42 h. Dieser Unterschied der Proliferationspeaks lässt sich durch die verschiedenen genetischen Hintergründe der beiden Mausstämme begründen (Mitchell and Willenbring, 2008). Auffällig ist jedoch, dass sowohl Bid^{-/-} als auch Bid^{S61A/S78A}KI-Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu ihren WT-Kontrollen präsentierten. Dies steht allerdings im Kontrast zu den bereits beschriebenen Ergebnissen von Bai et al., die zwar einen ähnlichen Verlauf der Proliferations-Kinetik, aber einen deutlich verzögerten Proliferationsstart in Bid-defizienten Mäusen nach Leberteileresektion nachweisen konnten (Bai et al., 2005).

Um die histologischen Analysen zu überprüfen, wurde darüber hinaus die Expression verschiedener Zellzyklus-assoziiierter Proteine nach Leberteileresektion untersucht. In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Analysen zeigten sich keine Unterschiede der Expressionslevel in WT- und Bid^{-/-}-Mäusen.

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass weder Bid noch die Phosphorylierung von Bid *in vivo* eine Rolle im Verlauf der Leberregeneration gesunder Mäuse spielt.

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das BH3-only-Protein Bid in der Leber nicht essentiell für die Fas-Liganden-induzierte Apoptose benötigt wird. Die Apoptose-Resistenz von Bid-defizienten Mäusen gegen den Antikörper und schwachen Fas-Trigger Jo₂ konnte mit dem starken Apoptose-Stimulus MegaFasL überwunden werden. Dies zeigt, dass Hepatozyten und nicht-parenchymale Zellen der Leber nicht ausschließlich als sogenannte Typ II-Zellen angesehen werden können. Vielmehr sind sie in der Lage, infolge von starker Fas-Stimulation unabhängig vom mitochondrialen Signalmechanismus auch eine direkte Typ I-Apoptose auszulösen.

Dennoch kommt dem Bid-Protein eine wichtige Funktion in der Apoptose-Regulation zu, da es die Sensitivität gegenüber einem Apoptose-Stimulus zu beeinflussen vermag. So konnte die Apoptose-Resistenz nach Leberteileresektion bzw. Suramin-Behandlung durch MegaFasL in WT-Mäusen überwunden werden, während Hepatozyten von Bid^{-/-}-Tieren eine signifikant geringere Apoptose-Anfälligkeit zeigten. Die post-translationale Phosphorylierung an S⁶¹ und S⁷⁸ des Bid-Proteins hatte hingegen keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Apoptose-Stimulation.

Ferner zeigten weder der Bid-Knockout noch die Nicht-Phosphorylierbarkeit des Bid-Proteins einen Effekt auf die proliferative Kapazität gesunder Hepatozyten im Rahmen der Gewebsregeneration nach Leberteilresektion.

MegaFasL ist ein deutlich potenterer Apoptose-Trigger als der Antikörper Jo₂. Es bleibt allerdings zu klären, ob die physiologische Situation der Fas-Liganden/Fas-Rezeptor-Bindung durch dieses synthetische hexamere Protein-Konstrukt adäquat widergespiegelt wird.

Um die bereits gut erforschte Rolle von Bid als Mediator des Typ II-Apoptose-Signalwegs detaillierter zu charakterisieren und um darüber hinaus vor allem die suggerierte Rolle von Bid in nicht-apoptotischen Funktionen in Zukunft genauer zu erfassen, werden weitere Studien erforderlich sein.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fas-Rezeptor und DISC.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Caspase-Aktivierung.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bildung des Apoptosoms.....	8
Abbildung 4: Typ I- und Typ II-Apoptose-Signaltransduktionsmechanismus.....	9
Abbildung 5: Einteilung und Struktur der Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine.....	11
Abbildung 6: Aminosäure-Sequenz und Tertiär-Struktur von Bid.....	12
Abbildung 7: Beispiel des Bandenverlaufs einer Bid-Genotypisierung für Bid ^{+/+} , Bid ^{+/-} und Bid ^{-/-}	33
Abbildung 8: Beispiele für Ponceau S gefärbte PVDF Membranen.....	36
Abbildung 9: Histologische Untersuchungen Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT- Kontrollmäusen nach Apoptose-Stimulation mit dem Antikörper Jo ₂	45
Abbildung 10: Caspase-Aktivität in Lebern Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen nach Apoptose-Stimulation durch Jo ₂ -Antikörper.....	46
Abbildung 11: Histologische Untersuchungen Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT- Mäusen nach Apoptose-Stimulation mit MegaFasL.....	47
Abbildung 12: Untersuchung der Caspase-Aktivität in Lebern Bid-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren nach Apoptose-Stimulation durch MegaFasL.....	48
Abbildung 13: Überlebenskurve von Bid ^{-/-} - und WT-Mäusen nach Behandlung mit MegaFasL.....	49
Abbildung 14: Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach MegaFasL-Behandlung.....	50
Abbildung 15: Untersuchungen zur Induktion von Apoptose mit MegaFasL in <i>lpr</i> -Mäusen.....	51
Abbildung 16: Einfluss eines pan-Caspase-Inhibitors auf MegaFasL-induzierte Apoptose.....	52
Abbildung 17: Makroskopisches Bild des Lebergewebes LPS/GalN-behandelter Mäuse.....	53
Abbildung 18: Histologische Untersuchungen von WT- und Bid ^{-/-} -Gewebepräparaten nach Induktion der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose durch LPS/GalN.....	53
Abbildung 19: Aktivität von Caspase-3 in Gewebehomogenaten von WT- und Bid ^{-/-} -Tieren nach Induktion der TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptose durch LPS/GalN.....	54
Abbildung 20: Histologische Untersuchungen von WT-Gewebepräparaten nach Apoptose- Induktion durch Jo ₂ in Apoptose-Resistenzmodellen.....	56
Abbildung 21: Analyse der Proteinlevel aktiver Caspase-3 sowie ihrer proteolytischen Aktivität in Gewebe-homogenaten von WT-Apoptose-Resistenz-Modellen nach Jo ₂ -Behandlung	57
Abbildung 22: Histologische Untersuchungen von WT-Gewebepräparaten nach Apoptose- Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen.....	58
Abbildung 23: Caspase-3-Aktivität in Gewebehomogenaten von WT-Tieren nach Apoptose- Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen.....	59
Abbildung 24: Histologische Untersuchungen von Bid ^{-/-} -Gewebepräparaten nach Apoptose- Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen.....	60

Abbildung 25: Aktivität von Caspase-3 in Gewebehomogenaten von Bid ^{-/-} -Tieren nach Apoptose-Induktion durch MegaFasL in Apoptose-Resistenz-Modellen.....	61
Abbildung 26: Histologische Untersuchungen von Bid ^{S61A/S78A} KI-Gewebepräparaten nach Apoptose-Induktion durch Jo ₂ in Apoptose-Resistenz-Modellen.....	62
Abbildung 27: Caspase-3-Aktivität in Gewebehomogenaten von Bid ^{S61A/S78A} KI-Mäusen nach Apoptose-Induktion durch Jo ₂ in Apoptose-Resistenz-Modellen.....	63
Abbildung 28: Western Blot-Analyse der Bid-Expression in Lebergewebehomogenaten von WT- und Bid ^{-/-} -Mäusen nach 2/3-Leberteileresektion.....	64
Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der Gesamtzellzahl pro Sichtfeld in Lebergewebshistologien von WT- und Bid ^{-/-} -Proben nach partieller Leberteileresektion	65
Abbildung 30: Histologische Untersuchungen von BrdU- und Ki67-gefärbten Leberpräparaten nach partieller Leberresektion an WT- und Bid ^{-/-} -Mäusen.....	65
Abbildung 31: Quantitative Auswertung BrdU-positiver Zellen in WT- und Bid ^{-/-} -Gewebepräparaten nach partieller Leberresektion	66
Abbildung 32: Quantitative Auswertung Ki67-positiver Zellen in WT- und Bid ^{-/-} -Gewebepräparaten nach partieller Leberresektion	66
Abbildung 33: Western Blot-Analysen zellzyklusassoziierter Proteine in Gesamtzelllysaten von WT- und Bid ^{-/-} -Leberproben zu definierten Zeitpunkten nach 2/3-Leberteileresektion	67
Abbildung 34: Western Blot-Analyse der Bid-Expression in Lebergewebehomogenaten von WT- und Bid ^{S61A/S78A} KI-Mäusen nach 2/3-Leberteileresektion	68
Abbildung 35: Histologische Untersuchung Ki67-gefärbter Leberpräparate nach partieller Leberresektion von WT- und Bid ^{S61A/S78A} KI-Mäusen.....	69
Abbildung 36: Quantitative Auswertung Ki67-positiver Zellen in WT- und Bid ^{S61A/S78A} KI-Gewebepräparaten nach partieller Leberresektion	69
Abbildung 37: Western Blot-Analysen zellzyklusassoziierter Proteine in Gesamtzelllysaten von WT- und Bid ^{S61A/S78A} KI-Leberproben zu definierten Regenerationszeitpunkten nach 2/3-Leberteileresektion.....	70

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper für den Proteinnachweis auf PVDF-Membranen.....	37
Tabelle 2: Sekundäre Meerrettichperoxidase-gekoppelte Antikörper.....	38
Tabelle 3: Abkürzungsverzeichnis	85

8 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 3: Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ALT	Alanin-Aminotransferase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM- and Rad3-related
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-assoziated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x _L	B-cell lymphoma-extra large
BDL	Gallengangligatur
BH	Bcl-2-Homologiedomäne
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bid ^{-/-}	Bid-Defizienz
Bid ^{+/+}	Wildtyp-, C57BL/6J
Bid ^{S61A/S78A} KI	nicht-phosphorylierbare Bid-Mutation
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIR	baculoviral IAP repeat
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3
BrdU	5'-Brom-2'-deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
C	Kontrolle
CARD	caspase recruitment domain
Caspase	cysteiny-l-aspartate specific protease
CBBG	Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250
cdc27	Cell division cycle protein 27 homolog
cdk	Cyclin-dependent kinase
cFlip	cellular FLICE/Caspase-8-like inhibitory protein
cFlip _L	große Splicevariante von cFlip
cFlip _S	kleine Splicevariante von cFlip
cIAP1/cIAP2	cellular IAP 1 und 2
c-Jun	Transkriptionsfaktor
CK1/CK2	Caseinkinase 1 und 2
CRD	cystein-rich domain
dADP	Desoxyadenosindiphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
dTTP	Thymidine triphosphate
dUTP	2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphate
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
FADD	Fas-associated protein with death domain
Fas/CD95/APO-1	Fas-Rezeptor
FasL	Fas-Ligand
FLICE	Fas-associated death-domain-like IL-1 β -converting enzyme
GalN	Galactosamin
GCDC	glycochenodeoxycholate
H	α -Helix
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HD	hohe Dosis
HGF	hepatocyte growth factor
HGFR/MET	N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine HOS Transforming gene/hepatocyte growth factor receptor
Hsc70	heat-shock cognate protein 70
Hu	human
IAP	inhibitor of apoptosis
IBM	IAP binding motif
I κ B α	inhibitor of NF κ B alpha
Jo2	monoklonaler anti-CD95/Fas-Antikörper
Ki67/MKI67	mit Zellzyklus assoziiertes nukleäres Protein
LD	niedrige Dosis
<i>Lpr</i> -Mäuse	B6.MRL-Tnfrsf6 ^{lpr} /J , Fas-Rezeptor-defiziente Mäuse
LPS	Lipopolisaccharid
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
MegaFasL	hexameres Konstrukt des sFasL
miRNA	micro-RNA
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
Mu	murin
MW	Mittelwert
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Omi/HtrA2	Omi/high temperature requirement A2
P	Phosphorylierung
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PH	partielle Leberteileresektion
PI3K	phosphoinositide 3-kinase

Abkürzungsverzeichnis

PLZF	promyelocytic leukemia zink finger
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Suraminbehandlung
SD	Standardabweichung
sFasL	lösliche Form des FasL
Smac/Diablo	second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI
Stat 3	Signal transducer and activator of transcription 3
tBid	truncated Bid
TCDC	taurochenodeoxycholate
TdT	terminal desoxynucleotid transferase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLCS	tauroolithocholate-3-sulfate
TM	Trockenmilchpulver
TNF-R1/p55/CD120a	TNF-Rezeptor 1
TNF- α /TNF	Tumornekrosefaktor-alpha
TRADD	TNF rezeptor-assoziiated protein with death domain
TUDC	tauroursodeoxicholate
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Wee1	Kern-assoziierte Ser/Thr-Kinase
WT	C57BL/6J, Bid ^{+/+}
XIAP	x-linked IAP

9 Literaturverzeichnis

- ADAMS, J. M. & CORY, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-6.
- AOUACHERIA, A., BRUNET, F. & GOUY, M. 2005. Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol*, 22, 2395-416.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- BACHELDER, R. E., WENDT, M. A., FUJITA, N., TSURUO, T. & MERCURIO, A. M. 2001. The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 34702-7.
- BAI, L., NI, H. M., CHEN, X., DIFRANCESCA, D. & YIN, X. M. 2005. Deletion of Bid impedes cell proliferation and hepatic carcinogenesis. *Am J Pathol*, 166, 1523-32.
- BAKHSHI, A., JENSEN, J. P., GOLDMAN, P., WRIGHT, J. J., MCBRIDE, O. W., EPSTEIN, A. L. & KORSMEYER, S. J. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, 41, 899-906.
- BARRY, M., HEIBEIN, J. A., PINKOSKI, M. J., LEE, S. F., MOYER, R. W., GREEN, D. R. & BLEACKLEY, R. C. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol*, 20, 3781-94.
- BENZ, C., ANGERMULLER, S., OTTO, G., SAUER, P., STREMMEL, W. & STIEHL, A. 2000. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *Eur J Clin Invest*, 30, 203-9.
- BILLEN, L. P., KOKOSKI, C. L., LOVELL, J. F., LEBER, B. & ANDREWS, D. W. 2008. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol*, 6, e147.
- BLACK, R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J., STOCKING, K. L., REDDY, P., SRINIVASAN, S., NELSON, N., BOIANI, N., SCHOOLEY, K. A., GERHART, M., DAVIS, R., FITZNER, J. N., JOHNSON, R. S., PAXTON, R. J., MARCH, C. J. & CERRETTI, D. P. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385, 729-33.
- BOLDIN, M. P., METT, I. L., VARFOLOMEEV, E. E., CHUMAKOV, I., SHEMER-AVNI, Y., CAMONIS, J. H. & WALLACH, D. 1995. 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*, 270, 387-91.
- BOSSY-WETZEL, E. & GREEN, D. R. 1999. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem*, 274, 17484-90.
- BOTS, M. & MEDEMA, J. P. 2006. Granzymes at a glance. *J Cell Sci*, 119, 5011-4.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BREITSCHOPF, K., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2000. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J Biol Chem*, 275, 21648-52.
- BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- CANBAY, A., FELDSTEIN, A. E., HIGUCHI, H., WERNEBURG, N., GRAMBIHLER, A., BRONK, S. F. & GORES, G. J. 2003. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology*, 38, 1188-98.

- CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMSON, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3666-70.
- CASCINO, I., FIUCCI, G., PAPOFF, G. & RUBERTI, G. 1995. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol*, 154, 2706-13.
- CERTO, M., DEL GAIZO MOORE, V., NISHINO, M., WEI, G., KORSMEYER, S., ARMSTRONG, S. A. & LETAI, A. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9, 351-65.
- CHANG, D. W., XING, Z., PAN, Y., ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., BARNHART, B. C., YAISH-OHAD, S., PETER, M. E. & YANG, X. 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J*, 21, 3704-14.
- CHAO, Y., SHIOZAKI, E. N., SRINIVASULA, S. M., RIGOTTI, D. J., FAIRMAN, R. & SHI, Y. 2005. Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol*, 3, e183.
- CHEN, L., WILLIS, S. N., WEI, A., SMITH, B. J., FLETCHER, J. I., HINDS, M. G., COLMAN, P. M., DAY, C. L., ADAMS, J. M. & HUANG, D. C. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 17, 393-403.
- CHEN, M., HE, H., ZHAN, S., KRAJEWSKI, S., REED, J. C. & GOTTLIEB, R. A. 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*, 276, 30724-8.
- CHENG, E. H., SHEIKO, T. V., FISHER, J. K., CRAIGEN, W. J. & KORSMEYER, S. J. 2003. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 301, 513-7.
- CHINNAIYAN, A. M., TEPPER, C. G., SELDIN, M. F., O'ROURKE, K., KISCHKEL, F. C., HELLBARDT, S., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. & DIXIT, V. M. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 271, 4961-5.
- CHOU, J. J., LI, H., SALVESEN, G. S., YUAN, J. & WAGNER, G. 1999. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, 96, 615-24.
- CIRMAN, T., ORESIC, K., MAZOVEC, G. D., TURK, V., REED, J. C., MYERS, R. M., SALVESEN, G. S. & TURK, B. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem*, 279, 3578-87.
- CLEARY, M. L., SMITH, S. D. & SKLAR, J. 1986. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, 47, 19-28.
- COMPTON, S. J. & JONES, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*, 151, 369-74.
- CONUS, S. & SIMON, H. U. 2008. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol*, 76, 1374-82.
- CORY, S., HUANG, D. C. & ADAMS, J. M. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22, 8590-607.
- COSULICH, S. C., WORRALL, V., HEDGE, P. J., GREEN, S. & CLARKE, P. R. 1997. Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr Biol*, 7, 913-20.
- DANIAL, N. N. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*, 13, 7254-63.
- DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-41.

- DE LA COSTE, A., FABRE, M., MCDONELL, N., PORTEU, A., GILGENKRANTZ, H., PERRET, C., KAHN, A. & MIGNON, A. 1999. Differential protective effects of Bcl-xL and Bcl-2 on apoptotic liver injury in transgenic mice. *Am J Physiol*, 277, G702-8.
- DEGLI ESPOSTI, M., FERRY, G., MASDEHORS, P., BOUTIN, J. A., HICKMAN, J. A. & DIVE, C. 2003. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem*, 278, 15749-57.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M. & YUAN, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-67.
- DESAGHER, S., OSEN-SAND, A., MONTESSUIT, S., MAGNENAT, E., VILBOIS, F., HOCHMANN, A., JOURNOT, L., ANTONSSON, B. & MARTINOU, J. C. 2001. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell*, 8, 601-11.
- DESAGHER, S., OSEN-SAND, A., NICHOLS, A., ESKES, R., MONTESSUIT, S., LAUPER, S., MAUNDRELL, K., ANTONSSON, B. & MARTINOU, J. C. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, 144, 891-901.
- DESBARATS, J. & NEWELL, M. K. 2000. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med*, 6, 920-3.
- DEVERAUX, Q. L. & REED, J. C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 13, 239-52.
- DRESSEL, J. & OESPER, R. E. 1961. The discovery of Germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe. *J Chem Educ*, 38, 620-1.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- EBERSTADT, M., HUANG, B., CHEN, Z., MEADOWS, R. P., NG, S. C., ZHENG, L., LENARDO, M. J. & FESIK, S. W. 1998. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392, 941-5.
- EICHHORST, S. T., KRUEGER, A., MUERKOSTER, S., FAS, S. C., GOLKS, A., GRUETZNER, U., SCHUBERT, L., OPELZ, C., BILZER, M., GERBES, A. L. & KRAMMER, P. H. 2004. Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis in vitro and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nat Med*, 10, 602-9.
- ESKES, R., DESAGHER, S., ANTONSSON, B. & MARTINOU, J. C. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, 20, 929-35.
- ESPOSTI, M. D. 2002. The roles of Bid. *Apoptosis*, 7, 433-40.
- EVAN, G. I. & VOUSDEN, K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-8.
- FAUBION, W. A., GUICCIARDI, M. E., MIYOSHI, H., BRONK, S. F., ROBERTS, P. J., SVINGEN, P. A., KAUFMANN, S. H. & GORES, G. J. 1999. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest*, 103, 137-45.
- FERNANDEZ, Y., VERHAEGEN, M., MILLER, T. P., RUSH, J. L., STEINER, P., OPIPARI, A. W., JR., LOWE, S. W. & SOENGAS, M. S. 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*, 65, 6294-304.
- FUENTES-PRIOR, P. & SALVESEN, G. S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384, 201-32.
- GALANOS, C., FREUDENBERG, M. A. & REUTTER, W. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5939-43.
- GALLE, P. R. & KRAMMER, P. H. 1998. CD95-induced apoptosis in human liver disease. *Semin Liver Dis*, 18, 141-51.

- GARCIA, S., LIZ, M., GOMEZ-REINO, J. J. & CONDE, C. 2010. Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage. *Arthritis Res Ther*, 12, R33.
- GARDAI, S. J., HILDEMAN, D. A., FRANKEL, S. K., WHITLOCK, B. B., FRASCH, S. C., BORREGAARD, N., MARRACK, P., BRATTON, D. L. & HENSON, P. M. 2004. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem*, 279, 21085-95.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. & BEN-SASSON, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 493-501.
- GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H. & STEIN, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31, 13-20.
- GOLSTEIN, P. & KROEMER, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32, 37-43.
- GRAF, D., KURZ, A. K., REINEHR, R., FISCHER, R., KIRCHEIS, G. & HAUSSINGER, D. 2002. Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology*, 36, 829-39.
- GRASL-KRAUPP, B., RUTTKAY-NEDECKY, B., KOUDELKA, H., BUKOWSKA, K., BURSCH, W. & SCHULTE-HERMANN, R. 1995. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, 21, 1465-8.
- GREANEY, P., NAHIMANA, A., LAGOPOULOS, L., ETTER, A. L., AUBRY, D., ATTINGER, A., BELTRAMINELLI, N., HUNI, B., BASSI, I., SORDAT, B., DEMOTZ, S., DUPUIS, M. & DUCHOSAL, M. A. 2006. A Fas agonist induces high levels of apoptosis in haematological malignancies. *Leuk Res*, 30, 415-26.
- GREIDER, C., CHATTOPADHYAY, A., PARKHURST, C. & YANG, E. 2002. BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 21, 7765-75.
- GRELL, M., WAJANT, H., ZIMMERMANN, G. & SCHEURICH, P. 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 570-5.
- GROSS, A., YIN, X. M., WANG, K., WEI, M. C., JOCKEL, J., MILLIMAN, C., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & KORSMEYER, S. J. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, 274, 1156-63.
- GUICCIARDI, M. E., BRONK, S. F., WERNEBURG, N. W., YIN, X. M. & GORES, G. J. 2005. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*, 129, 269-84.
- HAWKING, F. 1978. Suramin: with special reference to onchocerciasis. *Adv Pharmacol Chemother*, 15, 289-322.
- HISHINUMA, I., NAGAKAWA, J., HIROTA, K., MIYAMOTO, K., TSUKIDATE, K., YAMANAKA, T., KATAYAMA, K. & YAMATSU, I. 1990. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in development of hepatic injury in galactosamine-sensitized mice. *Hepatology*, 12, 1187-91.
- HOLLER, N., TARDIVEL, A., KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., HERTIG, S., GAIDE, O., MARTINON, F., TINEL, A., DEPERTHES, D., CALDERARA, S., SCHULTHESS, T., ENGEL, J., SCHNEIDER, P. & TSCHOPP, J. 2003. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*, 23, 1428-40.

- HOTTI, A., JARVINEN, K., SIIVOLA, P. & HOLTTA, E. 2000. Caspases and mitochondria in c-Myc-induced apoptosis: identification of ATM as a new target of caspases. *Oncogene*, 19, 2354-62.
- HU, S., VINCENZ, C., NI, J., GENTZ, R. & DIXIT, V. M. 1997. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 17255-7.
- HUANG, B., EBERSTADT, M., OLEJNICZAK, E. T., MEADOWS, R. P. & FESIK, S. W. 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 384, 638-41.
- IIMURO, Y., NISHIURA, T., HELLERBRAND, C., BEHRNS, K. E., SCHOONHOVEN, R., GRISHAM, J. W. & BRENNER, D. A. 1998. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest*, 101, 802-11.
- IRMLER, M., THOME, M., HAHNE, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., STEINER, V., BODMER, J. L., SCHROTER, M., BURNS, K., MATTMANN, C., RIMOLDI, D., FRENCH, L. E. & TSCHOPP, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-5.
- JAESCHKE, H., FARHOOD, A., CAI, S. X., TSENG, B. Y. & BAJT, M. L. 2000. Protection against TNF-induced liver parenchymal cell apoptosis during endotoxemia by a novel caspase inhibitor in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 169, 77-83.
- JANICKE, R. U., WALKER, P. A., LIN, X. Y. & PORTER, A. G. 1996. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J*, 15, 6969-78.
- JIN, Z. & EL-DEIRY, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4, 139-63.
- KAMER, I., SARIG, R., ZALTSMAN, Y., NIV, H., OBERKOVITZ, G., REGEV, L., HAIMOVICH, G., LERENTHAL, Y., MARCELLUS, R. C. & GROSS, A. 2005. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell*, 122, 593-603.
- KAUFMANN, T., JOST, P. J., PELLEGRINI, M., PUTHALAKATH, H., GUGASYAN, R., GERONDAKIS, S., CRETNEY, E., SMYTH, M. J., SILKE, J., HAKEM, R., BOUILLET, P., MAK, T. W., DIXIT, V. M. & STRASSER, A. 2009. Fatal hepatitis mediated by tumor necrosis factor TNFalpha requires caspase-8 and involves the BH3-only proteins Bid and Bim. *Immunity*, 30, 56-66.
- KELEKAR, A. & THOMPSON, C. B. 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 8, 324-30.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIM, H., RAFIUDDIN-SHAH, M., TU, H. C., JEFFERS, J. R., ZAMBETTI, G. P., HSIEH, J. J. & CHENG, E. H. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*, 8, 1348-58.
- KIM, H. E., DU, F., FANG, M. & WANG, X. 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17545-50.
- KIM, T. H., ZHAO, Y., BARBER, M. J., KUHARSKY, D. K. & YIN, X. M. 2000. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem*, 275, 39474-81.
- KISCHKEL, F. C., LAWRENCE, D. A., CHUNTHARAPAI, A., SCHOW, P., KIM, K. J. & ASHKENAZI, A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12, 611-20.
- KOPS, G. J. & BURGERING, B. M. 1999. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med*, 77, 656-65.
- KORSMEYER, S. J., WEI, M. C., SAITO, M., WEILER, S., OH, K. J. & SCHLESINGER, P. H. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 7, 1166-73.

- KOTHAKOTA, S., AZUMA, T., REINHARD, C., KLIPPEL, A., TANG, J., CHU, K., MCGARRY, T. J., KIRSCHNER, M. W., KOTHS, K., KWIATKOWSKI, D. J. & WILLIAMS, L. T. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278, 294-8.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. & MELINO, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3-11.
- KU, N. O., LIAO, J. & OMARY, M. B. 1997. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem*, 272, 33197-203.
- KUROSAWA, H., QUE, F. G., ROBERTS, L. R., FESMIER, P. J. & GORES, G. J. 1997. Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2. *Am J Physiol*, 272, G1587-93.
- KUWANA, T., BOUCHIER-HAYES, L., CHIPUK, J. E., BONZON, C., SULLIVAN, B. A., GREEN, D. R. & NEWMAYER, D. D. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, 17, 525-35.
- LA ROCCA, R. V., STEIN, C. A., DANESI, R. & MYERS, C. E. 1990. Suramin, a novel antitumor compound. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37, 893-8.
- LACRONIQUE, V., MIGNON, A., FABRE, M., VIOLLET, B., ROUQUET, N., MOLINA, T., PORTEU, A., HENRION, A., BOUSCARY, D., VARLET, P., JOULIN, V. & KAHN, A. 1996. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med*, 2, 80-6.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAVRIK, I. N., GOLKS, A. & KRAMMER, P. H. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 115, 2665-72.
- LEIST, M., GANTNER, F., BOHLINGER, I., GERMANN, P. G., TIEGS, G. & WENDEL, A. 1994. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol*, 153, 1778-88.
- LEIST, M. & JAATTELA, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 589-98.
- LETAI, A., BASSIK, M. C., WALENSKY, L. D., SORCINELLI, M. D., WEILER, S. & KORSMEYER, S. J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2, 183-92.
- LEVKAU, B., KOYAMA, H., RAINES, E. W., CLURMAN, B. E., HERREN, B., ORTH, K., ROBERTS, J. M. & ROSS, R. 1998. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell*, 1, 553-63.
- LEVKAU, B., SCATENA, M., GIACHELLI, C. M., ROSS, R. & RAINES, E. W. 1999. Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol*, 1, 227-33.
- LI, H., ZHU, H., XU, C. J. & YUAN, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- LINDROOS, P. M., ZARNEGAR, R. & MICHALOPOULOS, G. K. 1991. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*, 13, 743-50.

- LIU, Z., SUN, C., OLEJNICZAK, E. T., MEADOWS, R. P., BETZ, S. F., OOST, T., HERRMANN, J., WU, J. C. & FESIK, S. W. 2000. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, 408, 1004-8.
- LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. & LENARDO, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.
- LORD, S. J., RAJOTTE, R. V., KORBUTT, G. S. & BLEACKLEY, R. C. 2003. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev*, 193, 31-8.
- LUO, X., BUDIHARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-90.
- MAJNO, G. & JORIS, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146, 3-15.
- MANDIC, A., VIKTORSSON, K., STRANDBERG, L., HEIDEN, T., HANSSON, J., LINDER, S. & SHOSHAN, M. C. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22, 3003-13.
- MATSUI, H., ASOU, H. & INABA, T. 2007. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell*, 25, 99-112.
- MCDONNELL, J. M., FUSHMAN, D., MILLIMAN, C. L., KORSMEYER, S. J. & COWBURN, D. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, 96, 625-34.
- MCDONNELL, T. J. & KORSMEYER, S. J. 1991. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*, 349, 254-6.
- MCSTAY, G. P., SALVESEN, G. S. & GREEN, D. R. 2008. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ*, 15, 322-31.
- MICHALOPOULOS, G. K. 2007. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 213, 286-300.
- MICHALOPOULOS, G. K. 2010. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*, 176, 2-13.
- MITCHELL, C. & WILLENBRING, H. 2008. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc*, 3, 1167-70.
- MITSUAYA, H., POPOVIC, M., YARCHOAN, R., MATSUSHITA, S., GALLO, R. C. & BRODER, S. 1984. Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. *Science*, 226, 172-4.
- MOLDOVEANU, T., LIU, Q., TOCILJ, A., WATSON, M., SHORE, G. & GEHRING, K. 2006. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell*, 24, 677-88.
- MUCHMORE, S. W., SATTLER, M., LIANG, H., MEADOWS, R. P., HARLAN, J. E., YOON, H. S., NETTESHEIM, D., CHANG, B. S., THOMPSON, C. B., WONG, S. L., NG, S. L. & FESIK, S. W. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381, 335-41.
- MUZIO, M., CHINNAIYAN, A. M., KISCHKEL, F. C., O'ROURKE, K., SHEVCHENKO, A., NI, J., SCAFFIDI, C., BRETZ, J. D., ZHANG, M., GENTZ, R., MANN, M., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. & DIXIT, V. M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85, 817-27.
- NAGATA, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-65.
- NAGATA, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, 33, 29-55.
- NALAPAREDDY, P., SCHUNGEL, S., HONG, J. Y., MANN, M. P., JAESCHKE, H. & VOGEL, A. 2009. The BH3-only protein bid does not mediate death-receptor-induced liver injury in obstructive cholestasis. *Am J Pathol*, 175, 1077-85.

- NESTEROV, A., LU, X., JOHNSON, M., MILLER, G. J., IVASHCHENKO, Y. & KRAFT, A. S. 2001. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 10767-74.
- NIKRAD, M., JOHNSON, T., PUTHALALATH, H., COULTAS, L., ADAMS, J. & KRAFT, A. S. 2005. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther*, 4, 443-9.
- OGASAWARA, J., WATANABE-FUKUNAGA, R., ADACHI, M., MATSUZAWA, A., KASUGAI, T., KITAMURA, Y., ITOH, N., SUDA, T. & NAGATA, S. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-9.
- OLTVAI, Z. N., MILLIMAN, C. L. & KORSMEYER, S. J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74, 609-19.
- OPPENHEIM, R. W., FLAVELL, R. A., VINSANT, S., PREVETTE, D., KUAN, C. Y. & RAKIC, P. 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci*, 21, 4752-60.
- OSAWA, Y., HANNUN, Y. A., PROIA, R. L. & BRENNER, D. A. 2005. Roles of AKT and sphingosine kinase in the antiapoptotic effects of bile duct ligation in mouse liver. *Hepatology*, 42, 1320-8.
- PARRADO, A., ROBLEDO, M., MOYA-QUILES, M. R., MARIN, L. A., CHOMIENNE, C., PADUA, R. A. & ALVAREZ-LOPEZ, M. R. 2004. The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1898-903.
- PETROS, A. M., MEDEK, A., NETTESHEIM, D. G., KIM, D. H., YOON, H. S., SWIFT, K., MATAYOSHI, E. D., OLTERS DORF, T. & FESIK, S. W. 2001. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3012-7.
- PFEFFER, K., MATSUYAMA, T., KUNDIG, T. M., WAKEHAM, A., KISHIHARA, K., SHAHINIAN, A., WIEGMANN, K., OHASHI, P. S., KRONKE, M. & MAK, T. W. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*, 73, 457-67.
- RAO, L., PEREZ, D. & WHITE, E. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, 135, 1441-55.
- REINEHR, R., GRAF, D. & HAUSSINGER, D. 2003. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology*, 125, 839-53.
- REINERS, J. J., JR., CARUSO, J. A., MATHIEU, P., CHELLADURAI, B., YIN, X. M. & KESSEL, D. 2002. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ*, 9, 934-44.
- RODRIGUES, C. M., FAN, G., MA, X., KREN, B. T. & STEER, C. J. 1998. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*, 101, 2790-9.
- ROTHER, J., LESSLAUER, W., LOTSCHER, H., LANG, Y., KOEBEL, P., KONTGEN, F., ALTHAGE, A., ZINKERNAGEL, R., STEINMETZ, M. & BLUETHMANN, H. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 364, 798-802.
- ROY, N., DEVERAUX, Q. L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G. S. & REED, J. C. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*, 16, 6914-25.
- RUST, C., BAUCHMULLER, K., FICKERT, P., FUCHSBICHLER, A. & BEUERS, U. 2005. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling modulates taurochenodeoxycholic acid-induced liver injury and cholestasis in perfused rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289, G88-94.

- RUST, C., KARNITZ, L. M., PAYA, C. V., MOSCAT, J., SIMARI, R. D. & GORES, G. J. 2000. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem*, 275, 20210-6.
- SAELENS, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G. & VANDENABEELE, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.
- SAITO, J. M. & MAHER, J. J. 2000. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology*, 118, 1157-68.
- SALVESEN, G. S. & DIXIT, V. M. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10964-7.
- SATTLER, M., LIANG, H., NETTESHEIM, D., MEADOWS, R. P., HARLAN, J. E., EBERSTADT, M., YOON, H. S., SHUKER, S. B., CHANG, B. S., MINN, A. J., THOMPSON, C. B. & FESIK, S. W. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275, 983-6.
- SAX, J. K., FEI, P., MURPHY, M. E., BERNHARD, E., KORSMEYER, S. J. & EL-DEIRY, W. S. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, 4, 842-9.
- SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K. J., DEBATIN, K. M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17, 1675-87.
- SCHMEISER, K., HAMMOND, E. M., ROBERTS, S. & GRAND, R. J. 1998. Specific cleavage of gamma catenin by caspases during apoptosis. *FEBS Lett*, 433, 51-7.
- SCHNEIDER, P., HOLLER, N., BODMER, J. L., HAHNE, M., FREI, K., FONTANA, A. & TSCHOPP, J. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*, 187, 1205-13.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SCHULZE-BERGMANN, H., BRENNER, D., KRUEGER, A., SUESS, D., FAS, S. C., FREY, C. R., DAX, A., ZINK, D., BUCHLER, P., MULLER, M. & KRAMMER, P. H. 2004. Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatology*, 39, 645-54.
- SCHÜNGEL, S., BUITRAGO-MOLINA, L. E., NALAPAREDDY, P., LEBOSKY, M., MANN, M. P., JAESCHKE, H., GROSS, A. & VOGEL, A. 2009. The strength of the Fas ligand signal determines whether hepatocytes act as type 1 or type 2 cells in murine livers. *Hepatology*, 50, 1558-66.
- SHUDO, K., KINOSHITA, K., IMAMURA, R., FAN, H., HASUMOTO, K., TANAKA, M., NAGATA, S. & SUDA, T. 2001. The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. *Eur J Immunol*, 31, 2504-11.
- SKOV OLSEN, P., BOESBY, S., KIRKEGAARD, P., THERKELSEN, K., ALMDAL, T., POULSEN, S. S. & NEXO, E. 1988. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*, 8, 992-6.
- SLEE, E. A., KEOGH, S. A. & MARTIN, S. J. 2000. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ*, 7, 556-65.
- SRINIVASULA, S. M., GUPTA, S., DATTA, P., ZHANG, Z., HEGDE, R., CHEONG, N., FERNANDES-ALNEMRI, T. & ALNEMRI, E. S. 2003. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem*, 278, 31469-72.
- STEHLIK, C., DE MARTIN, R., KUMABASHIRI, I., SCHMID, J. A., BINDER, B. R. & LIPP, J. 1998. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene

- expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med*, 188, 211-6.
- STOKA, V., TURK, B., SCHENDEL, S. L., KIM, T. H., CIRMAN, T., SNIPAS, S. J., ELLERBY, L. M., BREDESEN, D., FREEZE, H., ABRAHAMSON, M., BROMME, D., KRAJEWSKI, S., REED, J. C., YIN, X. M., TURK, V. & SALVESEN, G. S. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*, 276, 3149-57.
- STRASSER, A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 5, 189-200.
- SUDA, T., TAKAHASHI, T., GOLSTEIN, P. & NAGATA, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75, 1169-78.
- SUTTON, V. R., DAVIS, J. E., CANCELLA, M., JOHNSTONE, R. W., RUEFLI, A. A., SEDELIES, K., BROWNE, K. A. & TRAPANI, J. A. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med*, 192, 1403-14.
- SUZUKI, M., YOULE, R. J. & TJANDRA, N. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103, 645-54.
- TAKAHASHI, R., DEVERAUX, Q., TAMM, I., WELSH, K., ASSA-MUNT, N., SALVESEN, G. S. & REED, J. C. 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*, 273, 7787-90.
- TAKIKAWA, Y., MIYOSHI, H., RUST, C., ROBERTS, P., SIEGEL, R., MANDAL, P. K., MILLIKAN, R. E. & GORES, G. J. 2001. The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits Fas apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes. *Gastroenterology*, 120, 1810-7.
- TANAKA, M., SUDA, T., HAZE, K., NAKAMURA, N., SATO, K., KIMURA, F., MOTOYOSHI, K., MIZUKI, M., TAGAWA, S., OHGA, S., HATAKE, K., DRUMMOND, A. H. & NAGATA, S. 1996. Fas ligand in human serum. *Nat Med*, 2, 317-22.
- TANG, P., HUNG, M. C. & KLOSTERGAARD, J. 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, 35, 8216-25.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6.
- THORNBERRY, N. A., RANO, T. A., PETERSON, E. P., RASPER, D. M., TIMKEY, T., GARCIA-CALVO, M., HOUTZAGER, V. M., NORDSTROM, P. A., ROY, S., VAILLANCOURT, J. P., CHAPMAN, K. T. & NICHOLSON, D. W. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 17907-11.
- TSUJIMOTO, Y., COSSMAN, J., JAFFE, E. & CROCE, C. M. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228, 1440-3.
- TSUJIMOTO, Y. & SHIMIZU, S. 2000. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*, 466, 6-10.
- TZUNG, S. P., FAUSTO, N. & HOCKENBERY, D. M. 1997. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am J Pathol*, 150, 1985-95.
- UREN, R. T., DEWSON, G., CHEN, L., COYNE, S. C., HUANG, D. C., ADAMS, J. M. & KLUCK, R. M. 2007. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J Cell Biol*, 177, 277-87.
- VAN LOO, G., SCHOTTE, P., VAN GURP, M., DEMOL, H., HOORELBEKE, B., GEVAERT, K., RODRIGUEZ, I., RUIZ-CARRILLO, A., VANDEKERCKHOVE, J., DECLERCQ, W., BEYAERT, R. & VANDENABEELE, P. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*, 8, 1136-42.

- VANDE VELDE, C., CIZEAU, J., DUBIK, D., ALIMONTI, J., BROWN, T., ISRAELS, S., HAKEM, R. & GREENBERG, A. H. 2000. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol*, 20, 5454-68.
- VAUX, D. L., CORY, S. & ADAMS, J. M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335, 440-2.
- VAUX, D. L. & KORSMEYER, S. J. 1999. Cell death in development. *Cell*, 96, 245-54.
- VERMA, S., ZHAO, L. J. & CHINNADURAI, G. 2001. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 4671-6.
- VOGEL, A., ASLAN, J. E., WILLENBRING, H., KLEIN, C., FINEGOLD, M., MOUNT, H., THOMAS, G. & GROMPE, M. 2006. Sustained phosphorylation of Bid is a marker for resistance to Fas-induced apoptosis during chronic liver diseases. *Gastroenterology*, 130, 104-19.
- WAJANT, H. 2003. Death receptors. *Essays Biochem*, 39, 53-71.
- WALTER, D., SCHMICH, K., VOGEL, S., PICK, R., KAUFMANN, T., HOCHMUTH, F. C., HABER, A., NEUBERT, K., MCNELLY, S., VON WEIZSACKER, F., MERFORT, I., MAURER, U., STRASSER, A. & BORNER, C. 2008. Switch from type II to I Fas/CD95 death signaling on in vitro culturing of primary hepatocytes. *Hepatology*, 48, 1942-53.
- WANG, C. Y., MAYO, M. W., KORNELUK, R. G., GOEDDEL, D. V. & BALDWIN, A. S., JR. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-3.
- WANG, H. G., PATHAN, N., ETHELL, I. M., KRAJEWSKI, S., YAMAGUCHI, Y., SHIBASAKI, F., MCKEON, F., BOBO, T., FRANKE, T. F. & REED, J. C. 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 284, 339-43.
- WANG, K., YIN, X. M., CHAO, D. T., MILLIMAN, C. L. & KORSMEYER, S. J. 1996. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*, 10, 2859-69.
- WATERHOUSE, N. J., SEDELIES, K. A., BROWNE, K. A., WOWK, M. E., NEWBOLD, A., SUTTON, V. R., CLARKE, C. J., OLIARO, J., LINDEMANN, R. K., BIRD, P. I., JOHNSTONE, R. W. & TRAPANI, J. A. 2005. A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 4476-82.
- WEI, M. C., LINDSTEN, T., MOOTHA, V. K., WEILER, S., GROSS, A., ASHIYA, M., THOMPSON, C. B. & KORSMEYER, S. J. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, 14, 2060-71.
- WEI, M. C., ZONG, W. X., CHENG, E. H., LINDSTEN, T., PANOUTSAKOPOULOU, V., ROSS, A. J., ROTH, K. A., MACGREGOR, G. R., THOMPSON, C. B. & KORSMEYER, S. J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-30.
- WILLIS, S. N., CHEN, L., DEWSON, G., WEI, A., NAIK, E., FLETCHER, J. I., ADAMS, J. M. & HUANG, D. C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, 19, 1294-305.
- WILLIS, S. N., FLETCHER, J. I., KAUFMANN, T., VAN DELFT, M. F., CHEN, L., CZABOTAR, P. E., IERINO, H., LEE, E. F., FAIRLIE, W. D., BOUILLET, P., STRASSER, A., KLUCK, R. M., ADAMS, J. M. & HUANG, D. C. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315, 856-9.
- WU, G., CHAI, J., SUBER, T. L., WU, J. W., DU, C., WANG, X. & SHI, Y. 2000. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, 408, 1008-12.
- XIAO, C., SRINIVASAN, L., CALADO, D. P., PATTERSON, H. C., ZHANG, B., WANG, J., HENDERSON, J. M., KUTOK, J. L. & RAJEWSKY, K. 2008. Lymphoproliferative

- disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*, 9, 405-14.
- XIAO, G. H., JEFFERS, M., BELLACOSA, A., MITSUUCHI, Y., VANDE WOUDE, G. F. & TESTA, J. R. 2001. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 247-52.
- YANG, Q. H., CHURCH-HAJDUK, R., REN, J., NEWTON, M. L. & DU, C. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev*, 17, 1487-96.
- YERUSHALMI, B., DAHL, R., DEVEREAUX, M. W., GUMPRICHT, E. & SOKOL, R. J. 2001. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*, 33, 616-26.
- YIN, X. M. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, 369, 7-19.
- YIN, X. M., WANG, K., GROSS, A., ZHAO, Y., ZINKEL, S., KLOCKE, B., ROTH, K. A. & KORSMEYER, S. J. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400, 886-91.
- YOULE, R. J. & STRASSER, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47-59.
- YU, X., ACEHAN, D., MENETRET, J. F., BOOTH, C. R., LUDTKE, S. J., RIEDL, S. J., SHI, Y., WANG, X. & AKEY, C. W. 2005. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure*, 13, 1725-35.
- ZHA, J., HARADA, H., YANG, E., JOCKEL, J. & KORSMEYER, S. J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87, 619-28.
- ZHA, J., WEILER, S., OH, K. J., WEI, M. C. & KORSMEYER, S. J. 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, 290, 1761-5.
- ZHAO, Y., LI, S., CHILDS, E. E., KUHARSKY, D. K. & YIN, X. M. 2001. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor- α -induced liver injury. *J Biol Chem*, 276, 27432-40.
- ZHOU, B. B., LI, H., YUAN, J. & KIRSCHNER, M. W. 1998. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6785-90.
- ZHOU, X. M., LIU, Y., PAYNE, G., LUTZ, R. J. & CHITTENDEN, T. 2000. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *J Biol Chem*, 275, 25046-51.
- ZINKEL, S. S., HUROV, K. E., ONG, C., ABTAHI, F. M., GROSS, A. & KORSMEYER, S. J. 2005. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell*, 122, 579-91.
- ZINKEL, S. S., ONG, C. C., FERGUSON, D. O., IWASAKI, H., AKASHI, K., BRONSON, R. T., KUTOK, J. L., ALT, F. W. & KORSMEYER, S. J. 2003. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev*, 17, 229-39.
- ZONG, W. X., DITSWORTH, D., BAUER, D. E., WANG, Z. Q. & THOMPSON, C. B. 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*, 18, 1272-82.

10 Publikationsliste

Originalarbeiten:

Schüngel S, Buitrago-Molina LE, Nalapareddy P, Lebofsky M, Manns MP, Jaeschke H, Gross A, Vogel A; The strength of the Fas ligand signal determines whether hepatocytes act as type 1 or type 2 cells in murine livers; *Hepatology* 2009, 50(5):1558-66.

Nalapareddy P, **Schüngel S**, Hong JY, Manns MP, Jaeschke H, Vogel A; The BH3-only-Protein bid does not mediate death-receptor-induced liver injury in obstructive cholestasis; *Am J Pathol.* 2009, 175(3):1077-85.

Teilnahme an Kongressen:

Poster:

The strength of the Fas ligand signal determines whether hepatocytes act as type 1 or type 2 cells in murine livers, German Association for the Study of the Liver (GASL), Bonn (2010)

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sven Schüngel
Geburtsdatum: 13. März 1978
Geburtsort: Herford

Promotion

Seit 05/2006 Medizinische Hochschule Hannover,
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie,
Thema: „Die Bedeutung von Bid für Apoptose und Proliferation in der murinen Leber“

Berufserfahrung/Praktika

08-09/2003 Praktikum unter Betreuung von Prof. Dr. J. Westermann,
Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck
12/2003 – 03/2004 Studentische Hilfskraft,
Institut für Pathologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Studium

10/1999 – 08/2005 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald,
Studium der Humanbiologie
03/2004 – 08/2005 Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. R. Warzok,
Institut für Pathologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Thema: „Beeinflussung der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit durch Simvastatin (Effekt von Simvastatin auf die RNA- und Proteinexpression ausgewählter ABC-Transporter in einem Rattenmodell)“

Wehrdienst

01/1998 – 08/1999 Sanitätssoldat im Marine-Sanitätsdienst der Bundeswehr
01/1998 – 03/1998 Grundausbildung, Marine-Versorgungsschule List/Sylt
04/1998 – 06/1998 Marine-Standortsanitätszentrum Wilhelmshaven
07/1998 – 08/1999 Schiffslazarett Fregatte Brandenburg

Schulausbildung

08/1988 – 06/1997 Gymnasium am Markt Bünde
08/1984 – 06/1988 Grundschule Bünde-Mitte
08/1981 – 07/1984 Evangelische Kleinkinderschule Bünde

Sonstiges

08/1999 – 07/2005 Mitglied im Verein „Humanbiologie Greifswald e.V.“
09/2000 – 09/2002 Stellvertretender Präsident des Vereins „Humanbiologie Greifswald e.V.“