

Das Zwei-Signalwege-Modell des Todesrezeptors CD95: Implikationen für das Verständnis der T-Zell- Immunantwort

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Diplom-Biochemiker Ingo Schmitz
geboren am 28.04.1971 in Troisdorf-Sieglar

2000

Referat: Prof. Dr. W. Müller
Abt. Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Koreferat: Prof. Dr. P.H. Krammer
Abt. Immungenetik
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Tag der Promotion: 27.06.2000

„Tod, wo ist Dein Sieg? Tod, wo ist Dein Stachel?“

1. Korinther 15,55

„Da die menschliche Existenz eine Halluzination ist, welche die sekundäre Halluzination von Tag und Nacht einschließt, steht es einem jeden, der seine Sinne beisammen hat, übel an, mit dem illusorischen Unterfangen, die erhabenste Halluzination, die wir kennen, den Tod, zu begreifen, befaßt zu sein.“

Flann O'Brien (aus: „Der dritte Polizist“)

Für Sabine

Das Verfassen der vorliegenden Arbeit stellt einen Abschluß der zurückliegenden Jahre dar, den ich zum Anlaß nehmen möchte, mich bei den Personen zu bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei meiner Frau Sabine für ihre Unterstützung und ihre Geduld bedanken. Es war sicher nicht immer leicht mit mir in den vergangenen Jahren. Auch meinen Eltern und meiner Oma, die mich schon im Studium in vielerlei Hinsicht unterstützt haben, danke ich. Ohne sie würde ich dies hier wohl nicht schreiben.

Herrn Prof. Dr. Peter H. Krammer möchte ich für die intensive Betreuung in den letzten drei Jahren danken. Darüber hinaus hat er mir gezeigt, wie wichtig neben dem reinen Forschen auch die Präsentation der Forschungsergebnisse ist. Dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Betreuung dieser Arbeit innerhalb der Fakultät für Chemie der Universität Hannover. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Michael U. Martin, der meinen wissenschaftlichen Werdegang schon seit dem Studium beobachtet und gefördert hat. Darüber hinaus sind Frau Dr. Sabine Kirchhoff und Herr Dr. Marcus E. Peter zu nennen. Nur durch ihre intensive und kompetente Betreuung konnte ich so viel erreichen.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die teils enge Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Oliver Keppler, Herrn Dr. Michael Pawlita, Herrn Dr. Jiping Zha, Herrn Dr. Stanley Korsmeyer, Herrn Dr. Tim Holmström und Herrn Dr. John Eriksson.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Krammer für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere allen Mitarbeitern der "Signalgruppe" Sven Baumann, Kerstin Hettler, Kathrin Kappes, Dr. Frank Kischkel, Andreas Krueger, Wolfgang Müller, Therese Panek, Dr. Carsten Scaffidi, Olaf Schickling, Thorsten Sebens, Alexander Stegh, Christine Stumpf und Jörg Volkland bin ich dankbar. Besonders erwähnen möchte ich dabei Wendelin Wolf, der mir immer wieder gezeigt hat, daß mir die Lehre Spaß macht. Die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft in der Signalgruppe haben dazu beigetragen, den Spaß an der Wissenschaft zu entdecken.

Danke!

Zusammenfassung

CD95 (APO-1/Fas) gehört zur Familie der Todesrezeptoren, einer Unterfamilie der TNF-/NGF-Rezeptor-Superfamilie. Todesrezeptoren haben die Eigenschaft, nach Bindung ihres Todesliganden Apoptose auszulösen. Für die Weiterleitung des apoptotischen Signals in die Zelle ist die sogenannte Todesdomäne im intrazellulären Teil der Todesrezeptoren verantwortlich. Die Todesdomäne ist eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Nach Stimulation von CD95 durch den CD95-Liganden (CD95L) werden zytoplasmatische Signalmoleküle an den oligomerisierten Rezeptor rekrutiert und es bildet sich ein Tod-induzierender Signalkomplex (engl. „death inducing signaling complex“, DISC). Im DISC wird Procaspase-8 durch auto-proteolytische Spaltung aktiviert. Dies ist der erste enzymatische Schritt in der CD95-Signaltransduktion. Unterhalb des DISC können je nach Zelltyp zwei verschiedene Signalwege beschriftet werden. Wird der DISC effizient gebildet, so werden große Mengen Procaspase-8 am DISC aktiviert. Dann ist Caspase-8 in der Lage, durch Spaltung der Effektorcaspase-3 eine direkte Caspasenkaskade auszulösen. Dieser Signalweg wird in Typ I-Zellen beschriftet. In Typ II-Zellen dagegen ist die DISC-Bildung stark vermindert. Deshalb werden nur geringe Mengen an Caspase-8 am DISC aktiviert. Zur Ausführung des Apoptoseprogramms ist daher ein Verstärkermechanismus notwendig. Dieser Verstärker ist der evolutionär konservierte mitochondrielle Apoptose-Signalweg. In diesem Signalweg wird das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid von Caspase-8 gespalten. Gespaltenes Bid transloziert zum Mitochondrium und löst dort apoptotische Veränderungen aus. Da nur Typ II-Zellen von diesem mitochondriellen Apoptose-Signalweg abhängig sind, läßt sich CD95-vermittelte Apoptose auch nur in Typ II-Zellen durch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren.

Dieses Zwei-Signalwege-Modell der CD95-Signaltransduktion konnte unter Verwendung von CD95L als Apoptosestimulus verifiziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß neben der DISC-Bildung und der Bcl-2-Inhibierbarkeit CD95-vermittelter Apoptose noch weitere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen bestehen. Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) inhibiert CD95-vermittelte Apoptose nur in Typ II-Zellen. Dies wird durch eine MAPK-vermittelte Inhibition der Spaltung von Bid erreicht.

Mit c-FLIP_L wurde ein Molekül beschrieben, dessen Rolle in Rahmen CD95-vermittelter Apoptose kontrovers diskutiert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß c-FLIP_L in den DISC rekrutiert wird und dort gespalten wird. Das Spaltprodukt verbleibt mit dem Spaltungsintermediat von Caspase-8 im DISC, was eine weitere Aktivierung von Caspase-8 und somit CD95-

vermittelte Apoptose blockiert. Die Rekrutierung von c-FLIP_L in den DISC erklärt, warum CD95-vermittelte Apoptose in Typ I- und Typ II-Zellen inhibiert wird.

Typ II-Zellen zeigen eine stark reduzierte Bildung des DISC, obwohl alle bekannten Komponenten des DISC im gleichen Maße exprimiert werden, wie in Typ I-Zellen. In dieser Arbeit konnten Hinweise gesammelt werden, die darauf hindeuten, daß CD95 in Typ II-Zellen in der Art posttranslational modifiziert ist, daß eine effiziente DISC-Bildung verhindert wird. Diese Modifikation korreliert mit der Beobachtung, daß CD95 in Typ II-Zellen stärker kreuzvernetzt werden muß, um Apoptose auszulösen.

T-Zellen wechseln im Rahmen einer Immunantwort ihre Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. So sind Kurzzeit-aktivierte T-Zellen resistent, Langzeit-aktivierte T-Zellen sensitiv gegenüber Stimulation von CD95. Mit Hilfe eines *in vitro*-Modells konnte gezeigt werden, daß T-Zellen mit dem Aktivierungsstatus auch ihren CD95-Phänotyp von Typ II nach Typ I wechseln. Die Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen konnte durch eine verminderte DISC-Bildung zusammen mit der Expression von Bcl-x_L erklärt werden. Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind also Typ II-Zellen, deren mitochondrieller Signalweg durch Bcl-x_L inhibiert ist. Damit konnte eine physiologische Relevanz für das Zwei-Signalwege-Modell aufgezeigt werden.

Stichworte:

Apoptose / CD95 / Signaltransduktion

Abstract

CD95 (APO-1/Fas) is a member of the death receptors, a subfamily of the TNF-/NGF-receptor superfamily. Death receptors induce apoptosis upon binding of the respective death ligand. In their intracellular part, they contain a protein-protein-interaction domain crucial for the induction of apoptosis, called death domain. Triggering of CD95 results in formation of the death-inducing signaling complex (DISC), a complex of signaling proteins recruited by activated CD95. At the DISC procaspase-8 is activated by autoproteolytical cleavage. Recently, two different CD95 apoptosis signaling cell types were identified. Type I cells show efficient DISC formation, thereby activating high amounts of caspase-8 and initiating a direct caspase cascade. In type II cells DISC formation is strongly reduced. Therefore, these cells need an amplifier for propagation of the apoptosis program. This amplifier is the evolutionary conserved mitochondrial apoptosis pathway. Active caspase-8 is generated in low amounts at the DISC of type II cells. Caspase-8 cleaves the proapoptotic Bcl-2 family member Bid, which then translocates to the mitochondrion and induces apoptogenic changes. Since only type II cells depend on the mitochondrial pathway, expression of antiapoptotic Bcl-2 family members abrogate CD95-mediated apoptosis only in type II cells.

The Two-pathway model was verified by using CD95L instead of agonistic antibodies for triggering of CD95. Moreover, new differences between type I and type II cells, other than DISC formation and Bcl-2 inhibition, could be shown. Activation of protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibit CD95-mediated apoptosis in type II cells. This inhibition is due to MAPK-mediated reduction of cleavage of Bid.

The role of c-FLIP_L in CD95-mediated apoptosis was discussed controversially. Here, it was shown that upon triggering of CD95 c-FLIP_L is recruited into the DISC, where it is cleaved. The cleavage intermediate stays at the DISC together with the cleavage intermediate of caspase-8 and prevents further activation of caspase-8. Thereby, CD95-mediated apoptosis is inhibited. The recruitment of c-FLIP_L into the DISC explains inhibition of CD95-mediated apoptosis by c-FLIP_L in both, type I and type II cells.

Type II cells are characterized by highly reduced DISC formation which is not due to reduced expression of the DISC components. It was shown that CD95 is posttranslationally modified in type II cells. This modification correlates with reduced DISC formation and the fact that CD95 needs stronger crosslinking in type II cells to induce apoptosis.

During an immune response T cells change their sensitivity towards CD95-mediated apoptosis. Freshly activated T cells are resistant, long term activated T cells are sensitive towards induction

of apoptosis via CD95. Using an *in vitro* model it was shown that T cells switch from a type II to a type I phenotype depending on the activation phase. The resistance of freshly activated T cells is due to reduced DISC formation and high expression of Bcl-x_L. Therefore, these cells could be characterized as type II cells in which the mitochondrial apoptosis pathway is blocked by Bcl-x_L. In conclusion, the switch from type II to type I during the T cell immune response is the first evidence for the physiological relevance of the two CD95 signaling pathways.

Keywords:

apoptosis / CD95 / signal transduction

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	6
ABSTRACT.....	8
INHALTSVERZEICHNIS.....	10
I. EINLEITUNG.....	12
1. APOPTOSE - DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD	12
2. MODELLSYSTEME DER APOPTOSE.....	13
3. TODESREZEPTOREN.....	14
4. DIE SIGNALTRANSDUKTION VON CD95.....	16
4.1 Rezeptortrimerisierung als auslösender Stimulus	16
4.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex.....	17
4.3 Die Caspasen-Familie.....	19
4.4 Die Bcl-2-Familie.....	22
4.5 Die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose	23
4.6 Zwei CD95-Signalwege.....	25
4.7 Die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren.....	26
4.8 Regulation und Inhibition der Signaltransduktion der Todesrezeptoren	29
4.8.1 Caspase-Inhibitoren.....	29
4.8.2 FLIPs.....	30
4.8.3 Kinasen.....	32
5. DIE PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER APOPTOSE	33
6. AUFGABENSTELLUNG.....	36
II. MATERIAL UND METHODEN.....	37
1. MATERIAL	37
1.1 Chemikalien.....	37
1.2 Häufig verwendete Puffer.....	37
1.3 Biologisches Material.....	39
1.3.1 Bakterienstämme.....	39
1.3.2 Eukaryontische Zellen.....	40
1.4 Nährmedien.....	41
1.4.1 Medien für die Zellkultur	41
1.4.2 Medien für Bakterien.....	41
1.5 Antikörper.....	42
1.6 Molekularbiologische Materialien.....	43
1.6.1 Vektoren	43
1.6.2 Enzyme und Kits.....	43
1.7 Geräte.....	43
2. METHODEN.....	45
2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	45
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	45
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	45
2.2.2 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
2.2.3 Restriktionsspaltung von DNA.....	47
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	47
2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel.....	47
2.2.6 Dephosphorylierung und Ligation von DNA.....	47
2.2.7 Transformation von Bakterien.....	48
2.3 Zellbiologische Methoden.....	49
2.3.1 Präparation primärer humaner T-Zellen	49
2.3.2 Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen.....	50
2.3.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenz.....	50
2.3.4 Biotinylierung von Oberflächenmolekülen auf Zellen.....	51
2.3.5 Messung apoptotischer Zellen.....	51
2.3.6 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials.....	51

2.3.7 Transfektion von Zellen	52
2.3.8 Herstellung von Antikörpern	53
2.3.9 Radioaktive Markierung von Zellen.....	54
2.3.10 Präparation von cytosolischen Extrakten	54
2.4 Herstellung rekombinanter Proteine.....	55
2.4.1 Verwendete Konstrukte.....	55
2.4.2 Induktion und Expression der Proteine in E.coli	55
2.4.3 Aufreinigung der Fusionsproteine.....	55
2.5 Proteinchemische Methoden.....	57
2.5.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	57
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.5.3 Western Blot	58
2.5.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	59
2.5.5 Kopplung von Antikörpern an Sepharose.....	59
2.5.6 Immunpräzipitation.....	59
2.5.7 DISC-Analyse.....	60
2.5.8 Analyse von CD95-Aggregaten	60
2.5.9 In vitro-Caspase-8-Spaltung.....	60
III. ERGEBNISSE.....	62
1. UNTERSUCHUNGEN ZUM ZWEI-SIGNALWEGE-MODELL VON CD95	62
1.1 CD95L induziert Apoptose über die zwei Signalwege von CD95.....	62
1.2 PMA inhibiert CD95-vermittelte Apoptose in CD95-Typ II-Zellen.....	65
2 REGULATION CD95-VERMITTELTEN APOPTOSE DURCH C-FLIP _L	68
2.1 c-FLIP _L inhibiert CD95-vermittelte Apoptose.....	68
2.2 c-FLIP _L wird in den DISC von Typ I-Zellen rekrutiert	71
2.3 c-FLIP _L inhibiert den DISC von Typ II-Zellen	73
3. DER CD95-REZEPTOR IN TYP I- UND TYP II-ZELLEN	75
3.1 Glykosylierung von CD95 in Typ I- und Typ II-Zellen.....	75
3.2 Das CD95-Paradoxon.....	77
3.3 Typ I- und Typ II-Zellen benötigen unterschiedliche Kreuzvernetzung von CD95.....	80
4 DIE ROLLE VON CD95 IN RAHMEN DER IMMUNANTWORT.....	82
4.1 Charakterisierung eines in vitro-Modells der Immunantwort	82
4.2 c-FLIP _L spielt keine Rolle bei der Vermittlung von Resistenz in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen	84
4.3 T-Zellen vollziehen einen Wechsel von Typ II nach Typ I während der Immunantwort.....	86
4.4 Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind durch Bcl-x _L geschützte Typ II-Zellen	87
4.5 Cycloheximid sensitiviert Kurzzeit-aktivierte T-Zellen.....	89
IV. DISKUSSION.....	92
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	105
VI. LITERATUR.....	107
VII. ABKÜRZUNGEN.....	132
VIII. PUBLIKATIONSLISTE	134
IX. LEBENS LAUF.....	136
X. ERKLÄRUNG.....	137

I. Einleitung

1. Apoptose - der programmierte Zelltod

Bereits im zweiten nachchristlichen Jahrhundert hatte Galenus Galen die Regression von larvalen und fetalen Strukturen im Laufe der Ontogenese beschrieben (Barclay et al., 1944; Clarke et al., 1996). In der Mitte des letzten Jahrhunderts erkannte Carl Vogt, daß Zellen einem vorhersagbaren, gleichsam „programmierten“ Tod unterliegen (Vogt, 1842). 1951 konnte der Embryologe Glucksmann dieses auf den Tod einzelner Zellen zurückführen (Glucksmann, 1951). Kerr, Wyllie und Currie schließlich beobachteten an toxinbehandelten Leberzellen eine den sterbenden Embryonalzellen vergleichbare Morphologie und prägten hierfür den Begriff „Apoptose“ (Kerr et al., 1972). Schon bald wurde erkannt, daß Apoptose nicht nur in der Embryonalentwicklung von Bedeutung ist (Vaux et al., 1999; Los et al., 1999). Eine besondere Rolle spielt sie bei der Erhaltung der Gewebshomöostase. Des weiteren werden durch virale Infektion oder Mutation geschädigte Zellen mittels Apoptose entfernt (Thompson, 1995).

Eine andere Art des Zelltods bezeichnet man als Nekrose. Die Nekrose ist keinem geordneten Mechanismus zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren unterworfen. Sie ist durch ein Anschwellen der Zelle (Onkose) charakterisiert, was zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Cytosols und von Zellorganellen in den interzellulären Raum führt. Eine inflammatorische Reaktion mit einhergehenden Gewebeschädigungen ist die Folge. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose durch die Aktivierung regulierter katabolischer Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen, charakterisiert. Apoptose ist unter anderem durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, welches im Bereich der nuklearen Peripherie aggregiert. Bei den meisten Formen von Apoptose wird in den kondensierten Chromosomen die DNA durch spezielle Endonukleasen zu einer charakteristischen „DNA-Leiter“ abgebaut (Wyllie, 1980). Dies beinhaltet die internukleosomale Spaltung von DNA, die zum Entstehen von DNA-Stücken mit einer Länge von 200 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen davon führt. Ein Verlust der Membranstabilität führt zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose) und mündet schließlich in das Abschnüren membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Parallel dazu wird ein Verlust der Membranasymmetrie beobachtet, der zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Über dieses Merkmal werden die apoptotischen Körperchen zum Beispiel von Makrophagen oder Nachbarzellen erkannt, aufgenommen und abgebaut (Savill et al., 1993). Trotz der gegensätzlichen Charakteristika von Nekrose und Apoptose lassen Beobachtungen den Schluß zu, daß beide Prozesse miteinander gekoppelt sein können. Die Blockade eines apoptotischen Signalweges kann zum Zelltod über einen nekrotischen Weg führen (Kerr et al., 1972).

2. Modellsysteme der Apoptose

Erste Hinweise auf die genetische Grundlage der Apoptose wurden aus der Entwicklungsbiologie gewonnen. Mehrere Gene des Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurden als Basiskomponenten des Apoptoseprogramms identifiziert (Horvitz et al., 1994). Während der Entwicklung dieses Wurms sterben 131 der 1090 somatischen Zellen durch Apoptose. Durch Mutationsanalysen wurden initial drei Gene identifiziert, die für das Apoptoseprogramm wichtig sind: *ced-3* und *ced-4* sind für die Ausführung der Apoptose essentiell, während *ced-9* die Aktivität von *ced-3* und *ced-4* inhibiert und somit Zellen vor Apoptose schützt (Ellis et al.,

	Todesrezeptoren	Adaptoren	Initiatoren	Regulatoren			Effektoren
	Dros. C.eig.	?	?	?	EGL-1	CED-9	CED-4
Dros.	?	?	DREDD/ DCP-2	?	Drob1 Debcl	Dark/ HAC-1/ Dapaf-1	DCP-1, drICE DRONC DECAY
Mammalia	CD95/APO-1/Fas TNF-R1 DR3/TRAMP/ wsl-1/APO-3/LARD DR4/APO-2/ TRAIL-R1 DR5/TRAIL-R2 TRICK2/KILLER DR6	FADD/Mort1 TRADD RAIDD/CRADD MADD RIP RIP2/RICK/ Cardiac RIP3	CASP-8 CASP-10 CASP-2 CASP-9 (CASP-1-4)	Bid Bim Bik/Nbk Hrk/DP5 Bik etc.	Inhibitoren Bcl-2 Bcl-x _L A1 Mcl-1 Bcl-w etc. Promotoren Bax Bak Bad etc.	Apaf-1 Nod1/ CARD4	CASP-9 CASP-3 CASP-6 CASP-7 CASP-8 CASP-10

Tabelle 1: Übersicht über die zueinander homologen Apoptose-Moleküle aus *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Mammalia*.

1986). Des weiteren konnte die Funktion von CED-4 zwischen der von CED-3 und CED-9 lokalisiert werden. CED-4 wirkt als Adapter zwischen dem Schutzprotein CED-9 und dem Effektor CED-3 (Shaham et al., 1996). So interagieren CED-3, CED-4 und CED-9 direkt miteinander, wobei CED-4 für die Aktivierung von CED-3 notwendig ist und CED-9 die Funktion von CED-4 blockieren kann (Chinnaiyan et al., 1997; Irmmler et al., 1997a; Seshagiri et al., 1997; Spector et al., 1997; Wu et al., 1997). Mit *egl-1* konnte eine weitere Komponente dieses Apoptoseprogramms identifiziert werden (Conradt et al., 1998). EGL-1 ist ein Apoptose induzierendes Protein, das mit CED-9 wechselwirken kann. *C. elegans* entwickelte sich zu

einem genetischen Modellorganismus für das Verständnis der Apoptosemaschinerie. Analoge Proteine zu CED-3, CED-4, CED-9 und EGL-1 konnten auch in Säugetieren identifiziert werden: CED-3 stellt eine Caspase dar, während CED-4 homolog zu dem Adapter Apaf-1 ist (Zou et al., 1997) und CED-9 und EGL-1 Homologien zu anti- bzw. proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie aufweisen (siehe unten).

Auch bei *Drosophila melanogaster* wurden homologe Proteine zu CED-3, CED-4, CED-9 und EGL-1 identifiziert. Die CED-3/Caspasen-Familie von *Drosophila melanogaster* umfaßt DCP-1 (Song et al., 1997), DCP-2/DREDD (Inohara et al., 1997; Chen et al., 1998), drICE (Fraser et al., 1997), DRONC (Dorstyn et al., 1999a) und DECAY (Dorstyn et al., 1999b). Dark/Dapaf-1/HAC-1 ist homolog zu CED-4/Apaf-1 (Rodriguez et al., 1999; Kanuka et al., 1999; Zhou et al., 1999a), und homolog zu CED-9/Bcl-2 sind Drob-1 und Debel (Igaki et al., 2000; Colussi et al., 2000). Darüber hinaus wurden mit *hid*, *grim* und *reaper* Apoptosegene bei *Drosophila melanogaster* identifiziert, für die bis heute keine homologen Gene bekannt sind (Abrams, 1999).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Apoptoseproteine bei Säugetieren, *C. elegans* und *Drosophila melanogaster*. Alle Apoptoseproteine aus *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* sind cytosolisch und an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt. Zusätzlich dazu gibt es bei Säugetieren eine Familie von Oberflächenrezeptoren, die Apoptosesignale von außen in die Zelle hinein vermitteln können. Diese Todesrezeptoren, die bei *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* bislang nicht identifiziert werden konnten, werden im folgenden Kapitel diskutiert.

3. Todesrezeptoren

Mit CD95 (APO-1/Fas) wurde 1989 zum ersten Mal ein Oberflächenmolekül beschrieben, das in der Lage ist, Apoptose auszulösen (Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989; Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992). CD95 ist ein differentiell glykosyliertes Typ I-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 42 - 52 kDa, welches in den meisten Säugetiergeweben exprimiert wird (Leithäuser et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Es gehört zur stetig wachsenden NGF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie (Smith et al., 1994; Baker et al., 1996). Charakteristisch für diese Familie ist das Vorhandensein von zwei bis sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen. Die biologischen Effekte, die von den Rezeptoren dieser Familie vermittelt werden, sind von hoher Diversität: Sie umfassen so verschiedene Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Aktivierung oder Apoptose (Smith et al., 1994). Abbildung 1 faßt die bisher identifizierten humanen Mitglieder der NGF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie zusammen.

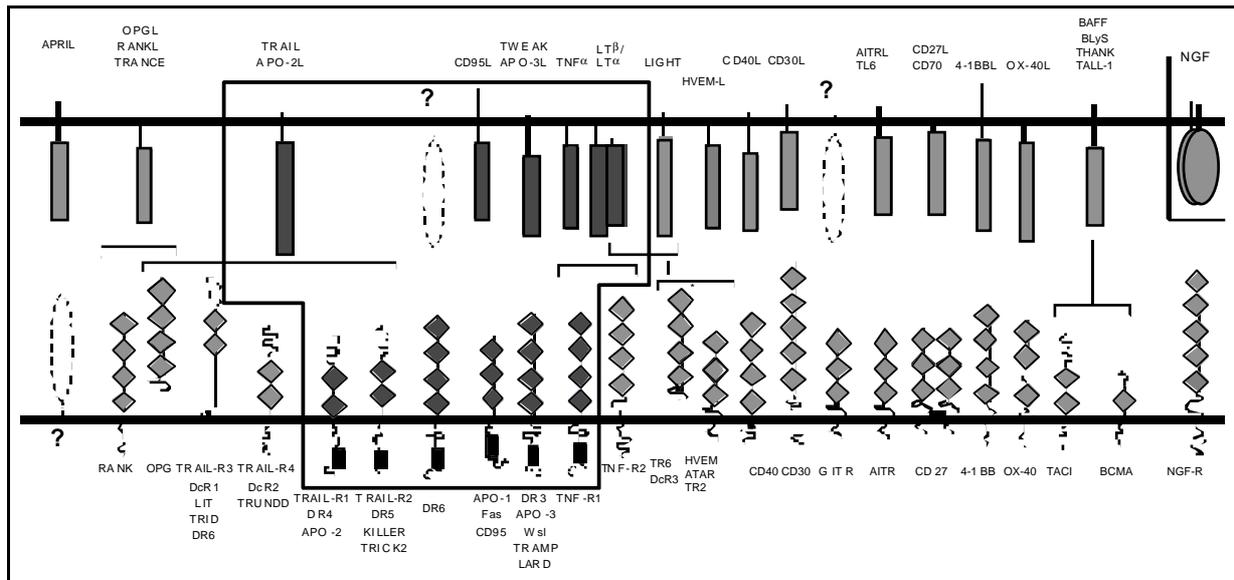


Abbildung 1: Die Interaktionen zwischen der TNF-Rezeptor Familie und der TNF Familie. Die Untergruppe der Todesrezeptoren ist in dunkelgrau gezeichnet. Die Todesdomäne ist durch ein schwarzes Rechteck dargestellt.

Eine Subfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren, ausgezeichnet durch die gemeinsame Eigenschaft, Apoptose auslösen zu können (Peter et al., 1998). Strukturell zeichnen sie sich durch eine ungefähr 80 Aminosäuren lange homologe intrazelluläre Domäne aus, die als Todesdomäne (engl.: death domain, DD) bezeichnet wird und für die Apoptoseinduktion essentiell ist (Tartaglia et al., 1993; Itoh et al., 1993a).

Todesrezeptoren wie CD95 und TNF-RI können durch agonistische Antikörper aktiviert werden. Unter physiologischen Bedingungen vollzieht sich die Aktivierung der Rezeptoren der NGF-/TNF-Rezeptorfamilie durch die Bindung spezifischer Liganden. Wie die Rezeptoren bilden auch die Liganden mit Ausnahme von NGF eine Familie, die TNF-Familie (siehe Abb. 1). Der Ligand von CD95, CD95L, ist ein glykosyliertes Typ II-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 40 kDa (Yu et al., 1999; Suda et al., 1994; Takahashi et al., 1994b). Im Gegensatz zu CD95 ist die Expression von CD95L auf aktivierte T-, B-, und NK-Zellen, sowie auf einige nichtlymphoide Organe wie Hoden (Yu et al., 1999) und die vordere Augenkammer beschränkt (Griffith et al., 1995). Ferner wurde die Expression in verschiedenen neoplastischen Zellen gezeigt (Strand et al., 1996; Hahne et al., 1996; O'Connell et al., 1996). Neben der membranständigen wurde auch eine lösliche Form von CD95L beschrieben, die durch die Aktivität einer Metalloprotease erzeugt wird (Tanaka et al., 1995; Mariani et al., 1995; Kayagaki et al., 1995). Die Funktion der beiden CD95L-Formen wird kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen schreiben dem löslichen CD95L Apoptose-auslösende Wirkung zu (Alderson et al., 1995; Brunner et al., 1995; Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995) Andere Studien dagegen zeigen, daß nur der membrangebundene CD95L Apoptose auslöst, während der lösliche CD95L inhibierend wirkt (Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998; Hohlbaum et al., 2000).

Die Interaktionen zwischen den Mitgliedern der TNF-/NGF-Rezeptorfamilie und den Liganden überschneiden sich teilweise. Beispielsweise bindet der Ligand TRAIL an fünf verschiedene Rezeptoren, und der TNF-Rezeptor I kann nicht nur mit TNF α , sondern auch mit dem LT α / β -Komplex wechselwirken. Diese Redundanz (siehe Abbildung 1) stellt ein wesentliches Problem des Verständnisses der wachsenden NGF-/TNF-Rezeptorfamilie dar.

4. Die Signaltransduktion von CD95

4.1 Rezeptortrimerisierung als auslösender Stimulus

Mit der Entdeckung von spezifischen Rezeptoren, die Apoptose auslösen können, war eine Grundlage geschaffen, um die zur Apoptose führenden Signalwege zu studieren. Erste Hinweise auf den Ursprung des Signals lieferte die Strukturanalyse des TNF-RI im Komplex mit LT α . Es konnte gezeigt werden, daß der Rezeptor nach Bindung des Liganden trimerisiert (Banner et al., 1993), wodurch das Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet wird. Auch TRAIL hat eine trimere Struktur (Cha et al., 1999), die dazu führt, daß der entsprechende Rezeptor, wie z.B. TRAIL-R2, durch Bindung des Liganden trimerisiert wird (Mongkolsapaya et al., 1999; Hymowitz et al., 1999). Vergleichende Modellstudien ergaben, daß CD95 und andere Familienmitglieder ebenfalls durch ihre trimerisierten Liganden in eine Dreierkonformation gezwungen werden können (Peitsch et al., 1995). Funktionelle Studien zeigten, daß ein CD95-Dimer keine Apoptose auslösen kann, wohingegen ein multimerisierter Rezeptor in der Lage ist, das apoptotische Signal in die Zelle weiterzuleiten (Dhein et al., 1992). Daraus kann geschlossen werden, daß eine Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors das erste Signal zur Apoptoseinduktion durch CD95 darstellt. Dies kann entweder durch die Bindung von CD95L oder eines agonistischen Antikörpers, wie zum Beispiel anti-APO-1 ausgelöst werden (Trauth et al., 1989). Anti-APO-1 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper des Isotyps IgG3, der sich gegen den extrazellulären Bereich von CD95 richtet, und mit der Bindung des Liganden konkurrieren kann. Aufgrund von Aggregationen des Antikörpers über den konstanten Teil der schweren Kette bilden sich Multimere mit mehr als zwei Bindungsstellen für CD95, was nach Bindung des Antikörpers zu einer Kreuzvernetzung des Rezeptors und zur Auslösung von Apoptose führt (Dhein et al., 1992). Die Verwendung eines solchen agonistischen Antikörpers hat die Möglichkeit eröffnet, biochemische Analysen des Rezeptors durchzuführen (Kischkel et al., 1995).

4.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex

Die Aggregation der Todesdomäne nach Stimulation von CD95 ist essentiell für die Übermittlung des apoptotischen Signals (Itoh et al., 1993a; Huang et al., 1996). Da der intrazelluläre Teil von CD95 keinerlei enzymatische Funktion aufweist, muß das Signal durch rezeptorassoziierte Moleküle übertragen werden. Die Identifizierung von Proteinen, die stimulationsabhängig nur an kreuzvernetztes CD95 binden, hat dieses Konzept bestätigt (Kischkel et al., 1995). So konnten verschiedene Proteine mit dem stimulierten CD95 coimmunpräzipitiert werden, während keine Assoziation dieser Proteine mit dem monomeren Rezeptor nachzuweisen war. Diese Proteine erhielten zunächst den Namen CAP, für cytotoxicity-dependent APO-1-associated proteins. Initial wurden vier verschiedene Proteine (CAP1-4) auf einem zweidimensionalen Gel identifiziert (Kischkel et al., 1995). Der Komplex zwischen aktiviertem CD95 und den assoziierten Signalmolekülen wurde Tod-induzierender Signalkomplex genannt (engl.: death-inducing signaling complex, DISC) (siehe Abbildung 2).

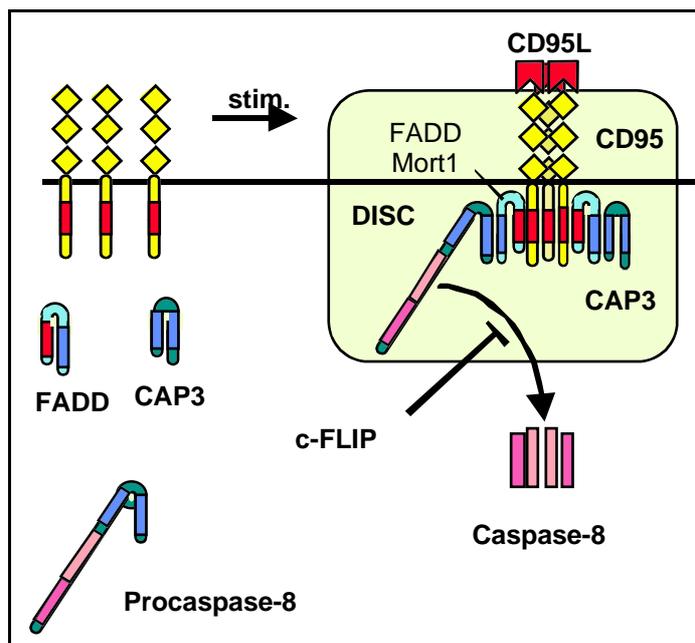


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CD95-DISC-Bildung. Der CD95-Ligand ist in der Lage, CD95 zu oligomerisieren. Dies führt zu der Anlagerung von FADD, CAP3 und Caspase-8 an die intrazelluläre Todesdomäne von CD95. Die Aktivierung von Caspase-8 kann durch c-FLIP inhibiert werden.

Die Bildung des DISC ist - wie die Signaltransduktion - von einer intakten Todesdomäne abhängig (Kischkel et al., 1995). Damit war eine erste Korrelation zwischen der Bildung des DISC und der Übertragung des apoptotischen Signals gefunden. CAP1 und CAP2 sind identisch mit dem Adaptermolekül FADD/Mort1 in phosphoryliertem bzw. nichtphosphoryliertem Zustand (Kischkel et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995). FADD besitzt ebenfalls eine Todesdomäne, die sich am C-Terminus des Moleküls befindet. Über diese Domäne assoziiert FADD mit der Todesdomäne des stimulierten CD95, übt aber selbst keinerlei enzymatische Funktion aus, sondern ist für die Bindung weiterer Effektormoleküle (CAP3 und CAP4) an den DISC verantwortlich.

Für diese Rekrutierung ist der N-terminale Bereich des Moleküls wichtig (Chinnaiyan et al., 1996c). So konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden, daß die Todesdomäne von FADD ohne den N-Terminus (FADD-DN, für FADD-dominant negativ) in

CD95-assoziiertes Molekül	Referenz
RIP	(Stanger et al., 1995)
DAXX	(Yang et al., 1997b)
FAF1	(Chu et al., 1995)
UBC-FAP (UBC9)	(Wright et al., 1996)
FAP-1	(Sato et al., 1995)
Sentrin	(Okura et al., 1996)
FLASH	(Imai et al., 1999)

Tabelle 2: CD95-assoziierte Moleküle

Terminus nicht in der Lage ist, weitere Signalmoleküle zu rekrutieren, bricht die Signalkette ab, und es wird keine Apoptose ausgelöst. Überexpression des N-Terminus von FADD kann ohne einen weiteren Stimulus Apoptose auslösen. Daher wurde dieser Bereich Todeseffektor-Domäne (engl.: death effector domain, DED) genannt (Chinnaiyan et al., 1995) Die Eigenschaft der DED von FADD, Apoptose auszulösen, fällt also mit der Fähigkeit, CAP3 und CAP4 an den DISC zu rekrutieren, zusammen.

Mit CAP4 wurde ein Molekül kloniert, das am N-Terminus zwei DEDs enthält (Muzio et al., 1996). Dies läßt den Schluß zu, daß die DED ebenso wie die DD eine Proteininteraktionsdomäne darstellt. Strukturanalysen ergaben, daß beide Strukturen aus sechs antiparallel angeordneten Alphahelices bestehen (Huang et al., 1996; Eberstadt et al., 1998; Jeong et al., 1999). Jedoch beruht die DD-Interaktion auf elektrostatischen Wechselwirkungen, während die DED-Interaktion auf hydrophobe Wechselwirkungen angewiesen ist. Mit CAP4 wurde die erste Komponente des DISC identifiziert, die enzymatische Aktivität besitzt. Aufgrund der Homologie zur Proteasenfamilie der Caspasen (Alnemri et al., 1996), die früher auch ICE-ähnliche Proteasen genannt wurden, wurde CAP4 FLICE genannt, was für FADD-like ICE steht (Muzio et al., 1996). Weitere Namen für dieses Molekül sind MACH (Boldin et al., 1996) und MCH5 (Fernandes-Alnemri et al., 1996) Die offizielle Nomenklatur sieht Caspase-8 als Namen vor (Alnemri et al., 1996). Von CAP3 wurden bisher nur Sequenzinformationen über 2 Peptide erhalten (Muzio et al., 1996). Diese Sequenzen sind identisch mit den Peptiden, die vom N-Terminus von CAP4 (Caspase-8) sequenziert wurden. Dies legt nahe, daß CAP3 den N-Terminus von Caspase-8 enthält, wobei die Funktion dieses Moleküls noch unklar ist.

Neben den Molekülen, die an den CD95-DISC rekrutiert werden, gibt es noch ein Reihe weiterer Proteine, für die eine Assoziation mit CD95 gezeigt wurde, deren Bedeutung für die CD95-Signaltransduktion allerdings kontrovers diskutiert wird (Krammer, 1999) (siehe Tabelle 2). So wurde RIP mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als CD95-interagierendes Protein gefunden (Stanger et al. 1995). RIP-defiziente Zellen zeigten jedoch, daß RIP keine essentielle Rolle bei CD95-vermittelter Apoptose spielt (Ting et al., 1996; Kelliher et al., 1998). Dagegen waren die Zellen sensitiver gegenüber TNF-vermittelter Apoptose und waren darüber hinaus nicht in der Lage, NF- κ B nach TNF-Stimulation zu aktivieren (Ting et al., 1996; Kelliher et al., 1998). Dies deutete auf eine Rolle für RIP in der TNF-vermittelten NF- κ B-Aktivierung hin. In der Tat wird RIP nach Stimulation von TNF-RI in den Rezeptorkomplex rekrutiert (Hsu et al.,

der Lage ist, nach Überexpression Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose zu schützen. Dies geschieht durch eine Kompetition der Mutante mit endogenem FADD um die Bindung an den DISC. Da die Mutante durch den fehlenden N-

1996a). RIP kann seinerseits den I κ B-Kinase-Komplex (IKK) an TNF-RI rekrutieren (Devin et al., 2000; Zhang et al., 2000).

Ebenfalls über das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde DAXX als CD95-interagierendes Protein kloniert (Yang et al., 1997b). DAXX soll über ASK1 c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) aktivieren und Apoptose auslösen (Yang et al., 1997b; Chang et al., 1998). Jedoch ist CD95-vermittelte Apoptose in DAXX defizienten Zellen nicht beeinträchtigt (Michaelson et al., 1999). In der Tat konnte endogenes DAXX nie im CD95-DISC nachgewiesen werden, vielmehr besitzt das Protein eine nukleäre Lokalisation (Pluta et al., 1998; Michaelson et al., 1999; Torii et al., 1999). Neuere Studien weisen darauf hin, daß DAXX im Zellkern an der Regulation der Transkription während der Apoptose beteiligt ist (Torii et al., 1999; Li et al., 2000; Zhong et al., 2000).

Ein weiteres, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziertes Protein, das mit dem CD95-DISC interagieren soll, ist FLASH (Imai et al., 1999). FLASH verstärkt Rekrutierung und Prozessierung von Caspase-8. Die zunächst berichtete Homologie zu Apaf-1/CED-4 konnte nach einer gründlichen Analyse der Primärstrukturen nicht mehr aufrecht erhalten werden (Koonin et al., 1999).

4.3 Die Caspasen-Familie

Die Klonierung des *C.elegans* Gens *ced-3* ergab, daß CED-3 Homologie zu der menschlichen Protease ICE aufweist (Yuan et al., 1993). Dies war der erste Hinweis, daß Proteasen bei der Induktion von Apoptose beteiligt sind. Bis heute sind 14 verschiedene ICE-homologe Proteasen aus Mensch und Maus identifiziert worden, die sich in verschiedene Gruppen aufteilen (Abbildung 2). Aufgrund eines Cysteins im aktiven Zentrum und der besonderen Spezifität dieser Proteasen, nach einem Aspartat zu spalten, wurden sie Caspasen (Cystein Aspartasen) genannt (Alnemri et al., 1996). Caspasen werden als inaktive Vorstufen, also als Zymogene, synthetisiert. Die Aktivierung der Caspasen geschieht durch proteolytische Spaltung nach definierten Aspartatresten, was zur Freisetzung einer großen und einer kleinen aktiven Untereinheit führt (Abbildung 2). Die große Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum. Analysen der Kristallstruktur von Caspase-1, Caspase-3 und Caspase-8 ergaben, daß das aktive Enzym aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten in Form eines $\alpha_2\beta_2$ Heterotetramers aufgebaut ist (Wilson et al., 1994; Walker et al., 1994; Rotonda et al., 1996; Mittl et al., 1997; Blanchard et al., 1999; Watt et al., 1999).

Die Aktivierung von Caspasen wurde für eine Vielzahl apoptotischer Stimuli beschrieben. Darüber hinaus ist Granzym B, eine Serinprotease ebenfalls mit Spezifität für Aspartat, die cytotoxische T-Lymphozyten als Effektormolekül einsetzen, in der Lage, Caspasen zu aktivieren (Medema et al., 1997; Froelich et al., 1998).

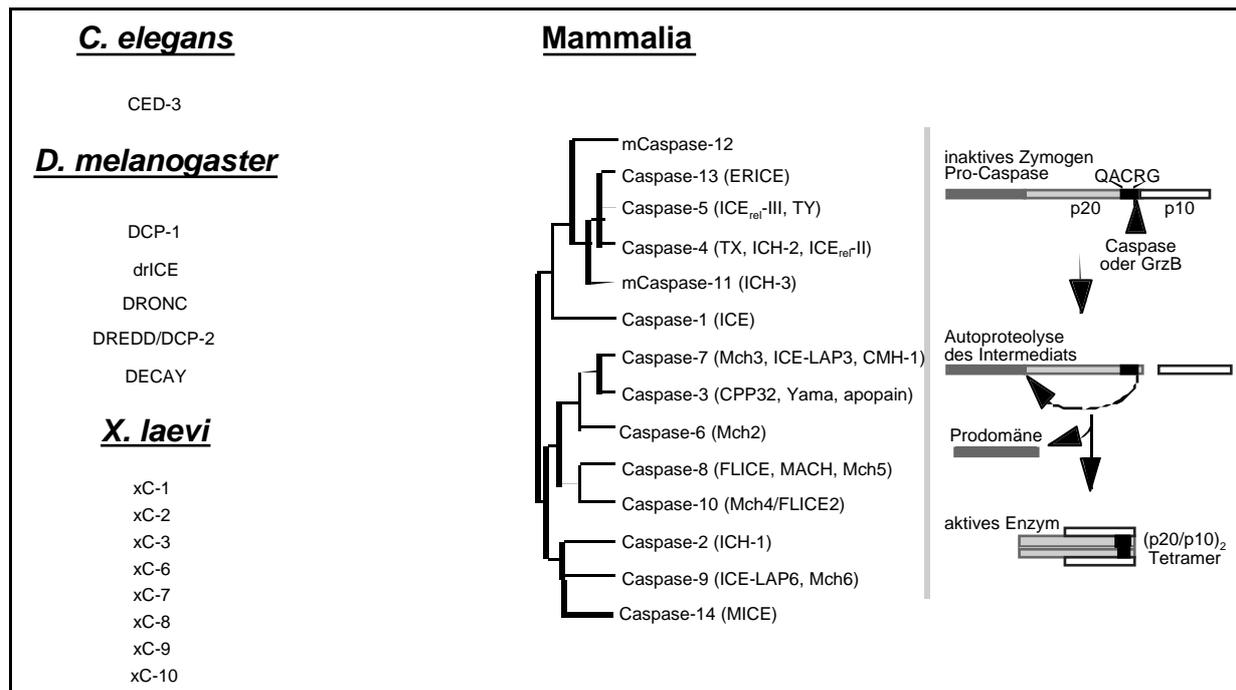


Abbildung 3: Die Familie der Caspasen. Links: Darstellung der bekannten Caspasen in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevi*. Mitte: Darstellung der bekannten Mitglieder der Säugetier-Caspasen Familie gemäß ihrer aus der Ähnlichkeit abgeleiteten Verwandtschaft. Rechts: Allgemeines Aktivierungsschema der Caspasen. Die Spaltung zwischen der großen und der kleinen Untereinheit führt zur autoproteolytischen Freisetzung der Prodomäne und zur Bildung des aktiven Enzyms. GrzB, Granzym B.

Die Inhibition von Caspasen blockiert Apoptose. Sie nehmen daher eine wesentliche Rolle in der Apoptose ein. Mit der Identifizierung von Caspase-8 war zum ersten Mal die Verbindung zwischen Todesrezeptoren und Caspasen hergestellt. Bisher war es jedoch noch nicht gelungen, eine einzelne Caspase als essentiellen Teil der Apoptosemaschinerie zu identifizieren. Obwohl berichtet wurde, daß Thymozyten von Caspase-1-defizienten Mäusen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose seien (Kuida et al., 1995), konnte dieses Ergebnis nicht eindeutig reproduziert werden (Li et al., 1995; Smith et al., 1997). Auf ähnliche Weise zeigen Caspase-3-defiziente Mäuse in einer Studie keinen generellen Apoptosedefekt (Kuida et al., 1996), während andere Studien zeigten, daß in diesen Mäusen Apoptose in T-Zellen, Fibroblasten und Hepatozyten durch Fehlen von Caspase-3 stark beeinträchtigt ist (Woo et al., 1998; Woo et al., 1999). Dies verdeutlicht, daß aufgrund der großen Anzahl von Caspasen eine gewisse Redundanz auf der Effektorebene besteht, so daß eine Caspase das Fehlen einer anderen Caspase ausgleichen kann. Im Gegensatz dazu spielt Caspase-8 als Bindeglied zwischen Todesrezeptoren und Effektorcaspasen eine essentielle Rolle, da Caspase-8-defiziente Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Varfolomeev et al., 1998a; Juo et al., 1998).

Durch die Aktivierung von Caspasen wird eine Vielzahl von Proteinen während der Apoptose gespalten. Die Liste der sogenannten Todessubstrate wächst stetig. So können Caspasen zum Beispiel andere Caspasen spalten und dadurch aktivieren, was zu einer Kaskade von

Caspasenaktivierung führt. Die Todessubstrate lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 3): Gruppe I umfaßt Proteine für DNA-Reparatur und Splicing von mRNA, die durch die Spaltung inaktiviert werden. Die apoptotische Zelle kann damit energieverbrauchende und unwichtig gewordene Prozesse abschalten. Auch Signalmoleküle (Gruppe II) werden gespalten und dadurch häufig aktiviert, aber auch inaktiviert. Eine weitere Gruppe (III) stellen Strukturproteine der Zelle dar. Deren Spaltung könnte für die Veränderungen der Membranintegrität und die Bildung apoptotischer Körperchen verantwortlich sein. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Todessubstraten, deren Funktion bei der Apoptose noch unklar ist.

Gruppe	Substrat	Referenz
I	PARP	(Lazebnik et al., 1994)
	DNA-PK	(Casciola-Rosen et al., 1995)
	U1-70kDa	(Casciola-Rosen et al., 1994)
	C1 und C2	(Waterhouse et al., 1996)
II	PKC δ	(Ghayur et al., 1996)
	PAK2	(Rudel et al., 1997)
	SREBP-1, SREBP-2	(Pai et al., 1996) (Wang et al., 1995)
	cPLA $_2$	(Wissing et al., 1997)
	PITSLRE kinase α 2-1	(Beyaert et al., 1997)
III	Lamin A und B	(Orth et al., 1996) (Neamati et al., 1995) (Zhivotovsky et al., 1997)
	Fodrin	(Cryns et al., 1996) (Martin et al., 1995)
	Gas2	(Brancolini et al., 1995)
	Plectin	(Stegh et al., 1998a)

Tabelle 3: Eine Auswahl der "Todessubstrate"

Ein Todessubstrat scheint unmittelbar mit einer morphologischen Veränderung während der Apoptose verbunden zu sein. So ist die Spaltung eines heterodimeren Proteinkomplexes für die charakteristische DNA Fragmentierung verantwortlich. Dieser Komplex besteht aus einer Nuklease (DFF40, CAD, CPAN) (Halenbeck et al., 1998; Enari et al., 1998), die nur zusammen mit ihrem Inhibitor (DFF45, ICAD) (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998), der in zwei Splicevarianten auftreten kann, in einer aktiven Konformation synthetisiert wird. Dies liegt darin begründet, daß DFF45/ICAD_L zusätzlich zur Inhibitorfunktion auch als Chaperon wirkt. Dagegen kann die kurze Spliceform, DFF35/ICAD_S, die Nuklease nur inhibieren, nicht aber als Chaperon wirken (Gu et al., 1999; Sakahira et al., 2000). Durch die Komplexierung mit dem Inhibitor wird die Nuklease trotz eines nuklearen Translokationssignals in einem inaktiven Zustand im Cytoplasma zurückgehalten. Der Inhibitor kann jedoch durch Caspase-3 und -7 gespalten und inaktiviert werden, worauf die Nuklease aus dem Komplex entlassen wird und die DNA im Kern fragmentieren kann (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998; Liu et al., 1999). Somit steht die Caspasenaktivität mit der Induktion der DNA-Fragmentierung in direktem Zusammenhang.

Auch die Translokation von DEDD (Death-effector-domain-containing DNA-binding protein) in den Zellkern geschieht in Abhängigkeit der Caspasenaktivität (Stegh et al., 1998). Im Kern ist DEDD in den Nucleoli lokalisiert, wo es die Transkription der ribosomalen DNA inhibieren soll.

Ein Todessubstrat scheint unmittelbar mit einer morphologischen Veränderung während der Apoptose verbunden zu sein. So ist die Spaltung eines heterodimeren Proteinkomplexes für die charakteristische DNA Fragmentierung verantwortlich. Dieser Komplex besteht aus einer Nuklease (DFF40, CAD, CPAN) (Halenbeck et al., 1998; Enari et al., 1998), die nur zusammen mit ihrem Inhibitor (DFF45, ICAD) (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998), der in zwei Splicevarianten auftreten kann, in einer aktiven Konformation synthetisiert wird. Dies liegt darin begründet, daß DFF45/ICAD_L zusätzlich zur Inhibitorfunktion auch als Chaperon wirkt. Dagegen kann die kurze Spliceform, DFF35/ICAD_S,

Berichte über einen direkten Zusammenhang von Caspasenaktivität mit bestimmten Krankheitsbildern liegen seit kurzem für Alzheimer und Caspase-3 (Gervais et al., 1999) sowie Chorea Huntington und Caspase-1 vor (Ona et al., 1999). Außerdem konnten bei bestimmten Patienten mit Autoimmun-Lymphoproliferativem Syndrom (ALPS) Mutationen in *caspase-10* gefunden werden (Wang et al., 1999).

4.4 Die Bcl-2-Familie

Eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose spielen die Proteine der Bcl-2-Familie, deren Namensgeber als das Onkogen *bcl-2* identifiziert wurde, welches als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist (Tsujimoto et al., 1985). Im Gegensatz zu anderen Onkogenen besteht die Funktion von Bcl-2 nicht darin, Proliferation zu stimulieren, sondern Zellen vor Apoptose zu schützen (Vaux et al., 1988; Hockenbery et al., 1990). Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine umfaßt anti-apoptotische Moleküle (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) und Moleküle, die Apoptose auslösen oder verstärken können (Bax, Bak, Bcl-x_S, Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk, Bok) (Gross et al., 1999a; Vander Heiden et al., 1999). Die evolutionär konservierte Funktion von Bcl-2 wird durch die Entdeckung unterstrichen, daß CED-9 aus *C. elegans* und Bcl-2 sowohl homologe Proteine, als auch funktionell austauschbar sind (Hengartner et al., 1994). Ebenso weist das *C.elegans* Protein EGL-1 Homologien mit den pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern wie Bik, Bid oder Bad auf (Conradt et al., 1998). Obwohl bisher viele Funktionen für Bcl-2 beschrieben sind, ist der Mechanismus der anti-apoptotischen Wirkung dieses Proteins bisher unverstanden. Bcl-2 besitzt eine Transmembrandomäne am C-Terminus, die zu einer Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, die Kernmembran und das Endoplasmatische Retikulum führt (Monaghan et al., 1992; Jacobson et al., 1993; Krajewski et al., 1993). Durch Deletion dieser Domäne verliert Bcl-2 weitgehend seine anti-apoptotische Wirkung (Tanaka et al., 1993).

Die Proteine der Bcl-2-Familie können miteinander interagieren (Gross et al., 1999a). Die Signifikanz der Dimerisierung ist bis heute noch unklar. Strukturanalysen von Bcl-x_L und Bid ließen eine Ähnlichkeit mit porenbildenden bakteriellen Toxinen erkennen (Muchmore et al., 1996; Parker et al., 1993; Chou et al., 1999; McDonnell et al., 1999). Eine porenbildende Aktivität in künstlichen Membranen wurde für Bcl-2, Bcl-x_L, Bax und Bid gezeigt (Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997; Antonsson et al., 1997; Schendel et al., 1999). Die Verbindung zwischen dieser Funktion von Bcl-2 und der Inhibition von Apoptose ist allerdings weitgehend unverstanden. Daß die Porenbildung und die Heterodimerisierung in der Regulation der Apoptose in unabhängigen Mechanismen eine Rolle spielen, wurde für Bcl-x_L berichtet (Minn et al., 1999).

Obwohl Bcl-2 ein sehr genereller Inhibitor von Apoptose ist, gibt es widersprüchliche Berichte über seine Fähigkeit, CD95-vermittelte Apoptose zu inhibieren. Berichte reichen von

Inhibition (Jäättelä et al., 1995; Takayama et al., 1995; Armstrong et al., 1996; Lee et al., 1996; Mandal et al., 1996; Vander Heiden et al., 1997) über einen partiellen Effekt (Itoh et al., 1993b; Memon et al., 1995; Boise et al., 1997) bis hin zu keiner beobachteten Wirkung von Bcl-2 auf CD95-vermittelte Apoptose (Chiu et al., 1995; Memon et al., 1995; Strasser et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1996b; Moreno et al., 1996; Huang et al., 1997; Susin et al., 1997).

4.5 Die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose

Neuere Studien haben Mitochondrien zu einem zentralen Bestandteil der Apoptose gemacht (Kroemer et al., 1997). So kann während der Apoptose ein Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) noch vor der DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Petit et al., 1995; Zamzami et al., 1995). Dieser Verlust von $\Delta\Psi_m$ ist nach nahezu allen Apoptosestimuli zu beobachten und stellt daher ein universelles Ereignis dar (Kroemer et al., 1997). Verursacht wird dieser Abfall des Transmembranpotentials durch einen Vorgang, den man Permeabilitäts-Transition (PT) nennt und der durch das Öffnen von Poren der inneren Mitochondrienmembran gekennzeichnet ist (Bernardi et al., 1994). Diese Poren sind permeabel für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ca. 1500 Da. Die molekulare Zusammensetzung der PT-Poren ist noch nicht vollständig bekannt, doch wurde eine Beteiligung von Hexokinase, Cyclophilin D, dem Adeninnukleotid-Translokator (ANT), sowie dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) gezeigt (Kroemer et al., 1997). Eine Blockierung der PT-Bildung inhibiert verschiedene Formen der Apoptose (Kroemer et al., 1997; Petit et al., 1996). Mit AIF (für *apoptosis inducing factor*) konnte ein Faktor aus dem Intermembranraum von Mitochondrien isoliert werden, der in den Kern transloziert und dort DNA-Kondensation und DNA-Fragmente von 50 kbp induziert (Susin et al., 1999b; Susin et al., 1996). Ferner verursacht AIF die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran. Diese Apoptosecharakteristika werden von AIF Caspase-unabhängig ausgelöst (Susin et al., 1999b; Daugas et al., 2000). Darüber hinaus ist die Translokation in den Kern unabhängig von ATP, so daß dies auch beim nekrotischen Tod auftreten kann (Daugas et al., 2000). Neben AIF enthält der Intermembranraum von Mitochondrien auch die Caspasen-3 und -9, sowie eine DNase-Aktivität (Susin et al., 1999a).

Ein weiterer Faktor, der von apoptotischen Mitochondrien freigesetzt wird, ist Cytochrom *c* (Liu et al., 1996). Dies ist ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, der Elektronen von der Cytochrom *c*-Reduktase auf die Cytochrom *c*-Oxidase überträgt. Cytochrom *c* ist mit der inneren Mitochondrienmembran auf der Seite des Intermembranspalts assoziiert. Das Cytochrom *c*-Apoprotein, das nicht proapoptotisch wirkt, wird im Cytoplasma synthetisiert und gelangt über einen speziellen Mechanismus in die Mitochondrien, wo es seine Hämgruppe erhält und zum komplett gefalteten Holocytochrom *c* wird. Dieses Holoprotein

kann unter normalen Umständen den Intermembranspalt nicht mehr verlassen. Ins Cytoplasma freigesetzt, trägt Cytochrom *c* zur Caspasenaktivierung bei. Für seine Freisetzung werden zwei verschiedene Modelle diskutiert: Eines, untersucht an rekonstituierten PT-Poren in Liposomen, postuliert einen Einstrom von Wasser und kleinen Molekülen nach Öffnung der PT-Pore. Dieser führt zur Schwellung und anschließenden Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran, so daß Cytochrom *c* freigesetzt wird (Marzo et al., 1998b).

Mit der Regulation dieses Prozesses konnte den Mitgliedern der Bcl-2-Familie eine neue Rolle in der Regulation der Apoptose zugewiesen werden: So sind die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder in der Lage, PT-Bildung und die Freisetzung von AIF und Cytochrom *c* aus Mitochondrien zu inhibieren (Susin et al., 1996; Susin et al., 1997; Zamzami et al., 1996; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997a). Die Grundlage für den Bcl-2-vermittelten, generellen Schutz von Mitochondrien vor apoptotischen Veränderungen ist noch unklar. Jedoch könnte die Fähigkeit von Bcl-2 und Bcl-x_L, Poren in Membranen zu bilden, und die teilweise Lokalisation dieser Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran mit dieser Funktion verknüpft sein (Zamzami et al., 1998). Für das proapoptotische Familienmitglied Bax konnte eine direkte Interaktion mit dem an der PT-Porenbildung beteiligten ANT nachgewiesen werden, die als essentiell für die PT-Bildung postuliert wird (Marzo et al., 1998a). Das zweite Modell der Freisetzung von Cytochrom *c* basiert ebenfalls auf der direkten Interaktion von Bcl-2-Familienmitgliedern mit einem Molekül der PT-Pore: VDAC. Der Nachweis direkter Interaktion von Bax/Bak/Bcl-x_L mit VDAC und die Fähigkeit von Bax/Bak-VDAC-Komplexen, Cytochrom *c* in Liposomen aufzunehmen, führte zu der Hypothese, daß Bax/Bak in der Lage seien, VDAC zu modulieren. Durch diese Modulation soll eine Freisetzung von Cytochrom *c* ohne die Zerstörung der Mitochondrienmembran möglich sein (Shimizu et al., 1999).

Der Mechanismus der Cytochrom *c*-induzierten Caspasenaktivierung wurde mittels zellfreier Systeme aufgeklärt und führte zu der Identifizierung des menschlichen CED-4-Homologs Apaf-1 (Zou et al., 1997). Cytochrom *c* bindet an Apaf-1, welches unter Verbrauch von ATP mit Caspase-9 über die an beiden Molekülen vorhandenen Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD) assoziiert (Li et al., 1997; Qin et al., 1999). Die CARD-Domäne besitzt eine ähnliche Struktur wie die DD und die DED 43,463,859}. Die Assoziation von Caspase-9 und Apaf-1 führt zu der autoproteolytischen Aktivierung von Caspase-9 (Srinivasula et al., 1998), was die Aktivierung weiterer Caspasen, wie z. B. Caspase-3, zur Folge hat und letztlich über die Spaltung von DFF45/ICAD zur DNA-Fragmentierung führt. Neuere Untersuchungen zeigen, daß Caspase-9 auch ohne Proteolyse aktiv sein kann (Stennicke et al., 1999) und vermutlich nur in einem hochmolekularen Komplex mit Apaf-1 aktiv ist (Rodriguez et al., 1999).

Eine weitere mögliche Funktion von Bcl-2 wurde aus Studien mit den homologen *C.elegans* Proteinen abgeleitet. So ist CED-9, das Bcl-2-Homologe, in der Lage, an CED-4, das Apaf-1-Homologe, zu binden (Spector et al., 1997). Des weiteren wurde gezeigt, daß CED-4 auch mit CED-3, dem Caspase-Homologen, assoziieren kann (Irmeler et al., 1997a). Schließ-

lich wurden diese Interaktionen auch auf das menschliche System ausgeweitet, und *in vitro* eine direkte Assoziation zwischen Bcl-x_L, CED4/Apaf-1 und verschiedenen Caspasen gezeigt (Chinnaiyan et al., 1997; Pan et al., 1998; Hu et al., 1998). In dem sich daraus ergebenden Modell würde Bcl-x_L über die Wechselwirkung mit Apaf-1 die Aktivierung von Caspase-9 durch Apaf-1 verhindern. Das proapoptotische Molekül Bax ist in der Lage, Bcl-x_L aus dem Komplex mit Apaf-1 und Caspase-9 zu lösen (Chinnaiyan et al., 1997), was dann zu einer Aktivierung von Caspase-9 durch Apaf-1 und somit zur Apoptose führen würde. Jedoch berücksichtigt dieses Modell nicht die Notwendigkeit der Cytochrom *c*-Bindung für die Aktivierung von Apaf-1. Ferner sind diese Interaktionen nur durch transiente Überexpression der Bindungspartner bestimmt worden und konnten *in vivo* nicht bestätigt werden (Moriishi et al., 1999). Mit Hilfe eines zellfreien Systems konnte weiterhin gezeigt werden, daß Bcl-x_L und Apaf-1 zwar miteinander interagieren können, wenn beide Proteine in ausreichend hohen Konzentrationen vorliegen, daß die Funktion von Apaf-1 aber nicht durch Bcl-x_L inhibiert wird (Newmeyer et al., 2000). Somit scheinen Apaf-1 und Bcl-x_L in Säugetieren nicht exakt die gleichen Funktionen zu haben wie CED-4 und CED-9 in *C. elegans*.

4.6 Zwei CD95-Signalwege

Wie oben dargestellt, wird die Rolle von Bcl-2 in der Regulation der CD95-vermittelten Apoptose kontrovers diskutiert. Auch bezüglich der DISC-Bildung im allgemeinen, sowie des Einflusses von Ceramid auf die Signaltransduktion von CD95 liegt kein klares Bild vor. Eine Annäherung an die Auflösung dieser Widersprüche gelang durch die Identifikation zweier CD95-Signalwege, die in jeweils unterschiedlichen Zelltypen zum Tragen kommen (Scaffidi et al., 1998).

In Typ II-Zellen führt eine geringe DISC-Bildung zu einer geringen Mengen aktiver Caspase-8. Diese spaltet das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid, wodurch ein 15 kDa großes Spaltprodukt entsteht, das zu den Mitochondrien transloziert und die Freisetzung von Cytochrom *c* über einen bislang unbekanntem Mechanismus auslöst (Gross et al., 1999b; Luo et al., 1998; Li et al., 1998; Han et al., 1999). Dies führt zur Aktivierung eines mitochondrien-abhängigen Signalweges, der durch Bcl-2 oder Bcl-x_L inhibiert werden kann. Wie sein *C. elegans* Homologes EGL-1 initiiert Bid die evolutionär konservierte Apoptosemaschinerie.

In Typ I-Zellen führt eine massive DISC-Bildung zu großen Mengen aktiver Caspase-8. Diese löst direkt eine Caspasenkaskade aus, indem Effektorcaspasen wie Caspase-3 direkt proteolytisch gespalten und damit aktiviert werden. Dieser Signalweg umgeht die Mitochondrien und wird folglich nicht durch Bcl-2 inhibiert. Zwar werden auch in Typ I-Zellen Mitochondrien während der Apoptose aktiviert, allerdings sind Typ I-Zellen durch die direkte Caspasekaskade unabhängig vom evolutionär konservierten Apoptosesignalweg (siehe Abb. 4).

Es konnte gezeigt werden, daß einige apoptoseauslösende oder -inhibierende Stimuli, wie z.B. C_2 -Ceramid, nur in Typ II-Zellen einen Effekt zeigen und daher vermutlich auf mitochondrialer Ebene wirken (Scaffidi et al., 1999b). Die Untersuchung der Rolle von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung ergab ferner eine Verstärkung der CD95-induzierten Apoptose nur in bestimmten Zelllinien, die sich dem Typ II zuordnen lassen (Linsinger et al., 1999).

4.7 Die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren

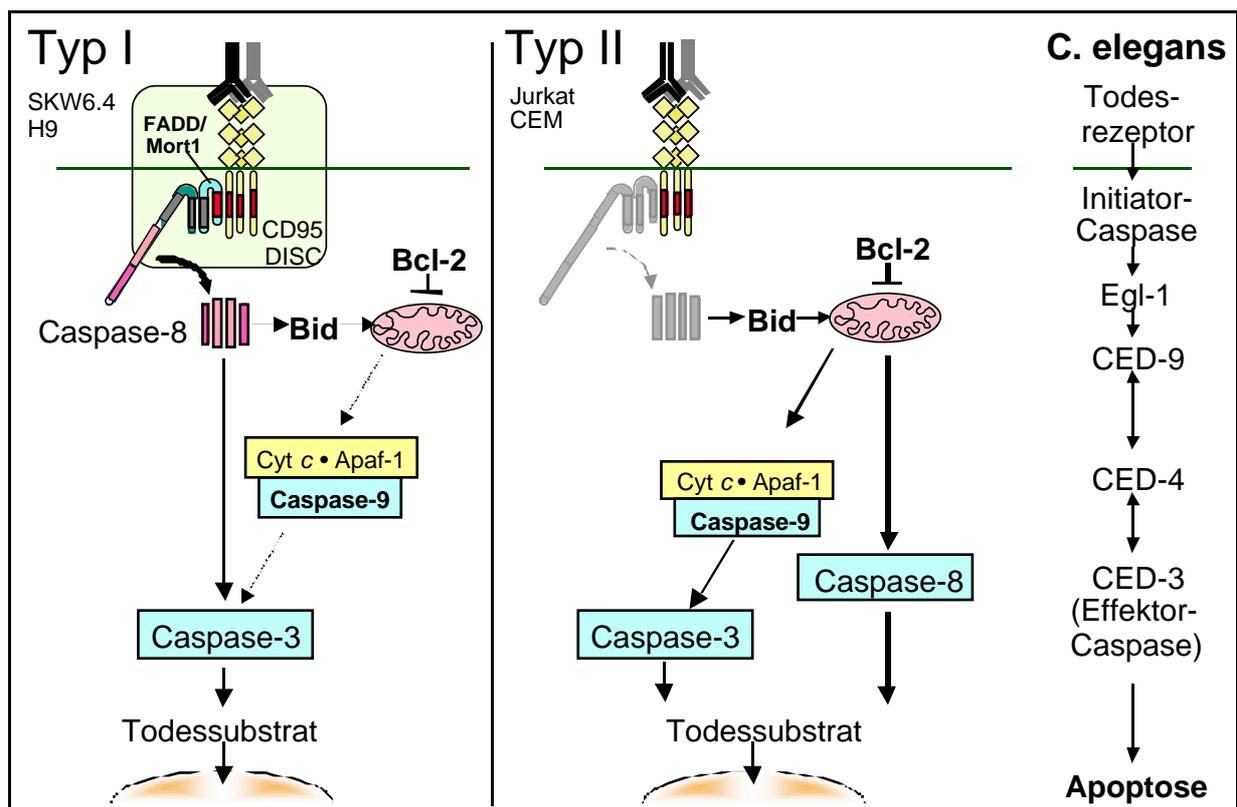


Abbildung 4: Die zwei CD95-Signaltransduktionswege. Schematische Übersicht über die CD95-Signalwege in Typ I- und Typ II-Zellen. Siehe Text für weitere Erläuterungen.

Die biologische Funktion des TNF/TNF-Rezeptor-Systems ist komplexer und weniger gut definiert als die des CD95/CD95L-Systems, da zwei verschiedene Liganden ($TNF\alpha$ und $LT\alpha$) an zwei Rezeptoren (TNF-RI (CD120a) und TNF-RII (CD120b)) binden können (Peter et al., 1998). Ferner haben lösliches (sTNF) und membranständiges (m)TNF unterschiedliche Affinitäten gegenüber beiden Rezeptoren (Wallach et al., 1999). TNF ruft ein weites Spektrum zellulärer Reaktionen wie die Induktion von Cytokinen, Proliferation, Differenzierung und Apoptose hervor. Demgemäß werden, verglichen mit CD95/CD95L-System, von diesem System auch Signaltransduktionswege größerer Diversität aktiviert (Tracey et al., 1993;

Vandenabeele et al., 1995). Diese umfassen unter anderem die drei bekannten MAP-Kinase-Wege, die Induktion von NF- κ B, sowie die Aktivierung von Caspasen (Wallach et al., 1999). Die Diversität der Signalwege spiegelt sich auch auf der Ebene der Adaptormoleküle wider. So soll TRADD den TNF-RI an FADD und Caspase-8 koppeln (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996b). Obwohl bisher noch keine direkte Assoziation von FADD mit TNF-RI beobachtet werden konnte, blockiert dominant negatives FADD (bestehend nur aus der Todesdomäne, DD) als auch inaktive Caspase-8 neben CD95 auch die Signaltransduktion von TNF-RI (Boldin et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996c). Darüber hinaus sind Zellen, die defizient für FADD oder Caspase-8 sind, resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose (Varfolomeev et al., 1998a; Juo et al., 1998; Juo et al., 1999). MADD, ein DD-enhaltendes Adaptormolekül mit Homologie zu Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, koppelt TNF-RI an die MAPK-Kaskade (Schievella et al., 1997; Brown et al., 1998). RIP dagegen vermittelt die TNF-RI-abhängige NF- κ B Aktivierung (siehe Kapitel 4.2). Ein weiteres DD-enhaltendes Adaptormolekül wurde mit RAIDD/CRADD beschrieben (Duan et al., 1997; Ahmad et al., 1997). RAIDD/CRADD soll Caspase-2 an TNF-RI koppeln und so eine Caspasekaskade parallel zu Caspase-8 initiieren. Da diese Studien jedoch nur mittels transienter Überexpression durchgeführt wurden und Caspase-8-defiziente Zellen vollkommen resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose sind, bedarf es weiterer Experimente zur Klärung dieses Signalweges. Das zuletzt beschriebene Molekül, das mit TNF-RI interagiert, ist SODD (Jiang et al., 1999). Es enthält selbst keine DD, bindet aber an die DD von TNF-RI und verhindert so die Aggregation nicht stimulierter Rezeptoren. Nach Stimulation dissoziiert SODD vom TNF-RI ab, so daß sich ein DISC bilden kann. Später assoziiert SODD wieder mit dem Rezeptor, um das Todessignal abzuschalten (Jiang et al., 1999).

Einige Zelllinien zeigen gegenüber TNF-RI-vermittelter Apoptose Resistenz, die jedoch durch Cycloheximid oder Actinomycin D überwunden werden kann (Holtmann et al., 1988). Dies läßt darauf schließen, daß die Resistenz von der aktiven Transkription/Translation bestimmter Faktoren abhängt. Dabei wird vor allem NF- κ B diskutiert, dem neben einer inflammatorischen auch eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben wird (Wallach et al., 1999). So sensitiviert die Inhibition von NF- κ B gegenüber TNF-induzierter Apoptose (Beg et al., 1996; Wang et al., 1996; Levkau et al., 1999), wohingegen Aktivierung von NF- κ B Apoptose supprimiert (Van Antwerp et al., 1996; Levkau et al., 1999).

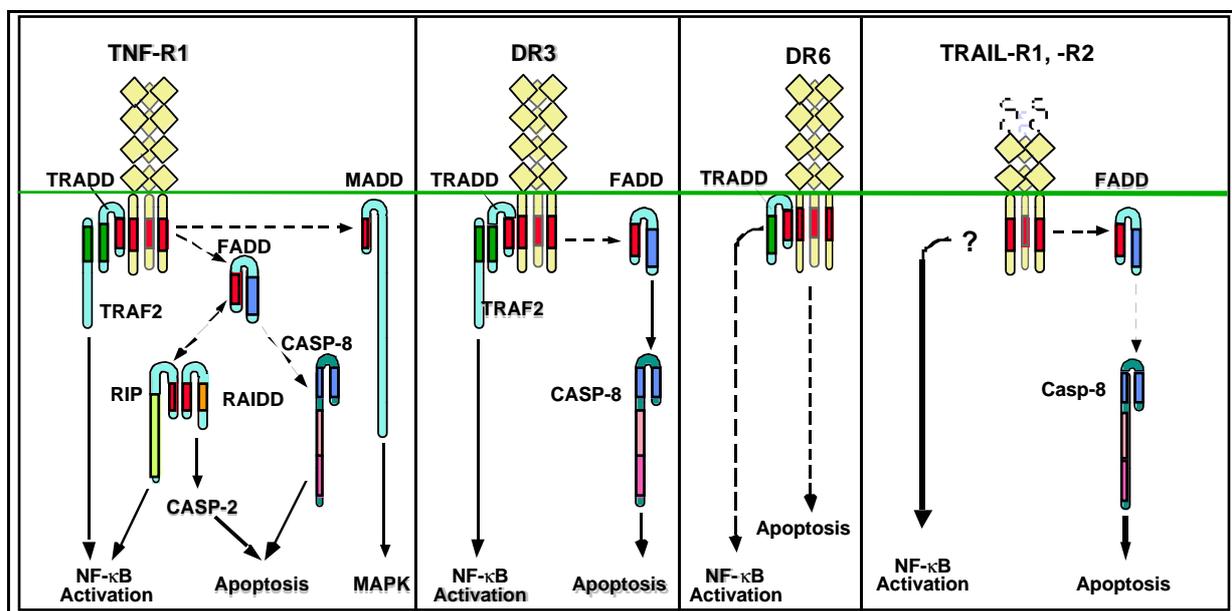


Abbildung 5: Die Signaltransduktion anderer Apoptose-induzierender Rezeptoren. Schematische Übersicht über die Signalwege der anderen Todesrezeptoren. Die Todesdomäne ist in rot, die Todes-effektordomäne in blau, die CARD-Domäne in orange und die TRAF-Domäne in grün dargestellt.

Über die biologische Funktion von DR3 und DR6 ist noch relativ wenig bekannt. DR3 scheint auf solche Gewebe beschränkt zu sein, die reich an Lymphozyten sind, und spielt möglicherweise eine Rolle in ihrer Homöostase (Chinnaiyan et al., 1996a; Bodmer et al., 1997). Da DR3 in Struktur und bezüglich der bindenden Adaptormoleküle dem TNF-RI vergleichbar (D'Souza et al., 1996) und ferner in der Lage ist, Apoptose auszulösen sowie NF- κ B zu aktivieren (Chinnaiyan et al., 1996a; Bodmer et al., 1997; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996b; Sreaton et al., 1997), wird postuliert, daß DR3 ähnliche Signalwege auslöst wie TNF-RI (Peter et al., 1998).

Auch für TRAIL kommt eine Rolle in der Regulation des Immunsystems in Betracht (Marsters et al., 1996a). Zudem hat TRAIL eine anti-tumorale Wirkung. So werden Tumor-

zelllinien effizient getötet, während untransformierte Zellen resistent zu sein scheinen (Walczak et al., 1999). Über die Rolle von FADD in der Signaltransduktion der TRAIL-Rezeptoren liegen widersprüchliche Berichte vor (Marsters et al., 1996a; Walczak et al., 1997). Allerdings konnte gezeigt werden, daß Caspasenaktivierung in der Signaltransduktion der TRAIL-Rezeptoren eine Rolle spielt (Mariani et al., 1997). Neuere Studien belegen, daß sowohl FADD als auch Caspase-8 in den DISC von TRAIL-R1 und TRAIL-R2 rekrutiert werden und für TRAIL-induzierte Apoptose essentiell sind (Bodmer et al., 2000; Sprick et al., 2000; Kischkel et al., 2000).

4.8 Regulation und Inhibition der Signaltransduktion der Todesrezeptoren

Neben den Proteinen der Bcl-2-Familie sind weitere Proteine beschrieben worden, die regulatorisch in die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose eingreifen.

4.8.1 Caspase-Inhibitoren

Verschiedene Viren besitzen spezialisierte Proteine, die die Funktion der Caspasen inhibieren können. Die bekanntesten Beispiele sind CrmA (cytokine response modifier A) des Kuhpockenvirus und p35 des Bakulovirus (Ekert et al., 1999). CrmA ist ein Serpin-ähnliches Molekül. Serpine, Inhaltsstoffe vieler Schlangengifte, sind Polypeptidsubstrate, die nach der Spaltung durch Proteasen stabil an das aktive Zentrum binden und somit das Enzym inaktivieren. CrmA ist in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Apoptoseformen, so auch CD95- oder TNF-vermittelte Apoptose, zu inhibieren (Tewari et al., 1995; Enari et al., 1995; Los et al., 1995; Miura et al., 1995). p35 hat die Aufgabe, durch Bakuloviren infizierte Zellen vor Apoptose zu schützen. Der Wirkmechanismus von p35 ist ähnlich wie der der Serpine, obwohl es nicht zu dieser Klasse von Proteinen gehört. Nach der Spaltung des Proteins durch Caspasen an der Sequenz DQMD↓G (Xue et al., 1995; Bertin et al., 1996) verbleiben die Spaltprodukte am Enzym und dissoziieren nur sehr langsam ab. Auch p35 vermag CD95- und TNF-vermittelte Apoptose zu inhibieren (Beidler et al., 1995).

In einer Suche nach p35-ähnlichen Proteinen wurde eine neue Familie von Apoptoseinhibitoren entdeckt, die IAP (Inhibitor of Apoptosis) genannt wurde (Deveraux et al., 1999). Neben drei viralen Proteinen dieser Familie, sind IAPs auch in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* und Säugetieren, darunter sechs im Menschen, beschrieben worden. IAPs besitzen eine Zinkfinger-ähnliche Domäne, die RING-Finger genannt wird und ein C/H-Motiv am N-Terminus, das als BIR-Motiv (Baculovirus IAP Repeat) bezeichnet wird (Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997). Einige humane IAPs verfügen zudem noch über eine CARD-Domäne (Roy et al., 1997). Über den Mechanismus der Apoptoseinhibition durch humane IAPs ist noch

relativ wenig bekannt. Beschrieben sind direkte Wechselwirkungen mit verschiedenen Caspasen, darunter Caspase-3, -9 und -1 (Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997). Ferner wird eine Assoziation von IAPs an den TNF-RII-Signalkomplex berichtet (Rothe et al., 1995; Liston et al., 1996). Die physiologische Bedeutung der IAPs ist weitgehend ungeklärt; diskutiert wird eine Rolle in der neuronalen Apoptose (Deveraux et al., 1999; Duckett et al., 1996).

4.8.2 FLIPs

Eine weitere Familie von viralen Apoptoseinhibitoren enthält zwei aufeinander folgende DEDs. Aufgrund dieser Struktureigenschaft wurden die Mitglieder dieser Familie v-FLIPs (viral FLICE inhibitory proteins) genannt (Thome et al., 1997). V-FLIPs werden von γ -Herpesviren wie dem equinen Herpesvirus-2 (EHV-2), dem bovinen Herpesvirus-4 (BHV-4), dem Herpesvirus Saimiri (HVS), dem Kaposi-Sarkom-assoziierten humanen Herpesvirus-8 (HHV-8), sowie dem humanen Molluscum Contagiosum Virus (MCV) exprimiert (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997a; Bertin et al., 1997).

In vitro-Bindungsstudien sowie die Untersuchung von v-FLIP-überexprimierenden Zellen ergaben für verschiedene v-FLIPs Wechselwirkungen mit FADD bzw. Caspase-8 (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997a; Bertin et al., 1997). Allerdings sind die Ergebnisse teils widersprüchlicher Art: So konnte *in vitro* und in transients Überexpression keine Interaktion zwischen dem v-FLIP E8 aus EHV-2 und FADD detektiert werden (Hu et al., 1997a; Bertin et al., 1997), während in stabil überexprimierenden Zelllinien das Protein im DISC gefunden werden konnte, einhergehend mit reduzierter Rekrutierung von Caspase-8 (Thome et al., 1997). V-FLIPs sind in der Lage, Todesrezeptor-vermittelte Apoptose zu inhibieren (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997a), ein Indiz für ähnliche Signalwege in allen Todesrezeptoren. Als biologische Funktion der v-FLIPs wird eine Protektion der Zellen in der späten lytischen Phase, in der die Zellen mit Viren überladen sind, diskutiert. Die Funktion dieser Proteine entspricht damit also der von p35, IAPs oder des viralen Bcl-2-Homologen E1B19 (Thome et al., 1997).

Zu den v-FLIPs wurde ein humanes Homolog gefunden, das als c-FLIP/Casper/I-FLICE/FLAME-1/CASH/CLARP/MRIT/Usurpin bezeichnet wird (Irmeler et al., 1997b; Shu et al., 1997; Hu et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Han et al., 1997; Rasper et al., 1998).

Multiple Splicevarianten von c-FLIP wurden berichtet, von denen allerdings nur zwei, bezeichnet als c-FLIP_L und c-FLIP_S, auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten (Irmeler et al., 1997b; Shu et al., 1997; Rasper et al., 1998). Während c-FLIP_S mit einem Molekulargewicht von 27 kDa aus zwei Todeseffektordomänen und einem kurzen C-terminalen Rest von 19 Aminosäuren besteht und damit den viralen FLIPs ähnelt, ist c-FLIP_L mit einem Molekulargewicht von 55 kDa homolog zu Caspase-8. Neben den beiden DEDs verfügt es über zwei Domänen, die der p18-, sowie der p10-Domäne von Caspase-8 ähnlich sind und als p20, bezie-

ungsweise p10 bezeichnet werden. Wie Caspase-8 enthält c-FLIP_L zwischen diesen beiden Domänen nach D376 eine Spaltstelle für Caspasen mit der Sequenz LEVD (Irmeler et al., 1997b; Shu et al., 1997). Die konservierten Motive HG und QACQG, die in Caspase-8 an der Katalyse beteiligt sind, finden sich allerdings nicht in c-FLIP_L. Hier lauten die entsprechenden Sequenzen RG, respektive QNYVV. Deshalb ist c-FLIP_L katalytisch nicht aktiv.

Zusammen mit Caspase-8 und -10 ist das menschliche Gen für c-FLIP, das aus 13 Exons besteht, auf Chromosom 2q33-34 in einem 200 kb großen Cluster lokalisiert (Irmeler et al., 1997b; Rasper et al., 1998).

Zum Teil widersprüchlich sind Berichte über Wechselwirkungen von c-FLIP mit anderen Proteinen. Den entsprechenden Untersuchungen liegen zumeist *in vitro*-Methoden wie das Hefe-Zwei-Hybrid-System oder die transiente Überexpression des Proteins zugrunde. So werden Interaktionen mit FADD, TRAF-1, TRAF-2, Caspase-8, Caspase-10, Caspase-3 und Bcl-x_L berichtet (Shu et al., 1997; Hu et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Han et al., 1997), sowie die Fähigkeit zur Bildung von Homodimeren (Srinivasula et al., 1997; Goltsev et al., 1997). Die Interaktion von c-FLIP mit FADD konnte allerdings nicht in jeder Studie bestätigt werden (Hu et al., 1997b; Han et al., 1997), ebenso die Bildung von c-FLIP-Homodimeren (Irmeler et al., 1997b).

Auch über die Funktion von c-FLIP gibt es gegensätzliche Aussagen. So wurde c-FLIP zunächst (Shu et al., 1997) und in weiteren Studien als proapoptotisches Molekül beschrieben (Inohara et al., 1997; Han et al., 1997), während andere Untersuchungen über eine apoptoseinhibierende Funktion von c-FLIP berichten (Irmeler et al., 1997b; Hu et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997; Rasper et al., 1998; Kataoka et al., 1998). Auch eine doppelte Funktion in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie sowie dem Expressionsniveau von c-FLIP wurde diskutiert (Goltsev et al., 1997; Wallach, 1997). Eine Studie zum Verhalten stabil c-FLIP_L-überexprimierender Zellen gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli zeigte, daß c-FLIP_L potent Todesrezeptor-vermittelte Apoptose blockiert, nicht jedoch solche, die durch Perforin/Granzym B, verschiedene Chemotherapeutika oder γ -Strahlung ausgelöst wird (Kataoka et al., 1998). Da jedoch allen diesen Studien Untersuchungen mit Hilfe stabiler oder transienter Überexpression des Proteins zugrunde liegen, ist die physiologische Situation damit noch nicht erfaßt. Da die Überexpression von DED-enhaltenden Proteinen generell Apoptose auslöst, muß eine in Überexpressionssystemen beobachtete proapoptotische Funktion von c-FLIP mit Vorsicht diskutiert werden (Irmeler et al., 1997b; Scaffidi et al., 1999a; Siegel et al., 1998). Eine weitere Funktion der FLIPs soll die Aktivierung von NF- κ B sein (Chaudhary et al., 1999; Hu et al., 2000).

Die geringe Expression von c-FLIP im Vergleich zu Caspase-8 legt die Vermutung nahe, daß die physiologische Rolle von c-FLIP möglicherweise eher in der Regulation von Apoptose zu suchen ist, die über andere Todesrezeptoren mit einer geringeren Expression als CD95 vermittelt wird. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Korrelation der Resistenz von humanen Melanomzellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose mit der Expression von

c-FLIP (Griffith et al., 1998; Zhang et al., 1999). Zunächst konnte eine positive Korrelation dergestalt festgestellt wurde, daß TRAIL-resistente Melanomzelllinien c-FLIP in größerer Menge exprimieren als sensitive (Griffith et al., 1998). Eine weitere Studie konnte unter Verwendung einer größeren Anzahl entsprechender Zelllinien diese Korrelation allerdings nicht bestätigen (Zhang et al., 1999). Dagegen scheint eine erhöhte Expression von c-FLIP_L in transformierten gegenüber normalen Keratinocyten mit der Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose einher zu gehen (Leverkus et al., 2000).

Eine weitere (patho-)physiologische Funktion wird c-FLIP in der Generation von Atherosklerose zugewiesen (Sata et al., 1998). Es wurde beschrieben, daß die Expression von c-FLIP_L in endothelialen Zellen unter der Wirkung oxidierten LDLs abnimmt, was zu einer verstärkten Apoptose dieser Zellen führt.

4.8.3 Kinasen

Auch eine Reihe von Kinasen haben einen Einfluß auf die Apoptose. Eine der bekanntesten anti-apoptotischen Kinase-Signalwege ist der Phosphoinositol 3-kinase (PI3-K)-Proteinkinase B (PKB/Akt)-Signalweg (Datta et al., 1999). PI3-K inhibiert in Th2-Klonen direkt Caspase-8-Aktivierung am DISC und vermittelt so Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, während Th1-Klone wegen einer geringeren PI3-K Aktivität sensitiv sind (Varadhachary et al., 1999). PKB wird indirekt durch PI3-K aktiviert und phosphoryliert diverse Proteine, die in der Apoptose eine Rolle spielen. So werden Bad (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997), Caspase-9 (Cardone et al., 1998) und die Forkhead-Transkriptionsfaktoren AFX und FKHRL1 (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999) durch Phosphorylierung inaktiviert. Die PKB-vermittelte Phosphorylierung von Caspase-9 scheint nur im Menschen funktionell zu sein, da die Phosphorylierungsstelle in der Caspase-9-Sequenz nicht evolutionär konserviert ist (Fujita et al., 1999; Rodriguez et al., 2000). Auf der anderen Seite ist PKB in der Lage, durch Aktivierung der I κ B-Kinasekomplexes Apoptoseinhibitoren zu aktivieren (Ozes et al., 1999; Romashkova et al., 1999).

Proteinkinase C (PKC) steht für eine ganze Familie von Serin-Threonin-Kinasen. Eine Untergruppe der PKC läßt sich durch Phorbolster, wie z. B. PMA, aktivieren (Toker, 1998). Aktivierung von PKC durch PMA inhibiert CD95-vermittelte Apoptose (Copeland et al., 1994; Rudert et al., 1997; Cuvillier et al., 1998), während Inhibition von PKC sensitiviert (Drew et al., 1998; Zhou et al., 1999b). Als Mechanismus der PKC-vermittelten Apoptose-Inhibition werden die indirekte Phosphorylierung von Bad (Tan et al., 1999) und Inhibition der CD95-Oligomerisierung diskutiert (Ruiz-Ruiz et al., 1999). Darüber hinaus können bestimmte Mitglieder der PKC-Familie auch pro-apoptotisch wirken. So transloziert PKC δ nach Spaltung durch Caspasen zum Mitochondrium und löst dort den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Ausschüttung apoptogener Faktoren aus (Emoto et al., 1995; Ghayur et al., 1996; Li et al., 1999).

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) vermitteln Proliferation (Seger et al., 1995), aber auch anti-apoptotische Signale (Nishina et al., 1997; Bonni et al., 1999). Inhibition bzw. Aktivierung von MAPK korreliert mit Sensitivierung bzw. Protektion gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Holmstrom et al., 1998; Holmstrom et al., 1999). Dies kann unter anderem durch MAPK-abhängige Phosphorylierung von Bad erklärt werden (Scheid et al., 1999; Scheid et al., 1998).

5. Die physiologische Bedeutung der Apoptose

Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Organismus. Sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und die Beseitigung von alten, verletzten, mutierten oder gefährlichen Zellen. Im Immunsystem ist sie der Hauptmechanismus, über den potentiell autoreaktive oder nutzlose Immunzellen beseitigt werden. T-Zellen durchlaufen im Thymus die Prozesse der positiven und negativen Selektion. Durch die positive Selektion werden T-Zellen mit T-Zell-Rezeptoren (TCR), die nicht mit MHC-Peptidkomplexen wechselwirken können, durch Apoptose eliminiert. Durch negative Selektion findet die Eliminierung von T-Zellen statt, deren TCR mit Komplexen aus körpereigenen Peptiden und MHC reagiert und damit potentiell autoreaktiv ist (von Boehmer, 1994; Fowlkes et al., 1988; Kisielow et al., 1988; Nossal, 1994; Jenkinson et al., 1989). Die Rolle des CD95-Systems bei der Selektion von T-Zellen im Thymus ist unklar. Während in *lpr*- und *gld*-Mäusen (siehe unten) T-Zell-Rezeptor vermittelte Apoptose nicht beeinträchtigt ist, konnten andere Studien eine Beteiligung von CD95 an der negativen Selektion nachweisen (Sebzda et al., 1999). Ob CD95 bei der negativen Selektion beteiligt ist, hängt möglicherweise von der Antigenkonzentration ab (Kishimoto et al., 1998). B-Zellen mit einem nichtfunktionellen B-Zell-Rezeptor werden - ähnlich wie T-Zellen im Thymus - im Knochenmark durch Apoptose beseitigt (Osmond, 1993).

Auch während einer Immunantwort ist Apoptose für den Erhalt der Zellhomöostase essentiell. Nach Erkennung eines gegebenen Antigens durch T-Zellen proliferieren diese und führen ihre Effektorfunktionen aus. Ist das Antigen beseitigt, werden die nun überflüssigen, aktivierten T-Zellen durch Apoptose eliminiert, was man als aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) bezeichnet (Dhein et al., 1995; Peter et al., 1997; Combadiere et al., 1998). Dies bezeichnet man als Deletionsphase der Immunantwort. Ihr schließt sich die Gedächtnisphase an. Abbildung 6 stellt den Verlauf einer Immunantwort schematisch dar. Beim AICD spielt das CD95/CD95L-System eine entscheidende Rolle. Die Stimulation des TCR auf bereits aktivierten T-Zellen führt zu einer verstärkten Produktion von CD95L, und durch eine Interaktion des CD95/CD95L-Systems werden die Zellen durch Apoptose beseitigt (Alderson et al., 1995; Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995). Neben dem CD95-System sollen auch andere Apoptose-auslösende Moleküle am AICD beteiligt sein. Neben reaktiven Sauerstoffradikalen und Perforin (Hildeman et al., 1999; Spaner et al., 1999) soll TNF-R II die Deletion von CD8⁺ T-Zellen vermitteln (Zheng et al., 1995). Nur Zellen, die den Prozeß des AICD

überleben, können potentiell zu Gedächtniszellen werden. Der AICD hat damit eine wesentliche Rolle in der Homöostase des Immunsystems. Wird diese Homöostase dadurch gestört, daß der AICD vermindert ist, kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen. So führt eine verstärkte Expression von c-FLIP_L in T- und B-Zellen zu Autoimmunität (Van Parijs et al., 1999a).

Des weiteren benutzen auch cytotoxische T-Zellen das CD95-System, um virusinfizierte oder entartete Zielzellen zu eliminieren (Rouvier et al., 1993). Ferner scheint das CD95-System auch an der Homöostase der Leber (Adachi et al., 1995) und dem Phänomen der immunprivilierten Organe (Barker et al., 1977; Griffith et al., 1995; Griffith et al., 1996; Stuart et al., 1997) beteiligt zu sein.

Bei Mäusen sind mehrere Mutationen beschrieben worden, die das CD95-System betref-

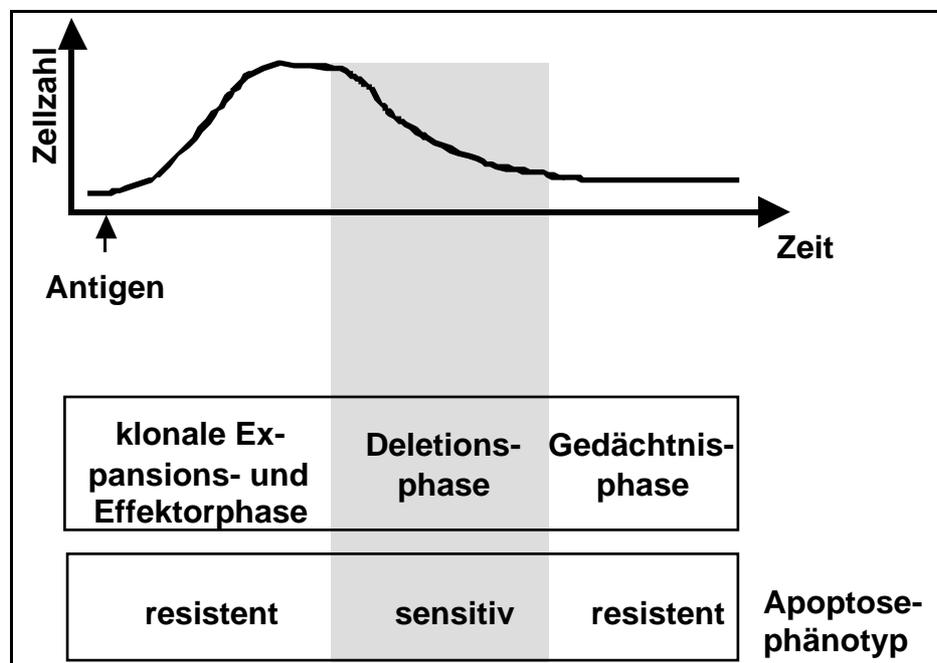


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer T-Zell-Immunantwort. Nach Erkennung des Antigen proliferieren Antigen-spezifische T-Zellen und führen ihre Effektorfunktionen aus. Nach Beseitigung des Antigens sterben T-Zellen über einen Mechanismus, der Aktivierungsinduzierter Zelltod (engl.: activation induced cell death, AICD) genannt wird. Nur in dieser Phase sind T-Zellen sensitiv für CD95-vermittelte Apoptose. Die Deletionsphase überleben nur wenige T-Zellen, die dann als langlebige Gedächtniszellen fungieren.

fen und dessen Bedeutung verdeutlichen. Der Phänotyp dieser Mäuse beinhaltet die unkontrollierte Akkumulation von B220⁺CD4⁻CD8⁻-T-Zellen, was zu einer Vergrößerung von Lymphknoten und Milz und Autoimmunsymptomen führt. Die *lpr*-Mutation (für Lympho-proliferation) betrifft CD95, dessen Expression durch die Insertion eines Transposons in das zweite Intron des Gens stark verringert wird (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Adachi et al., 1993; Chu et al., 1993; Mariani et al., 1994). Bei der *lpr^{cg}*-Mutation wird die Signaltransduktion von CD95 durch einen Aminosäureaustausch in der Todesdomäne verhindert (Matsuzawa et al.,

1990), was wiederum die Bedeutung dieser Domäne für die Signaltransduktion des Rezeptors verdeutlicht. In *gld*-Mäusen (für generalized lymphoproliferative disease) ist CD95L betroffen. Ein Aminosäureaustausch im extrazellulären Bereich des Proteins verhindert die Bindung des Liganden an den Rezeptor (Takahashi et al., 1994a). Auch beim Menschen wurden ähnliche Mutationen des CD95-Systems beschrieben (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). Sie führen zu der Ausbildung eines Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS), welches eine massive Lymphadenopathie, die Akkumulation von nicht-malignen T-Zellen und Anzeichen von Autoimmunität beinhaltet (Jackson et al., 1999).

Störungen des CD95-Systems können zudem an der Entwicklung von weiteren Krankheiten beteiligt sein. Eine vermehrte Apoptose trägt zur Depletion von CD4⁺-T-Zellen bei AIDS bei. T-Zellen HIV-1-infizierter Patienten zeigen eine erhöhte Expression von CD95 (Debatin et al., 1994; McCloskey et al., 1995) und reagieren sensitiver auf die Stimulation von CD95 (Katsikis et al., 1995). Zudem wurde ein weiterer Mechanismus identifiziert, der nach HIV-1-Infektion zu einer erhöhten Sensitivität von nichtinfizierten T-Zellen gegenüber AICD führt (Westendorp et al., 1995; Li et al., 1995). Dementsprechend kommt dem CD95-System eine wichtige Rolle bei AIDS zu. Allerdings wurden auch CD95-unabhängige Mechanismen beschrieben, die zur verstärkten Apoptose bei AIDS beitragen können (Gandhi et al., 1998; Berndt et al., 1998). Das virale Protein R (vpr) beispielsweise induziert Apoptose durch Aktivierung von Caspasen und Mitochondrien (Stewart et al. 2000, Jacotot et al. 2000).

Im Gegensatz dazu ist Apoptose bei Krebs in transformierten Zellen oft vermindert. So sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, wie sich Krebszellen vor Apoptoseinduktion durch das Immunsystem schützen. Einige dieser Mechanismen involvieren auch das CD95-System (Hahne et al., 1996; Strand et al., 1996). Tumorzellen, die stabil mit v-FLIP oder c-FLIP_L transfiziert sind, haben einen Wachstumsvorteil *in vivo* (Medema et al., 1999; Djerbi et al., 1999). Ferner scheint das CD95-System bei der krankhaften Entwicklung von Leberschäden (Galle et al., 1995; Kondo et al., 1997; Strand et al., 1998), neurodegenerativen Erkrankungen wie Multipler Sklerose (D'Souza et al., 1996; Strand et al., 1998) und verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Giordano et al., 1997) beteiligt zu sein.

6. Aufgabenstellung

Apoptose spielt eine bedeutende Rolle bei der Ontogenese und Homöostase von mehrzelligen Organismen. CD95 ist einer der wenigen bislang identifizierten Rezeptoren, die direkt Apoptose auslösen können. CD95-vermittelte Apoptose ist unter anderem von entscheidender Bedeutung bei der Homöostase des Immunsystems. Fehlregulationen im CD95-System tragen zur Entstehung von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Krebs oder AIDS bei.

Da CD95 selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, wird das Todessignal nach Aktivierung des Rezeptors durch Anlagerung von cytosolischen Signalmolekülen übertragen. Durch Bindung des CD95-Liganden wird CD95 oligomerisiert, und es bildet sich ein Tod-induzierender Signalkomplex (engl.: DISC). Die Fähigkeit, einen DISC zu bilden, ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich. Typ I-Zellen bilden den DISC effizient, Typ II-Zellen dagegen zeigen nur eine geringe DISC-Bildung. Aufgrund dieser geringen DISC-Bildung sind Typ II-Zellen von Mitochondrien als Verstärker der Apoptose abhängig. Deshalb läßt sich CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen durch Bcl-2 inhibieren.

In dieser Arbeit sollten Regulationsmechanismen der CD95-Signaltransduktion identifiziert werden. Es stellte sich die Frage, ob neben der unterschiedlichen DISC-Bildung und der Bcl-2-Inhibierbarkeit CD95-vermittelter Apoptose noch weitere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen vorhanden sind. Ein weiterer Ansatz war, die Typ I-/Typ II-Charakterisierung unter mehr physiologischen Bedingungen zu bestätigen. Dabei war vor allem die Frage zu klären, ob die beschriebenen Regulationsmechanismen der CD95-Signaltransduktion im Rahmen der T-Zell-Immunantwort eine physiologische Relevanz besitzen. Weiterhin sollte die Rolle und der Mechanismus von c-FLIP_L in der Inhibition von CD95-vermittelter Apoptose in Typ I- und Typ II-Zellen untersucht werden. Die Klärung dieses Mechanismus könnte Aufschluß darüber geben, ob c-FLIP_L therapeutisch einsetzbar wäre, um Zellen resistent gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose zu machen. Darüber hinaus sollte evaluiert werden, warum Typ I-Zellen einen DISC bilden können, Typ II-Zellen aber nicht.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen. Radioaktive Reagenzien wurden von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

1.2 Häufig verwendete Puffer

DNA-Probenpuffer (10 x): 50°% (v/v) Glycerol
0,42°% (w/v) Bromphenolblau
0,42°% (w/v) Xylencyanol

Nicolettipuffer: 0,1°% (w/v) Natriumcitrat
0,1°% (w/v) Triton X-100
50 µg/ml Propidiumiodid

Lysepuffer (Eukaryonten): 150°mM NaCl
30°mM Tris-HCl, pH = 7,5
1°mM PMSF
10°% (w/v) Glycerol
1°% (w/v) Triton X-100
0,5 µg/ml Antipain
0,5 µg/ml Chymostatin A
0,5 µg/ml Leupeptin
0,5 µg/ml Pepstatin
(F r Phosphorylierungsstudien zus tzlich noch)
10°mM NaF
1°mM Na-orthovanadat

PBS:	137°mM	NaCl	
	8,1°mM	Na ₂ HPO ₄	
	2,7°mM	KCl	
	1,5°mM	KH ₂ PO ₄	pH = 7,4
TBE (10 x):	0,45 M	Tris	
	0,45 M	Bors ure	
	10°mM	EDTA	pH = 8,3
TE:	10°mM	Tris	
	1°mM	EDTA	pH = 7,5
Probenpuffer reduz. (5 x):	50°% (v/v)	Glycerol	
	10°% (w/v)	SDS	
	50°mM	Tris, pH = 6,8	
	25°% (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	0,25°mg/ml	Bromphenolblau	
Sammelgel (5°%):	24°mM	Tris-HCl, pH = 6,8	
	5°% (w/v)	Acrylamid	
	0,1°% (w/v)	SDS	
	0,1°% (w/v)	APS	
	0,1°% (w/v)	TEMED	
Trenngel:	37,5°mM	Tris-HCl, pH = 8,8	
	7,5-15 % (w/v)	Acrylamid	
	0,1°% (w/v)	SDS	
	0,03°% (w/v)	APS	
	0,1°% (w/v)	TEMED	

Laufpuffer (SDS-PAGE):	25° mM	Tris-Base
	0,19° M	Glycin
	1° % (w/v)	SDS
Fixierung	20° % (v/v)	Methanol
	10° % (v/v)	Essigsäure
Transferpuffer: (Western Blot)	25° mM	Tris
	0,19° M	Glycin
	20° % (v/v)	Methanol
	0,037 % (w/v)	SDS

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Verwendung	Referenz, Bezugsquelle
XL1 blue	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
SuRE	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
DH5 α	vermehrung von Plasmiden	Clontech
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen
BL21	Produktion von Fusionsproteinen	Novagen
BL21 (DE3)	Produktion von Fusionsproteinen	Novagen

1.3.2 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Herkunft
SKW6.4	humane B-lymphoblastoide Zelllinie
BJAB	EBV-negative Burkitt- hnliche lymphoblastoide Zelllinie (human)
Raji	Burkitt-Lymphomzelllinie (human)
HuT78	humane T-Zell-Leuk mie-Linie
Jurkat	humane T-Zell-Leuk mie-Linie
H9	humane T-Zell-Leuk mie-Linie
CEM	humane T-Zell-Leuk mie-Linie
HT29	humane Colonkarzinomzelllinie
HepG2	humane Hepatomazelllinie
MCF7	humane Brustkarzinomzelllinie
U937	humane monozyt re Zelllinie
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie
293T	humane embryonale Nierenzelllinie
KYM-1	Myorhabdosarkom Zelllinie (human)
SCLC 22H	Kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie (human)
NCI N592	Kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie (human)
SKW6-neo, -Bcl-2	humane B-lymphoblastoide Zelllinie mit BCL-2 oder Vektor transfiziert
Jurkat-neo, -Bcl-2	Jurkat mit BCL-2 oder Vektor transfiziert
CEM-neo, -Bcl-x _L	humane T-Zell-Leuk mie-Linie mit BCL-x _L oder Vektor transfiziert
BLAB-K20, -K88	BJAB mit unterschiedlichem Glykosylierungsstatus
BL-60	Burkitt Lymphom Zelllinie
K50	BL-60 mit CD95 transfiziert
Ag8	Myelom Zelllinie
CV-1/EBNA	Nierenepithelzelllinie (Afrikanische Gr ne Meerkatze)

1.4 Nährmedien

1.4.1 Medien für die Zellkultur

Pulverisierte Zellkulturmedien RPMI 1640, DMEM und DMEM-F12 wurden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein) bzw. Sigma (Deisenhofen) bezogen und nach Herstellerangaben in pyrogenfreiem Wasser gelöst. Die Medien wurden sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen supplementiert:

10 % (v/v)	FCS	BRL, Eggenstein
10 mM	HEPES	BRL, Eggenstein
50 µg/ml	Gentamicin	BRL, Eggenstein

Folgende Antibiotika oder Zusätze wurden zur Selektion von eukaryontischen Zellen eingesetzt:

Antibiotikum	Hersteller
Geneticin, Na-Salz (G418)	Sigma, Deisenhofen
Puromycin	Sigma, Deisenhofen

Für die Markierung von Zellen wurden folgende Mangelmedien verwendet:

[³⁵S]-Methionin/Cystein Markierung: RPMI-Mangelmedium (Gibco BRL, Eggenstein; Kat. Nr.:51871-010), komplettiert mit allen fehlenden Bestandteilen außer Methionin und Cystein.

1.4.2 Medien für Bakterien

LB-Medium: 10°g/l Caseinhydrolysat
 5°g/l Hefeextrakt
 10°g/l NaCl
 pH°7,2 mit 1°N NaOH eingestellt

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt.

Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

1.5 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind gegen menschliche Proteine gerichtet. Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich um monoklonale Antikörper aus der Maus.

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-APO-1 (IgG3 und IgG1)	CD95	Trauth et al., 1989
C-20 (Kaninchen, polyklonal)	CD95 (AS 316-335: KDITSDSENSNFRNEIQSLV)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
B-10 (IgG1)	CD95 (AS 316-335: KDITSDSENSNFRNEIQSLV)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
3D5 (IgG1)	CD95 (Todesdom ne)	Alexis Biochemicals, Schweiz
HF-1 (Kaninchen, polyklonal)	CD95 (intrazellul rer Teil)	Dr. S. Nagata, Japan
FII23 (IgG3)	unbekannt	Trauth et al., 1989
IgG1 Kontrollantik rper	unbekannt	Pharmingen, San Diego, USA
C15 (IgG2b)	Capsase-8 p18 Untereinheit	Scaffidi et al., 1997
anti-FADD (IgG1)	FADD	Transduction Laboratories, Lexington, USA
NF6 (IgG1)	c-FLIP	Scaffidi et al., 1999a
anti-c-FLIP (Kaninchen, polyklonal)	c-FLIP (AS 190-209: IQKSLKDPSNNFRLHNGRS)	Scaffidi et al., 1998a
anti-Bid	Bid	Dr. J. Yuan, USA
anti-Cytochrom <i>c</i> (IgG2b)	Cytochrom <i>c</i> (AS 93-104)	Pharmingen, San Diego, USA
Bcl-x _L (Kaninchen, polyklonal)	Bcl-x _L	Transduction Laboratories, Lexington, USA
anti-IgG1, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2a, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2a	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2b, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti Kaninchen , HRPO (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

1.6 Molekularbiologische Materialien

1.6.1 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pcDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
pEFrsFLAG	eukaryontischer Expressionsvektor mit FLAG-Epitop Tag	Dr. A. Strasser, WEHI, Australien
pGEX 4T-1, 2, 3	prokaryontischer GST-Fusionsprotein Expressionsvektor	Pharmacia Biotech
pRSET A, B, C	prokaryontischer 6His-Fusionsprotein Expressionsvektor	Invitrogen

1.6.2 Enzyme und Kits

Es wurden folgende Enzyme verwendet:

Enzym	Bezugsquelle
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	New England Biolabs, Schwalbach
RNase (DNase frei)	Boehringer, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Trypsin EDTA L sung	Gibco BRL, Eggenstein
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas

Die verschiedenen Restriktionsenzyme wurden von Boehringer Mannheim und MBI Fermentas bezogen. Für die *in vitro*-Translation von Proteinen wurde das TNT[®] gekoppelte Reticulozytenlysatsystem von Promega verwendet.

1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoradiographieplatten	Rego
Blotapparatur Semi-Dry 20 x 25 cm	CTI
Brutschrank Stericult Inkubator	Forma Scientific
Durchflußzytometer FACScan	Becton Dickinson
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II Biorad
ELISA-Reader	SLT Labinstruments
Gefrierschränke:	Liebherr
	Forma Scientific
Geiger-Müller-Zählrohr 900	Series
Gelelektrophoresekammer	Horizon 11.14
Gelelektrophoresekammer	SDS-PAGE
	CTI

Heizbad		K ttermann
Heizblock Thermostat 5320		Eppendorf
Mikroskope:	Lichtmikroskop ID 02	Zeiss
	Phasenkontrastmikroskop	Leitz
	Labovert FS	
Mikrowellenger t HMG730B		Bosch
Minigelelektrophoresekammer		Biorad
Netzger t Electrophoresis Power		Renner
Supply Consort 865		
pH-Meter Calimatic		LHD Labortechnik
Photoeinheit:	UV-Fluoreszenzstrahler	Konrad Benda
	Kamera RA1	Kaiser
	Video Graphic Printer UP-	Sony
	860 CE	
Photometer U-1100		Hitachi
Quarzklebmittel Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsger t		Agfa-Gevaert
Curix 160		
Schüttelinkubator Certomat HK		Braun
Szintillationszähler		LHD Labortechnik
Vakuumrotationsverdampfer		Bachofer
100H		
Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Company
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Mettler
	Präzisionswaage PE 3600	Mettler
Zählkammer Neubauer		HBG
Zentrifugen:	Biofuge A	Heraeus
	Biofuge Fresco	Heraeus
	Megafuge 1.OR	Heraeus
	Omnifuge 2.ORS	Heraeus
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS, 5C	DuPont
	PLUS	

2. Methoden

2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung höherer Zellen erfordern sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden, und wurden daher in Zellkulturlabors an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich gamma-bestrahlte Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen der Firmen Renner, Falcon (Becton Dickinson), Greiner und Nunc verwendet. Die verwendeten Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert (siehe II. 1.3.1)

RPMI 1640 Medium: SKW6.4; BJAB; Raji; Jurkat; Hut78, H9; CEM; HT29; HepG2; MCF7; KYM-1; U937; SCLC 22H; NCI N592, Ag8

DMEM Medium: HeLa; 293T

DMEM-F12 Medium: CV-1/EBNA

Transfizierte Zellen wurden mit folgenden Zusätzen kultiviert:

BJAB-Kontrolle, BJAB-cFLIP_L: 1 µg/ml Puromycin

CEM-Vekt., CEM- cFLIP_L: 0,5 µg/ml Puromycin

CEM-neo, CEM-Bcl-x_L: 1 mg/ml Geneticin

Jurkat-neo, Jurkat-Bcl-2: 200 µg/ml Geneticin

SKW6-neo, SKW6-Bcl-2: 1 mg/ml Geneticin in DMEM

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab

1,5 ml einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurden abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm, 20°C) und das Pellet in 500 µl STET-Puffer (8 % Sucrose, 0,5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert. Durch Zugabe von 50 µl Lysozym-Lösung (50 mg/ml) wurden die Bakterien 3 min bei RT lysiert. Danach wurde für 90 sek. bei 95 °C inkubiert, um Proteinen zu denaturieren, und die Debris abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 0,5 ml Isopropanol und 50 µl Ammoniumazetat (8 M) präzipitiert und sofort abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und danach in 30 µl TE oder sterilem Wasser gelöst. Um RNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurde 1 µl (500 µg/ml) DNase-freie RNase zugegeben.

Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Dafür wurden 400 ml LB-Medium in einem 1 l-Fernbachkolben mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und mit 500 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur oder einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C unter Schütteln wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (Sorvall GS-3, 10 min, 5000 rpm, 4°C) und die Bakterien in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 10 ml des Lysepuffers P2 zugegeben, und das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer P3 wurden Proteine und chromosomale DNA gefällt, es wurde 20 min in Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (Sorvall SS-34, 30 min, 20000 x g und 4°C). Der Überstand wurde auf eine Anionentauschersäule (Qiagentip 500) aufgegeben, die zuvor mit 15 ml Puffer QBT äquilibriert worden war, wobei die Plasmid-DNA unter den gegebenen pH- und Salzbedingungen an die Säulenmatrix gebunden blieb (1,6 M Salz, pH = 7,0). Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 50 ml-Röhrchen eluiert und mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (Heraeus Varifuge, 30 min, 6000 rpm, 4°C) wurde das DNA-Pellet in 5 ml eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend im Vakuum getrocknet und in 200 µl TE gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde diese durch Zugabe von TE auf 1 mg/ml eingestellt und die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.2 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) läßt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen zur Verfügung stellen. Im ersten Schritt hybridisieren spezifische Oligonukleotide (Primer) mit der hitzedenaturierten einzelsträngigen DNA zu einem doppelsträngigen Startpunkt für die DNA-Polymerasen, welche dann im zweiten Schritt doppelsträngige DNA aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisieren. Durch Hitzeinwirkung trennen sich die komplementären Einzelstränge im dritten Schritt und können schließlich erneut mit den Primern hybridisieren, so daß sich bei jedem Zyklus die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen verdoppelt. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

5° 1	10x PCR-Puffer
1° 1	Desoxynukleotide (je 10° mM)
1° 1	Primer 1 (100° pmol)
1° 1	Primer 2 (100° pmol)
20 ng	Template DNA
1° 1	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase
ad 50° 1	H ₂ O

Der Ansatz wurde mit 50° 1 Mineral 1 beschichtet und die PCR wie folgt durchgeführt:

Start		4° min bei 94°C
25-35	Denaturierung	1° min bei 94°C
Zyklen	Annealing	1° min bei 56°C
	Elongation	1° min bei 72°C
Termination		5° min bei 72°C

2.2.3 Restriktionsspaltung von DNA

Es wurden etwa 1 - 2 µg Plasmid-DNA aus Mini- bzw. Maxipräparation mit 2 U einer Restriktionsendonuklease im vom Hersteller angegebenen enzymspezifischen Puffer für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Fragmente konnten anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt werden.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstandene DNA-Fragmente können im analytischen Agarosegel (TBE/1 % Agarose/0,00001 % Ethidiumbromid) mittels Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Dazu wurden sie mit DNA-Probenpuffer versehen, in Geltaschen pipettiert und 60 -120 min bei 80 V aufgetrennt. Zur Kalibrierung des Gels wurde neben die zu untersuchenden Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit definiertem Fragmentgemisch aufgetragen.

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden durch UV-Bestrahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle und führt so durch Anregung mit UV-Licht zu orangefarbener Fluoreszenz.

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Gel zum Zwecke der weiteren Klonierung wurde der Gel-Extraction-Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.6 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Für die Verwendung von geschnittener Vektor-DNA für eine Ligation kann diese durch eine Phosphatase behandelt werden, um die endständigen Phosphatgruppen abzuspalten. Dies verhindert eine intramolekulare Religation des Vektors. Dazu wurde zu einem Restriktionsverdau 10 U des Enzyms CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) zugegeben und dieser für weitere 30 min bei 37°C inkubiert.

Für die Ligation wurde geschnittene Vektor-DNA mit der zu inserierenden DNA gemischt, so daß eine etwa dreifach höhere Konzentration der Insertions-DNA vorlag. Dieses Gemisch wurde in Ligationspuffer mit 2 U T4-DNA-Ligase für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder für 16 Stunden bei 14°C inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten Bakterien verwendet.

2.2.7 Transformation von Bakterien

Chemokompetente Bakterien

Durch Transformation wurde Plasmid-DNA zwecks Amplifikation in Bakterien eingebracht. Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren dienten kompetente Bakterien des *E.coli*-Stammes XL1 blue oder TOP10. Für die Transformation wurden jeweils 100 µl kompetente Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und 1 - 5 µl DNA-Lösung (ca. 100 - 200 ng DNA) zugefügt. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation auf Eis. Kurzes Erhitzen auf 42°C (für 90-120 s) und zweiminütiges Abkühlen auf Eis führten zur Permeabilisierung der Bakterienzellwand für DNA-Moleküle. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit je 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versehen und 30 min bei 37°C zur Induktion der Antibiotikaresistenzen inkubiert. Die Selektion auf plasmidtragende Bakterien erfolgte in Petrischalen mit antibiotikahaltigem LB-Agar \ddot{Y} .N. bei 37°C. Die DNA mehrerer makroskopisch sichtbarer Kolonien wurde am darauf folgenden Tag mittels Minipräparation gewonnen und zur Kontrolle des enthaltenen Plasmids einer Restriktionsanalyse unterworfen. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde schließlich in größerem Maßstab mittels Maxipräparation gewonnen und für weitere Experimente eingesetzt.

Elektrokompetente Bakterien

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden Bakterien des *E.coli*-Stammes SuRE oder DH5 α verwendet. Jeweils 100 µl kompetente Bakterien wurden mit mit 100-200 ng Plasmid DNA gemischt. Die Transformation erfolgte im Gene Pulser (Biorad) bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF. Dann wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C in LB-Medium inkubiert und anschließend auf LB-Agar, der mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war, über Nacht kultiviert. Die Analyse positiver Klone erfolgte wie bei der chemischen Transformation.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Präparation primärer humaner T-Zellen

Alle Waschschrirte wurden mit sterilem PBS oder RPMI ohne FCS durchgeföhrt.

500 ml Vollblut wurden mit 1 ml Heparin (Braun, Melsungen) versetzt, um die Gerinnung des Blutes zu vermeiden. Je 15 ml Ficoll (Biochrom, Berlin) wurden mit 30 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20° C/ohne Bremse). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal gewaschen (1000 rpm/10 min/20° C/Bremse auf Stufe 6 und 900 rpm/10 min/20° C/Bremse auf Stufe 2) und in 200 ml RPMI/FCS aufgenommen. Anschließend wurden Monozyten und Makrophagen, d. h. adhärenre Zellen depletiert, indem die Zellen auf 2 große Kulturflaschen verteilt und mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Nicht adhärenre Zellen, d. h. die Lymphozyten, wurde abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm/10 min/20° C). Die Lymphozyten wurden mit RPMI/FCS auf 8×10^6 Zellen/ml eingestellt und 1:1 mit 2% AET-Erythrozyten (s.u.) gemischt (Rosettierung). Das Gemisch wurde zentrifugiert (1000 rpm/10 min/20° C/Bremse auf Stufe 2), der Überstand bis auf 20 ml abgenommen und das Pellet (Rosetten) vorsichtig wieder resuspendiert. Die Rosetten wurden auf 15 ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20° C/ohne Bremse). Das Pellet aus T-Zellen und Erythrozyten wurde gewaschen (1200 rpm/10 min/20° C), und dann die Erythrozyten mit dem vierfachen Volumen (bezogen auf das Pellet) an ACK-Puffer (frisch verdünnt aus 10 x Puffer: 41,45g NH_4Cl , 5g KHCO_3 , 0.186g EDTA, pH 7,27 ad 500 ml Wasser) lysiert. Dazu wurden Pellet und ACK-Puffer durch Pipettieren bis zur Lyse vermischt. Die Lyse der Erythrozyten zeigt sich durch einen Farbumschlag von trüb hellrot nach klar dunkelrot. Dann wurde mit RPMI/FCS auf 50 ml aufgefüllt und die T-Zellen mit RPMI/FCS auf 2×10^6 /ml eingestellt. Anschließend wurde mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-P über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit 25-30 U/ml Interleukin-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

AET-Erythrozyten

Alle Zentrifugationen wurden bei 1200 rpm für 10 min bei 20 °C durchgeföhrt.

0.5 g 2-Aminoethylisothiuroniumbromid (AET ,Sigma) wurden in 12,5 ml pyrogenfreiem Wasser bei pH 9,0 (mit 2N NaOH einstellen) gelöst und sterilfiltriert.

25 ml eines 1:1 Gemisches aus Hammelblut und Alsever-Lösung (GibcoBRL) wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen, zur AET-Lösung zugegeben und für 15 min bei 37° C inkubieren. Anschließend wurde viermal mit sterilem PBS gewaschen und schließlich eine 2%ige Suspension in RPMI/FCS hergestellt, die bis zu 3 Tagen haltbar war.

2.3.2 Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen.

Zur Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker wurden $3 - 5 \times 10^5$ Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 1500 rpm pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die resuspendierten Zellen 15 - 60 min mit je 50 μ l an monoklonalem Erstantikörper bei 4°C inkubiert, um eine Internalisierung der Oberflächenmoleküle zu verhindern. Dabei wurden Antikörperüberstände unverdünnt und gereinigte monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 10 μ g/ml in Kulturmedium eingesetzt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch einmalige Zugabe von 2 ml Kulturmedium, anschließende fünfminütige Zentrifugation bei 1500 rpm und Dekantieren des Überstandes entfernt. Die eigentliche Fluoreszenzfärbung erfolgte durch fünfzehnminütige Inkubation bei 4°C mit 50 μ l eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zweitantikörpers (10 μ g/ml). Zweimaliges Waschen mit PBS und Fixierung der gebundenen Antikörper mit 300 μ l PBS/1 % Formaldehyd ermöglichten eine Aufbewahrung der markierten Proben über mehrere Wochen bei 4°C im Dunkeln.

Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden in das Durchflußzytometer FACScan durch eine Kapillare eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge $\lambda = 488$ nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts war dann jeweils vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wurde von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe („forward scatter“, FSC), Granularität („side scatter“, SSC) oder Fluoreszenz („fluorescence detector“, FL) gaben.

2.3.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenz

Um auch Proteine zu analysieren, die intrazellulär exprimiert bzw. gespeichert werden, wurden Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert, bevor sie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden. Dazu wurden 5×10^5 Zellen zentrifugiert, in 100 μ l PBS aufgenommen und in ein 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch getropft, das auf -20 °C gekühlt war. Darin wurden die Zellen für 30 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, mit 0,5 ml PBS/1% BSA/0,1% Saponin gewaschen, in 100 μ l PBS/1% BSA/0,1% Saponin mit 1 μ g/ml spezifischen Antikörper resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit 0,5 ml PBS/1% BSA/0,1% Saponin gewaschen und in 100 μ l eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zweitantikörpers (10 μ g/ml) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen und in 100 μ l PBS resuspendiert und im FACScan wie unter 2.3.2 beschrieben analysiert.

2.3.4 Biotinylierung von Oberflächenmolekülen auf Zellen

Durch Anhängen von Biotinresten an Lysinreste von Proteinen können diese einer anschließenden Detektion durch Streptavidin zugänglich gemacht werden. Dabei macht man sich die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin zu Nutze. Zusätzlich stellt dies eine Methode dar, um ausschließlich Oberflächenmoleküle zu markieren, da Biotin nicht membrangängig ist. Eine Interferenz der Markierung mit der Erkennung durch Antikörper wird durch einen Abstandhalter erreicht, der zwischen Biotin und der lysinreaktiven Gruppe eingefügt ist. Hierzu wurden Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1×10^7 Zellen in 1 ml Biotinylierungspuffer (150 mM NaCl, 10 mM Na-Borat, pH 8,8) resuspendiert. Unmittelbar vorher wurde das Biotin-X-NHS (Boehringer, Mannheim) in DMSO gelöst (10 mg/ml) und anschließend zur Zellsuspension gegeben (Endkonzentration 50 µg/ml). Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur im Überkopfrührer wurde Ammoniumchlorid (ad 10 mM) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen und anschließend mit 50 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend lysiert und weiterverarbeitet.

2.3.5 Messung apoptotischer Zellen

Mit Hilfe einer von Nicoletti et al. (1991) etablierten Methode lassen sich apoptotische Zellkerne aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden. Dazu wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 250 µl eines hypotonischen Fluorochrompuffers (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) \ddot{Y} . N. bei 4°C unter Lichtabschluß lysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff dringt dabei in die Zellkerne ein und interkaliert in die DNA, so daß die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszieren. Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen ließen sich daher im FL-2-Detektor des Durchflußzytometers die apoptotischen Zellkerne als subdiploide DNA quantifizieren. Soweit nicht anders vermerkt, wurde bei Stimulation mit anti-APO-1 immer auch 10 ng/ml Protein A zur Kreuzvernetzung des agonistischen Antikörpers zugegeben. Spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet: $[(\% \text{ experimentelle Apoptose} - \% \text{ spontane Apoptose}) / (100 - \% \text{ spontane Apoptose})] \times 100$.

2.3.6 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials beruht auf membrangängigen kationischen Fluoreszenzfarbstoffen, die sich spezifisch in Mitochondrien anreichern, wenn deren Transmembranpotential intakt ist. Eine hohe Fluoreszenzintensität zeigt also eine intakte,

lebende Zelle an. Während der Apoptose bricht das mitochondrielle Transmembranpotential zusammen, so daß sich die Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr in den Mitochondrien anreichern. JC-1 besitzt zusätzlich die Eigenschaft, bei hohen Konzentrationen Aggregate zu bilden, sogenannte J-Aggregate. Diese fluoreszieren bei 590 nm, wohingegen das monomere JC-1 bei 527 nm fluoresziert. Apoptotische Zellen zeigen daher gegenüber lebenden Zellen eine Abnahme in Fluoreszenz-2 (FL-2) und eine Zunahme in Fluoreszenz-1 (FL-1) des FACScans. Der spezifische Verlust $\Delta\Psi_m$ wurde analog der in 2.3.5 beschriebenen Formel berechnet.

Färbung mit JC-1

0,5 - 1 x 10⁶ stimulierte oder unbehandelt gelassene Zellen wurden mit 5 µg/ml JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid, 1 mg/ml in DMSO) versetzt und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert (4000 rpm, 5 min, RT) und mit 1 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und direkt im FACScan analysiert (FL-1 vs. FL-2).

Färbung mit DiOC₆(3)

DiOC₆(3) (3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid) wird als Stammlösung (80 mM in DMSO) bei RT gelagert und final in einer Konzentration von 40 nM in PBS verwendet.

Stimulierte bzw. unstimulierte Zellen wurden zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS/DiOC₆(3) resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min bei 37 °C wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und im FACScan analysiert (501 nm, FL-1).

2.3.7 Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von CV-1/EBNA Zellen wurde die DEAE-Dextran Methode verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden 3 x 10⁶ Zellen pro 150 cm² Flasche ausgesät (10⁵ Zellen/ml). Hatten die Zellen eine Konfluenz von 80-85 % erreicht, wurde die Transfektion durchgeführt. Dazu wurden pro 150 cm² Flasche 15 µg der zu transfizierenden DNA mit 187,5 µl DEAE-Dextran (4 mg/ml in TBS; Sigma) in DMEM-F12/FCS/75 µM Chloroquin (Stammlösung 10 mM in PBS; Sigma) in einem finalen Volumen von 1,5 ml gemischt. Das Kulturmedium wurde von den Zellen entfernt, durch DMEM-F12/FCS/Chloroquin ersetzt und das DNA-Dextran-Gemisch zugegeben. Nach Inkubation für 4,5 h im Brutschrank wurde das Chloroquin-Medium entfernt und die Zellen mit DMEM/FCS/10% DMSO für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DMSO-Medium

abgenommen und die Zellen in DMEM-F12 kultiviert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und damit auch abgestorbene Zellen entfernt.

Zur Gewinnung von LZ-CD95L wurden die transfizierten Zellen 7 Tage kultiviert, der Überstand gesammelt und die Zellen weitere 7 Tage kultiviert.

Für die stabile Transfektion von BJAB oder CEM Zellen wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dazu wurden 5×10^6 Zellen pro Ansatz abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm), in je 300 μ l Kulturmedium resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach Zugabe von 10 bis 30 μ g Plasmid-DNA wurde kurz gemischt und mit 960 μ F und 200 V (BJAB) bzw. 220 V (CEM) elektroporiert. Anschließend wurde die Suspension zügig in eine kleine Kulturflasche überführt, in der 10 ml warmes Kulturmediums vorgelegt waren. Nach 24stündiger Inkubation wurden die Zellen gezählt und zu je 5000 Zellen pro 200 μ l Kulturmedium in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte verteilt. Zur Selektion wurde dem Medium G418 (4 mg/ml für BJAB bzw 1 mg/ml für CEM) oder Puromycin (1 μ g/ml für BJAB) zugegeben. Nach etwa zwei Wochen waren erste Klönnester in den Mikrotiterplatten makroskopisch erkennbar. Sie wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit des gewünschten Proteins überprüft und positive Klone weiter expandiert.

2.3.8 Herstellung von Antikörpern

Zur Herstellung von polyklonalen Kaninchenantikörpern wurde das entsprechende synthetisch hergestellte, HPLC gereinigte Peptid kovalent an das voraktivierte Protein KLH (keyhole limpet hemocyanin) (Pierce) entsprechend den Herstellerangaben gekoppelt. Mit 500 μ g des so erhaltenen Antigens in komplettem Freund'schen Adjuvans wurden ausgewachsene weibliche Kaninchen subcutan immunisiert. Diese Immunisierung wurde mit der gleichen Menge an Antigen in inkomplettem Freund'schen Adjuvans in monatlichen Abständen wiederholt. Der spezifische Titer wurde mittels ELISA kontrolliert und bei einer entsprechenden Immunantwort wurden die Antikörper aus dem Serum des Kaninchen durch eine Affinitätssäule aufgereinigt. Dazu wurde das zur Immunisierung verwendete Peptid an voraktiviertes BSA (Pierce) gekoppelt und anschließend an CNBr-aktivierte Sepharose-4B (Pharmacia) entsprechend den Herstellerangaben immobilisiert. An die so gefertigte Peptidsäule wurden bei 4°C in PBS die spezifischen Antikörper gebunden und anschließend mit 0,1 M Propionsäure eluiert, neutralisiert und schließlich gegen PBS dialysiert. Nach der Bestimmung der Konzentration mittels Photometer und Überprüfung der Funktionalität im ELISA wurde der aufgereinigte Antikörper bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden 10 Wochen alte weibliche BALBc Mäuse mit je 300 μ g rekombinanten GST-Fusionsproteinen immunisiert. Die erste Injektion

erfolgte subcutan in komplettem Freund'schen Adjuvans an fünf verschiedenen Stellen auf dem Rücken. Die anschließenden Immunisierungen wurden intraperitoneal mit in PBS gelöstem Antigen an den Tagen 21, 35 und 49 nach der ersten Injektion durchgeführt. Der Titer wurde mittels ELISA auf gebundenen 6His-Fusionsproteinen überprüft. Bei ausreichendem Titer wurde die letzte Immunisierung halb intraperitoneal und halb intravenös durchgeführt, die Maus 3 Tage später getötet und die Milz entnommen. Die Milzzellen wurden dreimal in DPBS gewaschen, mit 4×10^7 Ag8 Zellen (auch in DPBS gewaschen) gemischt und zusammen abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen für 1 min bei 37°C im Wasserbad geschwenkt. Anschließend wurde über 1 Minute 1 ml auf 37°C vorgewärmtes PEG 1500 (Boehringer, Mannheim) unter leichtem Schütteln zugetropft und die Zellen für eine weitere Minute bei 37°C im Wasserbad geschwenkt. Danach wurde über 5 Minuten 10 ml warmes DPBS unter leichtem Schütteln zugetropft, die fusionierten Zellen mit 60 ml HAT-Medium (Boehringer, Mannheim) aufgefüllt und zu je $100 \mu\text{l}$ in eine Mikrotiterplatte verteilt. Nach einer Woche wurden die Zellen mit $100 \mu\text{l}$ HAT Medium gefüttert. Nach einer weiteren Woche waren einzelne Kolonien makroskopisch sichtbar. Der Überstand dieser Kolonien wurde im ELISA auf den gewünschten Antikörper hin getestet und positive Klone expandiert und durch Einzelzellklonierung subkloniert.

2.3.9 Radioaktive Markierung von Zellen

Für die Markierung von neusynthetisierten Proteinen durch die radioaktiven Aminosäuren [^{35}S] Methionin und [^{35}S]-Cystein wurden exponentiell wachsende Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Methionin/Cystein-Mangelmedium aufgenommen. Nach einer Stunde bei 37°C wurde $0,5 \text{ mCi}$ [^{35}S]-Methionin/Cystein (Pro Mix, Amersham) pro 3×10^7 Zellen zugegeben und die Zellen für 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach standen die Zellen für weitere Versuche zur Verfügung.

2.3.10 Präparation von cytosolischen Extrakten

2×10^6 Zellen wurden in $62,5 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert, mit $62,5 \mu\text{l}$ DSS ($10 \mu\text{g/ml}$ Digitonin in $0,5 \text{ M}$ Sucrose) versetzt und 30 sek gevortext. Anschließend wurde 1 min bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge Fresco) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Digitonin wurde als 1%ige Stammlösung in Ethanol bei RT gelagert.

2.4 Herstellung rekombinanter Proteine

2.4.1 Verwendete Konstrukte

Es wurden folgende Fusionsproteine für die Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet:

Name	Bereich (AS)	Vektor
GST-N-c-FLIP	1-194	pGEX 4T-2
GST-C-c-FLIP	194-480	pGEX 4T-2
6His-c-FLIP	1-480	pRSET B

2.4.2 Induktion und Expression der Proteine in *E.coli*

Die oben beschriebenen Plasmide wurden in *E.coli* BL21 (DE3) transfiziert und die Übernachtskultur einzelner Klone wurden 1:10 mit LB (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt. Nach einer Stunde wurde IPTG bis zu einer Konzentration von 1 mM zugegeben und die Bakterien für 2-3 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Induktion der Fusionsproteine wurde durch Analyse von Bakterienlysat mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kontrolliert und die Bakterien dann weiterverarbeitet.

2.4.3 Aufreinigung der Fusionsproteine

Viele der in *E.coli* produzierten Fusionsproteine sind unlöslich, das bedeutet sie werden nach der Lyse der Bakterien mit den Zellwandbestandteilen abzentrifugiert. Daher wurden für die verschiedenen Verwendungszwecke unterschiedliche Aufreinigungsmethoden verwendet:

Um GST-Fusionsproteine für die Immunpräzipitation einsetzen zu können, müssen diese in nativer Form aufgereinigt werden. Dazu wurden die induzierten Bakterien abzentrifugiert (6000 g, 10 min) und in 40 ml Lysepuffer (20 mM Tris/HCL, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-100, 0,5 µg/ml Antipain, 0,5 µg/ml Chymostatin A, 0,5 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Pepstatin) pro Liter induzierter Kultur aufgenommen und mittels Sonifizierung für 2 x 30 Sekunden bei höchster Stufe beschallt. Die so lysierten Bakterien wurden abzentrifugiert (6000 g, 15 min) und der Überstand mit in Lysepuffer gewaschener GSH-Sepharose 4B (Pharmacia) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharosematrix wurde anschließend 4-5 mal mit kaltem Lysepuffer gewaschen und in PBS mit Proteaseinhibitoren bei 4°C gelagert. Die Konzentration und Reinheit der gebundenen Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zusammen mit einem Proteinstandard bestimmt.

Um größere Mengen an GST-Fusionsproteinen für die Immunisierung von Versuchstieren aufzureinigen, kann man sich die Unlöslichkeit der Proteine zunutze machen. Hierzu wurden die Bakterien abzentrifugiert (6000 g, 10 min) und mit dem 10fachen Zellvolumen in 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0 aufgenommen. Anschließend wurde Lysozym bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben und die Bakterien für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5000 g, 10 min). Das Pellet wurde in kaltem 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Natriumdesoxycholat, 50 mM Tris, pH 8,0 aufgenommen und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zu dem Bakterienlysat $MgCl_2$ bis zu einer Konzentration von 8 mM zugegeben und mit DNase I (10 μ g/ml) die DNA abgedaut, bis die Viskosität der Lösung verschwand. Anschließend wurden die unlöslichen Proteine bei 10 000 g für 10 min abzentrifugiert und in 1% NP-40, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0 gewaschen. Um eine größere Reinheit zu erreichen wurde das Proteinpellet noch mit 1 M Harnstoff, 50 mM Tris pH 8,0 gewaschen und schließlich in PBS aufgenommen und die Konzentration und Reinheit der Fusionsproteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zusammen mit einem Proteinstandard bestimmt.

6His-Fusionsproteine können auch unter denaturierenden Bedingungen über eine Affinitätssäule aufgereinigt werden, da die Interaktion zwischen den Histidinen und dem Nickel nicht von der dreidimensionalen Proteinstruktur abhängt. Dazu wurden die induzierten Bakterien abzentrifugiert (6000 g, 10 min) und in einem kleinen Volumen 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 8,0 lysiert. Anschließend wurde das Lysat auf 50 ml pro 500 ml induzierter Kultur mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M NaPhosphat, pH 8,0 aufgefüllt und für 60 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert, um die Lyse zu vervollständigen. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (6000 g, 15 min) und in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 8,0 gewaschene Ni^{2+} -NTA-Agarose mit dem Überstand für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Agarosematrix mehrfach in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 8,0 gewaschen und die gebundenen Proteine mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 4,0 eluiert. Das Eluat wurde gegen PBS dialysiert, wobei die Proteine ausfielen. Durch die Zugabe von 0,1 % SDS und leichtes Erhitzen wurden die Proteine wieder in Lösung gebracht und die Konzentration und Reinheit mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zusammen mit einem Proteinstandard bestimmt. Die so vorliegenden 6His-Fusionsproteine wurden für den In-Gel-Kinase-Test, sowie zum Beschichten von ELISA Platten für die Identifizierung von positiven Hybridomen verwendet.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Ladung wurde die Isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Dazu wurden Acrylamidzylindergele mit einem Durchmesser vom 2,3 mm und einer Länge von 187 mm gegossen. Für fünf Gele wurde dabei folgender Ansatz verwendet:

Harnstoff	4,0 g
IEF Acrylamid (28,38% (g/v) Acrylamid, 1,62% (g/v) Bisacrylamid)	933° μ l
H ₂ O	1225° μ l
Ampholin Serva, pH 5,0 - 7,0	193° μ l
Ampholin Pharmacia, pH 5,0 - 7,0	193° μ l
Ampholin Pharmacia, pH 3,5 - 10,0	140° μ l
10% NP-40	1,4°ml
TEMED	5° μ l
10% APS	7° μ l

Vor der Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wurde die Gellösung entgast. Die Polymerisierung benötigte wenigstens zwei Stunden. Danach wurde in der IEF-Kammer unten 10 mM H₃PO₄ und oben 20 mM NaOH (beide entgast) vorgelegt. Die Gele wurden gespült und mit je 10 μ l Überschichtungspuffer (8 M Harnstoff, 1 % (v/v) Ampholin Pharmacia, pH 5,0 - 7,0, 5 % NP-40, 10 mM DTT) überschichtet. Der Vorlauf erfolgte bei konstantem Strom von 0,33 mA/Gel, bis eine Spannung von 1200 V erreicht wurde. Dann wurden die Proben in zehnfachem Volumen Probenpuffer (9,8 M Harnstoff, 2 % (v/v) Ampholin Pharmacia, pH 5,0 - 7,0, 4 % NP-40, 100 mM DTT) aufgenommen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die so vorbereiteten Proben wurden auf die Zylindergele gegeben und mit 10 μ l Überschichtungspuffer überschichtet. Der Lauf erfolgte bei 1200 V für 18 bis 20 Stunden. Durch Wasserdruck wurden die Gele dann aus den Kapillaren gepreßt und 5 min in 4 ml Äquilibriumspuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 50 mM DTT, 10 % (w/v) Glycerol) inkubiert. Die Gele wurden direkt für eine Auftrennung in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) verwendet oder bei -80° C aufbewahrt.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen (Laemmli, 1970) mit 7,5-15 % Acrylamid-Trenngel und einem 5 % Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. Die Gele hatten folgende Dimensionen:

Sammelgel: 233 mm x 12 - 27 mm x 1,5 mm

Trenngel: 233 mm x 203 mm x 1,5 mm.

Die Gelzusammensetzung ist in Abschnitt II.1.2 aufgeführt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt, die Geloberfläche durch Tupfen mit Filterpapier getrocknet und das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation (10 min) wurden die Gele beladen. Proteinlösungen wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und 3 min bei 95°C inkubiert. Zylindergele aus der isoelektrischen Fokussierung wurden auf die Sammelgele gelegt und mit Agaroselösung (0,169M Tris/HCl, pH 8,8, 0,9 % (w/v) SDS, 9 % Glycerol, 1 % (w/v) Agarose, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) fixiert, die zuvor durch Aufkochen gelöst und mit DTT (Endkonzentration 50 mM) versetzt wurde. Der Lauf der Gele erfolgte bei 80 bis 130 Volt für 12-20 Stunden. Bei radioaktiven Proben wurden die Gele amplifiziert (Amplify, Amersham), getrocknet und autoradiographiert.

2.5.3 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen wurde ein "Semidry"-Verfahren eingesetzt. Dazu wurden die Graphitelektroden der Blotkammer (Pharmacia, Freiburg) mit Transferpuffer befeuchtet. Darauf wurden drei Lagen mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und fünf Lagen befeuchtete Filterpapiere gebracht. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² 90 min lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1 Stunde mit 5 % (w/v) Milchpulver oder 2% (w/v) BSA in TPBS (0,05% Tween-20 in PBS) bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Blot wurde dreimal mit TPBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in TPBS verdünnt (Hybridomüberstand: 1:5 - 1:20 Verdünnung und aufgereinigte Antikörper: 0,1-1,0 µg/ml) und der Blot unter Schütteln für 16 Stunden bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Danach wurde dreimal je 10 min mit TPBS gewaschen. Anschließend wurde ein Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20 000 in TPBS oder 1:5 000 in 1% Milchpulver, je nach Anwendung) für 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend der Blot dreimal je 10 min mit TPBS gewaschen. Gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (Renaissance-Kit, NEN, Bad Homburg v.d.H.) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

2.5.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden aus Hybridomüberständen mit 45 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt, das Präzipitat zentrifugiert (Sorvall GS-3 Rotor, 5000 rpm, 10 min, 4 °C), in Wasser aufgenommen und über Nacht gegen PBS dialysiert. Der so konzentrierte Antikörper wurde nach Zentrifugation (Megafuge 1OR, 6000 rpm, 10 min, 4 °C) und Filtration durch einen 0,8 µm Filter über eine Protein A-Sepharose-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumen 0,1 M Tris/HCl (pH 8) gewaschen (die Effizienz wurde an einem Durchflußphotometer bei 280 nm kontrolliert). Anschließend wurden die monoklonalen Antikörper mit 0,1 M Glycin (pH 3) in 3 ml-Fractionen eluiert. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 3 M Tris/HCl (pH 8,8) neutralisiert und gegen PBS dialysiert. Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, sterilfiltriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Monoklonale Antikörper des Subtyps IgG1 wurden unter Hochsalzbedingungen aufgereinigt. Dazu wurde der konzentrierte Antikörper auf 3 M NaCl gebracht bevor er auf die Säule gegeben wurde. Als Waschpuffer wurde 10 mM Natriumborat (pH 8,9) mit 3 M NaCl verwendet.

2.5.5 Kopplung von Antikörpern an Sepharose

Um Antikörper für die Immunpräzipitation kovalent an Sepharose zu immobilisieren, wurden diese zunächst über Nacht gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8,9) dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Cyanbromid (CNBr)-aktivierte Sepharose zur Aktivierung mit 20 ml 1 mM HCl für 15 min über Kopf bei RT gerührt, zentrifugiert (600 x g, 1 min) und dann der Überstand abgesaugt. Die aktivierte Sepharose wurde mit dem Antikörper für 2 h bei RT über Kopf gerührt, der ungebundene Antikörper gewaschen und nicht abgesättigte CNBr-Gruppen durch erneutes Rühren für 2 h mit 0,1 M Tris/HCl (pH 8) inaktiviert. Anschließend wurde die Sepharosematrix je dreimal abwechselnd mit 0,1 M Natriumazetat/0,5 M NaCl (pH 4) und 0,1 M Tris/HCl/0,5 M NaCl (pH 8) gewaschen. Schließlich wurde die Sepharose in PBS mit 0,1 % Natriumazid und 1 mM PMSF aufgenommen, so daß eine 50%ige Suspension entstand.

2.5.6 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die behandelten oder unbehandelten Zellen in Lysepuffer (siehe II.1.2) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C). Das so geklärte Lysat wurde dann für die Immunpräzipitation verwendet. Dazu wurden meist an Protein A- oder Protein G-Sepharose gekoppelte Antikörper verwendet. Um bei Immunpräzipitationen aus anti-APO-1 stimulierten Zellen eine Bindung des anti-APO-1 Antikörpers an die Protein A Sepharose zu verhindern, wurden Antikörper kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

(Pharmacia) gekoppelt. Die Immunpräzipitationen erfolgten für mehr als 1 Stunde bei 4°C auf einem Überkopfschüttler.

2.5.7 DISC-Analyse

Für die Analyse des CD95 DISC wurden zwei Ansätze verwendet. Für den stimulierten DISC wurden Zellen in der Regel für 5 min mit 2 µg/ml anti-APO-1 stimuliert und anschließend wie oben beschrieben lysiert. Der unstimulierte Ansatz wurde erst nach der Lyse mit 2 µg anti-APO-1 versetzt. Anschließend wurden beide Lysate identisch behandelt. Im Falle der Stimulation mit LZ-CD95L wurden Zellen in 1 ml Zellkultur-Überstand von mit LZ-CD95L transfizierten CV-1/EBNA Zellen resuspendiert. Nach Stimulation für 5 min bei 37° C wurden die stimulierten und die unbehandelten Zellen lysiert und CD95 mit 2 µg anti-APO-1 immunpräzipitiert.

Die unspezifischen Bindungen wurden durch 10 µg FII23 mAk, kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B gekoppelt (Pharmacia, Freiburg), reduziert. Anschließend wurde der an anti-APO-1 gebundene stimulierte oder unstimulierte CD95-Rezeptor mit 30 µl Protein A-Sepharose (Sigma) für 1-2 h bei 4°C präzipitiert. Anschließend wurde die Sepharosematrix durch Zentrifugation (3000 g, 30 s, 4° C) entfernt und mehrfach in Lysepuffer gewaschen. Das Immunpräzipitat wurde entweder zweidimensional oder eindimensional gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie oder Western Blot analysiert.

2.5.8 Analyse von CD95-Aggregaten

Um SDS-stabile Aggregate von CD95 zu analysieren wurden 5×10^6 Zellen stimuliert oder unbehandelt gelassen, zentrifugiert (600g, 5 min, 4 °C) und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 40 µl Lysepuffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM Iodoacetamid, 200 µM Natriumvanadat, 1% NP-40, pH 7,4) 10 min auf Eis lysiert. Dann wurde die Debris durch Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4 °C) abgetrennt, das Lysat mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und auf 7,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Western Blot mit anti-CD95-Antikörpern.

2.5.9 In vitro-Caspase-8-Spaltung

Die Caspase-8/a cDNA wurde *in vitro* mit dem T7-Polymerase-Retikulozytenlysat-System (TNT, Promega) translatiert. Für das *in vitro*-Spaltungsexperiment wurde der CD95-DISC von 5×10^7 unmarkierten Zellen immunpräzipitiert. Dann wurde das Immunpräzipitat in 50 µl Reaktionspuffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 0,1 % CHAPS; 100 mM NaCl; 100 mM DTT und

20 % Saccharose) 24 h bei 4°C mit *in vitro* translaterter Caspase-8/a inkubiert. Die Ansätze wurden mittels 2D-IEF-SDS-PAGE oder 1D-SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend amplifiziert (Amplify, Amersham), getrocknet und autoradiographiert.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zum Zwei-Signalwege-Modell von CD95

Der Einfluß von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern auf CD95-vermittelte Apoptose wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (Krammer, 1999). Eine vergleichende Studie zur CD95-vermittelten Apoptose in verschiedenen Zelllinien führte zu dem Schluß, daß unterschiedliche Signalwege vorhanden sind. Dies führte zum Zwei-Signalwege-Modell der CD95-vermittelten Apoptose (Scaffidi et al., 1998). Dieses Modell gruppiert CD95-sensitive Zellen in zwei Zellarten, Typ I und Typ II, ein. Typ I-Zellen (z.B. SKW6.4, H9) zeichnen sich durch eine effiziente DISC-Bildung aus. Dadurch werden große Mengen Caspase-8 am DISC aktiviert, so daß eine direkte Caspasenkaskade eingeleitet wird. In Typ II-Zellen (z.B. CEM, Jurkat) dagegen ist die DISC-Bildung stark vermindert, was eine direkte Caspasenkaskade verhindert. Deshalb benötigen diese Zellen einen Verstärkermechanismus. Als Verstärker fungiert hier der evolutionär konservierte mitochondrielle Apoptosesignalweg. Da Typ II-Zellen von den apoptogenen Faktoren des Mitochondriums abhängig sind, läßt sich Apoptose in diesen Zellen durch verstärkte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern inhibieren. Die Mitochondrien werden auch in Typ I-Zellen aktiviert, diese sind aber wegen der direkten Caspasenkaskade unabhängig von den mitochondriellen Apoptosemolekülen. Deshalb können anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder Apoptose in Typ I-Zellen nicht blockieren.

Dieses Modell sollte zum einen durch die Verwendung des CD95-Liganden (CD95L) verifiziert werden, um das Zwei-Signalwege-Modell unter mehr physiologischen Bedingungen zu testen. Zum anderen sollten weitere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen identifiziert werden.

1.1 CD95L induziert Apoptose über die zwei Signalwege von CD95

Um das Zwei-Signalwege-Modell unter mehr physiologischen Bedingungen zu testen, sollte zuerst untersucht werden, ob sich das Modell bestätigen läßt, wenn der CD95-Ligand (CD95L) zur Apoptose-Induktion verwendet wird. Dabei wurde ein Konstrukt verwendet, in dem CD95L durch Fusion mit einer Leuzin-Reißverschluß-Domäne (engl. leucine zipper, LZ) modifiziert ist (Walczak et al., 1999). Diese Domäne dient der Protein-Protein-Interaktion und vermittelt eine Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren (Struhl, 1989). Das LZ-Motiv wurde von der Firma Immunex derart modifiziert, daß stabile Trimere gebildet werden. Damit wird die natürliche Trimerisierung der Liganden der TNF-Familie stabilisiert, und daher ist der so modifizierte CD95L hoch aktiv (Walczak et al., 1999).

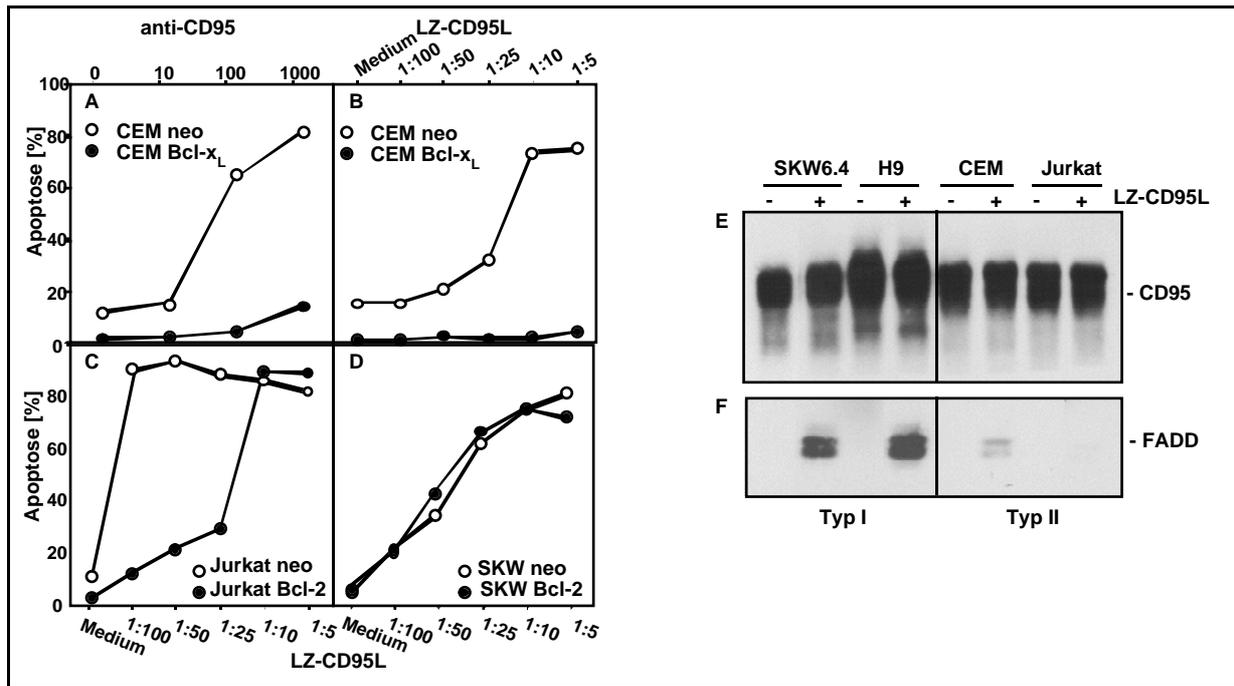


Abbildung 7: Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen nach Stimulation mit CD95L. (A-D) Bcl-2 bzw. Bcl-x_L überexprimierende Zellen wurden den angegebenen Konzentrationen von anti-APO-1 (A) bzw. LZ-CD95L (B-D) behandelt und Apoptose anhand von DNA-Fragmentierung gemessen. (E,F) Reduzierte FADD-Rekrutierung an CD95 in Typ II-Zellen nach LZ-CD95L-Stimulation. Zellen wurden unbehandelt gelassen (-) oder für 5 min bei 37° C mit 1 ml LZ-CD95L-enthaltendem Zellkulturüberstand stimuliert, lysiert und CD95 präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen CD95 (E) und FADD (F) analysiert.

Der LZ-CD95L enthaltende Überstand von CV1-EBNA-Zellen, die transient mit einem Expressionsplasmid für LZ-CD95L transfiziert worden waren, wurde auf verschiedenen Zelllinien titriert, die mit einem Expressionsplasmid für Bcl-2, Bcl-x_L bzw. dem leeren Kontrollvektor stabil transfiziert waren. Nach der Stimulation mit LZ-CD95L wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt. In Abb. 7B ist zu sehen, daß CEM-Zellen, die mit Bcl-x_L transfiziert wurden, gegenüber LZ-CD95L-induzierter Apoptose protektiert sind. CEM-Zellen, die mit einem leeren Kontrollplasmid transfiziert waren, sind dagegen sensitiv. Dies läßt sich auch bei Titration des agonistischen Antikörpers anti-APO-1 beobachten (Abb. 7A) (Scaffidi et al., 1998). Jurkat-Zellen, die Bcl-2 exprimieren, sind, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, ebenfalls deutlich gegenüber LZ-CD95L-induzierter Apoptose geschützt (Abb. 7C). Allerdings schützt Bcl-2 nicht gegenüber hohen Konzentrationen von LZ-CD95L. SKW6-Zellen sind nicht durch Bcl-2 vor LZ-CD95L-induzierter Apoptose geschützt (Abb. 7D), wie für Typ I-Zellen erwartet wurde. Die unterschiedliche Protektion durch Bcl-2 in SKW6- und Jurkat-Zellen ist nicht durch eine geringere Expression von Bcl-2 in SKW6 zu erklären, da die Expression von Bcl-2 in SKW6 10 bis 20fach höher ist als in Jurkat (Scaffidi et al., 1998). Damit sind die Unterschiede in der Bcl-2-Inhibierbarkeit CD95-vermittelter Apoptose nicht auf die Expressionsstärke von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L zurückzuführen, sondern auf unterschiedliche Signalwege in den verschiedenen Zelltypen.

Ein weiteres Charakteristikum von Typ II-Zellen ist die gegenüber Typ I-Zellen verminderte DISC-Bildung. Deshalb wurde der DISC aus Typ I- und Typ II-Zellen nach Stimulation mit LZ-CD95L untersucht. Die Zellen wurden stimuliert, lysiert und CD95 mit anti-APO-1 immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Die Immunpräzipitation von CD95 war in allen Ansätzen gleich effizient (Abb. 7E). Jedoch zeigen sich bei der Assoziation von FADD, die als Indikator für die DISC-Bildung analysiert wurde, die bekannten Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen (Abb. 7F). FADD wurde effizient in Typ I-Zellen nach Stimulation von CD95 rekrutiert. In Typ II-Zellen fand dagegen nur eine geringe (CEM) bzw. nicht detektierbare Rekrutierung statt.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß auch nach Stimulation mit LZ-CD95L, wie nach Stimulation mit dem agonistischen Antikörper anti-APO-1, Typ I- und Typ II-Zellen klassifiziert werden können. So ist die DISC-Bildung in Typ II- gegenüber Typ I-Zellen stark reduziert, und Bcl-2/Bcl-x_L können CD95-vermittelte Apoptose nur in Typ II-Zellen inhibieren. Die Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen reflektieren also unterschiedliche Signalwege in verschiedenen Zelltypen.

1.2 PMA inhibiert CD95-vermittelte Apoptose in CD95-Typ II-Zellen

Es sollte untersucht werden, ob neben der DISC-Bildung und der Bcl-2-Inhibierbarkeit CD95-vermittelter Apoptose noch andere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen existieren. Interessanterweise lässt sich CD95-vermittelte Apoptose durch Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), z.B. durch den Phorbolester (PMA), inhibieren (Copeland et al., 1994; Clement et al., 1996; Rudert et al., 1997; Cuvillier et al., 1998). Darüber hinaus ist PKC ein potenter Aktivator der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die ebenfalls CD95-vermittelte Apoptose inhibieren kann (Holmstrom et al., 1998; Holmstrom et al., 1999). Auffallend ist, daß bei all diesen Studien Jurkat-Zellen verwendet wurden. Um zu testen, ob PMA generell CD95-vermittelte Apoptose inhibieren kann, oder ob der Effekt zelltypspezifisch ist, wurden die vier Modellzelllinien SKW6.4 (Abb. 8A), H9 (Abb. 8B), CEM (Abb. 8C) und Jurkat (Abb. 8D) in An- oder Abwesenheit von PMA gegen anti-APO-1 titriert und Apoptose mittels DNA-Fragmentierung gemessen. Aktivierung von PKC inhibiert CD95-vermittelte Apoptose nur in den Typ II-, aber nicht in Typ I-Zellen. Um zu testen, ob diese Inhibition im Signalweg ober-

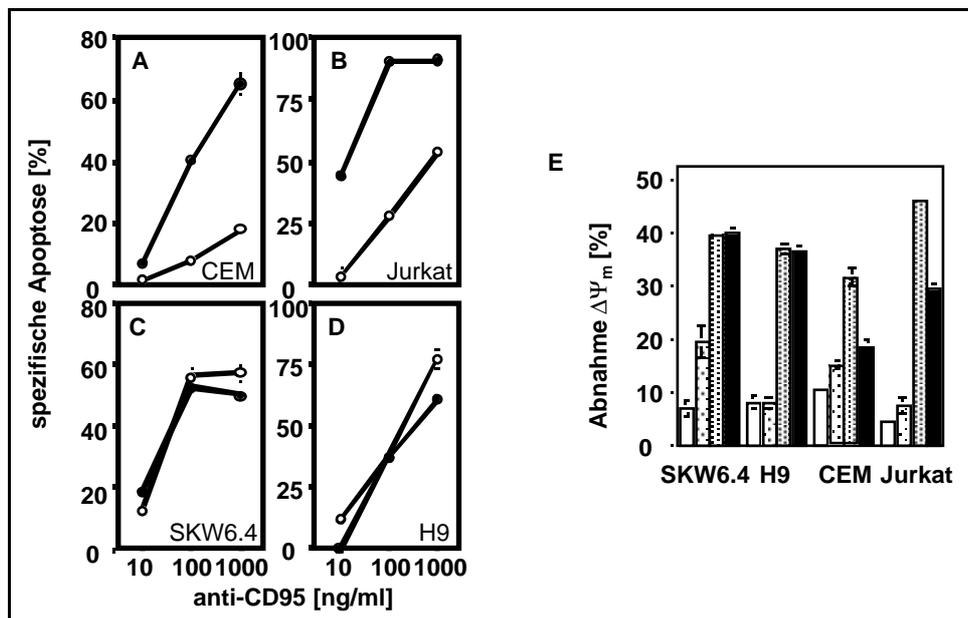


Abbildung 8: Aktivierung von PKC durch PMA reduziert CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen. (A-D) Die Typ II-Zellen CEM (A) und Jurkat (B), sowie die Typ I-Zellen SKW6.4 (C) und H9 (D) wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen von anti-APO-1 in An- (o) und Abwesenheit (•) von PMA (20 ng/ml bei SKW6.4, CEM und Jurkat, 5 ng/ml bei H9) inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten mit Standardabweichungen. (E) SKW6.4, H9, CEM und Jurkat wurden mit PMA (hellgrau), anti-APO-1 (dunkelgrau) bzw. PMA und anti-APO-1 (schwarz) behandelt bzw. unbehandelt (weiß) gelassen. Die Stimulation mit anti-APO-1 betrug 2 h, wobei gegebenenfalls 30 min vorher mit PMA stimuliert wurde (Konzentrationen siehe A-D). Anschließend wurde $\Delta\Psi_m$ mit DiOC₃(6) gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplikaten mit Standardabweichungen.

halb oder unterhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, wurde das mitochondrielle Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$) mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DiOC₃(6) im FACS gemessen. PMA hat keinen Effekt auf $\Delta\Psi_m$ in Typ I-Zellen. Die Abnahme von $\Delta\Psi_m$ in Typ II-Zellen wird jedoch durch PMA verhindert (Abb. 8E), woraus zu schließen ist, daß PMA oberhalb der Mitochondrien wirken muß.

Im CD95-Typ II-Signalweg gibt es zwei potentielle Angriffspunkte, an denen PKC oder ein von PKC aktiviertes Effektormolekül eingreifen könnte, nämlich den CD95-DISC und das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid, das von Caspase-8 gespalten wird. Gespaltenes Bid transloziert zum Mitochondrium, was zum Zusammenbrechen von $\Delta\Psi_m$ und der Ausschüttung apoptogener Faktoren aus dem mitochondriellen Intermembranraum führt (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999b). Um einen möglichen Einfluß von PKC oder MAPK auf die Aktivität des DISCs zu testen, wurden Jurkat-Zellen mit anti-APO-1 in An- oder Abwesenheit von PMA stimuliert und ein *in vitro*-Caspase-8-Spaltungstest durchgeführt (Abb. 9A). Dabei wird der DISC aus Zellen immunpräzipitiert und mit ³⁵S-markierter *in vitro* translaterter Caspase-8 inkubiert. Eine Spaltung von Caspase-8 in die bekannten Spaltungsintermediate zeigt die Bildung eines funktionellen DISCs an. Die Aktivierung von MAPK wurde dabei in einem Ansatz durch den MEK1-spezifischen Inhibitor PD98059 blockiert. Durch Blockierung der

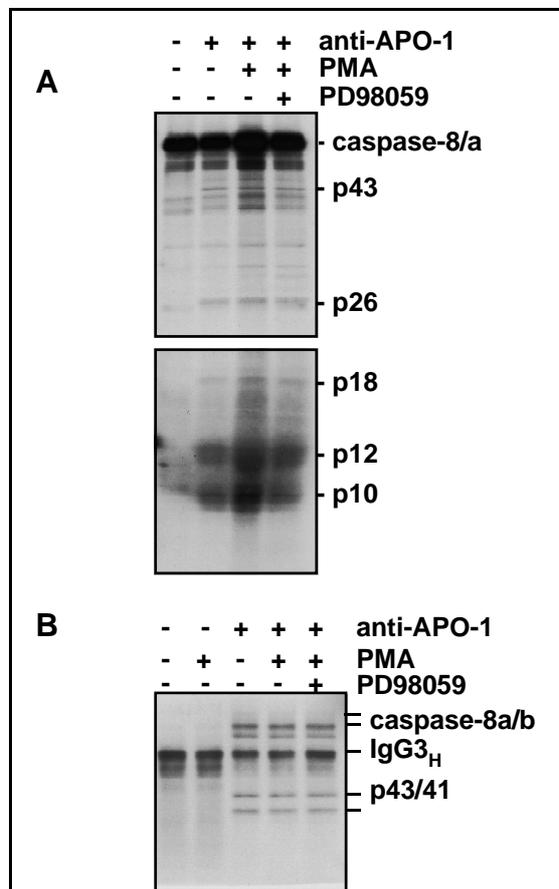


Abbildung 9: PMA hat keinen Einfluß auf den DISC. (A) *In vitro*-Caspase-8-Spaltungstest von Jurkat. 5×10^7 Zellen wurden wie angegeben mit 2 $\mu\text{g/ml}$ anti-APO-1, 20 nM PMA (10 min. vor anti-APO-1 Stimulation) und 30 μM PD98059 (30 min. vor anti-APO-1 Stimulation) stimuliert, lysiert und der DISC immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 24 h mit 1 μl *in vitro* translaterter ³⁵S-markierter Caspase-8/a inkubiert und auf 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden fixiert, amplifiziert (Amplify, Amersham, Braunschweig), getrocknet und autoradiographiert. Die Positionen von Caspase-8/a und der Spaltprodukte im Gel ist angegeben. **(B)** DISC-Analyse von 5×10^7 Jurkat-Zellen nach Behandlung mit PMA, PD98059 und/oder anti-APO-1 (Konzentrationen und Stimulationszeiten wie in A). Nach Stimulation wurden die Zellen lysiert, der DISC immunpräzipitiert und die Immunpräzipitate mittels Western Blot analysiert. Die Laufpositionen von Caspase-8/a, -/b, p43/41, sowie der schweren Kette des immunpräzipitierenden Antikörpers sind angegeben. Die Expositionsdauer betrug 30 min.

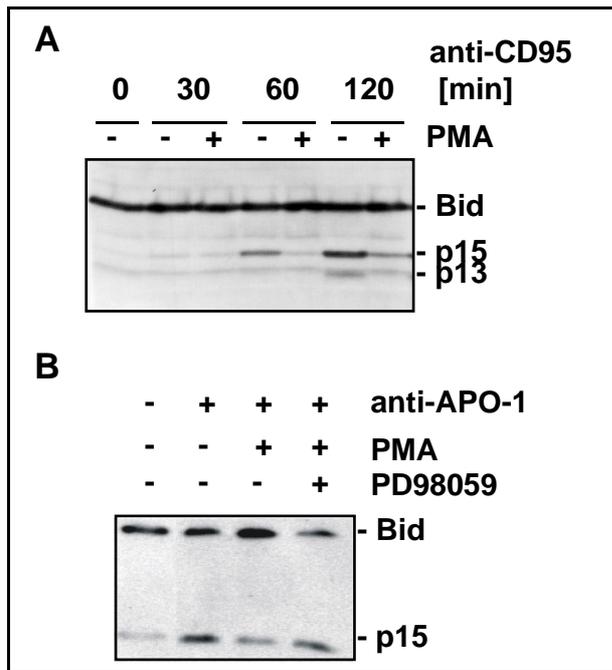


Abbildung 10: PMA reduziert die Spaltung von Bid. (A) Jurkat-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 20 ng/ml PMA (30 min. Vorinkubation) mit 100 ng/ml anti-APO-1 Antikörper für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Menge an gespaltenem und ungespaltenem Bid wurde per Western Blot-Analyse bestimmt. (B) Jurkat wurden für 2 h mit 2 µg/ml anti-APO-1, 20 nM PMA (10 min. vor anti-APO-1 Stimulation) und 30 µM PD98059 (30 min. vor anti-APO-1 Stimulation) stimuliert und die Menge an gespaltenem und ungespaltenem Bid per Western Blot-Analyse bestimmt.

MAPK ließe sich ein PKC-spezifischer, MAPK-unabhängiger Effekt aufzeigen. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Aktivität der DISCs aus den verschiedenen stimulierten Jurkat-Zellen festgestellt werden (Abb. 9A).

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die endogenen Mengen von Caspase-8, die an den CD95-DISC rekrutiert werden, durch Stimulation von PKC verändern. Da die als Modellzelllinie ausgewählten Jurkat-Zellen als Typ II-Zellen nur sehr geringe Mengen DISC bilden, wurden deutlich mehr Zellen als üblicherweise für die Immunpräzipitation des DISCs eingesetzt. Die Mengen an CD95-assoziiierter Caspase-8 in den Jurkat-Zellen waren deutlich geringer als in den als Kontrolle verwendeten SKW6.4, obwohl von diesen Typ I-Zellen fünfmal weniger Zellen eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt). Die Rekrutierung von endogener Caspase-8 an den DISC von Jurkat-Zellen wurde durch Aktivierung von PKC und MAPK allerdings nicht beeinflusst (Abb. 9B), was einen direkten oder indirekten Effekt von PKC oder MAPK auf den DISC von CD95 ausschließt.

Dagegen ist die Spaltung von Bid durch Aktivierung von PKC deutlich inhibiert (Abb. 10A), was darauf hindeutet, daß PKC bzw. ein PKC-aktiviertes Effektormolekül, wie z. B. MAPK, auf der Ebene von Bid wirkt. Der Einfluß scheint aber eher indirekt zu sein, da der MEK1-Inhibitor PD98059 die PMA-vermittelte Reduktion der Bid-Spaltung blockiert (Abb. 10B). PMA aktiviert also MAPK über PKC, wodurch CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen durch Inhibition der Spaltung von Bid blockiert wird. Die verminderte Spaltung von Bid unterbricht den mitochondrialen Signalweg der Typ II-Zellen.

2 Regulation CD95-vermittelter Apoptose durch c-FLIP_L

2.1 c-FLIP_L inhibiert CD95-vermittelte Apoptose

Bei der Suche nach Proteinen, die Sequenzhomologien zu DED-enhaltenden Proteinen, wie z.B. FADD oder Caspase-8, aufweisen, wurden virale Gene in EST-Datenbanken (EST: expressed sequence tag) identifiziert, die wie Caspase-8 zwei DEDs enthalten (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997a; Bertin et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß die korrespon-

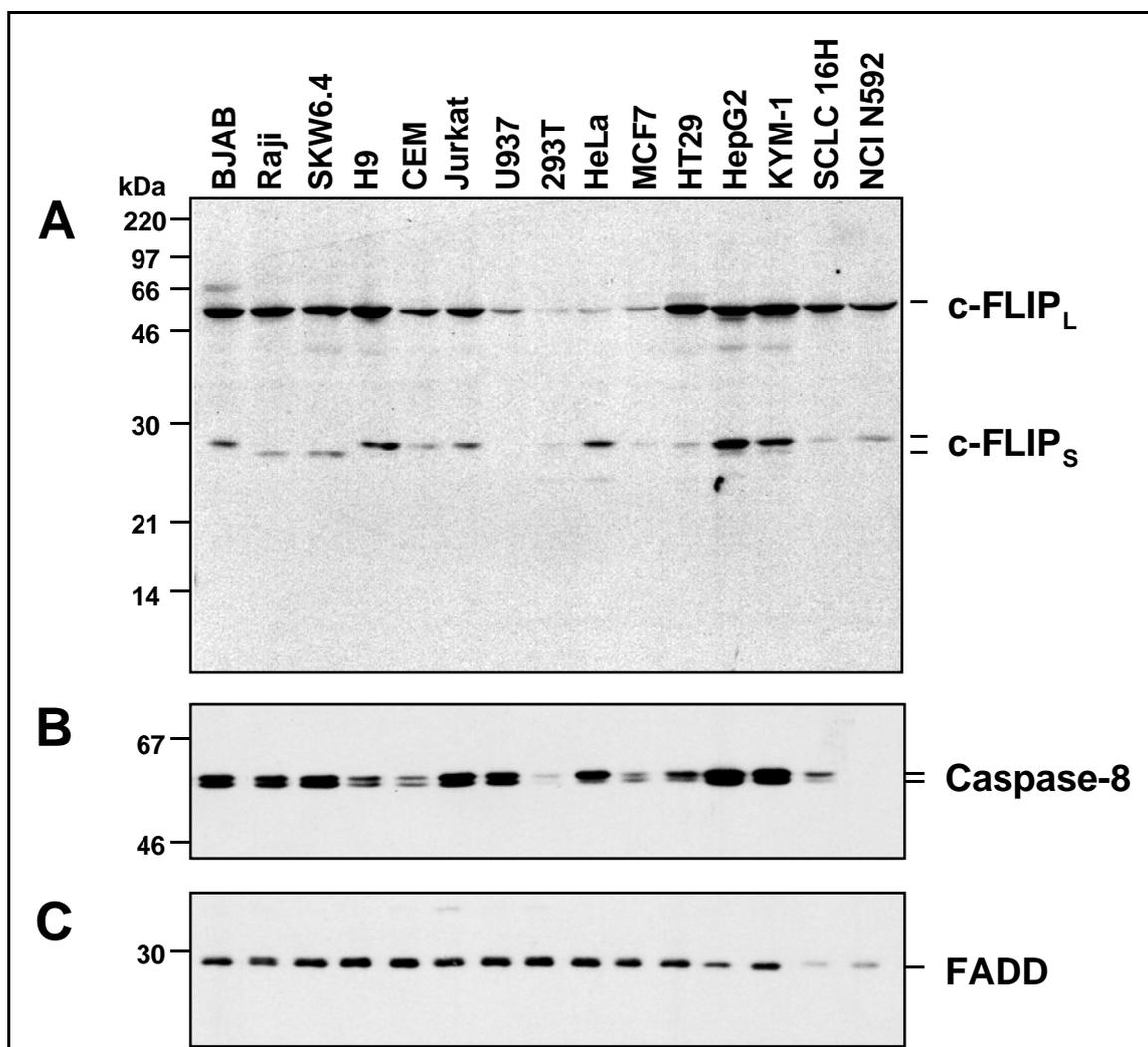


Abbildung 11: Expression von c-FLIP in verschiedenen Zellen. 50 µg an zellulären Proteinen der angegebenen Zelllinien wurden durch Western Blot mit (A) dem anti-c-FLIP Antikörper NF6 (B) dem anti-Caspase-8 Antikörper C15 und (C) einem anti-FADD Antikörper (Transduction Laboratories) analysiert. Die Zelllinien repräsentieren die folgenden Gewebe: Lymphgewebe: B-Zellen (BJAB, Raji, SKW6.4), T-Zellen (H9, CEM, Jurkat) und Monozyten (U937); Niere (293T); Gebärmutter-schleimhaut (HeLa); Brust (MCF-7); Darm (HT29); Leber (HepG2); Muskel (KYM-1) und Lunge (SCLC 16H, NCI N592). Die Laufpositionen von c-FLIP_L und c-FLIP_S sind markiert.

dierenden Proteine CD95-vermittelte Apoptose inhibieren können, indem sie in den DISC rekrutiert werden und dort die Aktivierung von Caspase-8 verhindern (Thome et al., 1997). Nachfolgend konnte von verschiedenen Gruppen ein zelluläres Homolog kloniert werden (Irmeler et al., 1997b; Goltsev et al., 1997; Shu et al., 1997; Inohara et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Hu et al., 1997b; Han et al., 1997; Rasper et al., 1998), das acht unterschiedliche Namen erhielt (siehe Einleitung, Kapitel 4.8.2) und im folgenden c-FLIP genannt wird. Dabei wurde sowohl eine pro- als auch eine anti-apoptotische Funktion für c-FLIP beschrieben. Die Untersuchungen in den Veröffentlichungen über die Klonierung von c-FLIP beschränkten sich



Abbildung 12: Schematische Darstellung der Struktur von c-FLIP. Die Aminosäuresequenz des mutierten aktiven Zentrums von c-FLIP ist mit der von Caspase-8 verglichen. DED, Todeseffektor-Domäne.

allerdings fast ausschließlich auf transiente Transfektionsexperimente. Außerdem wurden neun verschiedene Splicevarianten auf RNA Ebene beschrieben.

Um die Rolle von c-FLIP in der CD95-vermittelten Apoptose genauer untersuchen zu können, wurde zunächst mit Hilfe eines in unserem Labor hergestellten monoklonalen Antikörpers, der den in allen beschriebenen Spliceformen enthaltenen N-terminalen Bereich von c-FLIP erkennt, das endogene Expressionsniveau in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dazu wurden Lysate der verschiedenen Zelllinien hergestellt, gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Dabei konnten in Einklang mit anderen Arbeitsgruppen (Irmeler et al., 1997b; Shu et al., 1997; Rasper et al., 1998) zwei Formen von c-FLIP auf Proteinebene identifiziert werden (Abb. 11A). Die lange Form (55 kDa, c-FLIP_L) hat eine ähnliche Domänenstruktur wie Caspase-8. c-FLIP_L enthält zwei DEDs in seiner Prodomäne und eine putative Caspasendomäne mit zwei Untereinheiten an seinem C-Terminus. Jedoch besitzt c-FLIP_L ein nicht funktionelles aktives Zentrum, in dem das katalytische Cystein und andere für die Katalyse

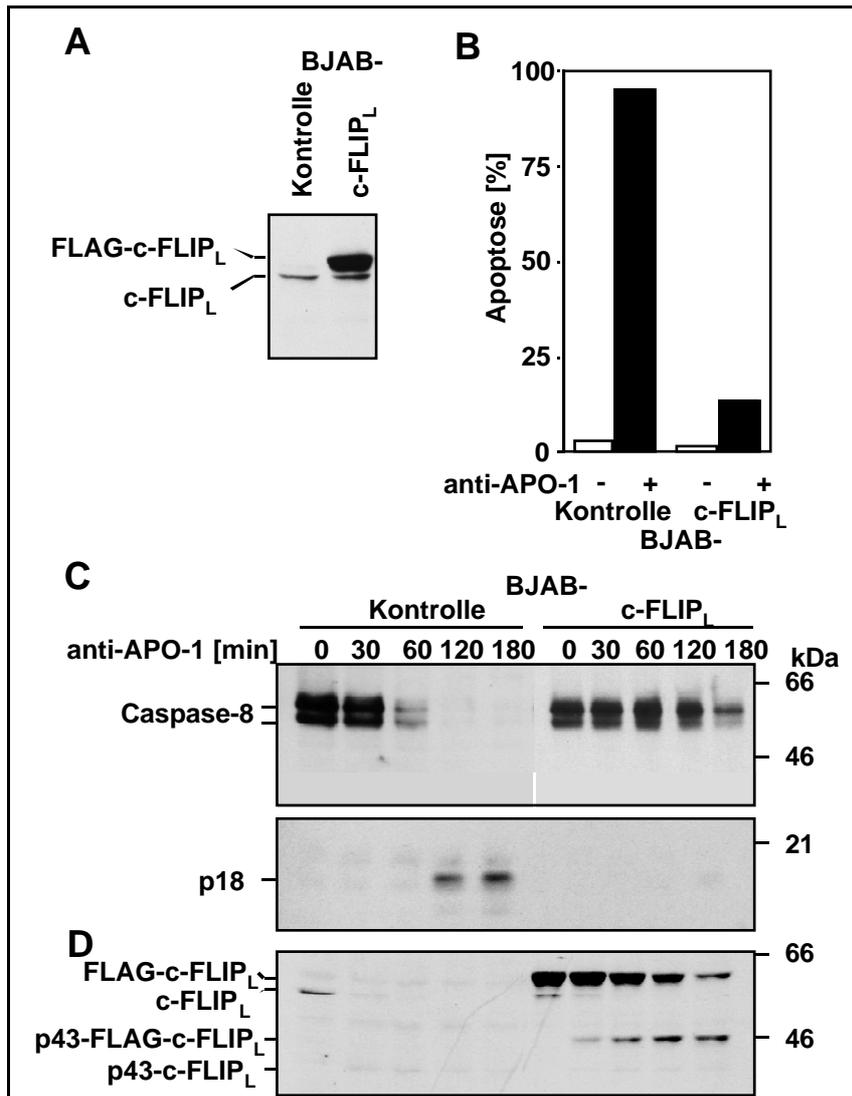


Abbildung 13: berexpression von c-FLIP_L schützt Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose. (A) BJAB-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (Kontrolle) oder einem FLAG-c-FLIP_L-Expressionsplasmid (c-FLIP_L) transfiziert und die Expression stabiler Klone im Western Blot mit dem anti-c-FLIP Antikörper NF6 nachgewiesen. (B) Die unter (A) gezeigten Zellen wurden mit (+) oder ohne (-) anti-APO-1 für 16 h inkubiert und anschließend die Apoptose bestimmt. (C, D) Die unter (A) gezeigten Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit anti-APO-1 behandelt und die Spaltung von Caspase-8 (C) und c-FLIP_L (D) im Western Blot mit den Antikörpern C15 (C) oder NF6 (D) nachgewiesen.

wichtige Aminosäuren mutiert sind. Die kurze Form (27 kDa, c-FLIP_S) ähnelt den viralen FLIPs. Abb. 12 faßt dies schematisch zusammen.

Die Expression von c-FLIP_S ist geringer als die der 55 kDa Splicevariante, und auch die Größe von c-FLIP_S war nicht einheitlich. So wurde in den B-Zellen Raji und SKW6.4 eine etwas kleinere Form von c-FLIP_S gefunden. Allerdings korrelierte weder die endogene Expression von c-FLIP_L noch die von c-FLIP_S mit Sensitivität oder Resistenz gegenüber Apoptose. Semi-quantitative Western Blot-Analysen ergaben, daß c-FLIP_L etwa 100fach geringer exprimiert wird als Caspase-8 (Daten nicht gezeigt). Da c-FLIP_L gegenüber c-FLIP_S die in lymphoiden Zellen stärker exprimierte Form ist, wurde diese Isoform näher untersucht.

Um den Einfluß von c-FLIP_L auf den CD95-Signalweg zu studieren, wurden BJAB-Zellen stabil mit einer FLAG-markierten Form dieses Moleküls transfiziert. Dies ermöglichte, das transfizierte FLAG-c-FLIP_L durch sein verändertes Laufverhalten vom endogenen c-FLIP_L zu unterscheiden. Es wurden mehrere c-FLIP_L Transfektanten erhalten, von denen die Ergebnisse eines repräsentativen Klons gezeigt sind. Die Expression von FLAG-c-FLIP_L lag deutlich über der des endogenen Proteins (Abb. 13A). Dies bewirkte, daß die transfizierten Zellen vor CD95-

vermittelter Apoptose geschützt waren (Abb. 13B). Die Protektion vor CD95-vermittelter Apoptose korrelierte in den verschiedenen Klonen mit dem Expressionsniveau von c-FLIP_L (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierung von Caspase-8 stellt den ersten enzymatischen Schritt im CD95-Signalweg dar. Um zu überprüfen, ob c-FLIP_L in der Lage ist, mit diesem frühen Ereignis zu interferieren, wurde die Spaltung von Caspase-8 nach CD95-Stimulation untersucht. Es zeigte sich, daß in den c-FLIP_L-transfizierten Zellen die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert war, wogegen eine normale Aktivierung von Caspase-8 in den Kontrolltransfektanten beobachtet werden konnte (Abb. 13C). Die Stimulation von CD95 führte jedoch auch zu einer Spaltung von c-FLIP_L, so daß die Bildung eines Spaltproduktes von 43 kDa (p43) beobachtet werden konnte (Abb. 13D). Dieses Spaltprodukt war jedoch nicht stabil und wurde schnell degradiert, so daß es bei dem endogenen c-FLIP_L nur schwer nachzuweisen war. Auch in den transfizierten Zellen wurde eine Spaltung von c-FLIP_L beobachtet, obwohl keine signifikante Caspase-8-Aktivierung vorlag. Bei dem gespaltenen c-FLIP_L war das N-terminale FLAG-Markerpeptid noch intakt, so daß auch das p43-Intermediat ein langsames Laufverhalten im Gel aufwies. Dies läßt den Schluß zu, daß c-FLIP_L in Analogie zu Caspase-8 zwischen der putativen p18 und p10 Untereinheit prozessiert wird (vgl. Abb. 14A), und daß diese Spaltung mit der Wirkung des Proteins als Apoptoseinhibitor einhergeht. Eine putative Spaltstelle für Caspasen in c-FLIPL ist beschrieben worden (Irmeler et al., 1997b). Eine Spaltung von c-FLIP_S nach CD95-Stimulation konnte nicht beobachtet werden.

2.2 c-FLIP_L wird in den DISC von Typ I-Zellen rekrutiert

Da c-FLIP_L ähnlich wie Caspase-8 oder v-FLIP zwei DEDs enthält, ist es möglich, daß auch c-FLIP_L in der Lage ist, über FADD an den aktivierten CD95-Rezeptor zu binden. Um dies zu testen, wurde entweder der stimulierte oder der unstimulierte CD95-Rezeptor aus c-FLIP_L und vektortransfizierten Zellen immunpräzipitiert und die Assoziation von c-FLIP_L mit dem DISC im Western Blot überprüft (Abb. 14B). c-FLIP_L war stimulationsabhängig in der Lage, an den CD95-DISC zu binden. Neben c-FLIP_L wurde auch c-FLIP_S am Rezeptor gefunden. Dies war zu erwarten, da auch c-FLIP_S die beiden N-terminalen DEDs enthält (Irmeler et al., 1997b). In den transfizierten Zellen war die Menge an DISC-assoziiertem c-FLIP_L deutlich erhöht, was darauf schließen läßt, daß die Bindekapazität des DISC für c-FLIP_L in den vektortransfizierten Zellen noch nicht ausgeschöpft war. Jedoch war nicht die ungespaltene Form von c-FLIP_L mit dem Rezeptor assoziiert, sondern die gespaltene p43-Form, die auch schon nach CD95-Stimulation im Lysat nachgewiesen werden konnte (Abb. 13D).

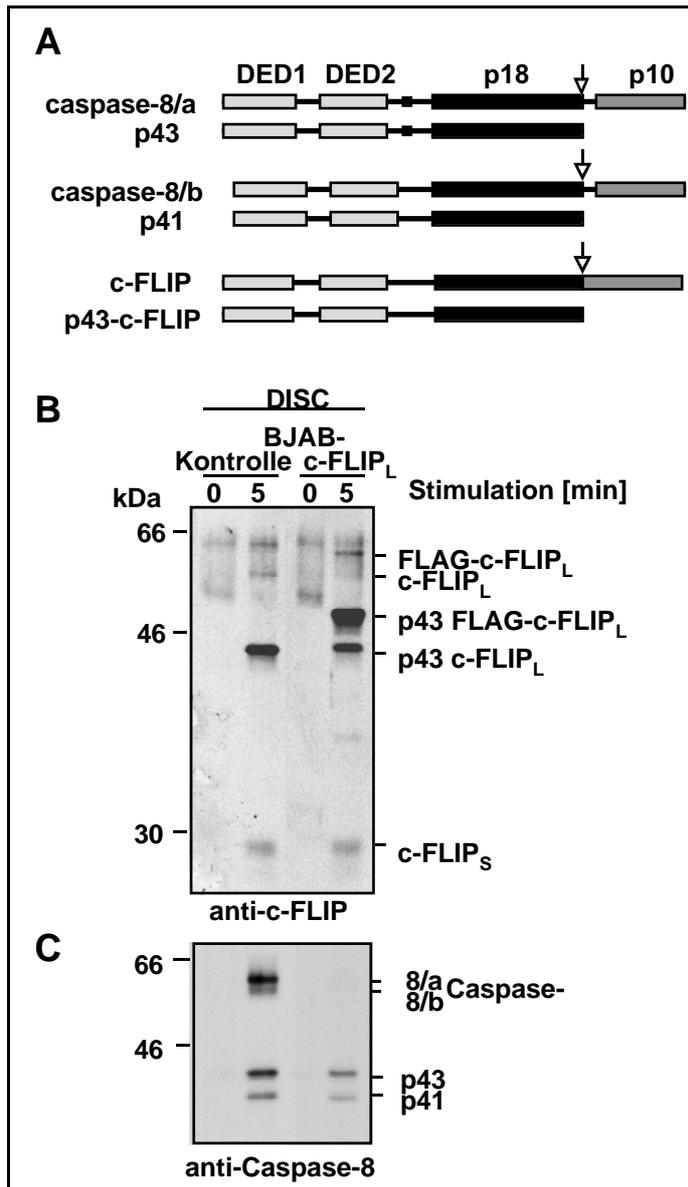


Abbildung 14: c-FLIP_L bindet an den CD95-DISC und blockiert seine Aktivität.

(A) Schematische Darstellung von c-FLIP_L, Caspase-8 und ihren Spaltprodukten. DED, Todeseffektor-Domäne. (B) Der CD95-DISC wurde aus den in Abb. 12 gezeigten, unstimulierten (-) oder stimulierten (+) BJAB-Zellen immunpräzipitiert und die Assoziation von c-FLIP_L im Western Blot nachgewiesen. (C) Ähnlich wie unter (B) gezeigt wurde die Assoziation von Caspase-8 mit dem CD95-DISC im Western Blot mit dem Antikörper C15 untersucht.

Caspase-8 wird in Typ I-Zellen hauptsächlich am CD95-DISC aktiviert. Da nun c-FLIP_L in der Lage war, an den DISC zu binden und die Caspase-8 Spaltung zu inhibieren, sollte als nächstes der Mechanismus dieser Inhibition aufgeklärt werden. Dazu wurde die Assoziation von Caspase-8 mit dem aktivierten CD95-Rezeptor in den transfizierten Zellen überprüft. In der Vektortransfektante waren sowohl ungespaltene Caspase-8 als auch die p43/41-Intermediate mit dem DISC assoziiert (Abb. 14C), was auf eine voranschreitende Caspase-8-Aktivierung schließen läßt.

In den c-FLIP_L-transfizierten Zellen waren jedoch nur die Spaltprodukte von Caspase-8, p43/41, mit dem DISC assoziiert. Ungespaltene Caspase-8 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 14C). Da diese Produkte nur durch die Spaltung von Caspase-8 erzeugt werden können, muß initial ungespaltene Caspase-8 mit dem DISC assoziiert gewesen sein. Jedoch scheint eine Blockade der Verdrängung der Spaltprodukte durch ungespaltene Caspase-8 vorzuliegen. Weitere Versuche zeigten, daß die Menge an DISC-gebundenem FADD durch c-FLIP_L nicht verändert wird (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß die erhöhte Menge an c-FLIP_L für die Blockade der Aktivierung von Caspase-8 verantwortlich ist.

Der Wirkmechanismus von c-FLIP_L kann wie folgt zusammengefaßt werden. Nach Stimulation binden c-FLIP_L, c-FLIP_S und Caspase-8 über FADD an CD95. Dort werden Caspase-8 und auch c-FLIP_L gespalten. Jedoch gehen die Spaltprodukte beider Proteine einen stabilen Komplex miteinander und mit FADD ein, der nicht durch ungespaltene Caspase-8 vom

Rezeptor verdrängt werden kann. Da dies aber für die weitere Aktivierung von Caspase-8 essentiell ist, wird das CD95-Signal an dieser Stelle unterbrochen und die Apoptose somit verhindert.

2.3 *c-FLIP_L inhibiert den DISC von Typ II-Zellen*

Da *c-FLIP_L* direkt den ersten enzymatischen Schritt CD95-vermittelter Apoptose, die Aktivierung von Caspase-8 am DISC, inhibiert, lag die Vermutung nahe, daß *c-FLIP_L* CD95-vermittelte Apoptose auch in Typ II-Zellen inhibieren kann. Um diese Vermutung zu testen, wurden stabile Transfektanten der Typ II-Zelllinie CEM hergestellt. Wie im Falle der BJAB *c-FLIP_L*-Transfektanten wurde eine mit einem FLAG-Markerpeptid versehene Version von *c-FLIP_L* bzw. ein Kontrollplasmid transfiziert (Abb. 15A). Zuerst wurden die Transfektanten auf ihre Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose getestet. Dazu wurde die DNA-Fragmentierung nach CD95-Stimulation analysiert. Durch die verstärkte Expression von *c-FLIP_L* sind die Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, wie die Titration von anti-APO-1 in Abb. 15B zeigt. Da verstärkte Expression von *c-FLIP_L* auch den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$), das im FACS mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 gemessen wurde, sowohl in der Titration von anti-APO-1 (Daten nicht gezeigt), als auch in der Kinetik (Abb. 15C) verhindert, wirkt *c-FLIP_L* in Typ II-Zellen oberhalb der Mitochondrien.

Es ist anzunehmen, daß *c-FLIP_L* auch in Typ II-Zellen direkt den DISC inhibiert. Da der DISC von Typ II-Zellen nicht oder nur sehr schwer im Western Blot analysiert werden kann, wurde ein *in vitro*-Caspase-8-Spaltungstest durchgeführt (vgl. Abb. 9A). Dabei wird die Fähigkeit eines DISCs gemessen, exogen zugegebene Caspase-8 umzusetzen. In Abb. 15D ist zu sehen, daß die Typ II-Zellen Jurkat und CEM in der Lage sind, nach CD95-Stimulation einen DISC zu bilden, der Caspase-8 spalten, d.h. aktivieren kann. Die Aktivität der Typ II-DISCs ist allerdings deutlich geringer als in den Typ I-Zellen SKW6.4. Caspase-8 ist stärker umgesetzt in den Typ I-DISCs, obwohl bei SKW6.4 nur halb so viele Zellen für die Immunpräzipitation des DISCs eingesetzt wurden. Der DISC von CEM-Zellen, die mit *c-FLIP_L* transfiziert wurden, hat dagegen keine Caspase-8-spaltende Aktivität (Abb. 15D). *c-FLIP_L* inhibiert also den DISC auch in Typ II-Zellen.

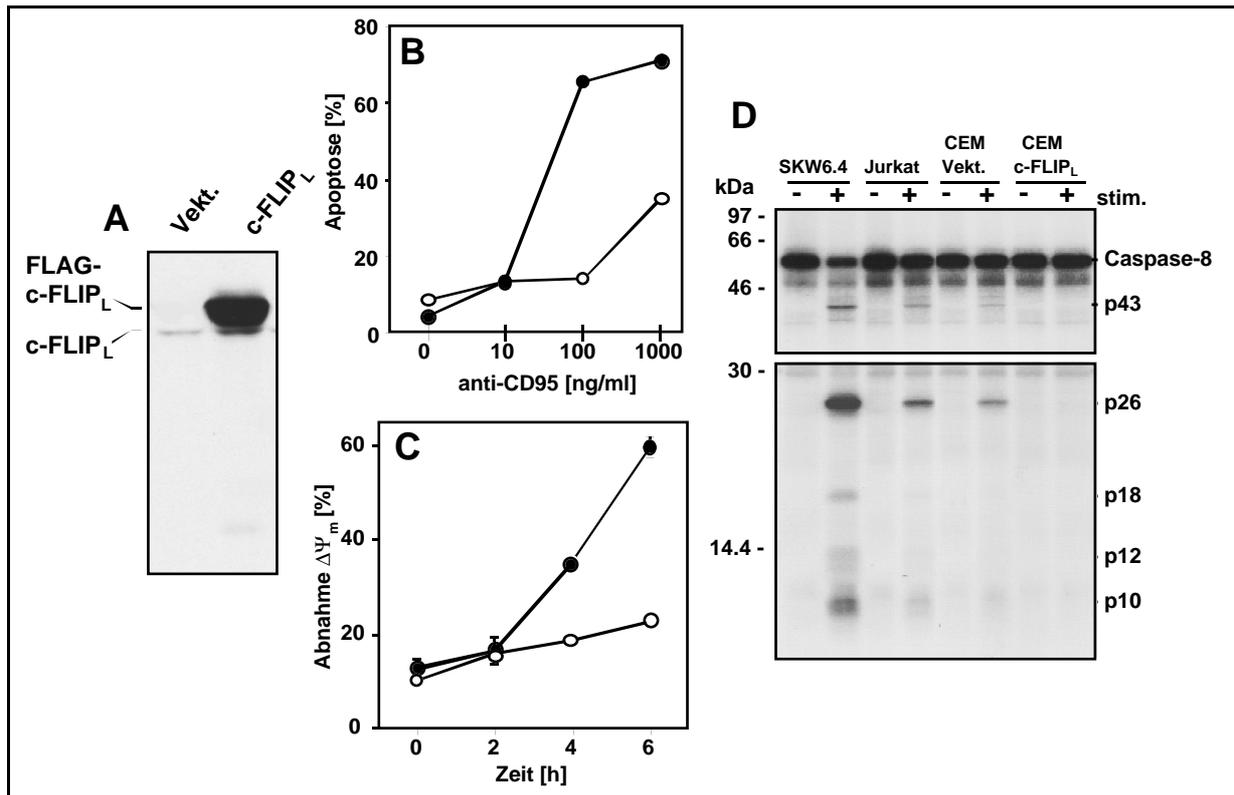


Abbildung 15: c-FLIP_L blockt CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen am DISC. (A) Expression von c-FLIP_L in CEM-Transfektanten. Zelluläre Lysate von CEM, die mit dem Kontrollvektor (Vekt.) oder FLAG-markiertem c-FLIP_L (c-FLIP_L) transfiziert sind, wurden per Western Blot mit Hilfe des monoklonalen c-FLIP Antikörpers NF6 analysiert. (B) Vektor-transfizierte (●) und c-FLIP_L-transfizierte (○) CEM wurden mit den angegebenen anti-APO-1 Konzentrationen für 16 h inkubiert und Apoptose anhand der DNA-Fragmentierung gemessen. (C) Vektor-transfizierte (●) und c-FLIP_L-transfizierte (○) CEM wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-APO-1 Konzentrationen für die angegebenen Zeiträume inkubiert, und anschließend $\Delta\Psi_m$ mittels JC-1 Färbung gemessen. (D) *in vitro*-Caspase-8-Spaltungstest. CD95 wurde von unstimulierten (-) oder stimulierten (+; 2 $\mu\text{g/ml}$ anti-APO-1 für 5 min bei 37° C) immunpräzipitiert und mit *in vitro* translaterter ³⁵S-markierter Caspase-8/a inkubiert (24 h, 4° C). Anschließend wurde die Proben auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele fixiert, amplifiziert (Amplify, Amersham, Braunschweig), getrocknet und autoradiographiert. Die Laufpositionen von Caspase-8/a und der Spaltprodukte sind angegeben. Der obere Teil des Gels wurde 16 h, der untere 3 Tage exponiert.

3. Der CD95-Rezeptor in Typ I- und Typ II-Zellen

Typ I- und Typ II-Zellen zeichnen sich durch eine unterschiedlich effiziente DISC-Bildung aus (Abb. 7) (Scaffidi et al., 1998). Da alle bekannten Komponenten des DISC, CD95 (Abb. 18) (Scaffidi et al., 1998), FADD, Caspase-8 und c-FLIP (Abb. 11) (Scaffidi et al., 1998), in den vier Modellzelllinien vergleichbar stark exprimiert sind, stellt sich die Frage, was die DISC-Bildung in Typ II-Zellen vermindert bzw. in Typ I-Zellen begünstigt.

Eine mögliche Erklärung könnte ein zusätzliches, mit CD95 assoziiertes Molekül sein. So könnte eine bisher nicht identifizierte DISC-Komponente in Typ I-Zellen die Bildung des DISC verstärken. Alternativ könnte in Typ II-Zellen ein Inhibitor der DISC-Bildung exprimiert sein. Ein Molekül, das nur in Typ II-Zellen exprimiert wird und somit für die verminderte DISC-Bildung verantwortlich sein könnte, wurde von Scaffidi et al. (1998) beschrieben und aufgrund des Molekulargewichtes p120 genannt. Dieses Molekül interagiert allerdings nicht spezifisch mit CD95, obwohl es Typ II-spezifisch exprimiert wird. Vielmehr bindet es an eine Oberfläche, die durch Bindung eines Antikörpers an Protein A entsteht (Daten nicht gezeigt). Weitere Moleküle, die mit CD95 interagieren, konnten bisher über den verfolgten Proteomansatz nicht identifiziert werden.

Eine posttranslationale Modifikation einer der DISC-Komponenten könnte eine andere Erklärung für die Unterschiede in der DISC-Bildung in Typ I- und Typ II-Zellen sein. Eine DISC-Komponente, die posttranslational modifiziert ist, ist FADD. FADD wird an Serin 194 phosphoryliert, was jedoch keinen Einfluß auf die Rekrutierung in den DISC hat (Scaffidi et al., 2000). Deshalb wurde untersucht, ob eine posttranslationale Modifikation von CD95 für die unterschiedliche DISC-Bildung verantwortlich ist.

3.1 Glykosylierung von CD95 in Typ I- und Typ II-Zellen

Eine häufige posttranslationale Modifikation von Zelloberflächenrezeptoren, so auch CD95, ist die Glykosylierung. CD95 ist in den Typ I-Zelllinien SKW6.4 und H9 stärker glykosyliert als in den beiden Typ II-Zelllinien CEM und Jurkat. Dies zeigt sich in der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Je stärker CD95 glykosyliert ist, desto mehr Sialinsäure-Gruppen werden eingebaut. Da Sialinsäure negativ geladen ist, verschiebt sich der isoelektrische Punkt von CD95 bei zunehmendem Molekulargewicht zu sauren pH-Werten (Abb. 16) (Peter et al., 1995).

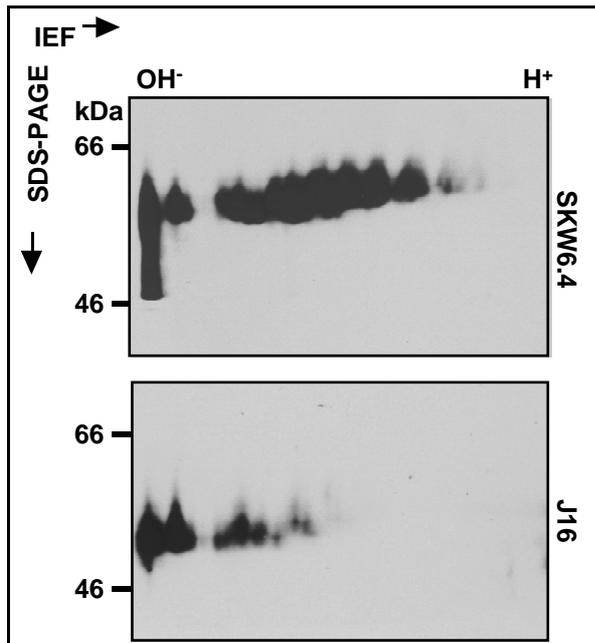
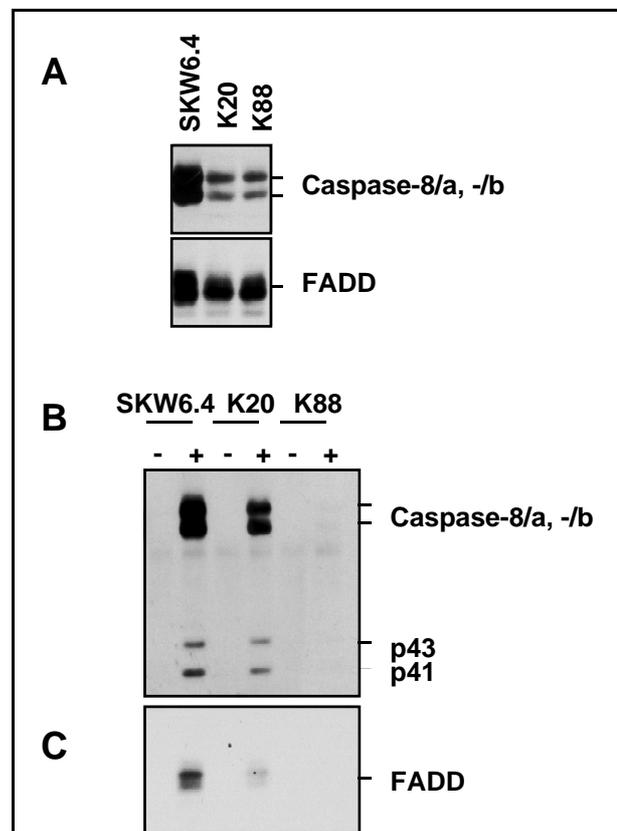


Abbildung 16: CD95 ist in Typ I-Zellen stärker glykosyliert. Zelloberflächenmoleküle von SKW6.4 und Jurkat wurden biotinyliert, die Zellen lysiert und CD95 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-IEF-SDS-PAGE) aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Hilfe von Streptavidin-HRPO analysiert.

Um die Rolle des Glykosylierungsstatus von CD95 bei der DISC-Bildung zu analysieren, wurden zwei BJAB-Klone untersucht, die sich im Grad der Glykosylierung der Oberflächenmoleküle unterscheiden. K88 ist stark, K20 niedrig glykosyliert (Keppler et al., 1999). Die Expression von Caspase-8 und FADD ist in beiden Klonen gleich, wenn auch niedriger im

Abbildung 17: DISC-Bildung korreliert nicht mit dem Glykosylierungsstatus von CD95. (A) Expression von Caspase-8 und FADD in zellulären Lysaten von SKW6.4, K20 und K88. Die Analyse erfolgte per Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Caspase-8 (C15) und FADD. (B,C) DISC-Analyse von K20 und K88. Je 5×10^7 K20 bzw. K88 wurden stimuliert (+) bzw. nicht stimuliert (-), lysiert und CD95 immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden 10^7 SKW6.4 in der gleichen Weise behandelt. Die Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot mit den gleichen Antikörpern wie in (A) analysiert.



Vergleich zu SKW6.4 (Abb. 17A). Beide Klone unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vermögens, einen DISC zu bilden. K20, die niedrig glykosyliert sind, weisen hinsichtlich der DISC-Bildung einen Typ I-Phänotyp auf, wohingegen die stark glykosylierten K88 keinen DISC bilden, also eine Typ II-Phänotyp aufweisen (Abb 17B,C). Das Verhältnis von Glykosylierungsstatus zur DISC-Bildung ist bei K20 und K88 also genau umgekehrt wie bei den Typ I- und Typ II-Zelllinien. Es gibt also keine eindeutige Korrelation zwischen Glykosylierungsstatus und DISC-Bildung, was einen Zusammenhang zwischen dem Glykosylierungsgrad von CD95 und einem Typ I- bzw. Typ II-Phänotyp unwahrscheinlich macht.

3.2 Das CD95-Paradoxon

Die vier Modellzelllinien SKW6.4 und H9 (Typ I), sowie CEM und J16 (Typ II) exprimieren vergleichbare Mengen an CD95 auf der Zelloberfläche. Dies zeigt eine FACS-Analyse (Abb. 18), die mit Hilfe von anti-APO-1, der ein konformationsspezifisches Epitop im extrazellulären Bereich von CD95 erkennt (Abb. 19B), durchgeführt wurde. Analysiert man dagegen die CD95-Expression mittels Western Blot, zeigen sich drastische Unterschiede (Abb.19A). Da das Epitop von anti-APO-1 auch in der nicht reduzierenden Gelelektrophorese zerstört wird, wurde für Western Blot-Analysen ein Antikörper verwendet, der die 20 C-terminalen Aminosäuren erkennt (C-20). Der Western Blot zeigt eine starke Expression von CD95 in den Typ I-Zellen

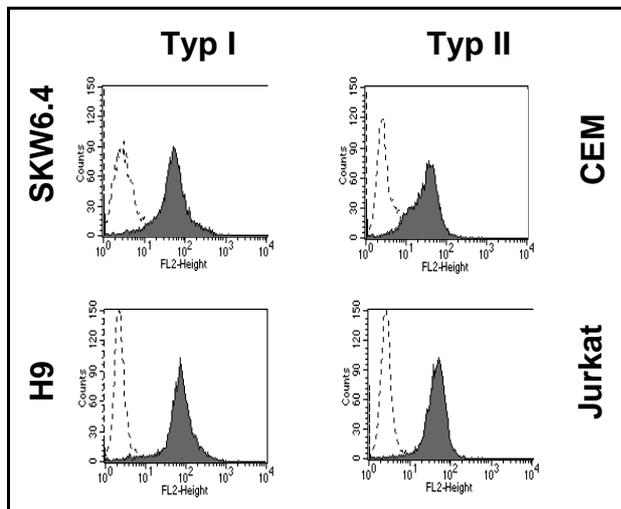


Abbildung 18: Typ I- und Typ II-Zellen exprimieren vergleichbare Mengen an CD95 auf der Zelloberfläche. Die Typ I-Zellen SKW6.4 und H9, sowie die Typ II-Zellen CEM und Jurkat wurden mit anti-APO-1 und einem PE-konjugierten Zweitantikörper gefärbt (graue Kurven). Als Kontrolle diente eine Färbung mit dem Zweitantikörper alleine (weiße Kurven). Die gefärbten Zellen wurden im FACSscan analysiert.

SKW6.4 und H9, jedoch keinerlei Signal in den Typ II-Zellen (Abb. 19A), obwohl in allen Bahnen gleichviel Protein geladen wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden mit zwei Antikörpern erzielt, die ebenfalls den intrazellulären Teil von CD95 erkennen (Abb. 19A). HF-1 ist ein aufgereinigtes, polyklonales Kaninchenserum, das gegen den kompletten intrazellulären Teil von CD95 gerichtet ist. Der monoklonale Antikörper 3D5 erkennt die Todesdomäne von CD95. Die Lage der Epitope der verschiedenen anti-CD95 Antikörper veranschaulicht Abb. 19B. Zusammenfassend ist also festzustellen, daß die Erkennung des extrazellulären Teils von CD95 in allen vier Zelllinien gleich ist, der intrazelluläre Teil aber unterschiedlich detektiert wird.

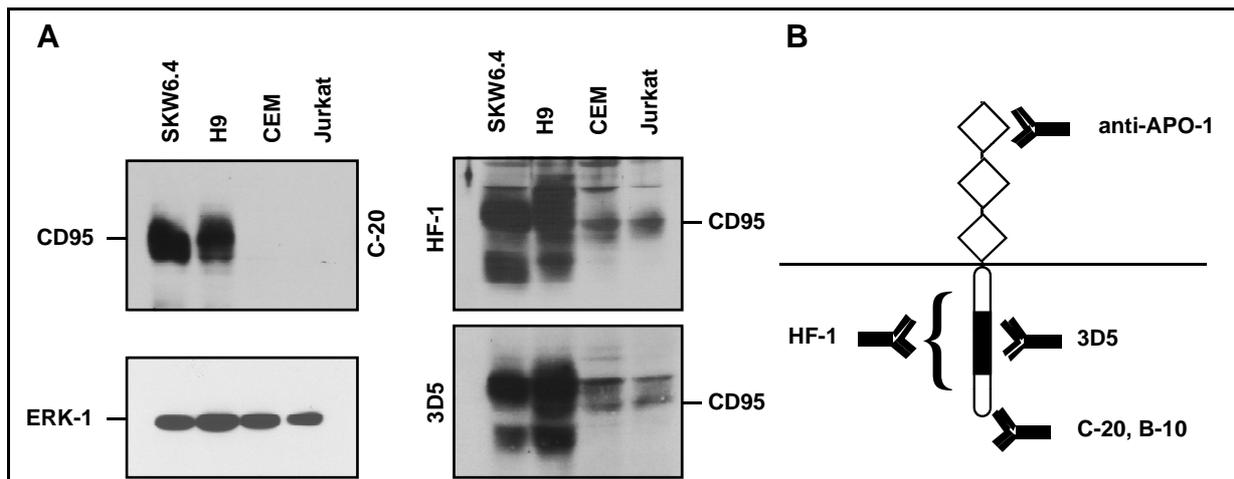


Abbildung 19: Western Blot-Analyse zeigt eine unterschiedliche Expression von CD95 in Typ I- und Typ II-Zellen. (A) Zelluläre Lysate der Typ I-Zellen SKW6.4 und H9, sowie der Typ II-Zellen CEM und Jurkat wurden per Western Blot mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper (C-20) analysiert. Der Blot wurde gestrippt und mit anderen CD95-Antikörpern entwickelt, nämlich einem polyklonalen Kaninchenserum (HF-1) und einem monoklonalen Antikörper (3D5). Schließlich wurde die Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen Erk-1 entwickelt, um die Beladung der einzelnen Bahnen zu überprüfen. (B) Schematische Darstellung von CD95. Die Lage der Epitope der verschiedenen anti-CD95 Antikörper ist angegeben.

Dies könnte durch die Typ II-spezifische Expression einer Splicevariante erklärt werden, welcher der intrazelluläre Teil von CD95 fehlt. Eine solche Splicevariante, in der Exon 7 von CD95 herausgespleißt wird, was zu einem verkürzten Protein führt, ist beschrieben worden (Jenkins et al., 2000). Eine andere Erklärung wäre, daß Typ I-Zellen intrazellulär CD95 gespeichert haben. Dies könnte durch stimulationsabhängigen Transport von intrazellulär gespeichertem CD95 zur Zelloberfläche zur effizienteren DISC-Bildung in Typ I-Zellen beitragen. In der FACS-Analyse ist nur Zelloberflächen-CD95 zu detektieren, wohingegen man im Western Blot auch intrazelluläres CD95 detektiert wird.

Deshalb wurde eine intrazelluläre FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden fixierte, permeabilisierte Zellen mit B-10, einem monoklonalen Antikörper, der das gleiche Epitop erkennt wie der polyklonale C-20, gefärbt. Abb. 20 zeigt, daß B-10 in allen vier Zellen die gleiche Signalstärke liefert. Die funktionell aktive, lange Spliceform von CD95 wird also in allen vier Zelllinien vergleichbar stark exprimiert. Damit kann sowohl eine andere Splicevariante, als auch eine höhere intrazelluläre Expression von CD95 davon ausgeschlossen werden, für die unterschiedliche DISC-Bildung in Typ I- und Typ II-Zellen verantwortlich zu sein.

Schließlich wurden BL-60-Zellen und der BL-60-Klon K50 analysiert. Abb. 21A zeigt, daß BL-60 relativ resistent, K50 dagegen sehr sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind. Dies hängt mit der Expression von CD95 zusammen (Abb. 21B). BL-60 exprimieren annähernd kein CD95 auf der Zelloberfläche, K50 sind BL-60 Zellen, die mit einer CD95-cDNA, die aus der Typ I-Zelllinie SKW6.4 kloniert wurde, transfiziert wurden. Trotz der hohen Expression auf der Zelloberfläche in den K50 kann CD95 jedoch nicht im Western Blot detektiert werden (Abb. 21C). Dies widerspricht der Möglichkeit, daß Typ I- und Typ II-Zellen unterschiedliche Splice-

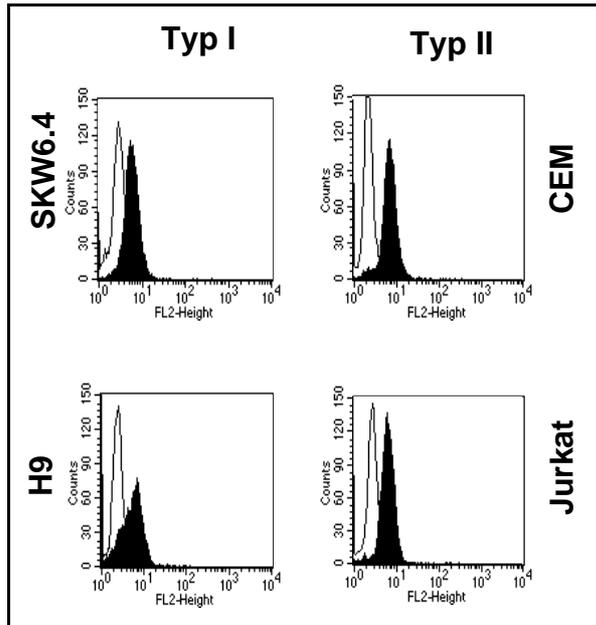


Abbildung 20: Intrazelluläre Färbung von CD95. Die Typ I- und Typ II-Zelllinien SKW6.4, H9, CEM und Jurkat wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen anti-CD95 Antikörper (B-10; vgl. Abb. 18B) bzw. einem Kontrollantikörper gleichen Isotyps inkubiert. Nach Färbung mit einem PE-konjugierten Zweitantikörper wurden die Zellen im FACSscan analysiert.

formen von CD95 exprimieren, und unterstützt die Hypothese, daß CD95 in Typ II-Zellen posttranslational modifiziert ist.

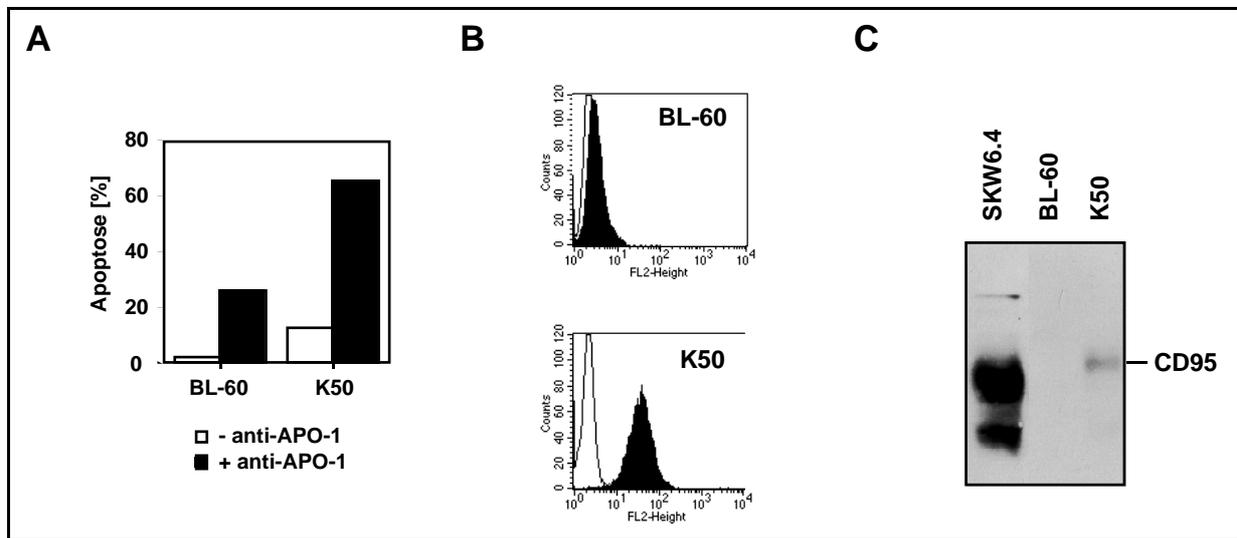


Abbildung 21: Hinweis auf eine posttranslationale Modifikation von CD95 in Typ II-Zellen. (A) Die Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose von parentalen BL-60 und Zellen, die mit CD95 transfiziert wurden (K50), wurde mittels DNA-Fragmentierung bestimmt. (B) Analyse der Oberflächenexpression von CD95. BL-60 und K50 wurden mit anti-APO-1 und einem PE-konjugierten Zweitantikörper gefärbt (graue Kurven). Als Kontrolle diente eine Färbung mit dem Zweitantikörper alleine (weiße Kurven). Die gefärbten Zellen wurden im FACSscan analysiert. (C) Zelluläre Lysate von SKW6.4, BL-60 und K50 wurden per Western Blot analysiert (C-20). Es wurden gleiche Proteinmengen geladen (50 µg).

3.3 Typ I- und Typ II-Zellen benötigen unterschiedliche Kreuzvernetzung von CD95

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der DISC-Bildung und der CD95-Detektierbarkeit im Western Blot zwischen Typ I- und Typ II-Zellen auch eine funktionale Bedeutung haben, wurde die Apoptoserate nach anti-APO-1-Stimulation in An- und Abwesenheit von kreuzvernetzendem Protein A untersucht. Die Typ I-Zellen SKW6.4 und H9 sterben sehr effizient, ohne daß der agonistische Antikörper anti-APO-1 durch Protein A kreuzvernetzt werden muß (Abb. 22A+B). Dagegen benötigen die Typ II-Zellen CEM und Jurkat eine starke Kreuzvernetzung von CD95, um effizient in die Apoptose zu gehen (Abb. 22C+D). Dies weist darauf hin, daß

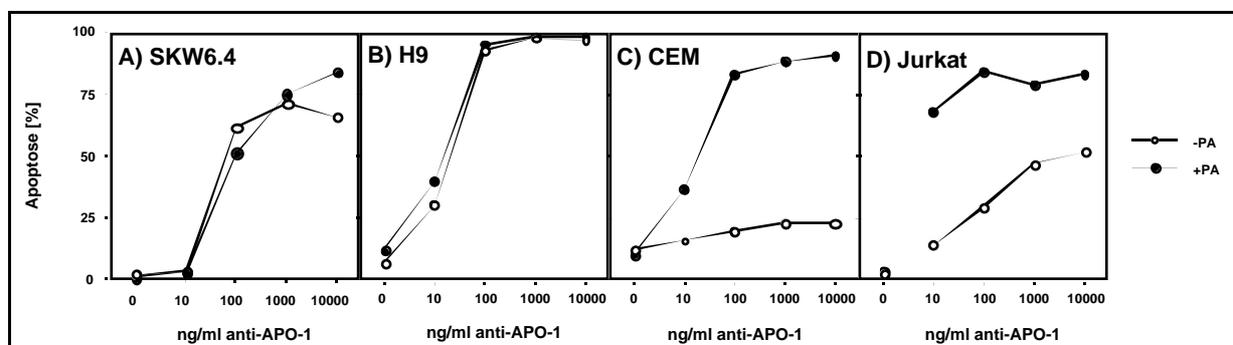


Abbildung 22: Typ II-Zellen benötigen eine effizientere Kreuzvernetzung von CD95. (A-D) SKW6.4 (A), H9 (B), CEM (C) und Jurkat (D) wurden mit den angegebenen Mengen anti-APO-1 in An- (●) und Abwesenheit (○) von kreuzvernetzendem Protein A ü.N. inkubiert. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt.

CD95 in Typ I- und Typ II-Zellen unterschiedlich stark aktiviert werden muß, um Apoptose auszulösen.

Die Unterschiede in der DISC-Bildung und im CD95-Rezeptor selbst spiegeln sich ebenfalls auf der Ebene der Rezeptoraggregation wider. Nach Stimulation bildet CD95 SDS-stabile Aggregate, die in der SDS-Gelelektrophorese bei hohen Molekulargewichten zu detektieren sind (Kischkel et al., 1995; Ruiz-Ruiz et al., 1999). Solche Aggregate lassen sich in den Typ I-Zellen (SKW6.4, H9), nicht dagegen in den Typ II-Zellen (CEM, Jurkat) nachweisen (Abb. 23).

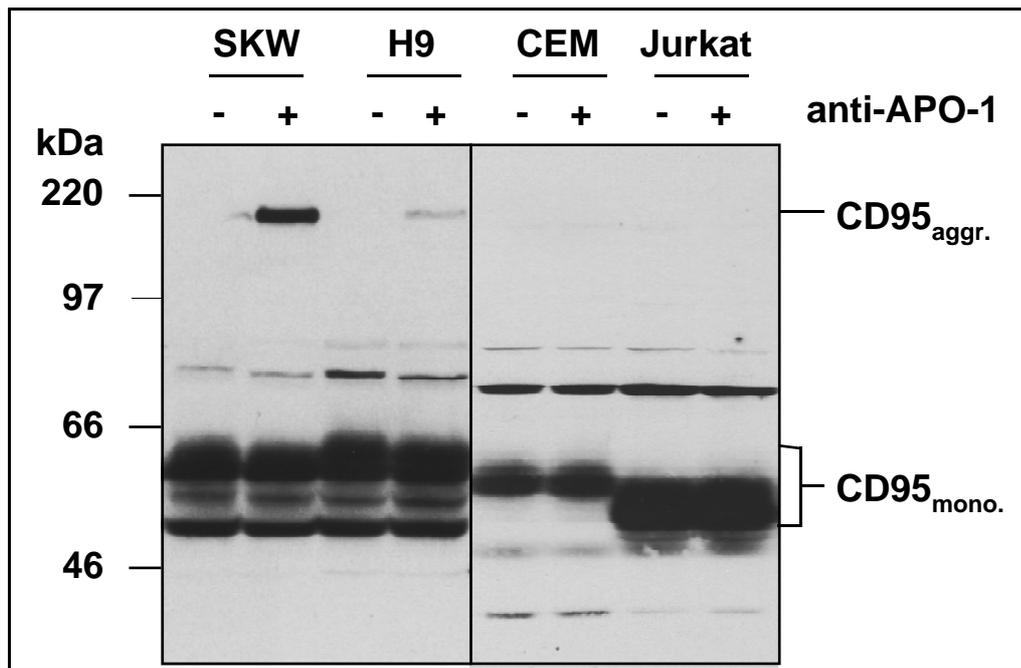


Abbildung 23: Nur Typ I-Zellen bilden SDS-stabile CD95-Aggregate. SKW6.4, H9 (Typ I) und CEM, Jurkat (Typ II) wurden mit anti-APO-1 stimuliert oder unstimuliert gelassen, lysiert und mittels 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die verschiedenen Zustände von CD95 wurden per Western Blot analysiert (C-20). Die Laufpositionen von monomerem und aggregiertem CD95 sind angegeben.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß es in CD95 Typ I- und Typ II-Zellen eine starke Korrelation zwischen CD95-Detektierbarkeit im Western Blot, Aggregation und DISC-Bildung gibt. Die Unterschiede scheinen in einer posttranslationalen Modifikation von CD95 begründet zu sein, nicht in der Expression assoziierter Moleküle. Der Glykosylierungsstatus scheint aber nicht für die Unterschiede von Typ I- und Typ II-Zellen verantwortlich zu sein.

4 Die Rolle von CD95 in Rahmen der Immunantwort

Wird ein präsentiertes Antigen von T-Zellen erkannt, beginnen sie zu proliferieren. Während dieser Proliferationsphase der Immunantwort führen die T-Zellen ihre Effektorfunktionen aus. So produzieren T-Helfer-Zellen Zytokine, zytotoxische T-Zellen töten z. B. virusinfizierte Zellen. In dieser Phase sind die T-Zellen resistent gegenüber der Induktion von Apoptose durch CD95. Nachdem das Antigen eliminiert worden ist, sterben T-Zellen durch einen Prozeß, der Aktivierungs-induzierter Zelltod genannt wird (engl.: "activation-induced cell death", AICD), um die Immunantwort wieder abzuschalten. In dieser Phase der Immunantwort sind T-Zellen also sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Einige wenige T-Zellen überleben und bilden sogenannte Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Immunantwort gegen dasselbe Antigen schneller reagieren können. Diese Gedächtniszellen sind resistent gegenüber Apoptose (siehe auch Abb. 6).

Um die an diesen Prozessen beteiligten Signalmoleküle untersuchen zu können, wurde ein bereits im Labor etabliertes *in vitro*-Modell verwendet.

4.1 Charakterisierung eines in vitro-Modells der Immunantwort

Primäre T-Zellen wurden aus peripherem humanem Blut aufgereinigt (d0 T-Zellen) und über Nacht mit einem T-Zell-Mitogen (Phytohemagglutinin, PHA) stimuliert (d1 T-Zellen) (Abb. 24A). Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und in Interleukin-2 (IL-2) haltigem Medium für weitere 5 Tage kultiviert (d6 T-Zellen).

Zunächst wurde die Expression von CD95 mittels FACS-Analyse untersucht. Ruhende T-Zellen (d0) exprimieren nur geringe Mengen an CD95 (Abb. 24B). Nach Aktivierung wird die Expression von CD95 auf der Zelloberfläche hochreguliert und bleibt dann konstant (Abb. 24B). Als nächstes wurde die Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose bestimmt. d0 T-Zellen waren sowohl resistent gegenüber Behandlung mit anti-APO-1 als auch mit LZ-CD95L (Abb. 24C), wie für Zellen, die CD95 nur gering exprimieren, erwartet wurde. Ein Vergleich der CD95 hoch exprimierenden T-Zellen von d1 und d6 ergab einen deutlichen Unterschied. Trotz der hohen Rezeptorexpression waren die d1 T-Zellen überraschenderweise resistent (Abb. 24C).

IL-2 ist bekannt als Wachstumsfaktor für T-Zellen. Jedoch ist auch eine für Apoptose sensitivierende Funktion von IL-2 beschrieben worden (Lenardo, 1991; Refaeli et al., 1998). Um den Einfluß von IL-2 im hier verwendeten *in vitro*-System zu analysieren, wurden T-Zellen mit zwei verschiedenen IL-2-Konzentrationen bis zum Tag 6 kultiviert und täglich die Apoptose-Sensitivität gegenüber anti-APO-1 Behandlung gemessen. Abb. 25A zeigt die spezifische Apoptoserate. Wie schon in Abb. 24C gezeigt, sind d0 und d1 T-Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Von Tag 2 zu Tag 6 hin werden die T-Zellen zunehmend sensiti-

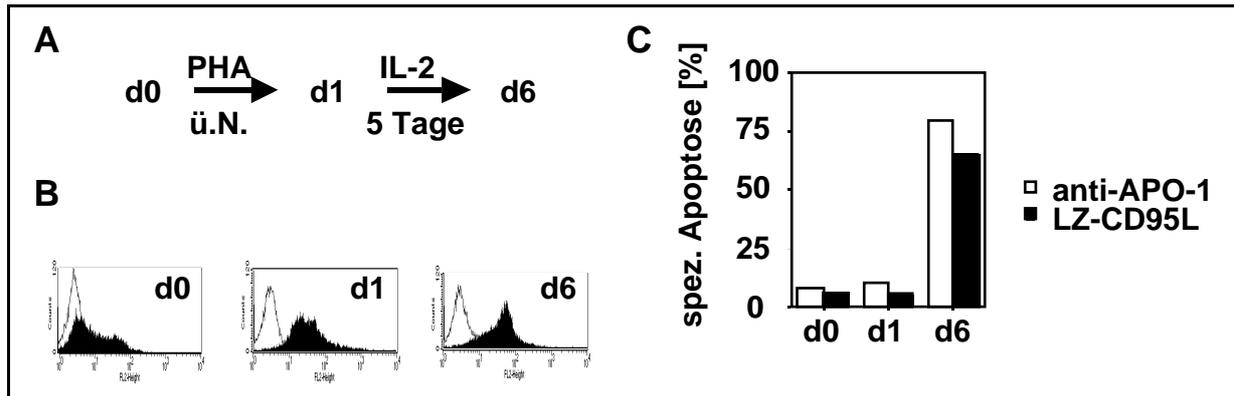


Abbildung 24: Das *in vitro* Modell der T-Zell-Immunantwort. (A) Frisch isolierte ruhende T-Zellen aus peripherem humanem Blut (d0) werden ü.N. mit 1 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert. So erhält man Kurzzeit-aktivierte T-Zellen (d1), die dann weiter 5 Tage mit 25 U/ml Interleukin-2 (IL-2) in Kultur gehalten werden. Diese T-Zellen entsprechen dann Langzeit-stimulierten T-Zellen (d6). (B) Analyse der CD95 Expression auf der Zelloberfläche von d0, d1 und d6 T-Zellen. (C) d0, d1 und d6 T-Zellen wurden ü.N. mit 1 µg/ml anti-APO-1 bzw. LZ-CD95L (1:5 Verdünnung) stimuliert und Apoptose durch Messung der DNA-Fragmentierung bestimmt.

ver. Dabei spielt die Menge an IL-2 aber offensichtlich eine untergeordnete Rolle (Abb. 25A). Um den Effekt von IL-2 genauer zu untersuchen, wurden T-Zellen bis zum Tag 6 mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-2 kultiviert (Abb. 25B+C). Wiederum sind d0 und d1 T-Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Ähnliches gilt für d6 T-Zellen, die ohne exogenes IL-2 kultiviert wurden. Zwar ist die Rate der spontanen Apoptose in diesen Zellen stark erhöht, jedoch läßt sich kaum Apoptose über CD95 induzieren. Die T-Zellen sind am Tag 6 nur sensitiv, wenn sie mit IL-2 in Kultur gehalten wurden. Dabei hat die Menge des exogen zugegebenen IL-2 keinen (Abb. 25B) bzw. nur einen geringen (Abb. 25C) Effekt. Zusammenfassend ist festzustellen, daß ruhende und frisch aktivierte T-Zellen im hier verwendeten *in vitro*-System resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind. T-Zellen werden dagegen sensitiv, wenn sie längere Zeit mit IL-2 in Kultur gehalten werden. IL-2 ist wichtig für die Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, die Konzentration von IL-2 spielt dabei aber nur eine untergeordnete Rolle. Damit spiegelt das hier verwendete *in vitro*-System die Resistenz und Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose von T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort *in vivo* wider.

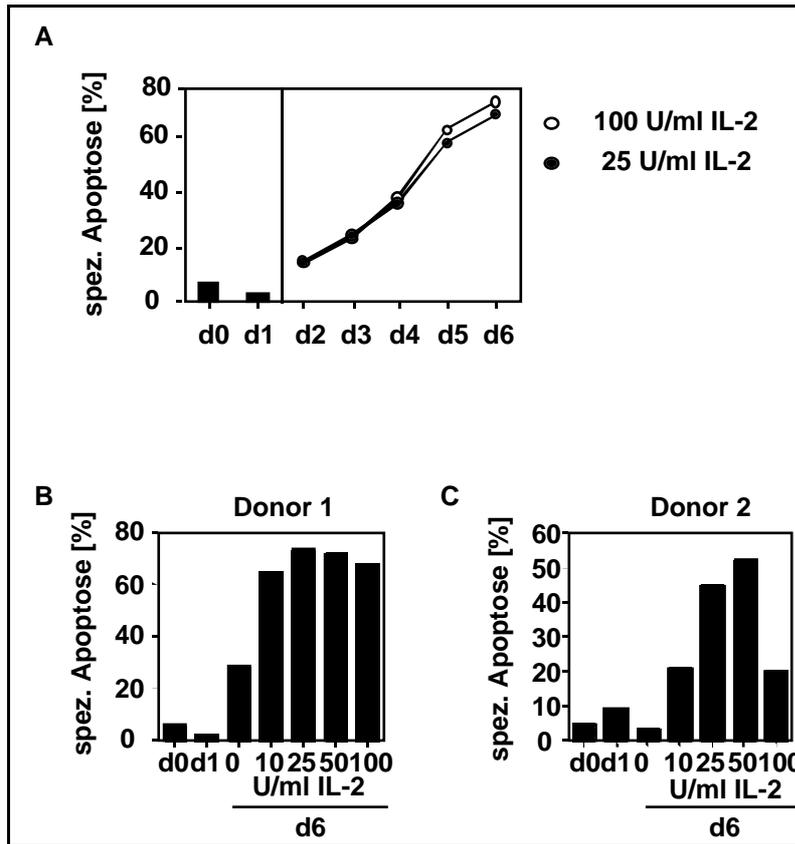


Abbildung 25: Effekt von Interleukin-2 auf die CD95-Sensitivität von primären T-Zellen. (A) Die Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose wurde in T-Zellen, die ü.N. mit 1 µg/ml anti-APO-1 stimuliert bzw. unbehandelt gelassen wurde, anhand von DNA-Fragmentation gemessen. d0 und d1 T-Zellen wurden wie in Abb. 23A beschrieben kultiviert. d2 bis d6 T-Zellen wurden in 25 und 100 U/ml Interleukin-2 (IL-2) kultiviert. (B,C) d0 und d1 T-Zellen wurden wie in Abb. 23A beschrieben kultiviert. Von Tag 1 an wurden die T-Zellen in den angegebenen Mengen IL-2 kultiviert und die CD95-Sensitivität wie unter (A) beschrieben gemessen. Die Ergebnisse zweier Donoren sind gezeigt.

4.2 *c-FLIP_L* spielt keine Rolle bei der Vermittlung von Resistenz in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen

Da die Expression von CD95 in d1 und d6 T-Zellen gleich ist, die Zellen sich aber hinsichtlich ihrer Sensitivität unterscheiden, muß der Grund für diesen Unterschied in der intrazellulären Signalkaskade liegen. Als verantwortlich für die Resistenz von Kurzzeit-aktivierten T-Zellen wird eine Hochregulation von *c-FLIP* diskutiert (Irmeler et al., 1997b; Refaeli et al., 1998). Um dies zu testen, wurde die Expression von *c-FLIP* und Caspase-8 in primären T-Zellen während der Kultivierung über 6 Tage per Western Blot verfolgt. Da *c-FLIP_L* in lymphoiden Zelllinien stärker exprimiert wird (Abb. 11), wurde zunächst diese Spliceform untersucht. Die Western Blot-Analyse zeigte, daß sich weder die Expression von Caspase-8 noch die von *c-FLIP_L* in den T-Zellen während der Kultivierungszeit änderte (Abb. 26A). Dies steht im Widerspruch zu Studien, die eine Abnahme der *c-FLIP_L*-Expression im Laufe der T-Zell-Aktivierung berichten (Irmeler et al., 1997b; Refaeli et al., 1998).

Weiterhin wurde die Spaltung von Caspase-8 in d1 und d6 T-Zellen analysiert, die unterschiedlich lange mit anti-APO-1 behandelt wurden. Während Procaspase-8 in d6 T-Zellen in die aktiven Fragmente (p18) gespalten wird, findet in d1 T-Zellen keine Spaltung statt (Abb. 26B).

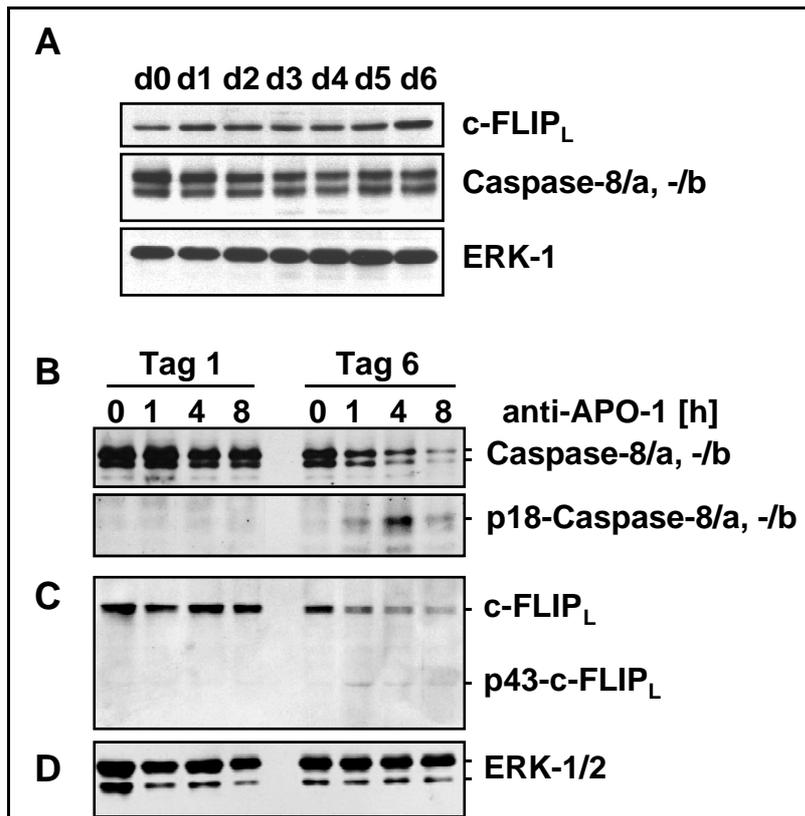


Abbildung 26: c-FLIP_L ist nicht verantwortlich für die Resistenz von d1 T-Zellen.

(A) Zelluläre Lysate von primären T-Zellen wurden per Western Blot auf die Expression von c-FLIP_L und Caspase-8 hin analysiert. Erk-1 dient als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. (B-D) d1 und d6 T-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 1 µg/ml anti-APO-1 stimuliert, lysiert und mittels Western Blot analysiert. Die Laufpositionen von Caspase-8, der aktiven Untereinheit von Caspase-8, p18, (B), sowie gespaltenem wie ungespaltenem c-FLIP_L (C) sind angegeben. Erk-1/2 dient als Ladekontrolle (D). Es wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen.

Die Spaltung von Caspase-8 korreliert also mit Resistenz bzw. Sensitivität der T-Zellen. Die Analyse von c-FLIP_L in der Kinetik zeigt, daß auch c-FLIP_L am Tag 6 zum p43-Fragment gespalten wird. Dagegen findet keine Spaltung in d1 T-Zellen statt (Abb. 26C). Da die Spaltung von c-FLIP_L aber als Teil des Inhibitionsmechanismus von c-FLIP_L identifiziert wurde (Abb. 13D und 14C), diese Spaltung aber am Tag 1 nicht zu detektieren ist, kann c-FLIP_L keine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Resistenz von d1 T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose spielen. Dagegen spricht auch, daß sich das Expressionsniveau von c-FLIP_L während der Kultivierung nicht verändert. Es muß hinzugefügt werden, daß c-FLIP_S in d1 T-Zellen hochreguliert ist (siehe Abb. 31). Allerdings kann auch c-FLIP_S nicht hauptverantwortlich für die Vermittlung von Resistenz sein, wie im folgenden Abschnitt dargelegt wird.

4.3 T-Zellen vollziehen einen Wechsel von Typ II nach Typ I während der Immunantwort

Da sich d1 und d6 T-Zellen in der Expression von CD95 (Abb. 24B), FADD (Peter et al., 1997), Caspase-8 und c-FLIP_L (Abb. 26A) nicht, wohl aber in der Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose unterscheiden, wurde der DISC in diesen Zellen untersucht. Dazu wurden d1 und d6 T-Zellen mit anti-APO-1 stimuliert bzw. unbehandelt gelassen, CD95 immunpräzipitiert und die Präzipitate per Western Blot mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen FADD, Caspase-8 und c-FLIP untersucht. Abb. 27A zeigt eine solche DISC-Analyse. Es zeigt sich, daß die sensitiven d6 T-Zellen einen DISC bilden, wie an der Rekrutierung der Signalmoleküle FADD, Caspase-8, c-FLIP_L und c-FLIP_S zu sehen ist. Caspase-8 und c-FLIP_L sind neben der Proform auch als Spaltungsintermediate zu detektieren. In Abb. 27B ist zu

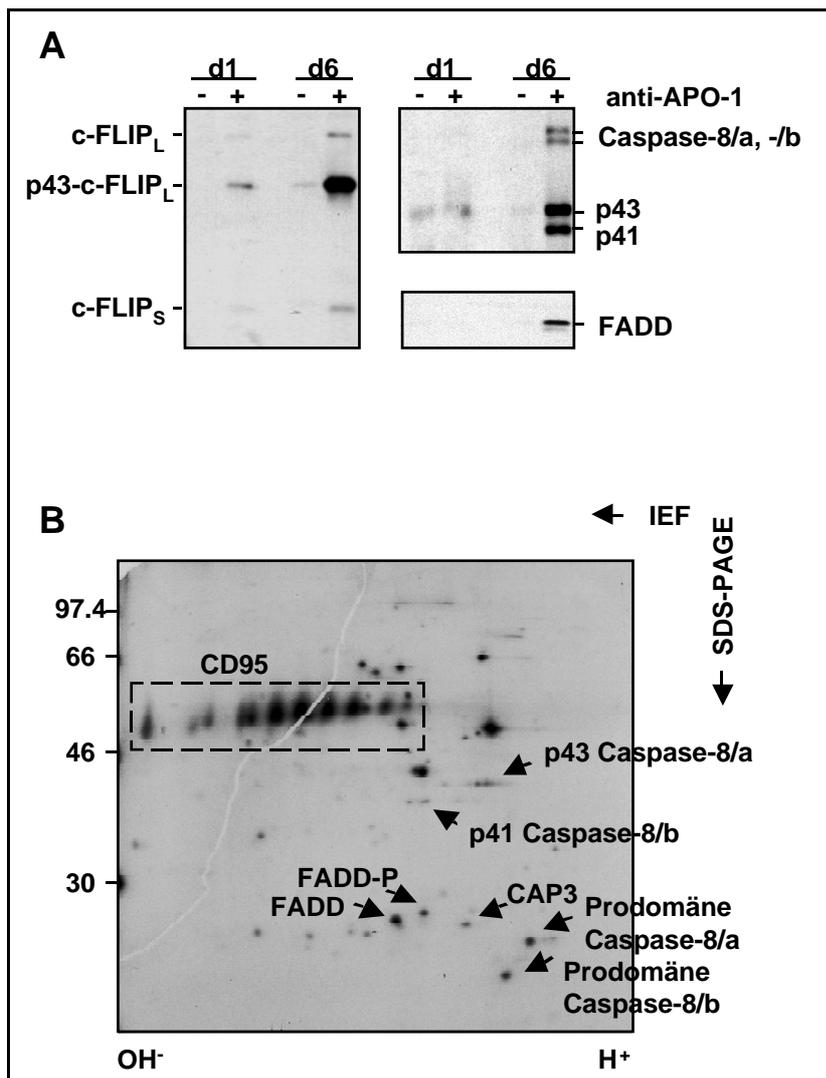


Abbildung 27: Verminderte DISC-Bildung in d1 T-Zellen. (A) d1 und d6 T-Zellen wurden mit anti-APO-1 stimuliert (+) bzw. unbehandelt gelassen (-), lysiert und CD95 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen c-FLIP (NF6), Caspase-8 (C15) und FADD auf die Assoziation dieser Signalmoleküle hin analysiert. Die Laufpositionen von FADD, C-FLIP_S, C-FLIP_L, Caspase-8 und der entsprechenden Spaltungsintermediate ist angegeben. (B) DISC-Analyse von ³⁵S-markierten d6 T-Zellen, die mit LZ-CD95L stimuliert wurden. Nach Stimulation in 1 ml LZ-CD95L-Überstand wurden die Zellen lysiert und CD95 immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde durch 2D-IEF-SDS-PAGE aufgetrennt. Unspezifische Moleküle wurden durch Vergleich mit einer Kontrollpräzipitation aus unstimulierten Zellen identifiziert. Die Laufpositionen von FADD, phosphoryliertem FADD, CAP3, sowie den Spaltungsintermediaten von Caspase-8/a und -8/b sind angegeben.

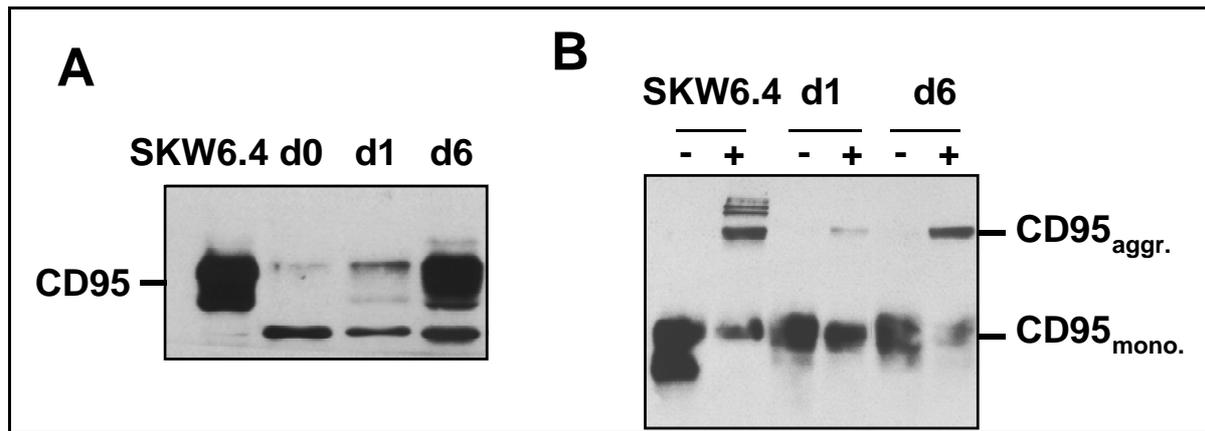


Abbildung 28: CD95 aus d1 T-Zellen verhält sich wie ein Typ II-Rezeptor. (A) CD95 wurde in zellulären Lysaten von d0, d1 und d6 T-Zellen per Western Blot analysiert (C-20, Santa Cruz, Heidelberg). SKW6.4 Zellysat ist als Kontrolle mit aufgetragen. (B) Analyse von CD95-Aggregaten in d1 und d6 T-Zellen. SKW6.4, d1 und d6 T-Zellen wurden mit 2 µg/ml anti-APO-1 stimuliert, lysiert und per Western Blot analysiert (C-20, Santa Cruz, Heidelberg). Die Laufpositionen von aggregiertem und monomerem CD95 ist angegeben.

sehen, daß sich der DISC auch nach Stimulation mit LZ-CD95L bildet. Es wurde der DISC von ³⁵S-markierten Zellen auf einem zweidimensionalen Gel aufgetrennt. Dabei sind zusätzlich zum Western Blot auch phosphoryliertes FADD (FADD-P), CAP3, sowie die Prodomänen von Capsase-8/a und -8/b zu erkennen. d1 T-Zellen bilden dagegen trotz Expression aller Moleküle keinen DISC (Abb. 27A). Dieses Bild erinnert an das Modell der Typ I- und Typ II-Zellen. T-Zellen scheinen also einen Wechsel von Typ II an d1 zu Typ I an d6 zu vollziehen.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde CD95 in d1 und d6 T-Zellen näher untersucht. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, läßt sich CD95 in Typ I-Zellen gut per Western Blot detektieren, wohingegen er in Typ II-Zellen - trotz per FACS nachgewiesener Expression - nicht zu detektieren ist (siehe Abb. 19). Dies ist auch bei den primären T-Zellen der Fall. Trotz hoher Expression von CD95 (siehe Abb. 24B) läßt es sich in d1 T-Zellen nur sehr schwach detektieren, ähnlich wie in den gering exprimierenden d0 T-Zellen (Abb. 28A). Dagegen detektiert man CD95 von d6 T-Zellen genauso gut wie den Rezeptor der Typ I-Zelllinie SKW6.4 (Abb. 28A). Darüber hinaus bilden d6 T-Zellen, ebenso wie SKW6.4, hochmolekulare, SDS-stabile Aggregate von CD95 (Abb. 28B). Die Bildung dieser Aggregate ist dagegen in den d1 T-Zellen, wie in den Typ II-Zelllinien (vgl. Abb. 23), deutlich reduziert (Abb. 28B).

Primäre T-Zellen vollziehen also während ihrer Aktivierung eine Wechsel hinsichtlich der drei Typ I-Typ II-Charakteristika DISC-Bildung, CD95-Detektierbarkeit im Western Blot und Aggregatbildung von CD95.

4.4 Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind durch *Bcl-x_L* geschützte Typ II-Zellen

Da d1 T-Zellen als CD95-Typ II eingestuft werden können und Typ II-Zellen abhängig vom mitochondrialen Signalweg von CD95 sind, wurden die Mitochondrien in d1 und d6 T-Zellen

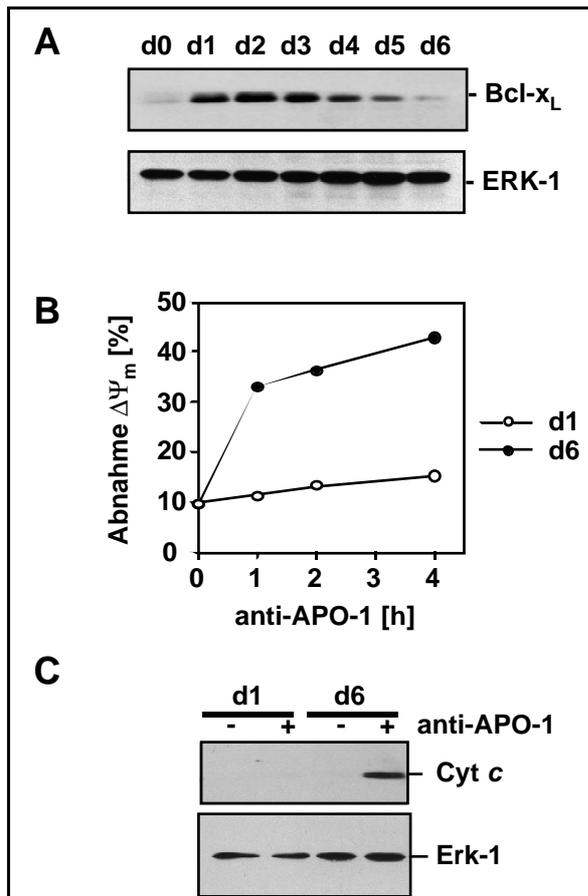


Abbildung 29: Bcl-x_L schützt Mitochondrien aus d1 T-Zellen. (A) Zelluläre Lysate von primären T-Zellen wurden per Western Blot auf die Expression von Bcl-x_L hin untersucht. Erk-1 dient als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. (B) d1 und d6 T-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 1 µg/ml anti-APO-1 stimuliert und $\Delta\Psi_m$ mittels JC-1-Färbung im FACScan gemessen. (C) Zytosolische Extrakte von anti-APO-1 behandelten (+) bzw. unbehandelten (-) d1 und d6 T-Zellen wurden mittels Western Blot auf die Translokation von Cytochrom c in Zytosol hin untersucht. Erk-1 dient als Ladekontrolle.

näher untersucht. Von den Mitgliedern der Bcl-2-Familie, die eine C-terminale Transmembrandomäne besitzen, ist bekannt, daß sie u. a. an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Peter et al. (1997) konnten zeigen, daß Bcl-x_L in d1 T-Zellen hochreguliert ist, wohingegen die Expression von Bcl-2 und Bax konstant bleibt. Deshalb wurde zunächst die Expression von Bcl-x_L über den Kultivierungszeitraum von 6 Tagen untersucht. Wie erwartet wurde Bcl-x_L durch Aktivierung der T-Zellen von d0 auf d1 hochreguliert. Die Expression nahm dann kontinuierlich ab, bis sie an d6 nahezu verschwunden war (Abb. 29A).

Im Verlauf der Apoptose vollziehen sich am Mitochondrium zwei Änderungen: Zum einen bricht das Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$) zusammen, zum anderen werden apoptogene Faktoren aus dem Intermembranraum ins Cytosol entlassen. Deshalb wurde zunächst $\Delta\Psi_m$ von d1 und d6 T-Zellen während Stimulation von CD95 untersucht. Dazu wurden T-Zellen unterschiedlich lange mit anti-APO-1 stimuliert, mit dem Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 markiert und im FACS analysiert. Die resistenten d1 T-Zellen zeigen keinen Verlust des $\Delta\Psi_m$, wohingegen die sensitiven d6 T-Zellen ihr $\Delta\Psi_m$ schon nach Stimulation von 1 h mit anti-APO-1 verlieren (Abb. 29B). Persistenz und Verlust von $\Delta\Psi_m$ korrelieren also mit Resistenz und Sensitivität der T-Zellen.

Einer der apoptogenischen Faktoren, der während der Apoptose aus dem Intermembranraum ins Cytosol entlassen wird, ist Cytochrom *c*. Daher wurde als nächstes die Translokation von Cytochrom *c* ins Cytosol untersucht. Dazu wurden d1 und d6 T-Zellen mit anti-APO-1 stimuliert bzw. unbehandelt gelassen, die Plasmamembranen mit Digitonin lysiert und cytosolische Extrakte durch Zentrifugation gewonnen. Die so gewonnenen cytosolischen Extrakte wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit von Cytochrom *c* analysiert. Dabei konnte in den resistenten d1 T-Zellen keine Cytochrom *c*-Translokation detektiert werden. Dagegen ist Cytochrom *c* im Cytosol stimulierter d6 T-Zellen zu sehen (Abb. 29C). Somit korreliert die Translokation von Cytochrom *c* mit der fehlenden Expression von Bcl-x_L.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Expression von Bcl-x_L dafür verantwortlich zu sein scheint, daß die Mitochondrien in d1 T-Zellen weder ihr $\Delta\Psi_m$ verlieren, noch apoptogenische Faktoren aus dem Intermembranraum ins Cytosol entlassen werden. Damit kann die Resistenz von d1 T-Zellen dadurch erklärt werden, daß sie Typ II-Zellen sind, die durch Bcl-x_L vor CD95-vermittelter Apoptose geschützt sind.

4.5 Cycloheximid sensitiviert Kurzzeit-aktivierte T-Zellen

Die Resistenz von d1 T-Zellen kann durch Behandlung mit Cycloheximid (CHX) gebrochen werden (Klas et al., 1993) Um dies nachzuvollziehen wurden T-Zellen (d0, d1, d6) über Nacht in An- und Abwesenheit von CHX mit anti-APO-1 stimuliert und Apoptose anhand der DNA-Fragmentierung gemessen. Abb. 30A zeigt, daß in Abwesenheit von CHX d0 und d1 T-Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind. d6 T-Zellen sind dagegen sehr sensitiv (ca. 75% spezifische Apoptose). In Anwesenheit von CHX werden d0 und d1 T-Zellen so für CD95-vermittelte Apoptose sensitiviert, daß ca. 25% der T-Zellen spezifisch über CD95 sterben. Da d0 T-Zellen CD95 geringer exprimieren als d1 und d6 T-Zellen und sich deshalb schlecht mit diesen vergleichen lassen, wurden im folgenden nur d1 und d6 T-Zellen analysiert. Als nächstes sollte geklärt werden, an welchem Punkt die Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose im CD95-Signalweg stattfindet. Dazu wurde zuerst untersucht, ob die Mitochondrien bei der Sensitivierung eine Rolle spielen. d1 T-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von CHX mit anti-APO-1 stimuliert, mit JC-1 gefärbt und anschließend im FACS analysiert. d6 T-Zellen, die nur mit anti-APO-1 stimuliert wurden, dienten als Kontrolle. Dabei wurde gezeigt, daß bei der Sensitivierung von d1 T-Zellen durch CHX Mitochondrien involviert sind, denn der Verlust des mitochondriellen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) der CHX-behandelten d1 T-Zellen war mit dem Verlust von $\Delta\Psi_m$ in d6 T-Zellen vergleichbar (Abb. 30B). Dagegen zeigten die nicht mit CHX behandelten d1 T-Zellen keinen Verlust des $\Delta\Psi_m$.

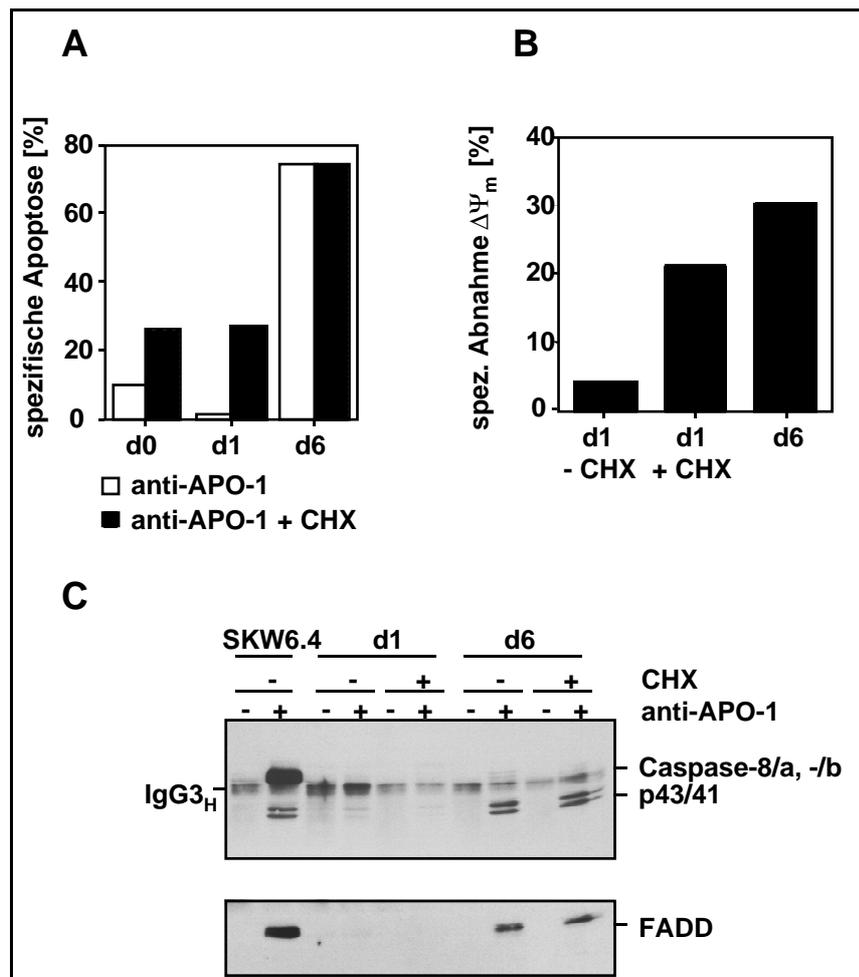


Abbildung 30: Cycloheximid sensitiviert d1 T-Zellen für CD95-vermittelte Apoptose. (A) Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose wurde in d0, d1 und d6 T-Zellen in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von Cycloheximid (CHX, 10 $\mu\text{g/ml}$) anhand der DNA-Fragmentierung bestimmt. (B) d1, mit CHX behandelte d1 (1 h Vorbehandlung, 10 $\mu\text{g/ml}$) und d6 T-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-APO-1 für 4 h stimuliert, mit JC-1 gefärbt und anschließend $\Delta\Psi_m$ im FACScan gemessen. (C) DISC-Analyse von d1 und d6 T-Zellen mit und ohne CHX-Behandlung. 2×10^7 T-Zellen wurden für 4 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX behandelt oder unbehandelt gelassen, mit 2 $\mu\text{g/ml}$ anti-APO-1 stimuliert, lysiert und CD95 immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde der DISC aus 10^7 SKW6.4 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden per Western Blot auf die Assoziation von Caspase-8 (C15) und FADD hin analysiert.

Da die CHX-behandelten d1 T-Zellen ihr $\Delta\Psi_m$ nach Stimulation von CD95 verlieren, muß die Sensitivierung oberhalb der Mitochondrien lokalisiert sein. Zunächst wurde untersucht, ob CHX einen Effekt auf die DISC-Bildung in primären T-Zellen hat. Dazu wurden d1 und d6 T-Zellen mit CHX vorbehandelt, der DISC stimuliert, immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot analysiert. Abb. 30C zeigt, daß CHX keinen Effekt auf die Bildung des DISC in d1 oder in d6 T-Zellen hat. In d1 T-Zellen läßt sich trotz Sensitivierung durch CHX kein DISC induzieren, die Zellen behalten ihren Typ II-Phänotyp.

Um Hinweise über den Mechanismus der CHX-induzierten Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose zu erhalten, wurde die Expression verschiedener Apoptosemoleküle analysiert. Es wurde vermutet, daß CHX als Proteinbiosyntheseinhibitor die Synthese eines anti-apopto-

tischen Faktors verhindert, der zur Resistenz der d1 T-Zellen beiträgt. Dazu wurden d1 T-Zellen mit CHX oder Actinomycin D (ActD), einem Inhibitor der Transkription, behandelt bzw. unbehandelt gelassen, lysiert und per Western Blot analysiert. In Abb. 31A ist zu sehen, daß d1 T-Zellen, im Gegensatz zu d0 und d6 T-Zellen c-FLIP_s exprimieren. Die Expression von c-FLIP_s ist durch CHX deutlich inhibiert, wohingegen c-FLIP_L kaum beeinträchtigt ist. Da die Behandlung mit ActD kaum einen Effekt auf die Expression von c-FLIP_s hat, scheint diese hauptsächlich translationell reguliert zu sein. Die Expression von Caspase-8 ist in allen Proben gleich und dient als Ladekontrolle (Abb. 31A).

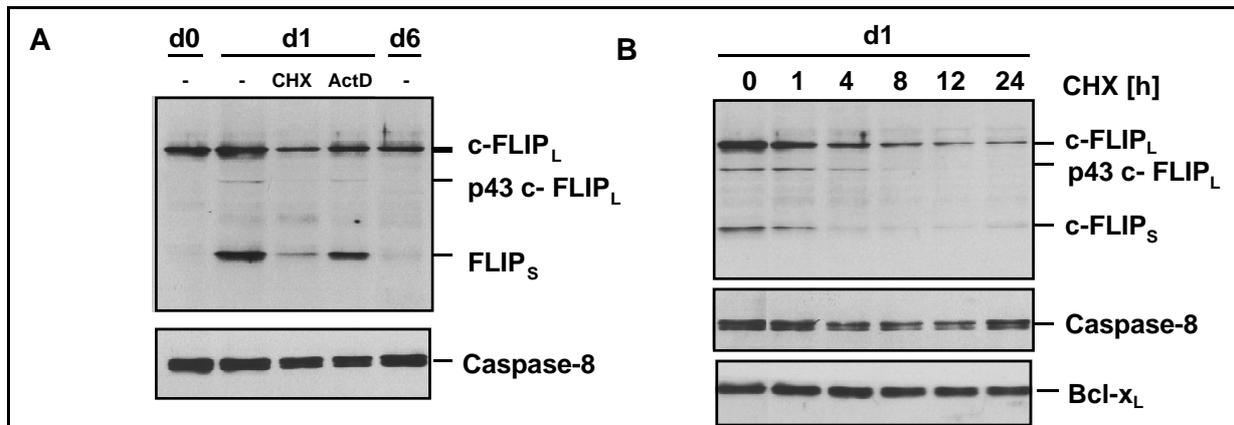


Abbildung 31: c-FLIP_s hat eine kurze Halbwertszeit. (A) Zelluläre Lysate von d0, d1 und d6 T-Zellen wurden auf die Expression von c-FLIP_L, c-FLIP_s (NF6) und Caspase-8 (C15) hin untersucht. d1 T-Zellen wurden zusätzlich 16 h mit 10 µg/ml Cycloheximid (CHX) bzw. 50 ng/ml Actinomycin D (ActD) behandelt. (B) d1 T-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10 µg/ml CHX behandelt und die Expression von c-FLIP (NF6), Caspase-8 (C15) und Bcl-x_L im Western Blot verfolgt.

Um zu untersuchen, ob der Verlust der Expression von c-FLIP_s zeitlich mit dem Verlust von $\Delta\Psi_m$ korreliert, wurden d1 T-Zellen unterschiedlich lange mit CHX behandelt, lysiert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Dabei wurde festgestellt, daß c-FLIP_s nach vier Stunden annähernd komplett verschwunden ist (Abb. 31B). Die Expression von c-FLIP_L nimmt zwar ebenfalls deutlich ab, c-FLIP_L läßt sich aber selbst nach 24-stündiger Behandlung mit CHX noch nachweisen. Dagegen ist weder die Expression von Caspase-8 noch die von Bcl-x_L durch die Behandlung mit CHX verändert (Abb. 31B). Die Abnahme von $\Delta\Psi_m$ ist dagegen schon nach einstündiger Behandlung mit CHX zu detektieren (Abb. 30B). Somit korreliert die Sensitivierung von d1 T-Zellen durch CHX zwar mit einer Abnahme der Expression von c-FLIP_s, der zeitliche Ablauf spricht jedoch gegen eine wesentliche Rolle von c-FLIP_s bei diesem Prozeß. Da die Abnahme der Expression von c-FLIP_s auch keinen Effekt auf die Bildung des DISCs hat, bleibt der genaue Mechanismus der Sensitivierung durch CHX unklar.

IV. Diskussion

Apoptose ist für mehrzellige Organismen von fundamentaler Bedeutung in der embryonalen Entwicklung und der Erhaltung der Zellhomöostase (Vaux et al., 1999; Krammer, 1999). Dabei spielen Todesrezeptoren, eine Unterfamilie der TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie, eine wesentliche Rolle (Peter et al., 1998). Der Todesrezeptor CD95 ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, die Apoptose involvieren. Speziell im Immunsystem kommt CD95 eine entscheidende Rolle zu, wie aus dem Phänotyp von Menschen oder Mäusen mit einem Defekt im CD95-System deutlich wird (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Matsuzawa et al., 1990; Takahashi et al., 1994a; Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). Eine Fehlregulation im CD95-System kann z. B. zur Entstehung von Krankheiten, wie z. B. dem Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS), beitragen (Krammer et al., 1994; Debatin et al., 1994; Galle et al., 1995; Jackson et al., 1999). Um therapeutisch solche Fehlregulationen korrigieren zu können, ist es unerlässlich, die Signalwege von CD95 und die Verknüpfung mit anderen Signalwegen zu kennen.

Das CD95-Zwei-Signalwege-Modell: Das Verhältnis von DISC und Bcl-2 definiert Sensitivität von Typ II-Zellen

CD95 kann das Todessignal auf zwei verschiedenen Signalwegen in die Zelle leiten. Mit Hilfe des agonistischen Antikörpers anti-APO-1 konnte in humanen Zelllinien gezeigt werden, daß diese Signalwege je nach Zelltyp präferentiell beschränkt werden (Scaffidi et al., 1998). Diese Zelltypen wurden Typ I und Typ II genannt. Typ I-Zellen (z.B. SKW6.4, H9) zeichnen sich durch eine effiziente DISC-Bildung aus. Dadurch werden große Mengen Caspase-8 am DISC aktiviert, so daß eine direkte Caspasenkaskade eingeleitet wird. Gleichzeitig werden durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid die Mitochondrien aktiviert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999b), was zum Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ und zur Ausschüttung apoptogener Faktoren, wie z. B. Cytochrom *c*, führt (Liu et al., 1996; Kroemer et al., 1997). Die Typ I-Zellen sind wegen der direkten Caspasenkaskade unabhängig von den mitochondrialen Apoptosemolekülen, weshalb anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder Apoptose in Typ I-Zellen nicht blockieren können. In Typ II-Zellen (z.B. CEM, Jurkat) dagegen ist die DISC-Bildung stark vermindert, was eine direkte Caspasenkaskade verhindert. Somit steht lediglich der evolutionär konservierte mitochondrielle Apoptosesignalweg zur Verfügung. Typ II-Zellen sind also von den apoptogenen Faktoren des Mitochondriums abhängig. Deshalb läßt sich Apoptose in diesen Zellen durch verstärkte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern inhibieren (siehe Abb. 32).

Das Zwei-Signalwege-Modell der CD95-Signaltransduktion konnte durch die Verwendung des CD95 Liganden (CD95L) verifiziert werden. Auf der Ebene der DISC-Bildung zeigten sich nach Stimulation mit CD95L die Unterschiede, die von den Untersuchungen mit dem agonistischen Antikörper anti-APO-1 her bekannt waren. Typ I-Zellen bilden effizient einen DISC. In Typ II-Zellen dagegen ist die DISC-Bildung so gering, daß sie sich mittels Western Blot nicht - oder nur sehr schwer - nachweisen läßt. Generell, d. h. in Typ I- und Typ II-Zellen, ist die DISC-Bildung nach CD95L- effizienter als nach anti-APO-1-Stimulation (Daten nicht gezeigt). Dies liegt vermutlich an der stärkeren Kreuzvernetzung des CD95L durch die Leuzin-Reißverschluß-Domäne. Der agonistische Antikörper anti-APO-1 kann lediglich schwach miteinander über den konstanten Teil der schweren Kette wechselwirken. So wurde auch eine unterschiedliche Abhängigkeit von Typ I- und Typ II-Zellen von der Kreuzvernetzung des agonistischen Antikörpers gefunden.

Auch die Inhibierbarkeit von CD95-vermittelter Apoptose durch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder war mit CD95L reproduzierbar. In den Typ I-Zellen SKW6 hatte die Expression von Bcl-2 keinen Effekt auf CD95-vermittelte Apoptose. Dies ist damit konsistent, daß Typ I-Zellen von den Mitochondrien unabhängig sind, da sie unterhalb des DISC eine direkte Caspasenkaskade initiieren. In den Typ II-Zellen dagegen war eine deutliche Protektion gegenüber CD95L-induzierter Apoptose durch Expression von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L festzustellen. CEM-Bcl-x_L-Zellen waren gegen jede eingesetzte Konzentration von CD95L resistent. Dagegen waren Jurkat-Bcl-2 zwar gegen geringe, nicht mehr aber höhere Konzentrationen von CD95L geschützt. Da Bcl-2 und Bcl-x_L grundsätzlich die gleiche anti-apoptotische Kapazität besitzen (Huang et al., 1997), liegt der Grund für die unterschiedliche Protektion eher in der unterschiedlichen Expression von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L in Jurkat bzw. CEM begründet.

Auch die Stärke der Kreuzvernetzung von CD95 kann einen Einfluß auf die Inhibition CD95-vermittelter Apoptose durch Bcl-2 haben. So ist der lösliche CD95L trotz seiner trimeren Struktur bei der Induktion von Apoptose in Jurkat-Zellen weniger aktiv als der membran-gebundene CD95L (Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998). Darüber hinaus ist Bcl-2 nicht in der Lage, Apoptose zu inhibieren, die durch hohe Konzentrationen des membrangebundenen Liganden induziert wird (Huang et al., 1999). Hohe Konzentrationen von CD95L können demnach die Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen verwischen. Da die bisherigen Erkenntnisse fast ausschließlich auf *in vitro* Experimenten beruhen, ist unklar, in welchen Konzentrationen CD95L *in vivo* vorliegt. Außerdem ist bisher nicht geklärt, welche Form des CD95L *in vivo* gebildet wird und aktiv ist.

Die Bestätigung des Zwei-Signalwege-Modells bei Verwendung von CD95L als Apoptosestimulus zeigt, daß es sich bei dem Modell um kein Antikörper-Artefakt handelt, wie postuliert wurde (Huang et al., 1999). Daß dieses Modell auch *in vivo* Bedeutung hat, zeigen diverse Knock-out- und transgene Mäuse. So sind Thymocyten aus Caspase-9- bzw. Apaf-1-defizienten Mäusen, und aus Mäusen, die ein T-Zell-spezifisches Bcl-2-Transgen tragen, immer noch sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998;

Cecconi et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Strasser et al., 1995). Damit scheinen Thymocyten Typ I-Zellen zu sein. Dagegen sind Hepatocyten aus Bcl-2-transgenen und Bid-defizienten Mäusen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Rodriguez et al., 1996; Lacronique et al., 1996; Yin et al., 1999). Darüber hinaus zeigen Fibroblasten aus Apaf-1-defizienten Mäusen einen CD95-Sensitivitätsdefekt (Cecconi et al., 1998). Hepatocyten und Fibroblasten sind daher als Typ II-Zellen anzusehen. Die Bedeutung des Zwei-Signalwege-Modells für periphere T-Zellen wird weiter unten diskutiert.

MAPK inhibiert CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen durch Inhibition der Bid-Spaltung

Es sollte untersucht werden, ob neben der DISC-Bildung und der Bcl-2-Inhibierbarkeit CD95-vermittelter Apoptose noch andere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen existieren. Für eine Reihe von Signalmolekülen, wie z. B. Proteinkinase C (PKC) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), wurde berichtet, daß sie CD95-vermittelte Apoptose inhibieren können (Copeland et al., 1994; Clement et al., 1996; Rudert et al., 1997; Cuvillier et al., 1998; Holmstrom et al., 1998; Holmstrom et al., 1999). PKC kann über Raf-1 die MAPK-Kaskade aktivieren (Toker, 1998). Interessanterweise wurden die meisten Studien in Jurkat-Zellen unter Verwendung des Phorbolesters PMA durchgeführt. Dies wirft die Frage auf, ob PMA generell in allen Zelltypen anti-apoptotisch wirkt, und welche Kinase für den Effekt verantwortlich ist.

Um zu testen, ob PMA in allen Zellen inhibitorisch wirkt, wurde ein möglicher Effekt auf die vier Modellzelllinien des Zwei-Signalwege-Modells untersucht. PMA inhibierte CD95-vermittelte Apoptose nur in Typ II-Zellen. Da dieser inhibitorische Effekt oberhalb der Mitochondrien lokalisiert werden konnte, mußte die Aktivität bzw. Bildung des DISC oder die Spaltung von Bid betroffen sein. Der DISC und Bid sind die einzigen bekannten Komponenten zwischen CD95 und den Mitochondrien. Eine Analyse des DISC ergab, daß PMA keinen Einfluß auf Bildung oder Aktivität des DISC hat. Dagegen konnte der inhibitorische Effekt von PMA auf der Ebene von Bid festgestellt werden. Darüber hinaus wird die Spaltung von Bid nicht direkt durch PKC verhindert, sondern über eine MAPK, da sich der Effekt von PMA durch Inhibition von MEK1 wieder rückgängig machen läßt. Offen bleibt, ob Bid direkt phosphoryliert wird, oder ob die Kinase einen Inhibitor der Bid-Spaltung aktiviert. Es wäre vorstellbar, daß der Inhibitor nach Phosphorylierung an Bid binden kann und dadurch die Spaltungsstelle für Caspase-8 maskiert. Ein ähnlicher Mechanismus ist für das Bid-Homologe Bad beschrieben worden. Neben der Inhibition der Spaltung von Bid kann MAPK auch Bad phosphorylieren (Scheid et al., 1998; Scheid et al., 1999; Holmström et al., 2000). Dies führt zu einer Inaktivierung von Bad durch Bindung an 14-3-3 Proteine. Geht die Phosphorylierung verloren, transloziert Bad zum Mitochondrium und löst Apoptose aus. Die Phosphorylierung von Bad wird durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. Interleukin-3, gefördert (Datta et al., 1997;

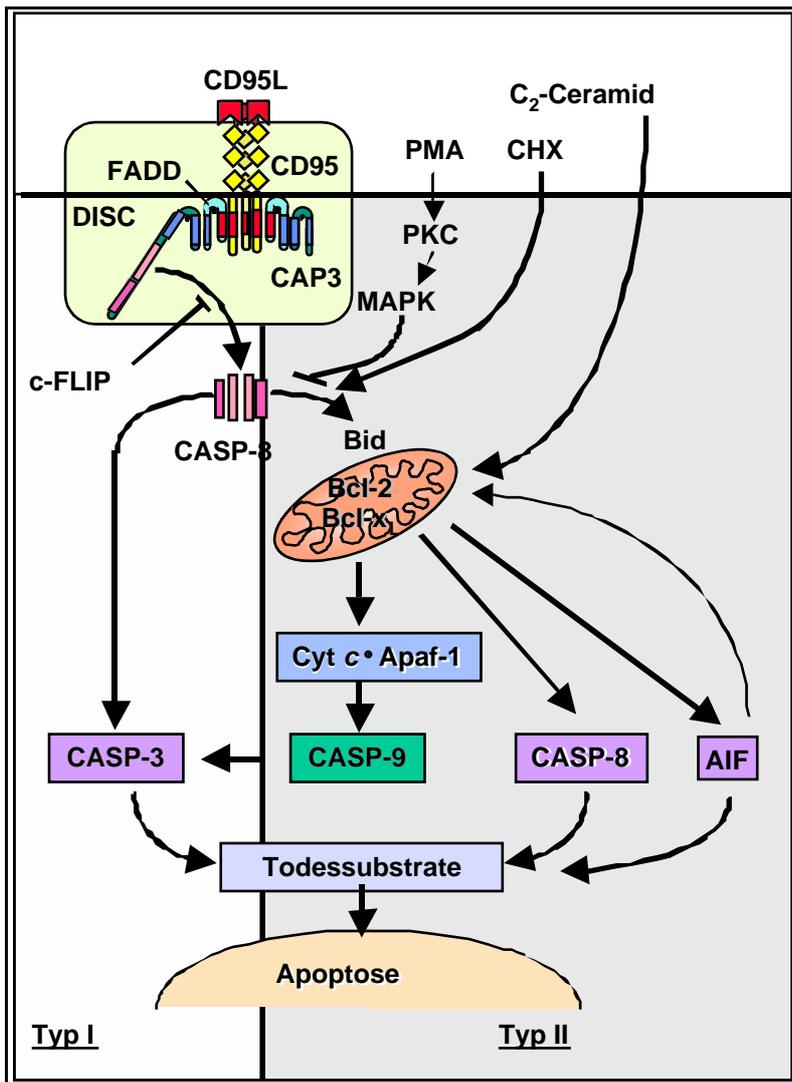


Abbildung 32: Integratives Modell für verschiedene Modulatoren der Apoptose in die zwei CD95-Signalwege. Auf der linken Seite ist der Typ I-Signalweg dargestellt, rechts der Typ II-Signalweg, der dem evolutionär konservierten mitochondrialen Signalweg entspricht. In diesem Signalweg konnten eine Reihe von Modulatoren identifiziert werden. $c\text{-FLIP}_L$ dagegen hemmt beide Signalwege, da es direkt am DISC wirkt. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

del Peso et al., 1997). Damit scheint Bid eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose nach Entzug von Wachstumsfaktoren zu spielen. MAPK, die für Vermittlung von Proliferation bekannt ist (Seeger et al., 1995), scheint also nicht nur CD95-vermittelte Apoptose zu inhibieren, sondern generell anti-apoptotisch zu wirken.

Alternativ könnte aktive Caspase-8 durch Phosphorylierung inhibiert werden, wie für Caspase-9 beschrieben wurde (Cardone et al., 1998). Jedoch konnten bisher keine Hinweise auf eine Phosphorylierung von Caspase-8 gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Da der inhibitorische Effekt von PMA bereits nach einer halben Stunde Vorinkubation zu beobachten ist, scheint der Effekt jedenfalls transkriptionsunabhängig zu sein. Auch bleibt unklar, welche Kinase genau für die Inhibition der Bid-Spaltung verantwortlich ist. Denn durch den MEK1-Inhibitor werden auch alle Kinasen inhibiert, die in der MAPK-Kaskade unterhalb von MEK1 lokalisiert sind.

Weitere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen

Neben der oben diskutierten inhibitorischen Wirkung von PMA sind in der Literatur noch weitere Moleküle beschrieben worden, die CD95-vermittelte Apoptose modulieren können. So inhibiert die Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) bzw. Protein-kinase B (PKB) CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen (Hausler et al., 1998; Fujita et al., 1998). Bisher konnten allerdings keine Moleküle aus den CD95-Signalwegen identifiziert werden, die durch PI3-K oder PKB reguliert werden. Es ist nicht bekannt, ob pro-apoptotische Moleküle wie Caspase-8 oder Bid inaktiviert, oder anti-apoptotische wie Bcl-2 oder Bcl-x_L hoch reguliert werden. Auch Stickstoffmonoxid (NO), das als sekundäres Signalmolekül (engl.: second messenger) dient, kann in Typ II-Zellen anti-apoptotisch wirken (Kim et al., 1997; Dimmeler et al., 1998). Da gezeigt wurde, daß NO auf die mitochondrielle Atmungskette inhibitorisch wirkt (Cleeter et al., 1994; Clementi et al., 1998), darf vermutet werden, daß NO vornehmlich in Typ II-Zellen Apoptose moduliert.

Außer inhibitorischen Stimuli sind auch Agentien beschrieben worden, die CD95-vermittelte Apoptose verstärken oder selbst Apoptose auslösen können. So wurde beschrieben, daß Ceramid, das aus Sphingomyelin entsteht und als second messenger wirken kann, in die CD95-Signaltransduktion involviert ist (Cifone et al., 1994). Neuere Untersuchungen jedoch zeigen, daß Ceramid in geringen Konzentrationen zur Hochregulation von CD95L beiträgt (Herr et al., 1997). Ceramid kann also oberhalb von CD95 wirken. Dagegen löst es in hohen Konzentrationen direkt Apoptose durch Wirkung auf die Mitochondrien aus (Tepper et al., 1997; Thornberry et al., 1998; Furukawa et al., 1996). Die meisten dieser Studien wurden in Zellen durchgeführt, die als Typ II klassifiziert werden können. In der Tat zeigte ein Vergleich der Wirkung von Ceramid auf die auch hier verwendeten vier Modellzelllinien des Zwei-Signalwege-Modells, daß Ceramid nur in Typ II-Zellen Apoptose auslösen kann (Scaffidi et al., 1999b). Ceramid wirkt also offensichtlich auf eine Komponente im mitochondriellen Apoptose-Signalweg, die nur in Typ II-Zellen exprimiert ist. Auch die Untersuchung der Rolle von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung ergab eine Verstärkung der CD95-induzierten Apoptose nur in bestimmten Zelllinien, die sich dem Typ II zuordnen lassen (Linsinger et al., 1999). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß sich Typ I- und Typ II-Zellen in Komponenten des mitochondriellen Apoptose-Signalwegs unterscheiden.

Cycloheximid sensitiviert resistente Typ II-Zellen für Apoptose

CD95 benötigt keine *de novo* Proteinbiosynthese, um Apoptose auszulösen. Im Gegensatz dazu sind Signalwege, die der Zelle positive Signale vermitteln, häufig von der Proteinbiosynthese abhängig. So lassen sich viele Zellen durch Gabe von Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, gegenüber TNF-induzierter Apoptose sensitivieren (Holtmann

et al., 1988). Dies trifft auch für CD95-vermittelte Apoptose in Boe^R- (Scaffidi et al., 1999b) und primären Kurzzeit-aktivierten T-Zellen zu (diese Arbeit) (Klas et al., 1993). Der Effekt von CHX konnte dabei unterhalb des DISC, jedoch oberhalb der Mitochondrien lokalisiert werden. CHX wirkt also im mitochondriellen Teil des CD95-Signalweges und wirkt vermutlich deshalb nur in Typ II-Zellen. Da Boe^R und Kurzzeit-aktivierte T-Zellen eine verminderte DISC-Bildung aufweisen, können sie als Typ II-Zellen angesehen werden. CHX sensitiviert offensichtlich für CD95-vermittelte Apoptose dadurch, daß die Synthese eines anti-apoptotisch wirkenden Faktors mit kurzer Halbwertszeit verhindert wird. Von den untersuchten anti-apoptotischen Molekülen war nur die Expression von c-FLIP_s durch CHX beeinträchtigt. Allerdings spricht zweierlei gegen eine wesentliche Rolle von c-FLIP_s bei der Vermittlung von Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Erstens korreliert der Verlust der Proteinexpression nicht mit dem Verlust von $\Delta\psi_m$, und zweitens verändert sich der DISC nicht (diese Arbeit) (Scaffidi et al., 1999b). Somit bleibt die Natur des CHX-sensitiven anti-apoptotischen Faktors leider ungeklärt. Abbildung 32 faßt die bisher diskutierten Daten zusammen.

Der Mechanismus von c-FLIP_L

Die Existenz der viralen FLIPs führte zu der Vorhersage, daß auch beim Menschen ein solcher Inhibitor existieren könnte. So wurde die Identifizierung von c-FLIP von acht Gruppen beschrieben (Irmeler et al., 1997b; Goltsev et al., 1997; Shu et al., 1997; Inohara et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Hu et al., 1997b; Han et al., 1997; Rasper et al., 1998). Dies führte zu so unterschiedlichen Namen wie CASH, Casper, CLARP, FLAME, I-FLICE, MRIT oder Usurpin für ein und dasselbe Protein. Jedoch war nicht nur die Namensgebung unterschiedlich, sondern auch die Funktion, die diesem Molekül zugesprochen wurde. So fanden einige Gruppen eine Apoptose verstärkende oder auslösende Funktion (Shu et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Han et al., 1997), während andere eine anti-apoptotische Wirkung beschrieben (Goltsev et al., 1997; Irmeler et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997; Hu et al., 1997b; Rasper et al., 1998). Ebenso wurde der Grund für diese Eigenschaft des Proteins unterschiedlich diskutiert. So fanden einige Gruppen sowohl eine Interaktion von c-FLIP mit FADD als auch mit Caspase-8 (Shu et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Irmeler et al., 1997b; Srinivasula et al., 1997; Han et al., 1997), während andere nur eine Interaktion zwischen c-FLIP und Caspase-8 finden konnten (Inohara et al., 1997; Hu et al., 1997b; Rasper et al., 1998). Die meisten dieser Resultate wurden *in vitro* oder mittels transienter Überexpression erzielt.

Erst die Generierung monoklonaler Antikörper gegen c-FLIP ließen eine genauere Untersuchung der Funktion von c-FLIP *in vivo* zu. So konnte nicht nur gezeigt werden daß c-FLIP_L eine anti-apoptotische Wirkung besitzt, sondern auch der Mechanismus von c-FLIP_L

geklärt werden. c-FLIP_L besitzt eine hohe Affinität für die Bindung an den DISC. Obwohl dieses Molekül nur in geringen Mengen endogen zu finden war, konnte es am DISC relativ einfach nachgewiesen werden. So scheint nahezu die gesamte Menge an c-FLIP_L in einer Zelle an den DISC zu binden. Dadurch kann auch die schnelle Spaltung des Moleküls, die schon wenige Minuten nach CD95 Stimulation vollständig ist, erklärt werden. Ebenso konnte nach Erhöhung der c-FLIP_L Expression durch Transfektion eine vermehrte Bindung dieses Moleküls an den DISC festgestellt werden. Dies bedeutet, daß der DISC eine hohe Bindekapazität für c-FLIP_L besitzt. Im Falle von Caspase-8 ist das anders. Obwohl dieses Molekül in größeren Mengen in der Zelle vorkommt, bindet immer nur ein kleiner Teil von Caspase-8 an den DISC. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß c-FLIP_L eine deutlich höhere Affinität für die Bindung an den DISC aufweist als Caspase-8. Dies steht im Einklang mit der Funktionsweise dieses Proteins, den DISC für die weitere Rekrutierung von Caspase-8 zu blockieren. Das weist aber auch darauf hin, daß auch die endogenen Mengen an c-FLIP_L inhibitorisch wirken müssen. Der Grund, warum Zellen mit geringen endogenen c-FLIP-Mengen sensitiv gegenüber CD95 vermittelter Apoptose sind, könnte dadurch erklärt werden, daß nur ein kleiner Teil der Rezeptorkomplexe durch geringe Mengen an c-FLIP_L gehemmt werden kann. Daher tritt erst bei einer Erhöhung der c-FLIP_L-Expression eine merkliche Inhibition CD95-vermittelter Apoptose auf, da nun immer mehr Rezeptorkomplexe inhibiert werden.

Der Wirkmechanismus von c-FLIP_L kann wie folgt zusammengefaßt werden (Abb. 33): Nach Stimulation von CD95 binden c-FLIP_L und Caspase-8 über FADD an den DISC. Diese Bindung induziert die autoproteolytische Aktivierung von Caspase-8. Durch die Aktivität von Caspase-8 wird auch c-FLIP_L prozessiert. Die Spaltprodukte von c-FLIP_L und Caspase-8 besitzen eine hohe Affinität für die Bindung an den DISC. Sie verbleiben am DISC bzw. dissoziieren nur sehr langsam ab und können daher nicht mehr von ungespaltener Caspase-8 verdrängt werden, was diesen Komplex für die weitere Aktivierung von Caspase-8 blockiert. Auf diese Weise wird das CD95-Signal auf der Ebene der Caspase-8-Aktivierung unterbrochen.

Daß einige Gruppen eine Apoptose auslösende Wirkung von c-FLIP_L beobachtet haben, kann dadurch erklärt werden, daß in diesen Versuchen c-FLIP_L transient überexprimiert war. Hierbei werden sehr große Mengen an c-FLIP_L exprimiert, die weit über den Mengen in stabil transfizierten Zellen liegen (Krammer, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß eine solche Überexpression von DED enthaltenden Proteinen zu einer unphysiologischen Aggregation und somit zur Apoptose führen kann (Siegel et al., 1998). Bisher ist noch keine stabil transfizierte Zelllinie beschrieben worden, bei der c-FLIP_L zu einer Verstärkung CD95 vermittelter Apoptose geführt hat. Auch die unterschiedlich beschriebenen Interaktionen von c-FLIP_L (siehe oben) können durch die transiente Überexpression erklärt werden. So konnte in stabilen Transfektanten gezeigt werden, daß c-FLIP_L erst nach Stimulation von CD95 mit FADD und Caspase-8 interagiert. Diese Interaktion findet am DISC statt (Scaffidi et al., 1999a).

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, daß zwei Formen von c-FLIP existieren, wobei die Funktion der langen Form bereits beschrieben wurde. Die kurze Form (c-FLIP_s) wird in noch geringeren Mengen exprimiert, und enthält nur die beiden N-terminalen DEDs. Sie ist also den v-FLIPs ähnlich und wird ebenfalls in den DISC rekrutiert. Wie c-FLIP_s wirkt und ob die beiden c-FLIP-Formen unterschiedliche Funktionen haben, ist bislang noch unklar, obwohl auch c-FLIP_s als anti-apoptotisch beschrieben wurde (Irmeler et al., 1997b). Aus der strukturellen Homologie zwischen c-FLIP_s und v-FLIP kann man schließen, daß beide auf ähnliche Weise Apoptose inhibieren. Allerdings stellt sich dann die Frage, warum zusätzlich c-FLIP_L existiert. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß die Caspasen-ähnliche Domäne in c-FLIP_L eine zusätzliche Funktion besitzt, oder daß die beiden c-FLIP-Formen unterschiedliche, zusätzliche Moleküle in den DISC rekrutieren.

Aus den hier diskutierten Daten wird deutlich, daß nur eine erhöhte Expression von c-FLIP_L CD95 vermittelte Apoptose inhibieren kann. Bisher wurde eine solche Erhöhung des Expressionsniveaus allerdings lediglich durch Transfektion erreicht. Somit stellt sich die Frage, unter welchen physiologischen Bedingungen eine erhöhte c-FLIP_L-Expression *in vivo* für Apoptoseresistenz sorgt, d. h. welche physiologischen Stimuli zu einer verstärkten c-FLIP-Expression führen. Bisher konnten lediglich Korrelationen zwischen c-FLIP-Expression und Resistenz gegenüber Apoptose gezeigt werden. So wurde die Expression von c-FLIP_L in ver-

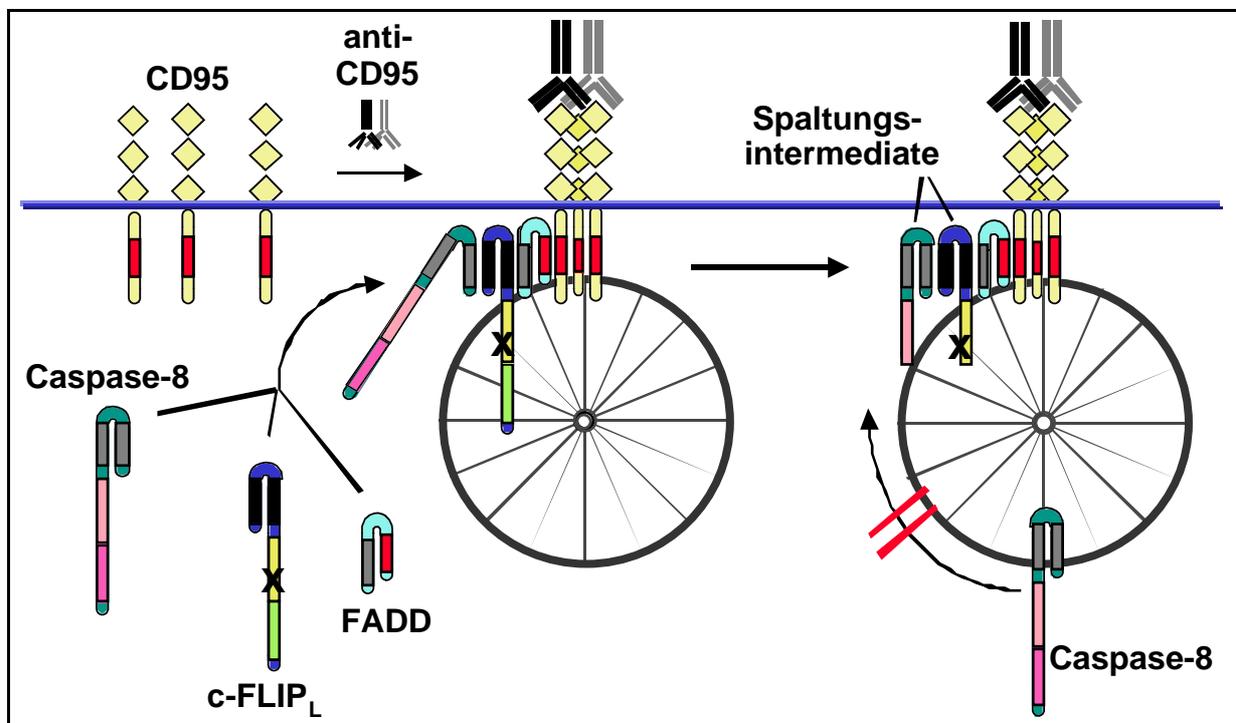


Abbildung 33: Schematische Darstellung des c-FLIP_L Wirkmechanismus. Nach Stimulation von CD95 werden sowohl Procaspase-8 als auch c-FLIP_L in den DISC rekrutiert. Dort kommt es zu einer initialen Spaltung von Procaspase-8 und c-FLIP_L an der p10-Untereinheit. Der Komplex aus p43/41-Caspase-8 und p43-c-FLIP_L verläßt jedoch den DISC nicht oder nur sehr langsam, so daß keine weitere Procaspase-8 in den DISC rekrutiert werden kann. Somit ist die Aktivierung von Caspase-8 am DISC blockiert.

schiedenen Melanomzelllinien gezeigt (Irmeler et al., 1997b; Griffith et al., 1998). Dies wurde mit der erhöhten Apoptoseresistenz dieser Krebsart in Zusammenhang gebracht. Allerdings zeigte eine weitere Studie, die eine größere Anzahl von Zelllinien analysierte, keine direkte Korrelation (Zhang et al., 1999). Dennoch kann vermutet werden, daß c-FLIP aufgrund der geringen Expression eher die Induktion von Apoptose durch solche Todesrezeptoren inhibiert, die ein geringeres Expressionsniveau als CD95 aufweisen, wie z. B. TNF-RI oder die TRAIL-Rezeptoren.

Warum ist die DISC-Bildung in Typ II-Zellen reduziert?

Typ I- und Typ II-Zellen zeichnen sich durch eine unterschiedliche Effizienz in der DISC-Bildung aus (diese Arbeit) (Scaffidi et al., 1998). Da alle bekannten Komponenten des DISC in den vier Modellzelllinien des Zwei-Signalwege-Modells vergleichbar stark exprimiert sind, (diese Arbeit) (Scaffidi et al., 1998) stellt sich die Frage, was die DISC-Bildung in Typ II-Zellen vermindert bzw. in Typ I-Zellen begünstigt.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß Typ II-Zellen einen alternativen DISC bilden, d. h. andere Moleküle an CD95 rekrutiert werden. So wurde mit DAXX ein Molekül kloniert, das an die DD von CD95 FADD-unabhängig binden kann und Jun-Kinasen aktiviert (Yang et al., 1997b). Andere Untersuchungen haben dagegen gezeigt, daß die CD95-vermittelte Aktivierung von Jun-Kinasen durch Caspase-Inhibitoren blockiert werden kann, diese also unterhalb von FADD und Caspase-8 stattfindet (Cahill et al., 1996). Außerdem sind FADD- und Caspase-8-defiziente Zellen komplett resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, was darauf hindeutet, daß FADD und Caspase-8 essentiell für die Apoptose-Induktion sind (Yeh et al., 1998b; Zhang et al., 1998; Varfolomeev et al., 1998b; Juo et al., 1998; Juo et al., 1999). Darüber hinaus konnte DAXX nicht im DISC von Typ I- oder Typ II-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Befund konsistent sind Berichte, daß DAXX fast ausschließlich im Kern lokalisiert ist (Pluta et al., 1998; Michaelson et al., 1999; Torii et al., 1999). Demnach kann DAXX als Komponente eines alternativen Typ II-DISC ausgeschlossen werden.

Ein anderes Molekül, das auch mit unstimuliertem CD95 in Typ II-Zellen interagiert und deshalb für eine verminderte DISC-Bildung verantwortlich sein könnte, ist aufgrund des Molekulargewichts p120 genannt worden (Scaffidi et al., 1998). Dieses Molekül interagiert jedoch nicht spezifisch mit CD95, sondern mit einer Bindungsstelle, die entsteht, wenn ein Antikörper an Protein A gebunden ist. Da es nur in Typ II-Zellen exprimiert wird, kann es trotz der fehlenden Spezifität für CD95 als Marker für Typ II-Zellen gelten (Daten nicht gezeigt). Das Protein scheint nur in geringen Mengen exprimiert zu sein, so daß es bisher nicht aufgereinigt werden konnte.

Weitere Moleküle, die mit CD95 interagieren, konnten bisher nicht identifiziert werden. Allerdings kann die Existenz einer weiteren DISC-Komponente nicht ausgeschlossen werden.

Dies könnte auch ein Molekül sein, daß präferentiell nur in Typ I-Zellen exprimiert wird und für die effiziente Bildung des DISC wichtig ist.

Daß Typ II-Zellen einen funktionellen DISC bilden, der Caspase-8 aktivieren kann, obwohl dieser bisher nicht im Western Blot oder per 2D-IEF-SDS-PAGE ³⁵S-markierter Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit das erste Mal gezeigt. Dies geschah indirekt mit Hilfe des *in vitro*-Caspase-8-Spaltungstest und direkt durch Verwendung des CD95L als Stimulus.

Eine andere Erklärung für die Unterschiede in der DISC-Bildung in Typ I- und Typ II-Zellen sein könnte eine posttranslationale Modifikation einer der DISC-Komponenten. Dafür spricht, daß CD95 in Typ II-Zellen im Western Blot nicht - oder nur sehr schwach - detektiert werden kann, obwohl der Rezeptor auf der Oberfläche der Typ II-Zellen in vergleichbarem Maße wie auf den Typ I-Zellen exprimiert wird. Dieses Phänomen könnte durch die Expression einer Splicevariante, die nicht den zytoplasmatischen Teil von CD95 enthält, erklärt werden. Ein solcher, verkürzter Rezeptor könnte bei der DISC-Bildung dominant-negativ wirken, da zwar der extrazelluläre Teil trimerisiert würde, die intrazellulären Todesdomänen dagegen nicht, so daß die Anlagerung von FADD inhibiert wäre. Eine solche Splicevariante konnte jedoch durch eine intrazelluläre FACS-Analyse ausgeschlossen werden. Dieses Experiment schloß ebenfalls aus, daß Typ I-Zellen mehr CD95 intrazellulär gespeichert haben als Typ II-Zellen. Ein solches intrazelluläres Reservoir hätte die Unterschiede in der Detektion im Western Blot erklären können.

Für eine direkte Modifikation von CD95 in Typ II-Zellen und gegen unterschiedliche Rezeptoren in Typ I- und Typ II-Zellen spricht ferner, daß CD95 in K50, einem Klon der Burkitt-Lymphom-Zelllinie BL-60, mittels Western Blot nicht detektiert werden kann, obwohl diese den Rezeptor exprimieren. Burkitt-Lymphome können als Typ II-Zellen angesehen werden, da diese durch Expression von Bcl-2 resistent gegenüber Apoptose werden (Liu et al., 1991; Knox et al., 1992; Ning et al., 1995). K50 wurde mit einer CD95 cDNA stabil transfiziert, die aus der Typ I-Zelle SKW6.4 kloniert wurde (Oehm et al., 1992). Gäbe es unterschiedliche Gene oder Spliceformen von CD95 in Typ I- und Typ II-Zellen, so würde man erwarten, daß transfiziertes Typ I-CD95 in Typ II-Zellen detektierbar ist. Dies ist aber nicht der Fall. Somit ist die wahrscheinlichste Erklärung für die fehlende Detektierbarkeit von CD95 in Typ II-Zellen im Western Blot, daß das Epitop durch eine posttranslationale Modifikation maskiert ist.

Eine beschriebene Modifikation von CD95, die auch Apoptose-Sensitivität modulieren kann, ist die Glykosylierung (Peter et al., 1995; Keppler et al., 1999). Da CD95 in den beiden Typ II-Zelllinien CEM und Jurkat geringer glykosyliert ist als in den Typ I-Zellen SKW6.4 und H9, wurde zunächst die Rolle der Glykosylierung bei der DISC-Bildung überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß die Glykosylierung von CD95 keinen entscheidenden Einfluß auf die DISC-Bildung hat. Auch die starke Glykosylierung von CD95 in Boe^R (Daten nicht gezeigt),

die als Typ II-Zellen identifiziert wurden (Scaffidi et al., 1999b), spricht gegen die Glykosylierung als Determinante für die Fähigkeit einer Zelle, einen DISC zu bilden oder nicht. Eine weitere, häufige Modifikation von Proteinen ist die Phosphorylierung. Obwohl Phosphorylierung von CD95 beschrieben wurde (Kennedy et al., 1998), konnten keine Hinweise auf eine differenzielle Phosphorylierung von CD95 in Typ I- und Typ II-Zellen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Somit stellt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung einer posttranslationalen Modifikation von CD95. Die Detektierbarkeit von CD95 im Western Blot korreliert mit der Fähigkeit von CD95, hochmolekulare Aggregate und einen DISC zu bilden. Darüber hinaus korrelieren diese Phänomene mit der Kreuzvernetzung von CD95, die notwendig ist für die Induktion von Apoptose ist. Die Modifikation von CD95 scheint also einen direkten Einfluß auf die Initiierung des Todessignals zu haben. Damit kann diese Modifikation einen potentiellen Einfluß auf die Sensitivität von Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose haben. Daß diese Modifikation physiologisch relevant ist, zeigt sich darin, daß sie auch in primären T-Zellen zu finden ist. Obwohl CD95 in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen stark exprimiert wird, ist der Rezeptor - im Gegensatz zu den Langzeit-aktivierten T-Zellen - nicht im Western Blot zu detektieren. Dies korreliert wiederum mit der Fähigkeit, CD95-Aggregate und einen DISC zu bilden. Somit scheint die Modifikation von CD95 auch an der Regulation von Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose im Rahmen einer Immunantwort beteiligt zu sein.

Die zwei Signalwege von CD95 in der Immunantwort

Daß das Zwei-Signalwege-Modell der CD95-Signaltransduktion auch eine physiologische Rolle hat, wird von Studien an Knock-out- und transgenen Mäusen unterstützt (siehe S. 89f.). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Modell auch im Rahmen einer T-Zell-Immunantwort von Bedeutung ist.

Wird ein präsentiertes Antigen von T-Zellen erkannt, proliferieren die T-Zellen und führen ihre Effektorfunktionen aus. In dieser Phase sind die T-Zellen resistent gegenüber der Induktion von Apoptose. Nachdem das Antigen eliminiert worden ist, sterben T-Zellen durch einen Prozeß, der Aktivierungs-induzierter Zelltod genannt wird (engl.: "activation-induced cell death", AICD). Der AICD schaltet die Immunantwort wieder ab (Alderson et al., 1995; Brunner et al., 1995; Golstein, 1997; Ju et al., 1995). Nur in dieser Phase der Immunantwort sind T-Zellen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Einige wenige T-Zellen überleben die Deletionsphase und bilden sogenannte Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Immunantwort gegen dasselbe Antigen schneller reagieren können. Diese Gedächtniszellen sind wieder resistent gegenüber Apoptose (siehe auch Einleitung, Abb. 6).

Der AICD hat damit eine wesentliche Rolle in der Homöostase des Immunsystems. Wird diese Homöostase dadurch gestört, daß der AICD vermindert ist, kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen. So führt eine verstärkte Expression von c-FLIP_L durch retroviralen Gentransfer in T- und B-Zellen zu Autoimmunität (Van Parijs et al., 1999b). Die physiologische Rolle von c-FLIP_L im Verlauf einer Immunantwort ist dagegen noch unklar. So wurde berichtet, daß bei frisch aktivierten T-Zellen die Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose mit einer erhöhten Expression von c-FLIP_L korreliert (Irmeler et al., 1997b; Refaeli et al., 1998; Yeh et al., 1998a). Jedoch konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen c-FLIP in primären T-Zellen keine Modulation der c-FLIP_L-Expression während der beobachteten Aktivierungszustände gefunden werden. Darüber hinaus konnte in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen keine Spaltung von c-FLIP_L zum p43-Intermediat nach Stimulation von CD95 detektiert werden. Da diese Spaltung als Teil des Inhibitionsmechanismus identifiziert wurde, kann c-FLIP_L keine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen spielen. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch könnten Speziesunterschiede zwischen Mensch und Maus sein, da einige Studien in der Maus durchgeführt wurden (Refaeli et al., 1998; Van Parijs et al., 1999b). Eine andere Erklärung ist, daß eine

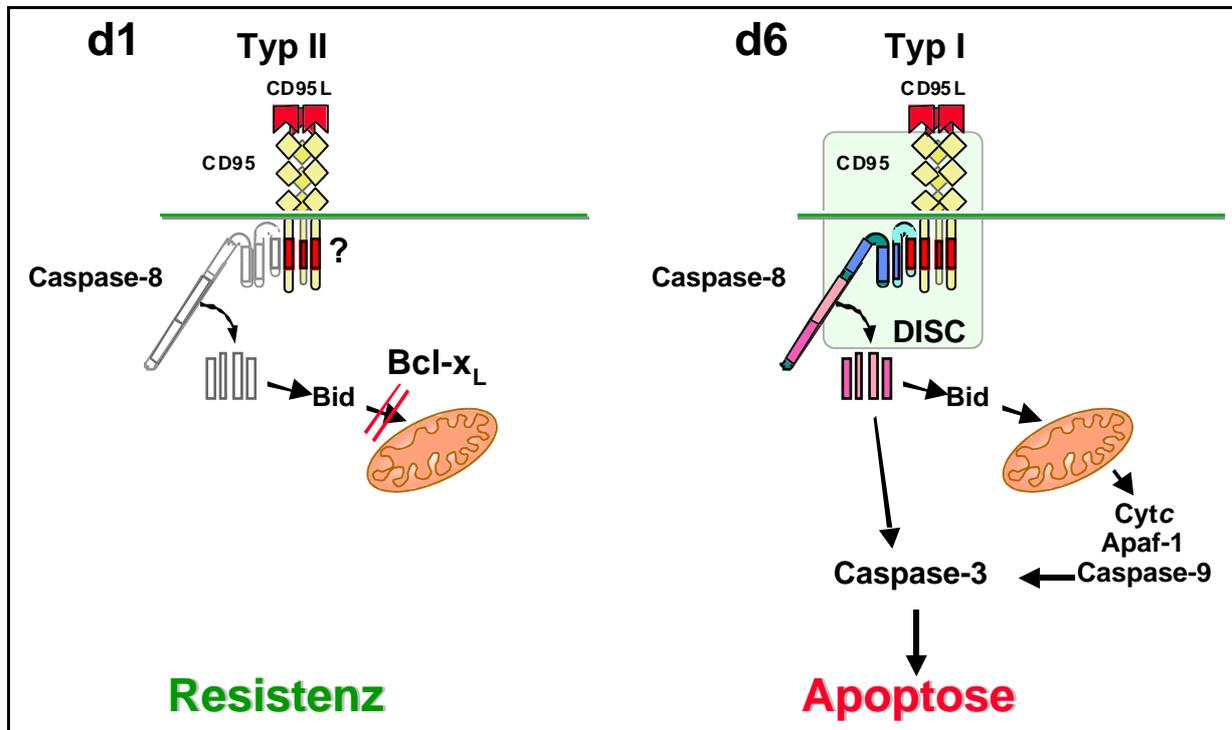


Abbildung 34: Modell der CD95-Sensitivität von T-Zellen während einer Immunantwort. links: d1 T-Zellen verhalten sich wie Typ II-Zellen, sie bilden kaum einen DISC. Deshalb sind sie abhängig vom mitochondrialen Signalweg. Die Mitochondrien sind jedoch durch Expression von Bcl-x_L gegenüber apoptotischen Veränderungen wie z.B. Cytochrom *c*-Ausschüttung und Verlust von $\Delta\Psi_m$ geschützt. rechts: d6 T-Zellen sind Typ I-Zellen, sie bilden den DISC sehr effizient. Dadurch werden große Mengen an Caspase-8 am DISC aktiviert, so daß eine direkte Caspasenkaskade initiiert wird. Zusätzlich wird Bcl-x_L nicht mehr exprimiert. Deshalb unterliegen auch die Mitochondrien den Veränderungen während der Apoptose.

Studie lediglich die Regulation von c-FLIP auf RNA-Ebene untersucht hat (Yeh et al., 1998a). Die Expression beider c-FLIP-Formen in T-Zellen scheint aber eher auf translationaler als auf transkriptioneller Ebene reguliert zu sein, wie Blockierungsexperimente mit Cycloheximid (CHX) und Actinomycin D (ActD) zeigten.

Im Gegensatz zu c-FLIP_L wird die Expression von c-FLIP_S kurz nach Aktivierung der T-Zelle hochreguliert. Die Sensitivierungsexperimente mit CHX zeigten jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen c-FLIP_S-Expression und Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Vielmehr geht die Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen mit einer stark reduzierten DISC-Bildung einher. Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind also Typ II-Zellen, die vom mitochondrialen Signalweg von CD95 abhängig sind. Dies hat direkte Konsequenzen für die T-Zelle, da sich - wie oben diskutiert - der Typ II-Signalweg auf mehreren Ebenen regulieren, d.h. inhibieren läßt. So sind Kurzzeit-aktivierte T-Zellen durch die Expression von Bcl-x_L vor apoptotischen Veränderungen der Mitochondrien - wie Abnahme von $\Delta\Psi_m$ und Ausschüttung von Cytochrom *c* - geschützt.

Somit läßt sich die Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen durch eine Blockade der CD95-Signaltransduktion auf zwei Ebenen erklären, nämlich der verminderten DISC-Bildung und der erhöhten Bcl-x_L-Expression. Abbildung 34 stellt dies schematisch dar. In Langzeit-aktivierten T-Zellen sind beide Blockaden aufgehoben. Diese T-Zellen bilden einen DISC, entsprechen also Typ I-Zellen. Dadurch sind sie in der Lage, eine direkte Caspasenkaskade unabhängig von den Mitochondrien zu initiieren. Darüber hinaus wird aber auch Bcl-x_L nicht mehr exprimiert. Damit kann auch der mitochondrielle Signalweg von CD95 aktiviert werden. Somit ist gewährleistet, daß Langzeit-aktivierte T-Zellen sensitiv für CD95-vermittelte Apoptose sind, und die Immunantwort wieder abgeschaltet werden kann. Der Wechsel primärer T-Zellen zwischen Typ I und Typ II ist also maßgeblich an der Regulation der Immunantwort in der Proliferations-/Effektor- und der Deletionsphase beteiligt. Dieser Wechsel könnte auch Einfluß auf die Bildung von Gedächtniszellen haben. Es ist vorstellbar, daß nur T-Zellen, die wieder einen resistenten Typ II-Phänotyp annehmen, zu Gedächtniszellen differenzieren können. Interessanterweise wurde beschrieben, daß CD8⁺-Gedächtniszellen verstärkt Bcl-2 exprimieren (Grayson et al., 2000). Ob sich Gedächtniszellen hinsichtlich der DISC-Bildung wie Kurzzeit-aktivierte T-Zellen verhalten, muß in Zukunft gezeigt werden.

V. Zusammenfassung

CD95 (APO-1/Fas) gehört zur Familie der Todesrezeptoren, einer Unterfamilie der TNF-/NGF-Rezeptor-Superfamilie. Todesrezeptoren haben die Eigenschaft, nach Bindung ihres Todesliganden Apoptose auszulösen. Für die Weiterleitung des apoptotischen Signals in die Zelle ist die sogenannte Todesdomäne im intrazellulären Teil der Todesrezeptoren verantwortlich. Die Todesdomäne ist eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Nach Stimulation von CD95 durch den CD95-Liganden (CD95L) werden zytoplasmatische Signalmoleküle an den oligomerisierten Rezeptor rekrutiert und es bildet sich ein Tod-induzierender Signalkomplex (engl. „death inducing signaling complex“, DISC). Im DISC wird Procaspase-8 durch auto-proteolytische Spaltung aktiviert. Dies ist der erste enzymatische Schritt in der CD95-Signaltransduktion. Unterhalb des DISC können je nach Zelltyp zwei verschiedene Signalwege beschriftet werden. Wird der DISC effizient gebildet, so werden große Mengen Procaspase-8 am DISC aktiviert. Dann ist Caspase-8 in der Lage, durch Spaltung der Effektorcaspase-3 eine direkte Caspasenkaskade auszulösen. Dieser Signalweg wird in Typ I-Zellen beschriftet. In Typ II-Zellen dagegen ist die DISC-Bildung stark vermindert. Deshalb werden nur geringe Mengen an Caspase-8 am DISC aktiviert. Zur Ausführung des Apoptoseprogramms ist daher ein Verstärkermechanismus notwendig. Dieser Verstärker ist der evolutionär konservierte mitochondrielle Apoptose-Signalweg. In diesem Signalweg wird das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid von Caspase-8 gespalten. Gespaltenes Bid transloziert zum Mitochondrium und löst dort apoptotische Veränderungen aus. Da nur Typ II-Zellen von diesem mitochondriellen Apoptose-Signalweg abhängig sind, läßt sich CD95-vermittelte Apoptose auch nur in Typ II-Zellen durch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren.

Dieses Zwei-Signalwege-Modell der CD95-Signaltransduktion konnte unter Verwendung von CD95L als Apoptosestimulus verifiziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß neben der DISC-Bildung und der Bcl-2-Inhibierbarkeit CD95-vermittelter Apoptose noch weitere Unterschiede zwischen Typ I- und Typ II-Zellen bestehen. Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) inhibiert CD95-vermittelte Apoptose nur in Typ II-Zellen. Dies wird durch eine MAPK-vermittelte Inhibition der Spaltung von Bid erreicht.

Mit c-FLIP_L wurde ein Molekül beschrieben, dessen Rolle in Rahmen CD95-vermittelter Apoptose kontrovers diskutiert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß c-FLIP_L in den DISC rekrutiert wird und dort gespalten wird. Das Spaltprodukt verbleibt mit dem Spaltungsintermediat von Caspase-8 im DISC, was eine weitere Aktivierung von Caspase-8 und somit CD95-

vermittelte Apoptose blockiert. Die Rekrutierung von c-FLIP_L in den DISC erklärt, warum CD95-vermittelte Apoptose in Typ I- und Typ II-Zellen inhibiert wird.

Typ II-Zellen zeigen eine stark reduzierte Bildung des DISC, obwohl alle bekannten Komponenten des DISC im gleichen Maße exprimiert werden, wie in Typ I-Zellen. In dieser Arbeit konnten Hinweise gesammelt werden, die darauf hindeuten, daß CD95 in Typ II-Zellen in der Art posttranslational modifiziert ist, daß eine effiziente DISC-Bildung verhindert wird. Diese Modifikation korreliert mit der Beobachtung, daß CD95 in Typ II-Zellen stärker kreuzvernetzt werden muß, um Apoptose auszulösen.

T-Zellen wechseln im Rahmen einer Immunantwort ihre Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. So sind Kurzzeit-aktivierte T-Zellen resistent, Langzeit-aktivierte T-Zellen sensitiv gegenüber Stimulation von CD95. Mit Hilfe eines *in vitro*-Modells konnte gezeigt werden, daß T-Zellen mit dem Aktivierungsstatus auch ihren CD95-Phänotyp von Typ II nach Typ I wechseln. Die Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen konnte durch eine verminderte DISC-Bildung zusammen mit der Expression von Bcl-x_L erklärt werden. Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind also Typ II-Zellen, deren mitochondrieller Signalweg durch Bcl-x_L inhibiert ist. Damit konnte eine physiologische Relevanz für das Zwei-Signalwege-Modell aufgezeigt werden.

VI. Literatur

Abrams, J.M. (1999). An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends. Cell Biol.* 9, 435-440.

Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. und Nagata, S. (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1756-1760.

Adachi, M., Suematsu, S., Kondo, T., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N. und Nagata, S. (1995). Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Genet.* 11, 294-300.

Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E.S. (1997). CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 57, 615-619.

Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F. und Lynch, D.H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 71-77.

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

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. und Martinou, J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.

Armstrong, R.C., Aja, T., Xiang, J., Gaur, S., Krebs, J.F., Hoang, K., Bai, X., Korsmeyer, S.J., Karanewsky, D.S., Fritz, L.C. und Tomaselli, K.J. (1996). Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271, 16850-16855.

Baker, S.J. und Reddy, E.P. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12, 1-9.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H. und Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.

Barclay, A.E., Franklin, K.J., and Prichard, M.L. (1944). *The fetal circulation and cardiovascular system and the changes they undergo at birth* (Oxford: Blackwell).

Barker, C.F. und Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25, 1-54.

Beg, A.A. und Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.

Beidler, D.R., Tewari, M., Friesen, P.D., Poirier, G. und Dixit, V.M. (1995). The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor- induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270, 16526-16528.

- Bernardi, P., Broekemeier, K.M. und Pfeiffer, D.R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 509-517.
- Berndt, C., Möpps, B., Angermüller, S., Gierschik, P. und Krammer, P.H. (1998). CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12556-12561.
- Bertin, J., Mendrysa, S.M., LaCount, D.J., Gaur, S., Krebs, J.F., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J. und Friesen, P.D. (1996). Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J. Virol.* 70, 6251-6259.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Otilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H., Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., Lenardo, M.J., Tomaselli, K.J. und Cohen, J.I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1172-1176.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R., Marco, S.D., Krebs, J.F., Wu, J.C., Tomaselli, K.J. und Grutter, M.G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure. Fold. Des.* 7, 1125-1133.
- Bodmer, J.L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L.E., Browning, J.L., MacDonald, H.R. und Tschopp, J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.
- Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J. und Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2000. Apr;2(4):241-3. 2, 241-243.
- Boise, L.H. und Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3759-3764.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. und Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270, 7795-7798.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. und Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A. und Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Brown, T.L. und Howe, P.H. (1998). MADD is highly homologous to a Rab3 guanine-nucleotide exchange protein (Rab3-GEP). *Curr. Biol.* 8, R191.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. und Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H. und Ware, C.F. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444.

Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H. und Nordheim, A. (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE- like proteases. *Oncogene* 13, 2087-2096.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. und Reed, J.C. (1998). Regulation of CellDeath Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A. und Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development. *Cell* 94, 727-737.

Cha, S.S., Kim, M.S., Choi, Y.H., Sung, B.J., Shin, N.K., Shin, H.C., Sung, Y.C. und Oh, B.H. (1999). 2.8 Å resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity*. 11, 253-261.

Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H. und Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-1863.

Chaudhary, P.M., Jasmin, A., Eby, M.T. und Hood, L. (1999). Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene*. 18, 5738-5746.

Chen, P., Rodriguez, A., Erskine, R., Thach, T. und Abrams, J.M. (1998). Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in Drosophila. *Dev. Biol.* 201, 202-216.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. und Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. und Dixit, V.M. (1996a). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.

Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G. und Dixit, V.M. (1996b). Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.* 271, 4573-4576.

Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E. und Dixit, V.M. (1996c). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 4961-4965.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. und Dixit, V.M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: A molecular Framework for Cell Death. *Science* 275, 1122-1126.

Chiu, V.K., Walsh, C.M., Liu, C.C., Reed, J.C. und Clark, W.R. (1995). Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 154, 2023-2032.

Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J. und Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615-624.

Chu, J.L., Drappa, J., Parnassa, A. und Elkon, K.B. (1993). The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. *J. Exp. Med.* 178, 723-730.

- Cifone, M.G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A. und Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* 180, 1547-1552.
- Clarke, P.G.H. und Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol.* 193, 81.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S. und Schapira, A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345, 50-54.
- Clement, M.V. und Stamenkovic, I. (1996). Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. *EMBO J.* 15, 216-225.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M. und Moncada, S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7631-7636.
- Colussi, P.A., Quinn, L.M., Huang, D.C., Coombe, M., Read, S.H., Richardson, H. und Kumar, S. (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. *J. Cell Biol.* 2000. Feb. 21;148(4):703-14. 148, 703-714.
- Combadiere, B., Reis e Sousa, C., Trageser, C., Zheng, L.X, Kim, C.R. und Lenardo, M.J. (1998). Differential TCR signaling regulates apoptosis and immunopathology during antigen responses *in vivo*. *Immunity* 9, 305-313.
- Conradt, B. und Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.
- Copeland, K.F., Haaksma, A.G., Goudsmit, J., Krammer, P.H. und Heeney, J.L. (1994). Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 10, 1259-1268.
- Cuvillier, O., Rosenthal, D.S., Smulson, M.E. und Spiegel, S. (1998). Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide- mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 2910-2916.
- D'Souza, S.D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N.R., Barker, P.A., Troutt, A.B., Raine, C.S. und Antel, J.P. (1996). Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J. Exp. Med.* 184, 2361-2370.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Datta, S.R., Brunet, A. und Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905-2927.
- Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. und Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB. J.* 2000. Apr;14(5):729-39. 14, 729-739.
- Debatin, K.M., Fahrig-Faissner, A., Enenkel-Stoodt, S., Kreuz, W., Benner, A. und Krammer, P.H. (1994). High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 83, 3101-3103.

- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. und Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. und Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.
- Deveraux, Q.L. und Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239-252.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. und Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*. 2000. Apr;12(4):419-29. 12, 419-429.
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moller, P. und Krammer, P.H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* 149, 3166-3173.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373, 438-441.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Sause, A. und Zeiher, A.M. (1998). Nitric oxide inhibits APO-1/Fas-mediated cell death. *Cell Growth. Differ.* 9, 415-422.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A.I., Bogen, B., Biberfeld, P. und Grandien, A. (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J. Exp. Med.* 190, 1025-1032.
- Dorstyn, L., Colussi, P.A., Quinn, L.M., Richardson, H. und Kumar, S. (1999a). DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4307-4312.
- Dorstyn, L., Read, S.H., Quinn, L.M., Richardson, H. und Kumar, S. (1999b). DECAY, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *J. Biol. Chem.* 274, 30778-30783.
- Drew, L., Kumar, R., Bandyopadhyay, D. und Gupta, S. (1998). Inhibition of the protein kinase C pathway promotes anti-CD95-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Int. Immunol.* 10, 877-889.
- Duan, H. und Dixit, V.M. (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385, 86-89.
- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M. und Thompson, C.B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15, 2685-2694.
- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S-C., Zheng, L., Lenardo, M.J. und Fesik, S.W. (1998). NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death effector domain. *Nature* 392, 941-945.
- Ekert, P.G., Silke, J. und Vaux, D.L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death. Differ.* 6, 1081-1086.
- Ellis, H.M. und Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R. und Weichselbaum, R. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 14, 6148-6156.

Enari, M., Hug, H. und Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375, 78-81.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. und Alnemri, E.S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7464-7469.

Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J. und Puck, J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946.

Fowlkes, B.J., Schwartz, R.H. und Pardoll, D.M. (1988). Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage. *Nature* 334, 620-623.

Fraser, A.G. und Evan, G.I. (1997). Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. *EMBO J.* 16, 2805-2813.

Froelich, C.J., Dixit, V.M. und Yang, X. (1998). Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol. Today* 19, 30-36.

Fujita, E., Kouroku, Y., Miho, Y., Tsukahara, T., Ishiura, S. und Momoi, T. (1998). Wortmannin enhances activation of CPP32 (Caspase-3) induced by TNF or anti-Fas. *Cell Death Differ.* 5, 289-297.

Fujita, E., Jinbo, A., Matuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U. und Momoi, T. (1999). Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 550-555.

Furukawa, Y., Iwase, S., Terui, Y., Kikuchi, J., Sakai, T., Nakamura, M., Kitagawa, S. und Kitagawa, M. (1996). Transcriptional activation of the *cdc2* gene is associated with Fas-induced apoptosis of human hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 271, 28469-28477.

Galle, P.R., Hofmann, W.J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P.H. und Runkel, L. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.* 182, 1223-1230.

Gandhi, R.T., Chen, B.K., Straus, S.E., Dale, J.K., Lenardo, M.J. und Baltimore, D. (1998). HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 187, 1113-1122.

Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, Y., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H.T., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S. und Nicholson, D.W. (1999). Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid- β Precursor Protein and Amyloidogenic A β Peptide Formation. *Cell* 97, 395-406.

Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. und Kufe, D.

- (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 2399-2404.
- Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R. und Galluzzo, A. (1997). Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275, 960-963.
- Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26, 59-81.
- Golstein, P. (1997). Controlling Cell Death. *Science* 275, 1081-1082.
- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M. und Wallach, D. (1997). CASH, A Novel Caspase Homologue with Death Effector Domains . *J. Biol. Chem.* 272, 19641-19644.
- Grayson, J.M., Zajac, A.J., Altman, J.D. und Ahmed, R. (2000). Cutting edge: increased expression of bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2000. Apr. 15;164(8):3950-4. 164, 3950-3954.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. und Ferguson, T.A. (1995). Fas-ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189.
- Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R. und Ferguson, T.A. (1996). CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5, 7-16.
- Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H. und Kubin, M.Z. (1998). Intracellular Regulation of TRAIL-Induced Apoptosis in Human Melanoma Cells. *J. Immunol.* 161, 2833-2840.
- Gross, A., McDonnell, J.M. und Korsmeyer, S.J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes. Dev.* 13, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X-M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Korsmeyer, S.J. (1999b). 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, 1156-1163.
- Gu, J., Dong, R.P., Zhang, C., McLaughlin, D.F., Wu, M.X. und Schlossman, S.F. (1999). Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *J. Biol. Chem.* 274, 20759-20762.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. und Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., Pompa, J.L.de la, Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M. und Mak, T.W. (1998). Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways in Vivo. *Cell* 94, 339-352.
- Halenbeck, R., MacDonald, H., Roulston, A., Chen, T.T., Conroy, L. und Williams, L.T. (1998). CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr. Biol.* 8, 537-540.
- Han, D.K.M., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask, B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M. und Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-

containing protein, interacts with caspases and BclX_L and initiates cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11333-11338.

Han, Z., Bhalla, K., Pantazis, P., Hendrickson, E.A. und Wyche, J.H. (1999). Cif (Cytochrome c Efflux-Inducing Factor) Activity Is Regulated by Bcl-2 and Caspases and Correlates with the Activation of Bid. *Mol. Cell Biol.* 19, 1381-1389.

Hausler, P., Papoff, G., Eramo, A., Reif, K., Cantrell, D.A. und Ruberti, G. (1998). Protection of CD95-mediated apoptosis by activation of phosphatidylinositide 3-kinase and protein kinase B. *Eur. J. Immunol.* 28, 57-69.

Hengartner, M.O. und Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* Cell Survival Gene *ced-9* Encodes a Functional Homolog of the Mammalian Proto-Oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.

Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P. und Debatin, K.M. (1997). Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J.* 16, 6200-6208.

Hildeman, D.A., Mitchell, T., Teague, T.K., Henson, P., Day, B.J., Kappler, J. und Marrack, P.C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity.* 10, 735-744.

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. und Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.

Hohlbaum, A.M., Moe, S. und Marshak-Rothstein, A. (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J. Exp. Med.* 2000. Apr. 3;191(7):1209-20. 191, 1209-1220.

Holmstrom, T.H., Chow, S.C., Elo, I., Coffey, E.T., Orrenius, S., Sistonen, L. und Eriksson, J.E. (1998). Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling. *J. Immunol.* 160, 2626-2636.

Holmstrom, T.H., Tran, S.E., Johnson, V.L., Ahn, N.G., Chow, S.C. und Eriksson, J.E. (1999). Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 19, 5991-6002.

Holmström, T.H., Schmitz, I., Johnson, V.L., Krammer, P.H., Chow, S.C., and Eriksson, J.E. (2000). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis in activated T-cells: impaired cleavage of Bid and caspase-8 (inger.)

Holtmann, H., Hahn, T. und Wallach, D. (1988). Interrelated effects of tumor necrosis factor and interleukin 1 on cell viability. *Immunobiology* 177, 7-22.

Horvitz, H.R., Shaham, S. und Hengartner, M.O. (1994). The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 59, 377-385.

Hsu, H., Xiong, J. und Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* 81, 495-504.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. und Goeddel, D.V. (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor- 1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.

- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. und Goeddel, D.V. (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. und Dixit, V.M. (1997a). A Novel Family of Viral Death Effector Domain-containing Molecules That Inhibit Both CD95- and Tumor Necrosis Factor Receptor-1-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 9621-9624.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. und Dixit, V.M. (1997b). I-FLICE, a Novel Inhibitor of Tumor Necrosis Factor Receptor-1- and CD-95-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17255-17257.
- Hu, W.H., Johnson, H. und Shu, H.B. (2000). Activation of NF-kappaB by FADD, casper, and caspase-8. *J. Biol. Chem.* 2000. Apr. 14;275(15):10838-44. 275, 10838-10844.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N. und Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4386-4391.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. und Fesik, S.W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.
- Huang, D.C., Cory, S. und Strasser, A. (1997). Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* 14, 405-414.
- Huang, D.C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J. und Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14871-14876.
- Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A. und de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* 4, 563-571.
- Igaki, T., Kanuka, H., Inohara, N., Sawamoto, K., Nunez, G., Okano, H. und Miura, M. (2000). Drob-1, a Drosophila member of the Bcl-2/CED-9 family that promotes cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Jan. 18;97(2):662-7. 97, 662-667.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K. und Yonehara, S. (1999). The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398, 777-785.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. und Nunez, G. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10717-10722.
- Irmeler, M., Hofmann, K., Vaux, D. und Tschopp, J. (1997a). Direct physical interaction between the Caenorhabditis elegans 'death proteins' CED-3 and CED-4. *FEBS Lett.* 406, 189-190.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. und Tschopp, J. (1997b). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. und Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.

- Itoh, N. und Nagata, S. (1993a). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268, 10932.
- Itoh, N., Tsujimoto, Y. und Nagata, S. (1993b). Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* 151, 621-627.
- Jackson, C.E. und Puck, J.M. (1999). Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 11, 521-527.
- Jacobson, M.D., Burne, J.F., King, M.P., Miyashita, T., Reed, J.C. und Raff, M.C. (1993). Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-369.
- Jenkins, M., Keir, M. und McCune, J.M. (2000). A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes. *J. Biol. Chem.* 2000. Mar. 17;275(11):7988-93. 275, 7988-7993.
- Jenkinson, E.J., Kingston, R., Smith, K.A., William, G.T. und Owen, J.J. (1989). Antigen induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 19, 2175.
- Jeong, E.J., Bang, S.H., Lee, T.H., Park, Y.I., Sim, W.S. und Kim, K.S. (1999). The Solution Structure of FADD Death Domain. *J. Biol. Chem.* 274, 16337-16343.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W. und Goeddel, D.V. (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Ju, S.T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z. und Marshak-Rothstein, A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature* 373, 444-448.
- Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J. und Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8, 1001-1008.
- Juo, P., Woo, M.S., Kuo, C.J., Signorelli, P., Biemann, H.P., Hannun, Y.A. und Blenis, J. (1999). FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth. Differ.* 10, 797-804.
- Jäättelä, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J.A. und Dixit, V.M. (1995). Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* 10, 2297-2305.
- Kanuka, H., Sawamoto, K., Inohara, N., Matsuno, K., Okano, H. und Miura, M. (1999). Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a *Drosophila* Apaf-1/CED-4- related caspase activator. *Mol. Cell* 4, 757-769.
- Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J. und Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 161, 3936-3942.
- Katsikis, P.D., Wunderlich, E.S., Smith, C.A. und Herzenberg, L.A. (1995). Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Exp. Med.* 181, 2029-2036.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. und Yagita, H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 182, 1777-1783.

- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z. und Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 8, 297-303.
- Kennedy, N.J. und Budd, R.C. (1998). Phosphorylation of FADD/MORT1 and Fas by kinases that associate with the membrane-proximal cytoplasmic domain of Fas. *J. Immunol.* 160, 4881-4888.
- Keppeler, O.T., Peter, M.E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W. und Pawlita, M. (1999). Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology.* 9, 557-569.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kim, Y.M., Talanian, R.V. und Billiar, T.R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138-31148.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588.
- Kischkel, F.C. et al., (2000). The TRAIL DISC. *Immunity* (im Druck)
- Kishimoto, H., Surh, C.D. und Sprent, J. (1998). A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 187, 1427-1438.
- Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M. und von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R. und Farrow, S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.
- Klas, C., Debatin, K.M., Jonker, R.R. und Krammer, P.H. (1993). Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int. Immunol.* 5, 625-630.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. und Newmeyer, D.D. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Knox, K.A., Finney, M., Milner, A.E., Gregory, C.D., Wakelam, M.J., Michell, R.H. und Gordon, J. (1992). Second-messenger pathways involved in the regulation of survival in germinal-centre B cells and in Burkitt lymphoma lines. *Int. J. Cancer* 52, 959-966.
- Kondo, T., Suda, T., Fukuyama, H., Adachi, M. und Nagata, S. (1997). Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis . *Nat. Med.* 3, 409-413.
- Koonin, E.V., Aravind, L., Hofmann, K., Tschopp, J. und Dixit, V.M. (1999). Apoptosis. Searching for FLASH domains [comment]. *Nature* 401, 662; discuss-662; discuss3.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. und Burgering, B.M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.

- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. und Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53, 4701-4714.
- Krammer, P.H., Dhein, J., Walczak, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P.T., Knipping, E. und Westendorp, M.O. (1994). The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol. Rev.* 142, 175-191.
- Krammer, P.H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71, 163-210.
- Kroemer, G., Zamzami, N. und Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18, 44-51.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. und Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000-2003.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. und Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C-Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S-S., Rakic, P. und Flavell, R.A. (1998). Reduced Apoptosis and Cytochrome c-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V. und Kahn, A. (1996). Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat. Med.* 2, 80-86.
- Lee, R.K., Spielman, J. und Podack, E.R. (1996). Bcl-2 protects against Fas-based but not perforin-based T cell-mediated cytotoxicity. *Int. Immunol.* 8, 991-1000.
- Leithäuser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Brüderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H. und Möller, P. (1993). Constitutive and induced expression of Apo-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab. Invest.* 69, 415.
- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C.T., Brocker, E.B., Krammer, P.H. und Walczak, H. (2000). Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* 2000. Feb. 1;60(3):553-9. 60, 553-559.
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C.M., Ross, R. und Raines, E.W. (1999). Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat. Cell Biol.* 1, 227-233.
- Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Meteleev, V. und Pardee, A.B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268, 429-431.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. und Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J. und Chen, J.D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell Biol.* 2000. Mar;20(5):1784-96. 20, 1784-1796.
- Li, L., Lorenzo, P.S., Bogi, K., Blumberg, P.M. und Yuspa, S.H. (1999). Protein Kinase Cdelta Targets Mitochondria, Alters Mitochondrial Membrane Potential, and Induces Apoptosis in Normal and Neoplastic Keratinocytes When Overexpressed by an Adenoviral Vector. *Mol. Cell Biol.* 19, 8547-8558.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L. und Salfeld, J. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80, 401-411.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. und Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H. und Häcker, G. (1999). Uncouplers of Oxidative Phosphorylation Can Enhance a Fas Death Signal. *Mol. Cell Biol.* 19, 3299-3311.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A. und Korneluk, R.G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-353.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. und Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W. und Wang, X. (1999). Activation of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease). *J. Biol. Chem.* 274, 13836-13840.
- Liu, Y.J., Mason, D.Y., Johnson, G.D., Abbot, S., Gregory, C.D., Hardie, D.L., Gordon, J. und MacLennan, I.C. (1991). Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 21, 1905-1910.
- Los, M., Van de Craen, M., Penning, L.C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P.A., Droge, W., Krammer, P.H., Fiers, W. und Schulze-Osthoff, K. (1995). Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375, 81-83.
- Los, M., Wesselborg, S. und Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* 10, 629-639.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Mandal, M., Maggirwar, S.B., Sharma, N., Kaufmann, S.H., Sun, S.C. und Kumar, R. (1996). Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 30354-30359.

- Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A. und Krammer, P.H. (1994). The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* 24, 3119-3123.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Baumler, C. und Krammer, P.H. (1995). Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur. J. Immunol.* 25, 2303-2307.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A. und Krammer, P.H. (1997). Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J. Cell Biol.* 137, 221-229.
- Marsters, S.A., Pitti, R.M., Donahue, C.J., Ruppert, S., Bauer, K.D. und Ashkenazi, A. (1996a). Activation of apoptosis by APO-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr. Biol.* 6, 750-752.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D. und Ashkenazi, A. (1996b). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr. Biol.* 6, 1669-1676.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L.A., Prévost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. und Kroemer, G. (1998a). Bax and Adenine Nucleotide Translocator Cooperate in the Mitochondrial Control of Apoptosis. *Science* 281, 2027-2031.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C. und Kroemer, G. (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187, 1261-1271.
- Matsuzawa, A., Moriyama, T., Kaneko, T., Tanaka, M., Kimura, M., Ikeda, H. und Katagiri, T. (1990). A new allele of the lpr locus, lprcg, that complements the gld gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. *J. Exp. Med.* 171, 519-531.
- McCloskey, T.W., Oyaizu, N., Kaplan, M. und Pahwa, S. (1995). Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Cytometry* 22, 111-114.
- McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. und Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96, 625-634.
- Medema, J.P., Toes, R.E., Scaffidi, C., Zheng, T.S., Flavell, R.A., Melief, C.J., Peter, M.E., Offringa, R. und Krammer, P.H. (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 27, 3492-3498.
- Medema, J.P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C.J. und Offringa, R. (1999). Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE- inhibitory protein. *J. Exp. Med.* 190, 1033-1038.
- Memon, S.A., Moreno, M.B., Petrak, D. und Zacharchuk, C.M. (1995). Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J. Immunol.* 155, 4644-4652.
- Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C. und Leder, P. (1999). Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes. Dev.* 13, 1918-1923.

- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. und Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-357.
- Minn, A.J., Kettlun, C.S., Liang, H., Kelekar, A., Vander Heiden, M.G., Chang, B.S., Fesik, S.W., Fill, M. und Thompson, C.B. (1999). Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J.* 18, 632-643.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J. und Grutter, M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J. Biol. Chem.* 272, 6539-6547.
- Miura, M., Friedlander, R.M. und Yuan, J. (1995). Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8318-8322.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y. und Greaves, M.F. (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1819-1825.
- Mongkolsapaya, J., Grimes, J.M., Chen, N., Xu, X.N., Stuart, D.I., Jones, E.Y. und Screaton, G.R. (1999). Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1048-1053.
- Moreno, M.B., Memon, S.A. und Zacharchuk, C.M. (1996). Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and IL-1beta-converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 157, 3845-3849.
- Moriishi, K., Huang, D.C., Cory, S. und Adams, J.M. (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9683-9688.
- 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. und Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.
- 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. und Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Newmeyer, D.D., Bossy-Wetzel, E., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Beere, H.M. und Green, D.R. (2000). Bcl-xL does not inhibit the function of apaf-1. *Cell Death Differ.* 2000, Apr;7(4):402-7. 7, 402-407.
- Ning, Z.Q., Norton, J.D., Johnson, D. und Murphy, J.J. (1995). Early gene signalling-dependent and -independent induction of apoptosis in Ramos human B cells can be inhibited by over-expression of Bcl-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 23-29.
- Nishina, H., Fischer, K.D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E.A., Bernstein, A., Mak, T.W., Woodgett, J.R. und Penninger, J.M. (1997). Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 385, 350-353.
- Nossal, G.J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.

- O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. und Shanahan, F. (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* *184*, 1075-1082.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J. und Trauth, B.C. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* *267*, 10709-10715.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P.G., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., Yuan, J., Penney, J.B., Young, A.B., Cha, J.H.J. und Friedlander, R.M. (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* *399*, 263-267.
- Osmond, D.G. (1993). The turnover of B-cell populations. *Immunol. Today* *14*, 34-37.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. und Donner, D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine- threonine kinase. *Nature* *401*, 82-85.
- Pan, G., O'Rourke, K. und Dixit, V.M. (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* *273*, 5841-5845.
- Parker, M.W. und Pattus, F. (1993). Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* *18*, 391-395.
- Peitsch, M.C. und Tschopp, J. (1995). Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol. Immunol.* *32*, 761-772.
- Peter, M.E., Kischkel, F.C., Scheuerpflug, C.G., Medema, J.P., Debatin, K-M. und Krammer, P.H. (1997). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1207-1212.
- Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F.C. und Krammer, P.H. (1998). The Death Receptors. In *Apoptosis, problems and diseases*. S. Kumar, ed. (Heidelberg: Springer), S. 25-63.
- Peter, M.E., Hellbardt, S., Schwartz-Albiez, A., Westendorp, M.O., Walczak, H., Moldenhauer, G., Grell, M. und Krammer, P.H. (1995). Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Diff.* *2*, 163-171.
- Petit, P.X., Lecoeur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. und Gougeon, M.L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.* *130*, 157-167.
- Petit, P.X., Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B. und Kroemer, G. (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* *396*, 7-13.
- Pluta, A.F., Earnshaw, W.C. und Goldberg, I.G. (1998). Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J. Cell Sci.* *111*, 2029-2041.
- Qin, H., Srinivasula, S.M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. und Shi, Y. (1999). Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* *399*, 549-557.

- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S. und Nicholson, D.W. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 5, 271-288.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. und Abbas, A.K. (1998). Biochemical Mechanisms of IL-2-Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Immunity* 8, 615-623.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A., Debatin, K.M., Fischer, A. und de Villartay, J.P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- Rodriguez, A., Oliver, H., Zou, H., Chen, P., Wang, X. und Abrams, J.M. (1999). Dark is a Drosophila homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *Nat. Cell Biol.* 1, 272-279.
- Rodriguez, I., Matsuura, K., Khatib, K., Reed, J.C., Nagata, S. und Vassalli, P. (1996). A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J. Exp. Med.* 183, 1031-1036.
- Rodriguez, J. und Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes. Dev.* 13, 3179-3184.
- Rodriguez, J., Chen, H., Lin, S. und Lazebnik, Y. (2000). Caspase Phosphorylation, Cell Death, and Species Variability. *Science* 287, 1363.
- Romashkova, J.A. und Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M. und Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83, 1243-1252.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A. und Becker, J.W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3, 619-625.
- Rouvier, E., Luciani, M.F. und Golstein, P. (1993). Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177, 195-200.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. und Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16, 6914-6925.
- Rudert, F., Wang, Y., Lindridge, E. und Watson, J. (1997). Apoptosis through CD95 (Fas/APO-1), but not a CD40/CD95 chimeric receptor, is inhibited by phorbol-12-myristate-13-acetate. *DNA Cell Biol.* 16, 197-205.
- Ruiz-Ruiz, C., Robledo, G., Font, J., Izquierdo, M. und Lopez-Rivas, A. (1999). Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in jurkat T cells. *J. Immunol.* 163, 4737-4746.
- Sakahira, H., Enari, M. und Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

- Sakahira, H., Iwamatsu, A. und Nagata, S. (2000). Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* 2000. Mar. 17;275(11):8091-6. 275, 8091-8096.
- Sata, M. und Walsh, K. (1998). Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J. Biol. Chem.* 273, 33103-33106.
- Savill, J.S., Fadok, V., Henson, P. und Haslett, J.E. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14, 131.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1999a). The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 1541-1548.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1999b). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22532-22538.
- Scaffidi, C., Volkland, J., Blomberg, I., Hoffmann, I., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (2000). Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70- kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J. Immunol.* 2000. Feb. 1;164(3):1236-42. 164, 1236-1242.
- Scheid, M.P. und Duronio, V. (1998). Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7439-7444.
- Scheid, M.P., Schubert, K.M. und Duronio, V. (1999). Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 31108-31113.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. und Reed, J.C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5113-5118.
- Schendel, S.L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B.L. und Reed, J.C. (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J. Biol. Chem.* 274, 21932-21936.
- Schievella, A.R., Chen, J.H., Graham, J.R. und Lin, L.L. (1997). MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 12069-12075.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A. und 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, 1205-1213.
- Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J. und Bell, J.I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4615-4619.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F. und Ohashi, P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 829-874.
- Seger, R. und Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.

- Seshagiri, S. und Miller, L.K. (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr. Biol.* 7, 455-460.
- Shaham, S. und Horvitz, H.R. (1996). An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* 86, 201-208.
- Shimizu, S., Narita, M. und Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Shu, H-B., Halpin, D.R. und Goeddel, D.V. (1997). Casper Is a FADD- and Caspase-Related Inducer of Apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.
- Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J. und Lenardo, M.J. (1998). Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J. Cell Biol.* 141, 1243-1253.
- Smith, C.A., Farrah, T. und Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-962.
- Smith, D.J., McGuire, M.J., Tocci, M.J. und Thiele, D.L. (1997). IL-1 beta convertase (ICE) does not play a requisite role in apoptosis induced in T lymphoblasts by Fas-dependent or Fas-independent CTL effector mechanisms. *J. Immunol.* 158, 163-170.
- Song, Z., McCall, K. und Steller, H. (1997). DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science* 275, 536-540.
- Spaner, D., Raju, K., Rabinovich, B. und Miller, R.G. (1999). A role for perforin in activation-induced T cell death in vivo: increased expansion of allogeneic perforin-deficient T cells in SCID mice. *J. Immunol.* 162, 1192-1199.
- Spector, M.S., Desnoyers, S., Hoepfner, D.J. und Hengartner, M.O. (1997). Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* 385, 653-656.
- Sprick, M. et al., (2000). FADD/Mort1 and Caspase-8 are recruited to native TRAIL Receptors 1 and 2 in a ligand-dependent manner and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* (im Druck)
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. und Alnemri, E.S. (1997). FLAME-1, a Novel FADD-like Anti-apoptotic Molecule That Regulates Fas/TNFR1-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 18542-18545.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1 Mediated Oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949-957.
- Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhänsel, C., Hofmann, T.G., Grummt, I., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1998). DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J.* 17, 5974-5986.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M. und Salvesen, G.S. (1999). Caspase-9 Can be Activated without Proteolytic Processing. *J. Biol. Chem.* 274, 8359-8362.
- Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H. und Galle, P.R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* 2, 1361-1366.

- Strand, S., Hofmann, W.J., Grambihler, A., Hug, H., Volkmann, M., Otto, G., Wesch, H., Mariani, S.M., Hack, V., Stremmel, W., Krammer, P.H. und Galle, P.R. (1998). Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat. Med.* *4*, 588-593.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H. und Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* *14*, 6136-6147.
- Struhl, K. (1989). Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends. Biochem. Sci.* *14*, 137-140.
- Stuart, P.M., Griffith, T.S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X. und Ferguson, T.A. (1997). CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J. Clin. Invest.* *99*, 396-402.
- Suda, T. und Nagata, S. (1994). Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* *179*, 873-879.
- Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T. und Nagata, S. (1997). Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.* *186*, 2045-2050.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. und Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* *184*, 1331-1341.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C. und Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide- induced apoptosis. *J. Exp. Med.* *186*, 25-37.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prévost, M-C., Alzari, P.M. und Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process. *J. Exp. Med.* *189*, 381-393.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.R., Penninger, J.M. und Kroemer, G. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* *397*, 441-446.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T. und Nagata, S. (1994a). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* *76*, 969-976.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. und Nagata, S. (1994b). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immunol.* *6*, 1567-1574.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A. und Reed, J.C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* *80*, 279-284.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M.R. und Comb, M.J. (1999). p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C- dependent pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 34859-34867.
- Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T. und Nagata, S. (1995). Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* *14*, 1129-1135.

- Tanaka, S., Saito, K. und Reed, J.C. (1993). Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J. Biol. Chem.* 268, 10920-10926.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. und Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
- Tepper, A.D., Cock, J.G., de Vries, E., Borst, J. und van Blitterswijk, W.J. (1997). CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/ CPP32 inhibition. *J. Biol. Chem.* 272, 24308-24312.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schröter, M., Scaffidi, C., Krammer, P.H., Peter, M.E. und Tschopp, J. (1997). Viral Flice-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry, N.A. und Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science* 281, 1312-1316.
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X. und Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* 15, 6189-6196.
- Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* 3, D1134-D1147.
- Torii, S., Egan, D.A., Evans, R.A. und Reed, J.C. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J.* 18, 6037-6049.
- Tracey, K.J. und Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 317-343.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. und Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. und Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787-789.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A.K. und Baltimore, D. (1999a). Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C- FLIP in lymphocytes. *Immunity.* 11, 763-770.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A.K. und Baltimore, D. (1999b). Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C- FLIP in lymphocytes. *Immunity.* 11, 763-770.

- Vandenabeele, P., Declercq, W., Vanhaesebroeck, B., Grooten, J. und Fiers, W. (1995). Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J. Immunol.* *154*, 2904-2913.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. und Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* *91*, 627-637.
- Vander Heiden, M.G. und Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* *1*, E209-E216.
- Varadhachary, A.S., Peter, M.E., Perdow, S.N., Krammer, P.H. und Salgame, P. (1999). Selective Up-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in Th2 cells inhibits caspase-8 cleavage at the death-inducing complex: A mechanism for Th2 resistance from fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* *163*, 4772-4779.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. und Wallach, D. (1998a). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* *9*, 267-276.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. und Wallach, D. (1998b). Targeted Disruption of the Mouse *Caspase 8* Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/APO-1, and DR3 and Is Lethal Prenatally. *Immunity* *9*, 267-276.
- Vaux, D.L., Cory, S. und Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* *335*, 440-442.
- Vaux, D.L. und Korsmeyer, S.J. (1999). Cell Death in Development. *Cell* *96*, 245-254.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). Solothurn.
- von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* *76*, 219-228.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G. und Rauch, C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* *16*, 5386-5397.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C. und Lynch, D.H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* *5*, 157-163.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C. und Hammill, L.D. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* *78*, 343-352.
- Wallach, D. (1997). Placing death under control. *Nature* *388*, 123-126.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. und Boldin, M.P. (1999). Tumor Necrosis Factor Receptor And Fas Signaling Mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 331-367.

- Wang, C.Y., Mayo, M.W. und Baldwin, A.S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-787.
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E. und Lenardo, M.J. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. und Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Heinrichson, R.L., Tomasselli, A.G. und Watenpaugh, K.D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure. Fold. Des.* 7, 1135-1143.
- Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, C., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375, 497-500.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A. und Raybuck, S.A. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370, 270-275.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M.S., Duncan, G.S., Shahinian, A., Kägi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S.A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S.W. und Mak, T.W. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12, 806-819.
- Woo, M., Hakem, A., Elia, A.J., Hakem, R., Duncan, G.S., Patterson, B.J. und Mak, T.W. (1999). In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. *J. Immunol.* 163, 4909-4916.
- Wu, D., Wallen, H.D. und Nunez, G. (1997). Interaction and Regulation of Subcellular Localization of CED-4 by CED-3. *Science* 275, 1126-1127.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Xue, D. und Horvitz, H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377, 248-251.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. und Wang, X. (1997a). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. und Baltimore, D. (1997b). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
- Yeh, J.H., Hsu, S.C., Han, S.H. und Lai, M.Z. (1998a). Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* 188, 1795-1802.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. und Mak, T.W. (1998b). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.

- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A. und Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.
- Yonehara, S., Ishii, A. und Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169, 1747-1756.
- Yoshida, H., Kong, Y-Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M. und Mak, T.W. (1998). Apaf1 is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development. *Cell* 94, 739-750.
- Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y. und Kwon, B.S. (1999). A Newly Identified Member of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TR6) Suppresses LIGHT-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 13733-13736.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. und Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X. und Kroemer, G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 181, 1661-1672.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. und Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183, 1533-1544.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A. und Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* 16, 2265-2282.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H. und Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.
- Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. und Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*. 2000. Mar;12(3):301-11. 12, 301-311.
- Zhang, X.D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T. und Hersey, P. (1999). Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* 59, 2747-2753.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H. und Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. und Pandolfi, P.P. (2000). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J. Exp. Med.* 2000. Feb. 21;191(4):631-40. 191, 631-640.
- Zhou, L., Song, Z., Tittel, J. und Steller, H. (1999a). HAC-1, a *Drosophila* homolog of APAF-1 and CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis. *Mol. Cell* 4, 745-755.
- Zhou, T., Song, L., Yang, P., Wang, Z., Lui, D. und Jope, R.S. (1999b). Bisindolylmaleimide VIII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T cell-mediated autoimmune diseases. *Nat. Med.* 5, 42-48.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

VII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom
AIF	Apoptose induzierender Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
c-FLIP	„Cellular FLICE-inhibitory protein“
CAP	Zytotoxizitäts-abhängiges APO-1 assoziiertes Protein
CD	„Cluster of differentiation“
CED	„ <i>C.elegans</i> death gene“
CHX	Cycloheximid
CIAP	„Calf intestinal alkaline phosphatase“
CrmA	„Cytokine response modifier A“
Da	Dalton
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DISC	Tod induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
ELISA	„enzyme-linked immunoabsorbant assay“
ERK	„Extracellular signal related kinase“
FADD	„Fas-associated death domain protein“
FADD-DN	FADD-dominant negativ
FCS	Fötales Kälberserum
FLICE	"FADD-like ICE"
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
ICE	Interleukin-1 β -konvertierendes Enzym

IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgG _H	schwere Kette eines Immunglobulins der Klasse G
kDa	Kilodalton
LZ	„Leucin-Zipper“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MW	Molekulargewicht
min.	Minute
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
pI	isoelektrischer Punkt
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PT	Permeabilitäts-Transition
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek.	Sekunde
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRAIL	„TNF-related Apoptosis-inducing ligand“
v-FLIP	„viral FLICE-inhibitory protein“

Für die Bezeichnung von Aminosäuren wurde der Ein-Buchstabencode verwendet.

VIII. Publikationsliste

Aus Prioritätsgründen wurden Teile der Arbeit vorab veröffentlicht:

- 1) Scaffidi C*, **Schmitz I***, Krammer PH, Peter ME „The role of c-FLIP in modulation of CD95- induced apoptosis.“ J Biol Chem. 1999 Jan 15;274(3):1541-8.
* = beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Studie bei.
- 2) Scaffidi C*, **Schmitz I***, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME „Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells.“ J Biol Chem. 1999 Aug 6;274(32):22532-8.
* = beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Studie bei.
- 3) Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, **Schmitz I**, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M „Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus.“ Glycobiology. 1999 Jun;9(6):557-69.
- 4) **Schmitz I**, Walczak H, Krammer PH, Peter ME „Differences between CD95 type I and type II cells detected with the CD95 ligand“ Cell Death and Diff. 1999 (6):821-822.
- 5) **Schmitz I**, Kirchhoff S, Krammer PH „Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways“ Int. J. Biochem. Cell Biol., zur Publikation eingereicht.
- 6) Kirchhoff S, Müller WW, Krueger A, **Schmitz I**, Krammer PH „TCR mediated upregulation of c-FLIP_{short} correlates with resistance towards CD95 mediated apoptosis by blocking DISC activity“ J. Immunol., zur Publikation eingereicht.
- 7) **Schmitz I**, Walczak H, Krammer PH, Peter ME „The two CD95 apoptosis signaling pathways may be a way of cells to respond to different amounts and/or forms of CD95 ligand produced in different tissues“ Cell Death and Diff., im Druck.
- 8) Holmström TH, **Schmitz I**, Johnson VL, Krammer PH, Chow SC, Eriksson JE „Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis in activated T-cells:impaired cleavage of Bid and caspase-8“, zur Publikation eingereicht.

-
- 9) Sartorius U, **Schmitz I**, Krammer PH „Molecular mechanisms of death receptor-mediated apoptosis“ Angew. Chemie, zur Publikation eingereicht.
- 10) Chatterjee D, **Schmitz I**, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH, Wyche JH, Pantazis P „Down-regulation of c-FLIP expression by 9-Nitrocamptothecin sensitizes DU145 human prostate carcinoma cells to induction of caspase-8-dependent apoptosis“
Manuskript in Vorbereitung.

IX. Lebenslauf

Name: Ingo Schmitz
geb. am: 28.04.1971
in: Troisdorf-Sieglar
Eltern: Heinrich Schmitz
Roswitha Schmitz, geb. Grommes
Familienstand: verheiratet mit Sabine Schmitz, geb. Ritter
Konfession: evangelisch-uniert

Schulbildung: 1976 - 1980 kath. Grundschule Niederkassel-Rheidt
1980 - 1990 Kopernikus-Gymnasium Niederkassel-Lülsdorf, Abitur

Zivildienst: 1996 - 1997 am Deutschen Krebsforschungszentrum

Hochschule: 1990 - 1996 Studium der Biochemie in Hannover
10/1992 Diplomvorprüfung
10/1995 Diplomhauptprüfung
11/1995 -
04/1996 Diplomarbeit am Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg bei Herrn Prof. Dr. Thomas Wirth
06/1996 -
11/1996 Wissenschaftliche Hilfskraft am Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg bei Herrn Prof. Dr. Hermann Bujard
ab 01/1998 Anfertigung der Doktorarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum, Abt. Immunogenetik, bei Herrn Prof. Dr. Peter H. Kramer

X. Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, im Mai 2000