

# **EFFEKTORMECHANISMEN CD95 (APO-1/FAS)-VERMITTELT APOPTOSE**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
genehmigte

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr.rer.nat.

**Alexander H. Stegh**  
**Diplom-Biochemiker**  
**aus Erftstadt**

November 2000

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1997 bis Juli 1999 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und von August 1999 bis Juli 2000 am Ben May Institute for Cancer Research, University of Chicago.

**Referent:** Priv. Doz. Dr. W. Müller (Medizinische Hochschule Hannover)

**Koreferent:** Prof. Dr. Marcus E. Peter (Ben May Institute for Cancer Research, The University of Chicago)

**Tag der Promotion:** 16. Dezember 2000

**Meinen Eltern und Freunden**

---

## Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Marcus Peter bedanken, der durch seine stete Gesprächsbereitschaft und seine Freundschaft maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Unter seiner Anleitung habe ich gelernt, als Wissenschaftler zu denken und sein großes Engagement und Motivation haben mir gezeigt, daß man mit der “richtigen” Einstellung sehr viel erreichen kann.

Dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Peter Krammer, der mich immer unterstützte und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Herrn Priv. Doz. Dr. W. Müller danke ich sehr herzlich für die entgegenkommende Betreuung seitens der Medizinischen Hochschule Hannover, sowie für die stete Unterstützung während des Studiums.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die z.T. sehr enge Zusammenarbeit mit Dr. Harald Herrmann, Dr. Dieter Weissenberger, Dr. Stefan Lampel, Dr. Carsten Scaffidi und Dr. John Reed. Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Harald Herrmann, der mich in verschiedene zellbiologische Techniken eingeführt hat und ohne dessen Kompetenz ein großer Teil dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre, sowie Dr. Carsten Scaffidi, der durch die Herstellung monoklonaler anti-Caspase-8-Antikörper den Grundstein für meine Dissertation legte.

Besonders möchte ich mich bei Olaf Schickling und Jörg Volkland für die hervorragende Zusammenarbeit und für ihre Freundschaft bedanken, die mir sehr viel bedeutet.

Allen anderen Mitgliedern des Peter-Labors sowie des Krammer-Labors gilt ebenso mein Dank für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds und hier insbesondere Frau Monika Beutelspacher und Herrn Dr. Hermann Fröhlich danke ich sehr herzlich für die finanzielle und ideelle Unterstützung, sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft.

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Rezeptoren gefunden, die nach Bindung ihres Liganden Apoptose in der Zelle induzieren können: die sogenannten Todesrezeptoren. Innerhalb dieser Todesrezeptor-/Todesligandenfamilie rückte das sogenannte CD95/CD95L-System immer mehr in den Mittelpunkt des therapeutischen Interesses, da dessen Dysregulation mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde. Voraussetzung für die Entwicklung rationaler Therapiekonzepte, die zur Heilung solcher Erkrankungen beitragen könnten, ist das Verständnis der molekularen Mechanismen von Apoptose im allgemeinen und CD95-vermittelter Apoptose im besonderen. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnten neuartige Signalmechanismen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose aufgezeigt werden:

Die vielleicht wichtigsten proapoptotischen Moleküle sind die sogenannten **Cysteiny-Aspartasen** oder kurz Caspasen. Mit Caspase-8 konnte erstmalig eine Caspase identifiziert werden, die durch Bindung an einen Todesrezeptor autoproteolytisch aktiviert wird. Wenig ist jedoch über die Funktionsweise von Caspase-8 bekannt. Mit Hilfe Domänen-spezifischer monoklonaler anti-Caspase-8-Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit die intrazelluläre Lokalisation dieses Enzyms bestimmt. Caspase-8 bindet an Mitochondrien und transloziert nach Apoptoseinduktion zu Plektin, einem Zytolinker-Protein, das verantwortlich ist für die Quervernetzung der drei Filamentsysteme (Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamente). Plektin wird quantitativ und hochspezifisch durch Caspase-8 gespalten. Mit Plektin konnte ein Caspasensubstrat identifiziert werden, das sehr früh, d.h. vor allen anderen Substraten wie Gelsolin, den Zytokeratinen, Lamin B oder Poly-ADP-Ribose-Polymerase gespalten wird. Durch Geninaktivierungsstudien in Mäusen und durch Analyse von natürlich auftretenden Mutationen im Plektin-Gen in Epidermolysis bullosa simplex-Patienten konnte gezeigt werden, daß Plektin essentiell für die Aufrechterhaltung einer funktionellen Zytoarchitektur ist. Darüber hinaus reguliert Plektin aktiv die Reorganisation des Aktinfilamentsystems in dynamischen Prozessen, wie z.B. Zellbewegung. Im Rahmen dieser Studie konnte nun gezeigt werden, daß Plektin auch maßgeblich an den strukturellen Veränderungen während Apoptose beteiligt ist. In primären Fibroblasten von Plektin-defizienten Mäusen ist die Reorganisation des Aktinfilament-Systems vollständig inhibiert – ein Prozess, der als Voraussetzung für die Ausbildung der klassischen apoptotischen Morphologie (Kondensation des Zytoplasmas, Zeiose, Bildung von apoptotischen Körperchen) angesehen wird. Plektin scheint als erstes Caspasensubstrat die zelluläre Desintegration einzuleiten.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte zudem gezeigt werden, daß Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-hochexprimierende Mitochondrien aktive Caspase-8 vermutlich über das ebenfalls mitochondrial lokalisierte BAR-Protein (für "**B**ifunctional **A**poptosis **R**egulator") binden und aus dem Zytoplasma entfernt, ohne sie dabei zu inaktivieren. Dieser durch Bcl-2-Familienmitglieder vermittelte Resistenzmechanismus scheint während der T-Zell-Aktivierung eine Rolle zu spielen. In der frühen Phase der Aktivierung, wenn T Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind und mitochondriales Bcl-x<sub>L</sub> hochreguliert ist, wird aktive Caspase-8 an Mitochondrien gebunden. Langzeitaktivierte und Apoptose-sensitive T-Zellen zeigen keine erhöhte Bcl-x<sub>L</sub>-Expression mehr und deren Mitochondrien folgerichtig keine Bindung für aktive Caspase-8. Es konnte somit ein

neuartiger Resistenzmechanismus identifiziert und charakterisiert werden, der dazu beiträgt, die Funktionsweise von Bcl-2-ähnlichen Proteinen besser zu verstehen.

Moleküle wie Caspase-8, die eine Schlüsselfunktion innerhalb des CD95-Signalweges besitzen, sind durch besondere Protein-Protein-Interaktionsdomänen gekennzeichnet. Eines dieser Wechselwirkungsmodule wird als Todeseffektordomäne (DED für “**D**eath **E**ffector **D**omain”) bezeichnet. In einer Suche nach neuartigen DED-haltigen Proteinen konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit das Molekül DEDD (für “**D**eath **E**ffector **D**omain containing **D**N**A** binding Protein”) identifiziert werden, das neben einer N-terminalen DED drei Kernlokalisierungssignale (NLS) sowie eine C-terminale Domäne mit Homologie zu DNA-bindenden Proteinen besitzt. Humanes DEDD zeichnet sich durch eine sehr hohe Homologie zwischen Mensch und Maus aus und ist ubiquitär exprimiert. DEDD ist ein zytoplasmatisches Protein, das nach Apoptoseinduktion mit Hilfe seiner NLS in den Kern transloziert und in Nukleoli akkumuliert. Rekombinantes DEDD bindet sowohl DNA als auch rekonstituierte Mononukleosomen und inhibiert nukleolare Transkription ribosomaler rDNA *in vitro*. DEDD ist somit ein Schlüsseffektormolekül, das zytoplasmatische proapoptotische Signale in den Nukleolus transferiert und letztlich zelluläre Biosynthese effizient inhibiert.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit entscheidende Effektormechanismen CD95-vermittelter Apoptose im Zytoplasma, auf der Ebene der Mitochondrien und im Kern aufgeklärt werden: Mit dem Zytolinker Plectin wurde ein neues Caspase-8-Substrat identifiziert, dessen Spaltung zur Desintegration zellulärer Strukturen während Apoptose beiträgt. Als neue Funktion von Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> wurde die Sequestrierung aktiver Caspase-8-Untereinheiten an Mitochondrien gefunden, und mit DEDD wurde ein Signalmolekül charakterisiert, das zytoplasmatische Signalereignisse in den Nukleolus weiterleitet, wo es die Transkription ribosomaler DNA inhibiert.

Stichworte: Apoptose/ Caspase-8/CD95/DEDD/plectin

## Abstract

Several receptors have been identified that induce apoptosis upon binding to their cognate ligands, known collectively as death receptors. The CD95/CD95L system has generated tremendous interest over the last decade, since its dysregulation has been linked to numerous diseases. A prerequisite for the development of rational therapeutical concepts is the understanding of the molecular mechanisms of apoptosis and of CD95-mediated apoptosis in particular.

One of the most important proapoptotic signaling molecules is the **cysteiny** **aspartase**, or short caspase. One member of this cysteine protease family, caspase-8, was found to be recruited to the CD95 receptor and subsequently activated upon ligand-induced receptor oligomerization. Whereas the receptor-proximal activation mechanism of caspase-8 is well understood, little is known about the modus operandi of caspase-8.

The subcellular localization of caspase-8 was determined using domain-specific monoclonal anti-caspase-8 antibodies. Procaspase-8 was found to be associated with mitochondria. Upon apoptosis induction active caspase-8 translocates to plectin, a cytoskeletal protein belonging to the family of cytolinkers, that are responsible for crosslinking the three major filament systems of higher eukaryotic cells (microfilaments, microtubuli and intermediate filaments) with one another. Plectin is quantitatively cleaved by caspase-8. Caspase-8-mediated cleavage of plectin precedes cleavage of other cytoskeletal death substrates like the cytokeratins, lamin B or poly-ADP-ribosyl-polymerase. Gene inactivation studies in mice and analysis of naturally occurring mutations within the plectin gene in patients suffering from epidermolysis bullosa simplex with muscle dystrophy convincingly showed that plectin is essential for maintaining a functional cytoarchitecture. Moreover, plectin regulates the reorganization of the microfilament system in dynamic processes, like cell movement. In this work, plectin was also shown to contribute to structural changes during apoptosis: In primary fibroblasts derived from plectin deficient mice the reorganization of the microfilament system was blocked – a process that is regarded as a prerequisite for the formation of the classical apoptosis morphology (cytoplasmic condensation, membrane blebbing, formation of apoptotic bodies). As the first death substrate plectin seems to initiate the cellular disintegration during apoptosis.

In this work, it was also shown that mitochondria expressing elevated levels of Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> bind to and sequester active caspase-8 presumably via the mitochondrial protein BAR (for “**B**ifunctional **A**ppoptosis **R**egulator”). This sequestration prevents caspase-8 from reaching its substrates in the cytoplasm without affecting its activity. This novel mechanism of Bcl-2-related proteins seems to play a role in T cell activation. In short-term activated T cells that are resistant towards CD95-mediated apoptosis and that have upregulated Bcl-x<sub>L</sub>, active caspase-8 was found to be associated with mitochondria. Mitochondria from long-term activated and apoptosis-sensitive T cells that downregulate Bcl-x<sub>L</sub> no longer have the ability to bind to and sequester active caspase-8. The sequestration of potentially cytotoxic active caspase-8 is therefore a novel resistance mechanism that helps to understand the modus operandi of Bcl-2 related proteins.

Molecules like caspase-8 that play a key role within the CD95 signaling pathway are characterized by specialized protein-protein-interaction domains. One of those domains is the death effector domain (DED). In a search for novel DED-containing proteins the protein DEDD (for “**D**eath **E**ffector **D**omain containing **D**NNA-binding protein”) was identified. This molecule is characterized by an N-terminal DED, three nuclear localization signals (NLS) and a C-terminal domain with homology to DNA-binding proteins. Human DEDD has a very high degree of homology compared to its murine analogue and is ubiquitously expressed. DEDD is a cytoplasmic protein that translocates to the nucleus upon apoptosis induction where it accumulates within nucleoli. Recombinant DEDD binds to DNA and to mononucleosomes and inhibits transcription of ribosomal DNA *in vitro*. Therefore, DEDD is a key effector molecule that transfers cytoplasmic signaling events into the nucleolus to efficiently inhibit cellular biosynthesis.

To summarize, important effector mechanisms of CD95-mediated apoptosis were identified in the cytoplasm, at the level of mitochondria and within the nucleus. Plectin was shown to be a caspase-8 substrate that initiates the cellular disintegration process. The sequestration of active caspase-8 was shown to be a novel mechanism of how Bcl-2 related proteins exert their anti-apoptotic function and the DEDD protein was found to bridge the cytoplasmic signaling cascade with nuclear events during apoptosis.

Key words: Apoptose/ Caspase-8/CD95/DEDD/plectin



<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	MECHANISMEN DES ZELLTODES – APOPTOSE UND NEKROSE.....	1
1.2	<i>C. ELEGANS</i> ALS MODELLSYSTEM – DIE GRUNDLEGENDE APOPTOSEMASCHINERIE .....	2
1.3	DIE TODESREZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN .....	2
1.4	DIE BEDEUTUNG DER CD95-VERMITTELTE APOPTOSE .....	4
1.5	DER TOD-INDUZIERENDE SIGNALKOMPLEX – INITIATION CD95-VERMITTELTER APOPTOSE.....	5
1.6	CASPASEN – DIE ÜBERBRINGER DER TODESBOTSCHAFT .....	6
1.6.1	<i>Die subzelluläre Lokalisation von Caspasen.....</i>	7
1.6.2	<i>Virale und zelluläre Inhibitoren von Caspasen.....</i>	9
1.6.3	<i>Die Caspasensubstrate .....</i>	11
1.7	DIE RENAISSANCE DER MITOCHONDRIEN IN DER APOPTOSE.....	14
1.8	ZWEI CD95-SIGNALWEGE .....	17
1.9	DER ZYTOLINKER PLEKTIN – HAUPTINTEGRATOR ZYTOSKELETTALER NETZWERKE.....	18
1.10	AUFGABENSTELLUNG .....	21
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>1</b>	<b>ALLGEMEINE MATERIALIEN.....</b>	<b>22</b>
1.1	CHEMIKALIEN .....	22
1.2	HÄUFIG VERWENDETE PUFFER.....	23
1.3	GERÄTE.....	24
1.4	BIOLOGISCHES MATERIAL .....	25
1.4.1	<i>Bakterienstämme .....</i>	25
1.4.2	<i>Eukaryontische Zellen .....</i>	26
1.5	NÄHRMEDIEN.....	26
1.5.1	<i>Medien für die Zellkultur.....</i>	26
1.5.2	<i>Medien für Bakterien.....</i>	27
1.6	ANTIKÖRPER .....	27
1.7	CASPASENINHIBITOREN.....	29
1.8	CASPASENPEPTIDSUBSTRATE .....	29
1.9	MOLEKULARBIOLOGISCHE MATERIALIEN .....	30
1.9.1	<i>Vektoren.....</i>	30
1.9.2	<i>Enzyme und Kits.....</i>	30
<b>2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>	<b>31</b>
2.1	ANZUCHT VON BAKTERIEN.....	31
2.2	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON RNA UND DNA .....	31
2.2.1	<i>Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen.....</i>	31
2.2.2	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli.....</i>	31
2.3	AUFTRENNUNG UND ELUTION VON DNA-FRAGMENTEN.....	32
2.4	RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNA.....	33
2.5	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA 5´-ENDEN.....	33
2.6	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN .....	34
2.7	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) .....	34

2.8	RT/PCR.....	35
2.9	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN.....	35
2.9.1	Herstellung chemo-kompetenter Bakterien .....	35
2.9.2	Transformation chemo-kompetenter Bakterien .....	36
2.10	NORTHERN BLOT-ANALYSE .....	36
<b>3</b>	<b>PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....</b>	<b>36</b>
3.1	SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) .....	36
3.2	WESTERN BLOT .....	37
3.3	IMMUNPRÄZIPITATION .....	37
3.4	HERSTELLUNG VON GST-FUSIONSPROTEINEN .....	38
3.4.1	Induktion und Expression der GST-Fusionsproteine .....	38
3.4.2	Lyse der Bakterien und Extraktion von GST-Fusionsproteinen .....	38
3.4.3	Elution und Analyse von GST-Fusionsproteinen.....	38
<b>4</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>	<b>39</b>
4.1	KULTIVIERUNG EUKARYONTISCHER ZELLEN.....	39
4.2	PRÄPARATION PRIMÄRER HUMANER T-ZELLEN.....	39
4.3	HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN.....	40
4.4	AUFREINIGUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER.....	40
4.5	SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG .....	41
4.6	ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN .....	41
4.7	PRÄPARATION VON INTERMEDIÄRFILAMENTEN.....	42
4.8	CASPASENAKTIVITÄTSTEST .....	42
4.9	TRANSFEKTION VON ZELLEN .....	42
4.10	OBERFLÄCHENFÄRBUNG ZUR FACS-ANALYSE.....	43
4.11	MESSUNG APOPTOTISCHER ZELLEN.....	43
4.12	MESSUNG DES MITOCHONDRIALEN TRANSMEMBRANPOTENTIALS .....	44
4.13	IMMUNFLUORESCENZMIKROSKOPIE.....	44
4.14	IN VITRO-PLEKTINSPALTUNG.....	45
4.15	IN VITRO BINDUNGSEXPERIMENT MIT MITOCHONDRIEN ODER GST-PROTEINEN .....	45
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
III-1.	IDENTIFIZIERUNG DES ZYTOLINKERS PLEKTIN ALS IN VIVO-SUBSTRAT VON CASPASE-8 IM RAHMEN CD95- UND TNF-R-VERMITTELTEN APOPTOSE .....	46
	Intrazelluläre Translokation von Caspase-8 im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose.....	46
	Pro-Caspase-8 ist in MCF7-Zellen mitochondrial lokalisiert .....	48
	Aktive Caspase-8 transloziert zu Plektin .....	50
	Plektin wird spezifisch durch Caspasen in vivo gespalten.....	51
	Caspase-8 ist die proteolytische Aktivität, die Plektin spaltet .....	53
	Plektin ist das früheste Substrat, das im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose gespalten wird .....	57
	Plektin ist für die Aktin-Reorganisation während Apoptose verantwortlich.....	58

III-2. MITOCHONDRIALES BCL-2/BCL-X <sub>L</sub> REGULIERT CYTOPLASMATISCHE AKTIVE CASPASE-8 .....	59
<i>Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid und Plektin, nicht aber die</i>	
<i>Caspase-8-Prozessierung in MCF7-Zellen .....</i>	60
<i>Aktive Caspase-8 ist in MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub> Zellen mitochondrial lokalisiert.....</i>	61
<i>Mitochondriale Procaspase-8 kann durch aktive Caspase-8 aktiviert werden.....</i>	63
<i>Mitochondrien-gebundene aktive Untereinheiten von Caspase-8 sind enzymatisch aktiv .....</i>	64
<i>Die Bindung aktiver Caspase-Untereinheiten ist spezifisch für Caspase-8.....</i>	66
<i>Mitochondrien von kurzzeit-aktivierten und Bcl-x<sub>L</sub>-hochregulierenden T-Zellen binden</i>	
<i>aktive Caspase-8.....</i>	67
<i>Aktive Caspase-8 kann durch mitochondriales BAR gebunden werden .....</i>	69
<i>Die Expression von BAR und Bcl-x<sub>L</sub>, nicht aber von c-FLIP, korreliert mit der</i>	
<i>Apoptoseresistenz peripherer T-Zellen.....</i>	71
<i>Mitochondrien von d2 T-Zellen besitzen die höchste Bindungskapazität für aktive Caspase-8-</i>	
<i>Untereinheiten.....</i>	72
III-3. DEDD, EIN NEUARTIGES, NUKLEOLARES DED-PROTEIN .....	73
<i>DEDD besitzt eine Multi-Domänenstruktur.....</i>	75
<i>DEDD ist auf mRNA-Ebene ubiquitär exprimiert.....</i>	76
<i>DEDD induziert Apoptose mit Hilfe seiner DED.....</i>	76
<i>DEDD befindet sich in Nukleoli.....</i>	78
<i>Im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose transloziert DEDD vom Zytoplasma in den Kern.....</i>	80
<i>Translokation von DEDD in den Kern ist Caspasen-vermittelt.....</i>	81
<i>DEDD assoziiert mit FADD in vivo.....</i>	82
<i>DEDD ist ein DNA- und Nukleosom-bindendes Protein, das die Transkription von</i>	
<i>rDNA inhibiert.....</i>	83
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
PROCASPASE-8 IST MITOCHONDRIAL LOKALISIERT UND KANN DURCH DISC-AKTIVIERTE CASPASE-8	
PROZESSIERT WERDEN .....	86
AKTIVE CASPASE-8 TRANSLOZIERT ZU UND SPALTET PLEKTIN .....	88
IST PLEKTIN EIN SPEZIFISCHES CASPASE-8-SUBSTRAT?.....	88
DIE PROTEOLYTISCHE DEGRADATION ZYTOSKELETTALER STRUKTUREN WÄHREND APOPTOSE IST	
HIERARCHISCH ORGANISIERT .....	89
PLEKTIN IST ESSENTIELL FÜR DIE AKTINREORGANISATION WÄHREND APOPTOSE.....	90
EIN MODELL FÜR DIE MORPHOLOGIEVERÄNDERUNGEN WÄHREND APOPTOSE – PLEKTIN UND DIE	
AKTINREORGANISATION .....	91
CASPASE-8 WIRD DURCH MITOCHONDRIALES BCL-2/BCL-X <sub>L</sub> REGULIERT.....	94
SEQUESTRIERUNG AKTIVER CASPASE-8 ALS RESISTENZMECHANISMUS KURZZEIT-AKTIVIERTER	
PERIPHERER T-ZELLEN.....	96

DEDD, EIN NEUARTIGES DED-PROTEIN.....	97
DEDD BESITZT EINE FUNKTIONELLE DED .....	98
DEDD IST EIN HOCHKONSERVIERTES, DNA-BINDENDEN PROTEIN.....	98
DEDD BEINHALTET KERNLOKALISIERUNGSSIGNALE UND TRANSLOZIERT IN DEN NUKLEOLUS .....	99
DEDD INHIBIERT DIE TRANSKRIPTION RIBOSOMALER DNA .....	99
EIN MODELL FÜR DIE TRANSLOKATION VON DEDD IN DEN KERN.....	100
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>102</b>
<b>VII. VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>118</b>
<b>VIII. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>120</b>
<b>VIII. LEBENS LAUF .....</b>	<b>121</b>

# I. Einleitung

## 1.1 Mechanismen des Zelltodes – Apoptose und Nekrose

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein unverzichtbarer Prozeß, der im Rahmen von Zellwachstum und -entwicklung eine wichtige Rolle spielt und für die Regulation des Immunsystems und für Gewebshomöostase verantwortlich ist (Thompson 1995). Der Begriff "Apoptose" wurde von Kerr, Wyllie und Currie geprägt, die damit eine Reihe morphologischer Veränderungen definierten, die in Lebergewebe nach Entzug des Wachstumsfaktors ACTH zu beobachten waren (Kerr et al., 1972). Leberzellen fragmentierten in kleine Vesikel variabler Größe und wurden durch Nachbarzellen oder Phagozyten aufgenommen und damit aus dem Zellverband entfernt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß apoptotische Zellen eine charakteristische Abfolge zytologischer Veränderungen aufweisen, die durch die Aktivierung katabolischer Enzyme, wie Nukleasen und Proteasen hervorgerufen werden: Das Chromatin kondensiert und chromosomale DNA wird endonukleolytisch gespalten. Zunächst entstehen 50, 150 und 300 kb große DNA-Fragmente (Watanabe et al., 1995; Oberhammer et al., 1993). In einer zweiten Phase der DNA-Spaltung entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von 180 bp und ganzzahligen Vielfachen davon. Die DNA-Fragmentierung spielt aber keine kausale Ursache im apoptotischen Zelltod, denn Zellen ohne Kern können ebenfalls apoptotisch werden (Schulze-Osthoff et al., 1994). Zudem bilden Membranen bläschenförmige Ausstülpungen (Vorstufe der später auftretenden apoptotischen Körper), die mit dem Verlust der Membranasymmetrie einhergehen. Phosphatidylserine werden hierbei an der Zelloberfläche exponiert und spezifisch durch Makrophagen erkannt, was zur Elimination dieser apoptotischen Körperchen führt. Somit wird sicher gestellt, daß alternde oder geschädigte Zellen in einer kontrollierten Weise eliminiert werden, ohne daß inflammatorische Reaktionen auftreten, die benachbarte intakte Zellen oder die extrazelluläre Matrix schädigen könnten. Der Apoptose als physiologischer Form des Zelltodes ist daher die Nekrose gegenüberzustellen, die vielfach mit Entzündungserscheinungen verbunden ist (Trump et al., 1981). Sie ist Folge irreversibler Schädigungen, die durch Einwirkung verschiedener Noxen entstehen. Es kommt zur Erhöhung der Membranpermeabilität und als unmittelbare Folge zum Anschwellen der Zelle und deren Organellen. Gekoppelt an den Verlust der Membranintegrität ist die Freisetzung lysosomaler Enzyme, die den zellulären Desintegrationsprozeß weiter fördern. Obwohl Apoptose und Nekrose grundsätzlich verschiedene Charakteristika aufweisen und daher voneinander unabhängig scheinen, so zeigen einige Studien, daß beide Prozesse unter bestimmten Bedingungen miteinander gekoppelt sind: Verschiedene Toxine lösen in geringer Konzentration Apoptose, in größeren Mengen Nekrose aus (Kroemer, 1995). Der zelluläre ATP-Status scheint ebenfalls einen Einfluß darauf zu haben, ob eine Zelle einen nekrotischen oder einen apoptotischen Zelltod stirbt: Höhere ATP-Konzentration begünstigen Apoptose, niedrige ATP-Konzentrationen führen zu Nekrose (Leist et al., 1997;

Egushi et al., 1997). Apoptose wird durch eine Vielzahl exogener und endogener Stimuli ausgelöst, wie z.B. Hypoxia, Hitze, Kälte, ionisierende Strahlung, Glukokortikoide, Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor, TNF) oder Pharmaka (z.B. Zytostatika). Ist der apoptotische Signalweg jedoch blockiert, kann ein proapoptotischer Stimulus auch Nekrose auslösen (Vercammen et al., 1998).

## 1.2 *C.elegans* als Modellsystem – die grundlegende Apoptosemaschinerie

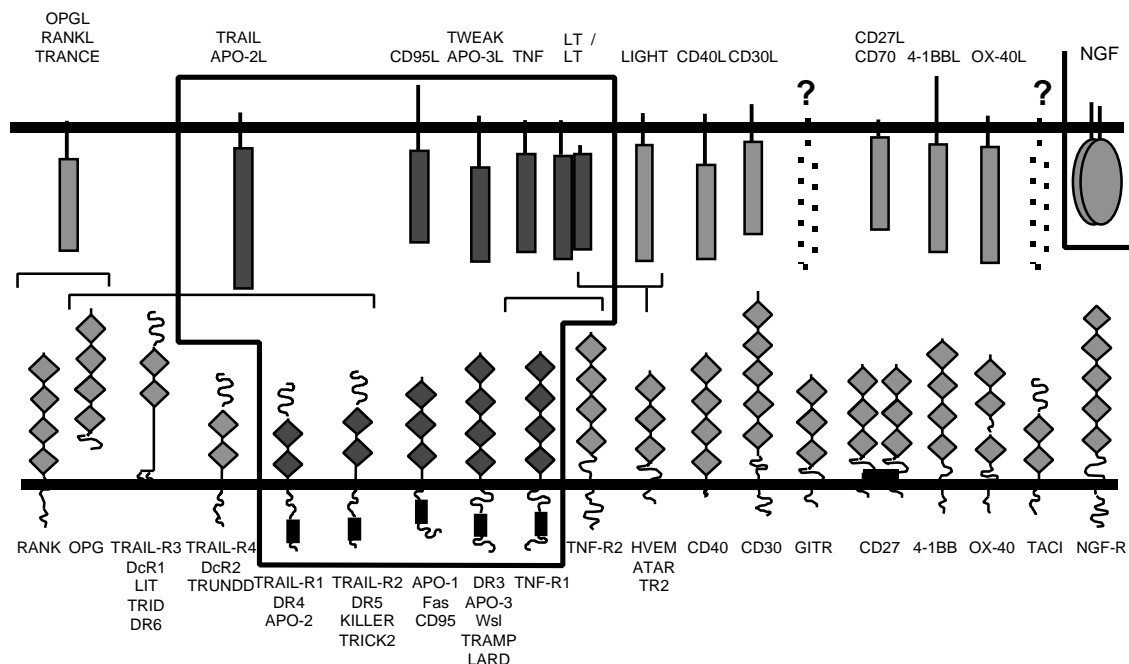
Der Nematod *Caenorhabditis elegans* stellte sich als guter Modellorganismus heraus, um die grundlegenden Prinzipien der Apoptotischesignaltransduktion zu studieren. Während der Entwicklung von *C.elegans* sterben 131 der 1090 somatischen Zellen (Sulston et al., 1992). Dabei spielen drei Genprodukte eine essentielle Rolle: CED-3 und CED-4 sind proapoptotische Moleküle, während CED-9 anti-apoptotisch wirkt (Lin und Hengartner, 1999). CED-3 ist eine Cysteinprotease, die ihre Substrate nach einem Aspartatrest spaltet. CED-3 liegt als Zymogen vor, das sich durch Autoproteolyse selbst aktiviert (Thornberry und Lazebnik, 1998). CED-4 interagiert mit CED-3 und fördert so die Aktivierung dieser Protease. CED-9 inhibiert die Aktivierung von CED-3 durch direkte Bindung an CED-4 (Chinnaiyan et al., 1997). In einer lebendigen Zellen liegen CED-3, CED-4 und CED-9 als ternärer Komplex vor. Induktion von Apoptose führt zur Dissoziation von CED-9 und damit zur CED-4-vermittelten Aktivierung von CED-3. Vertebraten haben ganze Genfamilien entwickelt, die diesen prototypischen *C.elegans*-Proteinen ähneln: Caspasen (für Cysteinyln-Aspartasen) sind homolog zu CED-3 (Thornberry und Lazebnik, 1998), Apaf-1 ist ein CED-4-Homolog (Zou et al., 1997), und die *Bcl-2*-Genfamilie steht in enger Beziehung zu CED-9 (Yang und Korsmeyer, 1996).

## 1.3 Die Todesrezeptoren und ihre Liganden

Verliert eine Zelle den Kontakt zu ihrer Umgebung, d.h. zu benachbarten Zellen oder zur extrazellulären Matrix oder wird sie irreparabel geschädigt, so wird das apoptotische Selbstmordprogramm initiiert (Evan und Littlewood, 1998). Säugetiere haben darüber hinaus einen weiteren, bei niederen Organismen wie *C.elegans* nicht zu beobachtenden Mechanismus entwickelt, der als "instruktive Apoptose" bezeichnet werden kann (Ashkenazi und Dixit, 1998), und der es dem Organismus ermöglicht, individuelle Zellen direkt zu eliminieren. Die sogenannten Todesrezeptoren – Oberflächenrezeptoren, die nach Bindung ihres spezifischen Liganden Apoptose induzieren - spielen im Rahmen dieser "instruktiven Apoptose" eine zentrale Rolle. Diese differentiell glykosylierten Oberflächenmoleküle mit charakteristischen Cysteinreichen Subdomänen gehören zur TNF/NGF-Rezeptorsuperfamilie (Abbildung 1).

Mit der Entdeckung von CD95 (APO-1/Fas) (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992) wurde erstmals ein Rezeptor beschrieben, dessen Hauptaufgabe die Induktion von Apoptose zu sein scheint. Durch Vergleich mit TNF-R1 wurde eine intrazelluläre Domäne identifiziert, die für die Transduktion des Todessignals in das Zellinnere verantwortlich ist (Tartaglia et al., 1993; Itoh

und Nagata, 1993), und die als Todesdomäne ("death domain", DD) bezeichnet wurde. Diese Todesdomäne weist eine charakteristische Proteinfaltung auf, die aus sechs antiparallelen amphipatischen  $\alpha$ -Helices besteht (Huang et al., 1996). CD95 wird in Thymus, Herz, Leber und Ovarien stark exprimiert, in geringfügigem Ausmaß in Gehirn, Rückenmark und Milz (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). B- und T-Lymphozyten exprimieren CD95 im Zuge ihres Reifungsprozesses, d.h. mit fortschreitendem Differenzierungszustand, in verstärktem Maße: Alle Thymozyten - außer der doppelt negativen Subpopulation ( $CD4^-CD8^-$ ) - exprimieren CD95 (Drappa et al., 1993), ebenso mit bestimmten Viren transfizierte lymphoblastoide Zellen (z.B. Debatin et al., 1990). B-Zellen zeigen eine verstärkte CD95-Expression, wenn sie über CD40



**Abbildung 1. Die TNF-R/NGF-R-Superfamilie und ihre Liganden.** Die Subfamilie der Todesrezeptoren ist umrahmt. Die Cystein-reichen extrazellulären Domänen sind als Rauten dargestellt. CD95 (Fas/APO-1), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2, DR3 (WSL, APO-3, TRAMP, LARD, AIR) und TNF-R1 verfügen intrazellulär über einen Bereich erhöhter Homologie, der als Todesdomäne (DD) (symbolisiert durch schwarze Rechtecke) bezeichnet wird. Die Liganden dieser Rezeptoren sind ebenfalls mit ihrem extrazellulären C-Terminus, mit ihrem Membrandurchgang und ihrer intrazellulären N-terminalen Region oberhalb der entsprechenden Rezeptoren dargestellt.

stimuliert werden und ihnen ein zweites stimulatorisches Signal über den B-Zellrezeptor fehlt (Schattner et al., 1995). Neben der membrangebundenen tritt auch eine lösliche Form des Rezeptors auf, die durch alternatives Spleißen gebildet wird (Hughes und Crispe, 1995). Die lösliche Form könnte regulatorische Aufgaben besitzen, da sie Apoptose *in vitro* durch Abfangen löslicher CD95L-Moleküle effektiv inhibieren kann (Mariani et al. 1995, Cheng et al., 1994, 1995; Knipping et al., 1995). Der an CD95 bindende CD95L ist ein Mitglied der Familie der TNF-ähnlichen Moleküle (Farrah und Smith, 1992). Mitglieder dieser Familie sind Typ-II-

Membranproteine und besitzen einen extrazellulären C-Terminus, einen Membrandurchgang (Takahashi et al., 1994), sowie einen intrazellulären Teil, dessen Funktion unbekannt und innerhalb der Familie nicht konserviert ist. Wie durch chemische Quervernetzungsexperimente von TNF gezeigt, scheint bei allen Mitgliedern der TNF-Familie die trimere die aktive Form zu sein (Tanaka et al., 1995). Die Liganden binden an ihre Rezeptoren und aktivieren sie durch Trimerisierung. Experimente mit CD95 zeigten, daß eine Dimerisierung nicht ausreicht, um Apoptose auszulösen (Dhein et al., 1992; Kischkel et al., 1995). Eine weitere Ähnlichkeit zu TNF besteht darin, daß neben der membrangebundenen Form auch eine lösliche Form des CD95L auftritt (sCD95L), die durch  $Zn^{2+}$ -Metalloproteasen-vermittelte Proteolyse erzeugt wird (Mariani et al., 1995). Die  $Zn^{2+}$ -abhängigen Metalloproteasen regulieren zudem die konstitutive Expression von CD95L und dienen wahrscheinlich als Schutzmechanismus, der eine verstärkte Akkumulation des Liganden auf der Zelloberfläche verhindert (Mariani et al., 1995). Neben  $CD8^+$ -Killerzellen, deren Zytotoxizität zu einem großen Teil auf der Expression von CD95L beruht (Stalder et al., 1994; Hanabuchi et al., 1994; Rathmell et al., 1995), wird CD95L zudem auf aktivierten Milzzellen, in der Niere, der Lunge und sehr stark in den Hoden (Suda et al., 1993) exprimiert.

#### 1.4 Die Bedeutung der CD95-vermittelten Apoptose

Die Immunschwäche AIDS ist ein Beispiel, bei dem die Dysregulation des CD95/CD95L-System eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu einer Immundefizienz, da  $CD4^+$ -T-Zellen depletiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß CD95-vermittelte Apoptose beim aktivierungsinduzierten Tod der  $CD4^+$ -T-Zellen eine maßgebliche Rolle spielt (Westendorp et al., 1995; Ju et al., 1995; Brunner et al., 1995; Vignaux et al., 1995). Zudem wurde bei HIV-Infizierten eine verstärkte Expression von CD95 auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten beobachtet (Debatin und Krammer 1995; McCloskey et al., 1995) und ein erhöhter Titer an Autoantikörpern gegen CD95 gefunden (Stricker et al., 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß T-Lymphozyten bei AIDS-Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose besitzen (Katsikis et al., 1995).

Mittlerweile sind pathologische Veränderungen bekannt geworden, an denen ein Defekt im CD95/CD95L-System maßgeblich beteiligt ist: Dazu gehören Leberschädigungen (Hiramatsu et al., 1994; Galle et al., 1995; Natoli et al., 1995), Schädigungen der Niere (Matsumoto et al., 1995), degenerative Veränderungen des Gehirns (Nishimura et al., 1995), sowie maligne Veränderungen (Debatin und Krammer, 1995; Xerri et al., 1995; Hamazaki et al., 1995). Das *lpr*-Syndrom (für „**L**ympho**p**roliferations“-Syndrom) bei Mäusen, dessen Ursache in einer Mutation in der DD von CD95 liegt, ist der menschlichen Erkrankung SLE sehr ähnlich, die ebenfalls mit der Produktion von Autoantikörpern einhergeht. Da die molekulare Grundlage des *lpr*-Syndroms mit der Identifizierung eines Defekts im CD95-System aufgeklärt ist, sind nun die Vorgänge beim menschlichen SLE einer eingehenderen Untersuchung zugänglich geworden (Rose et al., 1994; Steinberg, 1994; Drake und Kotzin, 1992; Elkon, 1994). Darüber hinaus scheint der

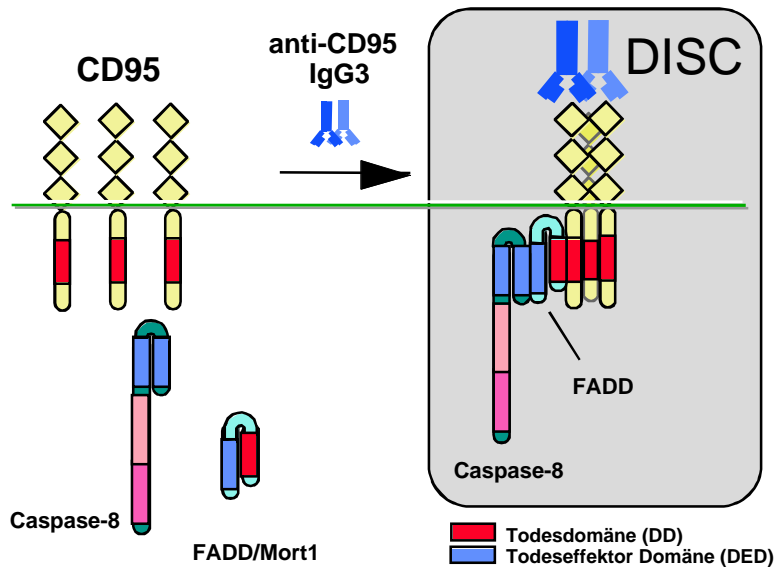


CD95L bei einigen Geweben dafür verantwortlich zu sein, den immunprivilegierten Status aufrechtzuerhalten. Ein Beispiel für eine solche immunprivilegierte Region ist die vordere Augenkammer. Eine Inokkulation von Viren in die Augenkammer führt dazu, daß durch die Virusinfektion rekrutierte Lymphozyten und Granulozyten apoptotisch werden, da die Epithelzellen der Augenkammer funktionellen CD95L exprimieren (Griffith et al., 1995; 1996). Dieser Zelltod von immunkompetenten Zellen konnte bei Mäusen mit einem Defekt im CD95-Liganden (*gld*-Mäuse; für „generalized lymphoproliferative disease“) nicht nachgewiesen werden. Als Folge treten Entzündungserscheinungen und die Zerstörung des Gewebes ein. Interessanterweise treten bei *gld*- oder *lpr*-Mäusen ohne vorherige virale Inokkulation keinerlei Abnormitäten im Auge auf. Offensichtlich sind neben dem CD95/CD95L-System weitere Mechanismen daran beteiligt, den immunprivilegierten Status aufrechtzuerhalten, z. B. die Blut-Augen-Schranke. Mutationen im CD95/CD95L-System treten auch beim Menschen auf. Vergleichbar mit dem *lpr*-Syndrom bei Mäusen wurde beim Menschen das sogenannte autoimmune lymphoproliferative Syndrom (ALPS) beschrieben, das auch als Candale-Smith-Syndrom (CSS) bezeichnet wird (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). Dieser Defekt in der CD95-vermittelten Apoptose, von dem häufig Kinder betroffen sind, führt zu einer massiven, nicht-malignen Lymphadenopathie, zu einer veränderten und vergrößerten T-Zellpopulation und zu massiven Autoimmunerscheinungen.

Zudem konnte gezeigt werden, daß bestimmte Tumore funktionellen CD95L auf der Zelloberfläche exprimieren. Dazu gehören humane Melanome (Hahne et al., 1996), hepatozelluläre Karzinome (Strand et al., 1996) sowie eine Kolonkarzinom-Zelllinie (O'Connell et al., 1996). Diese Untersuchungen legen nahe, daß die Expression von CD95L auf Tumoren dazu beiträgt, eine immunprivilegierte Umgebung zu schaffen, die es dem Tumor ermöglicht, dem Immunsystem zu entkommen.

## 1.5 Der Tod-induzierende Signalkomplex – Initiation CD95-vermittelter Apoptose

Die Initiationsphase ist für CD95 detailliert analysiert worden. Wie andere Mitglieder der TNF-Familie, so ist auch CD95L ein homotrimeres Molekül. In Analogie zur Kristallstruktur von Lymphotoxin mit TNF-R1 bindet CD95L drei CD95-Moleküle (Smith et al., 1994). Da die DD in der intrazellulären Region die Eigenschaft zur Oligomerisation besitzt, führt die Trimerisierung von CD95 zu einer Komplexbildung der DD. Dies ist durch Mutations- und NMR-Strukturanalysen gezeigt worden (Huang et al., 1996). Nach Trimerisierung des Rezeptors lagert sich das Adaptermolekül FADD (für “Fas Associated Death Domain“, auch als Mort1 bezeichnet) an den Rezeptorkomplex an. FADD verfügt wie CD95 über eine DD und bindet CD95 über eine homophile DD-Wechselwirkung (Chinnaiyan et al., 1995). Neben einer DD besitzt FADD ein zweites Protein-Protein-Interaktionsmodul, das als Todeseffektordomäne (DED für “Death Effector Domain“) bezeichnet wird. Mit Hilfe seiner DED rekrutiert FADD über eine DED-DED-Interaktion die Cysteinprotease Caspase-8 (auch als FLICE oder MACH bezeichnet) an den Rezeptor (Muzio et al., 1995; Boldin et al., 1995; Fernandez-Alnemri et al., 1996). Der



**Abbildung 2. Der Tod-induzierende Signalkomplex (DISC).** Apoptoseinduktion durch den anti-CD95-Antikörper oder den CD95L führt zur Trimerisierung des Rezeptors und damit zur Rekrutierung von FADD und Caspase-8. FADD bindet CD95 über eine DD-DD-Wechselwirkung (DD als rotes Rechteck dargestellt) und attrahiert Caspase-8 über eine DED-DED-Interaktion (DED als blaues Rechteck dargestellt). Caspase-8 wird daraufhin autolytisch gespalten und das aktive Enzym dissoziiert vom Rezeptorkomplex ab. Die aktiven Untereinheiten von Caspase-8 sind als hell- bzw. dunkel-rosa-farbene Rechtecke symbolisiert.

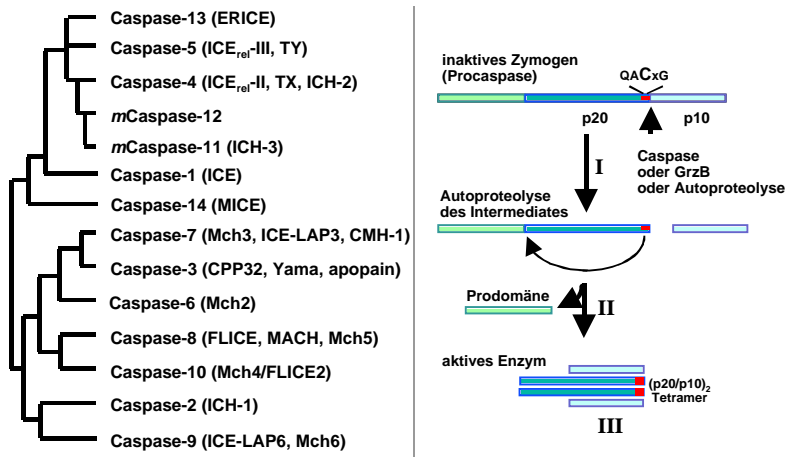
besitzt eine Vielzahl von Isoformen, die zum größten Teil lediglich auf mRNA-Ebene beschrieben wurden. Es konnte gezeigt werden, daß von allen acht bisher publizierten Caspase-8-Isoformen hauptsächlich zwei auf Proteinebene exprimiert werden (Scaffidi et al., 1997). Diese Isoformen sind Caspase-8/a und Caspase-8/b. Beide Isoformen assoziieren über FADD mit der Todesdomäne von CD95 und werden mit vergleichbarer Kinetik prozessiert (Scaffidi et al., 1997). Das sogenannte "Induced Proximity Model" schlägt vor, daß ein Caspase-8-Molekül durch ein zweites Zymogenmolekül proteolytisch prozessiert wird, woraufhin das aktive Enzym vom DISC freigesetzt wird (Muzio et al., 1998).

## 1.6 Caspasen – die Überbringer der Todesbotschaft

Die Schlüsselmoleküle, die für die Weiterleitung des apoptotischen Signals von der Zelloberfläche ins Zellinnere maßgeblich verantwortlich sind, sind sogenannte Cysteiny-Aspartasen oder kurz Caspasen. Es handelt sich dabei um eine Familie von Proteasen, die ein Cystein-Rest im aktiven Zentrum besitzen und ihre Substrate nach einem Aspartat spalten, d.h. sie benötigen ein Aspartatrest in der P1-Position ihres korrespondierenden Substrates. Die Caspasenfamilie umfaßt 14 Mitglieder, die in Säugetieren identifiziert und von denen 12 Enzyme im Menschen gefunden wurden. Caspasen lassen sich aufgrund ihrer mit Hilfe einer

Komplex aus trimerisiertem CD95, FADD und Caspase-8 wird als DISC (für "Death Inducing Signalling Complex") bezeichnet (Kischkel et al., 1995). Caspase-8 besitzt zwei N-terminale DED. Die Interaktion mit FADD erfolgt mit Hilfe der ersten DED. Der C-Terminus, der Caspase-8 als Mitglied der Caspasenfamilie identifiziert, ist durch zwei charakteristische

Untereinheiten gekennzeichnet, die die Proteaseaktivität besitzen und die bei allen Mitgliedern dieser Familie zu finden ist. (Wilson et al., 1994, Walker et al., 1995). Caspase-8



**Abbildung 3. Die Familie der Caspasen.** Links: Die verschiedenen Caspasen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit in verschiedenen Untergruppen zusammengefaßt sind (für Erläuterungen s. Text). Rechts: Der Aktivierungsmechanismus von Caspasen besteht aus zwei proteolytischen Schritten: Zunächst erfolgt die Spaltung zwischen der kleinen und der großen aktiven Untereinheit (I), woraufhin ein aktives Intermediat gebildet wird, welches die Abspaltung der Prodomäne bewirkt (II). Das aktive Enzym liegt als Heterotetramer vor. GrzB, Granzym B.

ihre Substrate an einem DExD-Motiv, das in den meisten Todessubstraten vorkommt. Gruppe III-Caspasen (6, 8, 9, 10) bevorzugen eine (L/V)E(T/H)D-Spaltsequenz. Die Substratspezifität humaner Caspase-14 ist noch nicht bestimmt. Der Aktivierungsmechanismus ist in Abbildung 3 illustriert: In allen Fällen wird nach der ersten Spaltung zwischen kleiner (p10) und großer Untereinheit (p20) ein Intermediat gebildet, das proteolytische Aktivität besitzt und die große Untereinheit von der Prodomäne abspaltet. Wie Kristallstrukturanalysen der Caspasen 1, 3 und 8 zeigten (Blanchard et al., 1999; Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994; Watt et al., 1999; Wilson et al., 1994) bilden die aktiven Untereinheiten daraufhin ein Heterodimer.

### 1.6.1 Die subzelluläre Lokalisation von Caspasen

Caspasen sind keine rein zytoplasmatisch lokalisierten Enzyme, sondern zeigen vielmehr ein komplexes Verteilungsmuster. Da Caspase-3 eine zentrale Effektorcaspase für verschiedene Apotoseformen darstellt, konzentrierten sich einige Studien auf die subzelluläre Lokalisation dieses Enzyms, um dessen Wirk- und Regulationsmechanismen besser zu verstehen. In einer Vielzahl humaner Zelllinien und Geweben ist Caspase-3 sowohl diffus zytoplasmatisch als auch mitochondrial lokalisiert (Mancini et al., 1998). Elektronenmikroskopie zeigte, daß sich das Proenzym z.T. im mitochondrialen Intermembranraum befindet, während die aktive Caspase von den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt wird. Eine weitere Studie identifizierte eine zweite mitochondriale Form von Caspase-3, die über eine Transmembranregion verfügte (Krebs et al., 1999). Ähnlich wie CED-9 die Prozessierung von CED-3 durch direkte Protein-Protein-

Peptidbibliothek bestimmten Substratspezifität in drei Gruppen einteilen (Thornberry et al., 1997): Gruppe I-Caspasen (Caspasen 1, 4, 5, 13), deren Hauptfunktion in der Prozessierung von Zytokinen besteht, bevorzugen das Spaltungsmotiv (W/L)EHD. Caspasen der Gruppen II und III sind Effektorproteasen im Rahmen verschiedener Apoptosesignalwege. Gruppe II-Caspasen (Caspasen 2, 3, 7) spalten

Interaktion inhibieren kann, so scheint die membranständige Procaspase-3 durch mitochondrial-lokalisiertes Bcl-2 reguliert zu werden (Krebs et al., 1999). Die Lokalisation von Caspase-3 besitzt jedoch nicht nur mechanistische, sondern auch therapeutische Implikationen. Eine Studie konnte einen Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Lokalisation von Procaspase-3 in bestimmten Tumorzellen und deren Sensitivität gegenüber Chemo- und Strahlungs-therapie herstellen (Donoghue et al., 1999): Großzellige diffuse B-Zell-Lymphome zeigten nach Chemo- und Strahlungs-therapie keine Regression, wenn Procaspase-3 zytoplasmatisch vorlag. Eine Therapie war dann erfolgreich, wenn Procaspase-3 mitochondrial lokalisiert war. Es scheint, daß Chemotherapeutika und Strahlung, die direkt die apoptogene Aktivität von Mitochondrien induzieren, nur dann effizient Apoptose auslösen und somit die Regression des Tumors bewirken können, wenn Procaspase-3 mit Mitochondrien assoziiert vorliegt.

Neben Caspase-3 wurden auch die Caspasen 2 und 7 im mitochondrialen Intermembranraum gefunden (Susin et al., 1999b). Nach Desintegration der äußeren Mitochondrienmembran während Apoptose werden sie freigesetzt und aktiviert. Sowohl die Translokation ins Zytoplasma als auch die nachfolgende Aktivierung sind durch Bcl-2 inhibierbar (Susin et al., 1999b; Adachi et al., 1997). Aktive Caspase-9 ist sowohl zytoplasmatisch (Susin et al., 1999b) als auch aufgrund putativer Kernlokalisierungssignale nuklear lokalisiert (Krajewski et al., 1999). Eine detaillierte Analyse der Lokalisation von Caspase-9 in Ischemie-sensitiven Hirnregionen zeigte, das Caspase-9 in nicht-geschädigten (d.h. nicht-apoptotischen) Neuronen mitochondrial lokalisiert ist und nach Ischemie-Induktion ins Zytoplasma und in den Kern transloziert – ein Prozeß, der mit DNA-Fragmentierung einhergeht (Krajewski et al., 1999). Diese Daten deuten auf eine zentrale Rolle von Caspase-9 in bestimmten neuronalen Apoptoseformen hin. In Analogie zu Caspase-9 verfügt Caspase-2 über basische Tetrapeptidsequenzen, die als Kernlokalisierungssignale dienen könnten (Colussi et al., 1998). So wurde für das murine Homolog von Caspase-2, welches auch als Nedd2 bezeichnet wird, eine Kernlokalisation beobachtet (Colussi et al., 1998). Caspase-1 befindet sich nach TNF -Stimulation ebenfalls im Kern (Mao et al., 1998). Dabei transloziert zunächst das Proenzym mit Hilfe einer putativen NLS in der Prodomäne in den Kern, um dort zum aktiven Enzym prozessiert zu werden (Colussi et al., 1998). Es scheinen Mechanismen im Kern zu existieren, die die Aktivierung von Caspasen bewirken. Eine weitere Studie analysierte die Lokalisation aktiver Caspase-3 und Caspase-7 in der Leber von anti-CD95-behandelten Mäusen. Diese Caspasen wurden in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten gefunden: Aktive Caspase-3 lag zytoplasmatisch vor, während aktive Caspase-7 in der mikrosomalen Fraktion gefunden wurde, wo sie ihr potentiell Substrat SREBP-1 (für “**S**terol **R**egulatory **E**lement-**B**inding **P**rotein-1”) spaltet (Chandler et al., 1998). Obwohl beide Caspasen eine identische Substratspezifität besitzen (Thornberry et al., 1997), wird durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation gewährleistet, daß sie unterschiedliche, Kompartiment-spezifische Substrate spalten.

Mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde ein weiteres intrazelluläres “Caspasen-Kompartiment” identifiziert (Nakagawa et al., 2000). Caspase-12 wurde

ausschließlich im ER gefunden und nur durch solche Apoptosestimuli aktiviert, die direkt auf das ER wirkten. So wurde Caspase-12 nach Tunikamycin-Behandlung, nicht aber durch Todesliganden oder durch die auf Mitochondrien wirkenden Substanzen Staurosporin oder Dexamethason aktiviert (Nakagawa et al., 2000). Das Amyloid- (A $\beta$ )-Protein induziert neuronale Apoptose und ist damit möglicherweise für die neuronale Degeneration bei Alzheimer mitverantwortlich (Yankner et al., 1990). Es wirkt dabei auf das ER durch Bindung seines ER-lokalisierten Rezeptors ERAB (Yan et al., 1997) und bewirkt letztlich die Aktivierung ER-lokalisierter Caspase-12 (Nakagawa et al., 2000). Somit scheint Caspase-12 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Alzheimer zu spielen.

Warum sind verschiedene Caspasen mit verschiedenen intrazellulären Kompartimenten assoziiert? Caspasen besitzen z.T. identische oder ähnliche Substratspezifitäten. Durch intrazelluläre Segregation kann somit sichergestellt werden, daß ein bestimmtes zelluläres Protein nur durch eine bestimmte Caspase und damit zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Induktion von Apoptose gespalten wird. Eine Vielzahl von Krankheiten ist mit einer Deregulation von Apoptose verbunden. Es ist daher entscheidend, daß die intrazelluläre Apoptosemaschinerie strikt kontrolliert wird. Eine Möglichkeit besteht darin, intrazelluläre Signalmoleküle an bestimmte intrazelluläre Kompartimente zu binden und damit voneinander zu trennen. Erst nachdem die Zelle ein proapoptotisches Signal erhalten hat, werden die verschiedenen Komponenten freigesetzt und können daraufhin miteinander interagieren. Ein Beispiel für einen solchen regulatorischen Mechanismus zeigt das Apoptosom (s. Punkt I.1.7): Apaf-1 kann durch einen Cytochrom c-unabhängigen Mechanismus aktiviert werden. Die intramitochondriale Lokalisation von Caspase-9 stellt daher sicher, daß erst nach erfolgter Apoptoseinduktion und der damit verbundenen Freisetzung von Caspase-9 aus den Mitochondrien das Apoptosom gebildet und Caspase-9 aktiviert werden kann.

### 1.6.2 Virale und zelluläre Inhibitoren von Caspasen

Viren nutzen die Biosynthesemaschinerie ihrer Wirtszelle, um sich selbst reproduzieren zu können. Der einfachste und zugleich effektivste Mechanismus, die virale Replikation zu verhindern, besteht darin, die Virus-infizierte Zelle durch Apoptose zu eliminieren. Viren besitzen aber Proteine, darunter Caspaseninhibitoren, die Apoptose inhibieren. Der erste Caspaseninhibitor, der identifiziert wurde, war CrmA (für "Cowpox Virus Product Cytokine Response Modifier A"). Aufgrund der ermittelten Inhibitorkonstanten konnte gezeigt werden, daß CrmA Caspase-1 und Caspase-8 effizient inhibieren und damit die Produktion von IL-1 und IL-18 sowie Todesrezeptor-vermittelte Apoptose blockieren kann (Los et al., 1995; Tewari und Dixit, 1995; Varfolomeev et al., 1998). CrmA gehört zur Klasse der Serinproteaseinhibitoren (Serpine), zeigt aber im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie eine Spezifität für Cysteinproteasen (Ray et al., 1992; Komiyama et al., 1994). CrmA bindet mit seiner Pseudosubstratregion LVAD an eine Caspase. Für Caspase-1 ist gezeigt worden, daß CrmA zum größten Teil intakt bleibt und einen inhibitorischen Komplex mit der Caspase bildet, während ein

geringer Anteil an gespaltenen CrmA-Molekülen vom Enzym dissoziiert (Komiya et al., 1994; Whisstock et al., 1996). Durch Mutationen der Pseudosubstratregion konnten CrmA-Mutanten hergestellt werden, die andere Caspasen effizient inhibieren konnten, so z.B. CED-3 und Caspase-3 (Xue und Horvitz, 1995; Wright et al., 1999). Ein zu CrmA homologer Inhibitor, der in Säugetierzellen gefunden wurde, ist der Zytotoxische-Lymphozyten-Serpinproteinaseinhibitor PI-9 (auch als „Granzym **B**-Inhibitor“ (GBI) bezeichnet), der in seiner Pseudosubstratregion ein Glutamat anstelle eines Aspartatrestes besitzt und lediglich in der Lage ist, Granzym B, nicht aber Caspasen zu inhibieren (Bird et al., 1998). Das baculovirale Protein p35 inhibiert neben CED-3 und Caspasen von Insektenzellen die Säugetier-Caspasen 1, 3, 6, 7, 8 und 10 (Ekert et al., 1999). Im Gegensatz zu CrmA wird p35 gespalten und das Spaltprodukt bildet daraufhin einen inhibitorischen Komplex mit der Caspase (Hay et al., 1994). Transgene Expression von p35 in *C.elegans* und *Drosophila* zeigte, daß p35 Apoptose während der Entwicklung blockieren kann (Hay et al., 1994; White et al., 1996; Xue und Horvitz, 1995) und Thymozyten p35-transgener Mäusen erwiesen sich als resistent gegenüber einer Vielzahl apoptotischer Stimuli (Izquierdo et al., 1999).

Die sogenannten IAP (für „**I**nhibitor of **A**poptosis **P**roteins“) wurden wie p35 als baculovirale Proteine identifiziert (Crook et al., 1993), deren entsprechende zelluläre Analoge in Hefe, *C.elegans*, *Drosophila* und Vertebraten durch Homologievergleiche gefunden wurden (Uren et al., 1998; LaCasse et al., 1998). Neben einer Zinkfinger-Domäne (die sog. RING-Domäne) zeichnen sie sich durch bis zu drei sogenannte BIR (für „**B**aculoviral **I**AP **R**epeats“-Domänen aus, die für die Interaktion mit anderen Proteinen notwendig sind (Ekert et al., 1999). Eine Vielzahl von IAP spielt jedoch in der Apoptosesignaltransduktion keine Rolle und ist eher anderen Prozessen, wie z.B. der Zytokinese, zuzuordnen (Fraser et al., 1999; Uren et al., 1999). Die in Säugetieren identifizierten IAP XIAP (MIHA, hILP), cIAP-1 (MIHB), cIAP-2 (MIHC), NAIP und Survivin, binden und inhibieren Caspasen. XIAP und Survivin inhibieren die Caspasen 3 und 7, wobei die zweite BIR-Domäne für die inhibitorische Funktion notwendig ist (Takahashi et al., 1998). NIAP, cIAP-1 und cIAP-2 besitzen Inhibitionskonstanten, die darauf schließen lassen, daß diese Proteine *in vivo* keine Caspasen-inhibitorische Wirkung besitzen (Roy et al., 1997). Sie sind lediglich *in vitro* in 100 bis 1000fachem molaren Überschuß in der Lage, Caspase-3 und -7 zu inhibieren, also in Konzentrationen, die *in vivo* nicht auftreten (Roy et al., 1997). Die Funktion von Survivin ist noch nicht vollständig geklärt. Zwar zeigt eine Studie, daß dieses Säugetier-IAP Dexamethason-, Bax- und CD95-vermittelte Apoptose mit gleicher Effizienz wie XIAP blockieren kann, jedoch besitzen transformierte Zelllinien, wie Jurkat T-Zellen, hohe endogene Mengen an Survivin, zeigen aber eine hohe Sensitivität gegenüber jenen proapoptotischen Stimuli. Da Survivin in schnell proliferierenden Zellen exprimiert wird, wird eine Rolle bei der Zellteilung diskutiert (Fraser et al., 1999).

Mit v-FLIP (für „**v**iral **FL**ICE-**I**nhibitory **P**rotein“) wurde ein weiterer viraler Caspaseninhibitor gefunden, der von einer Vielzahl verschiedener Viren produziert wird (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997; Bertin et al., 1997). V-FLIP verfügt wie Caspase-8 über zwei N-terminale DED, mit deren Hilfe es an den CD95-DISC attrahiert wird und die Prozessierung von

Caspase-8 inhibiert. Das zelluläre Homolog c-FLIP wurde von verschiedenen Gruppen identifiziert (Irmeler et al., 1997; Shu et al., 1997; Hu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Han et al., 1997; Rasper et al., 1998; Scaffidi et al., 1999). Auf mRNA-Ebene konnte eine Vielzahl von Splicevarianten gefunden werden, doch nur zwei Isoformen (c-FLIP<sub>L</sub> und c-FLIP<sub>S</sub>) werden auf Proteinebene exprimiert (Irmeler et al., 1997; Shu et al., 1997; Rasper et al., 1998; Scaffidi et al., 1999). C-FLIP<sub>L</sub> besitzt wie Caspase-8 eine Tandem-DED am N-Terminus und eine ICE-ähnliche Domäne am C-Terminus, jedoch verfügt c-FLIP<sub>L</sub> nicht über jene konservierten Motive (insbesondere den Cysteinrest im aktiven Zentrum), die für die katalytische Aktivität von Caspase-8 verantwortlich sind. Anstelle eines QACQG-Motivs im aktiven Zentrum von Caspase-8 besitzt c-FLIP<sub>L</sub> die Sequenz QNYVV und ist daher katalytisch inaktiv. Beide Formen von c-FLIP werden an den CD95-DISC attrahiert und können, wenn überexprimiert, die Caspase-8-Prozessierung inhibieren, indem eine weitere Rekrutierung von Caspase-8 an den DISC blockiert wird (Scaffidi et al., 1999).

Eine Deregulation von Apoptose ist bei einer Vielzahl von Krankheiten beschrieben worden. Große Anstrengungen wurden daher unternommen, regulativ in die Apoptosesignalmaschinerie einzugreifen. Synthetische Caspaseninhibitoren wurden dabei als sehr wirksame Pharmazeutika angesehen. Caspasen stellen eine von etwa 20 verschiedenen Cysteinproteasefamilien dar. Inhibitoren (wie z.B. Iodacetamid), die mit dem Cystein im aktiven Zentrum reagieren, sind jedoch nicht spezifisch für Caspasen, sondern inhibieren sämtliche Cysteinproteasen. Es wurde daher eine Vielzahl Caspasen-spezifischer Inhibitoren entwickelt, die auf der Substratspaltstelle der jeweiligen Caspase basieren (Ekert et al., 1999). Dabei handelt es sich um Peptide, die als Pseudosubstrate für aktive Caspasen und damit als kompetitive Inhibitoren fungieren. Es werden vor allem Peptide mit drei bis fünf Aminosäuren eingesetzt (s. auch Material und Methoden Punkt I.1.7). Der Inhibitionsmechanismus der synthetischen Inhibitoren wird durch die reaktive Gruppe bestimmt, die an das entsprechende Peptid gekoppelt wird. Eine Fluoro- oder Chloromethylketongruppen (-FMK oder -CMK) bildet ein Thiomethylketon II mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum der Caspase, woraufhin die Caspase irreversibel blockiert wird (Thornberry et al., 1994). Ein Peptid mit einer Aldehydgruppe (-CHO) wirkt als reversibler Inhibitor (Ekert et al., 1999). Möglicherweise können diese Peptidinhibitoren in der Zukunft als wirkungsvolle Pharmazeutika eingesetzt werden, die Apoptose in akuten Situationen, wie Herzinfarkt und Schlaganfall und ggf. auch in chronischen Erkrankungen, wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen, selektiv blockieren können.

### 1.6.3 Die Caspasensubstrate

Caspasen spielen nicht nur in der Initiationsphase der Apoptosesignaltransduktion eine wichtige Rolle, sondern repräsentieren zudem die enzymatische Aktivität, die für die Degradation zellulärer Proteine verantwortlich ist und somit den Apoptosephänotyp induziert. Während Apoptose wird nur eine begrenzte Anzahl von zellulären Proteinen gespalten. Zweidimensionale SDS-PAGE-Analyse von nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellextrakten zeigte, daß etwa

200 Polypeptide proteolytisch degradiert werden (Martin und Green, 1995). Die physiologische Relevanz, die sich hinter der Spaltung einer Vielzahl zellulärer Proteine verbirgt, läßt sich wie folgt zusammenfassen:

- I. Strukturproteine, die Schlüsselfunktionen im zellulären Zytoskelett besitzen, werden proteolytisch degradiert. Dies führt letztlich zur Kondensation von Kern und Zytoplasma und zur Ausbildung apoptotischer Körperchen.

Zytoskelett	Signaltransduktion	DNA-/RNA-Metabolismus	Sonstige Prozesse
FAK	Rb	SBMA-AR	PARP
II-Fodrin	HDM2/MDM2	STAT-1	DNA-PKcs
-II-Fodrin	p21 <sup>CIP1/WAF1</sup>	SRP p72	Rad51
Gelsolin	SREBP	PISTLRE Kinase	Acinus
Cytokeratin 18	I- B	PAK2	DFF45
LAP2	cPLA-2	p59 <sup>FYN</sup>	DNA-RFC140
Rababtin	PKC	CaMk-IV	U1-70 kDa
Aktin	MEKK-1	p28BAP31	hnRNP-C1/C2
Gas2	Mst1	proIL16	Sp1
Lamine	PRK2	Procaspasen	MCM3
NuMA	PP2A	p27 <sup>KIP1</sup>	CDC27
D4-GDI	Bcl-2	Wee1	SAF
	Bcl-x <sub>L</sub>	RasGAP	hnRNP-U
	Bid	RAF1	hnRNP-A1
	Akt1	Cbl	
	PKN		

**Tabelle 1. Die Caspasensubstrate.** Proteine, die während Apoptose Caspasen-vermittelt gespalten werden, lassen sich in vier Gruppen einteilen: Zytoskelettale Proteine, Signalmoleküle und Proteine, die im Rahmen des DNA/RNA-Metabolismus sowie anderer zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle spielen. PARP, Poly(ADP-Ribose) Polymerase; DNA-PKcs, katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase; Rad51, Säugetierhomolog von RecA; Acinus, "apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus"; DFF45, 45 kDa-Komponente des DNA-Fragmentierungsfaktors, auch als I-CAD bezeichnet ("inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease"); DNA-RFC140, 140 kDa-Untereinheit des DNA Replikationsfaktors C; Rb Retinoblastoma-Genprodukt; MDM2, murine double-minute chromosome mdm2-Onkogen; p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, 21 kDa-Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen; NuMA, "nuclear-mitotic apparatus protein"; ATM, "ataxia telangiectasia mutated gene product; U1-70 kDa, 70 kDa Komponente des U1 "small nuclear ribonucleoprotein; hnRNP-C1/C2, "heteronukleare Ribonukleoproteine C1 and C2; SREBP, "sterol responsive element binding protein"; I- B, -Isoform des Rel/NF- B Inhibitors; D4-GDI, Rho GDP-Dissoziationsinhibitor D4; cPLA2, zytosolische Phospholipase A2; PKC, Proteinkinase C; MEKK-1, MEK-Kinase-1; Mst1 (auch als Krs2 bezeichnet), Säugetierhomolog des Ste20-Kinase in Hefe; PRK2, "protein kinase C-related kinase 2"; PP2A, Proteinphosphatase 2A; FAK, "focal adhesion kinase"; LAP2, "lamin associated protein 2"; Nup153, 153 kDa- Nukleoporin; Rabaptin-5, Rab5 GTPase-Effektorprotein; APC, "adenomatous polyposis coli oncosuppressor protein"; Hsp90, "90 kDa heat shock protein"; UbqCE NEDD4, "ubiquitin conjugating enzyme neural-expressed developmentally downregulated gene 4 protein"; Bcl-2, "B-cell lymphoma gene 2 product"; SBMA-AR, Androgenrezeptor, der in spinaler Muskeldystrophie (Kennedy's disease) defekt ist; STAT1, "signal transducer and activator of transcription factor 1"; SRPp72, 72 kDa-Protein des "signal recognition particle"; NF- B, "nuclear factor- $\kappa$ B" Transkriptionsfaktor; PISTLRE kinase, p34<sup>CDC2</sup>-ähnliche Proteinkinase; PAK2 (auch als PAK65, -PAK, PAKI bezeichnet), p21-aktivierte Proteinkinase; p59<sup>FYN</sup>, Src-ähnliche Tyrosinkinase p59 FYN; CaMK-IV, Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV; p28BAP31, 28 kDa großes Bcl-2-interagierende Protein; Gas2, "growth arrest-specific gene product 2"; Bcl-x<sub>L</sub>, lange Form des Bcl-2-ähnlichen Genprodukts X; BID, "BH3 interacting domain death agonist"; -APP, "amyloid- precursor protein"; proIL-16, pro-Interleukin-16; MCM3, "minichromosome maintenance protein 3"; p27<sup>KIP1</sup>, 27 kDa Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor; Wee1, Wee1 Kinase, Inhibitor von Cdc2 and Cdk2; SAF-A/hnRNP-U, "scaffold attachment factor A/heteronukleares Ribonukleoprotein U"; hnRNP-A1, "heteronukleares Ribonukleoprotein A1"; RasGAP, "Ras GTPase-aktivierendes Protein"; Raf1, "Ras aktiverter/assoziierter Factor 1"; PKN, Proteinkinase N. Verändert nach Nicholson, 2000.



- II. Prozesse, wie DNA-Replikation, -transkription oder -reparatur, Splicing, Translation und Zellzyklusprogression/Proliferation werden durch Spaltung involvierter Proteine abgebrochen, da es sich um energieverbrauchende und dem Zelltod entgegengesetzte Ereignisse handelt.
- III. Solche Prozesse, die für die Phagozytose und damit für die Eliminierung einer Zelle aus einem Zellverband notwendig sind, werden durch proteolytische Aktivierung bestimmter Proteine induziert.

Tabelle 1 faßt sämtliche, bisher identifizierte Todessubstrate zusammen, die sich in Proteine unterteilen lassen, die im Zytoskelett, im DNA-RNA-Metabolismus, in der Signaltransduktion, sowie in anderen zellulären Prozessen wichtige Rollen spielen. Insbesondere die molekularen Grundlagen der morphologischen Veränderungen, denen eine Zelle während Apoptose unterworfen ist, wurden nur ansatzweise verstanden. Die Identifizierung einiger zytoskelettaler Proteine als Caspasensubstrate zeigte jedoch potentielle Mechanismen auf. So wird Aktin während Apoptose Caspasen-vermittelt gespalten (Brown et al., 1997; Chen et al., 1996; Kayalar et al. 1996; Mashima et al., 1997, 1999). Ektope Expression der Aktinspaltfragmente führt zu morphologischen Veränderungen in der transfizierten Zelle, die jenen ähnelt, die in einer apoptotischen Zellen beobachtet werden kann (Mashima et al., 1999). Aktinspaltung kann somit zur Apoptosemorphologie beitragen. Gas2 ist eine weitere Komponente des Mikrofilamentsystems, die ein Caspasensubstrat darstellt. Gas2 wird durch Caspase-3 und Caspase-7 *in vitro* gespalten (Sgorbissa et al., 1999; Brancolini et al., 1995), woraufhin ein Spaltfragment gebildet wird, das dramatische Reorganisationsprozesse im Aktinzytoskelett auslöst und damit die Zellmorphologie maßgeblich beeinflußt (Sgorbissa et al., 1999). Gelsolin, ein Mikrofilament-assoziiertes Protein, wird ebenfalls durch Caspasen gespalten. Dabei entsteht ein N-terminales Spaltfragment, das nach Überexpression Aktindepolymerisation auslöst und zytoplasmatische und nukleare Kondensation induziert (Geng et al., 1997; Kothakota et al., 1997). Darüber hinaus zeigen Neutrophile von Gelsolin-defizienten Mäusen nach TNF - Stimulation eine verzögerte DNA-Fragmentierung und die von Natur aus Gelsolin-negativen HeLa-Zellen wurden nach Rekonstitution mit Gelsolin sensitiv gegenüber TNF -vermittelter Apoptose (Kothakota et al., 1997). Im Gegensatz zu dieser proapoptotischen Funktion von Gelsolin zeigten andere Studien, daß Apoptose nach Überexpression von Gelsolin blockiert ist, da Caspase-3 nicht aktiviert wird (Ohtsu et al., 1997). Ein potentieller Mechanismus für diese Inhibition könnte darin bestehen, daß Gelsolin zusammen mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat und den Caspasen 3 und 9 einen Komplex bildet, der die Aktivierung jener Caspasen unterbindet (Azuma et al., 2000). Darüber hinaus ist ein gewisser Anteil zellulären Gelsolins mit Mitochondrien assoziiert, wo er die Freisetzung von Cytochrom c und die Verminderung des mitochondrialen Transmembranpotentials verhindern kann (Koya et al., 2000). Apoptose ist jedoch nicht nur mit der Desintegration des Zytoplasmas, sondern darüber hinaus mit dem Kollaps nuklearer Strukturen verbunden (Prasad et al., 1999). Dabei spielt das Intermediärfilamentprotein Lamin, das ein Netzwerk zwischen Chromatin und der inneren Kernmembran ausbildet, eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer funktionellen

Kernarchitektur (Nigg, 1989). Verschiedene Studien zeigten, daß Lamine durch Caspase-6 (Orth et al., 1996; Rao et al., 1996; Takahasi et al., 1996) und durch eine nukleare, Calcium-abhängige Protease, die nicht zur Familie der Caspasen gehört, gespalten wird (Zhivotovsky et al., 1997). Die Überexpression von nicht-spaltbaren Formen der Lamine A und B führt dazu, daß Chromatinkondensation und die Zerstörung der Kernmembran inhibiert werden (Rao et al., 1996). Dies deutet darauf hin, daß die Laminspaltung ein wichtiger Schritt zur Desintegration nuklearer Strukturen ist.

Eine weitere Subfamilie der Intermediärfilamente, die Zytokeratine, zeigen dramatische Reorganisationen während Apoptose (Caulin et al., 1997). Zytokeratine spielen eine besonders wichtige Rolle in epithelialen Geweben. Zytokeratin 18 (CK18) zeigt in nicht-apoptotischen Epithelzellen eine netzwerkartige Verteilung, die in apoptotischen Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Statt dessen findet sich CK18 in Aggregaten, die im gesamten Zytoplasma verteilt sind. Diese Reorganisation geht einher mit DNA-Fragmentierung (Caulin et al., 1997). CK18 wird wie Lamin A und B durch Caspase-6 *in vitro* gespalten. Dies legt nahe, daß IF-Proteine während Apoptose nach einem ähnlichen Mechanismus degradiert werden (Caulin et al., 1997).

Neben der Desintegration zytoskelettaler Strukturen in Kern und Zytoplasma, sind DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation weitere wichtige Ereignisse während Apoptose. Proteine, die Schlüsselfunktionen im Rahmen dieser Prozesse übernehmen, wurden mit Acinus (für “**A**ppoptotic **C**hromatin **C**ondensation **I**nducer in the **N**ucleus”) und der Endonuklease CAD (für “**C**aspase-**A**ctivated **D**eoxyribonuclease”) identifiziert. In einer nicht-apoptotischen Zellen liegt CAD mit ihrem Inhibitor I-CAD komplexiert vor. Nach Apoptoseinduktion wird I-CAD durch Caspase-3 gespalten und dissoziiert somit von CAD, die daraufhin in den Kern transloziert und dort DNA fragmentiert (Enari et al., 1998; ; Halenbeck et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Acinus wird durch Caspase-3 proteolytisch aktiviert und ist verantwortlich für Chromatinkondensation *in vivo* und *in vitro*, ohne dabei DNA zu fragmentieren (Sahara et al., 1999).

## 1.7 Die Renaissance der Mitochondrien in der Apoptose

Apoptoseforschung der letzten Jahre war durch einen Paradigmenwechsel gekennzeichnet: Nicht mehr der Kern stellte jenes intrazelluläre Organell dar, das im Zentrum der Apoptose signaltransduktion stand, sondern das Mitochondrium, das Zelltod maßgeblich regulierte. Kinetische Studien belegten, daß Mitochondrien dramatische Veränderungen ihrer Membranintegrität zeigten noch bevor sich die klassischen proapoptotischen Merkmale manifestierten. Diese Veränderungen sind sowohl in der äußeren als auch in der inneren Mitochondrienmembran festzustellen. Das Transmembranpotential ( $\psi_M$ ) der inneren Mitochondrienmembran bricht zusammen. Parallel oder kurz vor dem Zusammenbruch von  $\psi_M$  wird die äußere Mitochondrienmembran permeabel und Proteine aus dem Intermembranraum werden ins Zytoplasma freigesetzt, wie z.B. verschiedene Procaspasen (Mancini et al., 1998; Susin et al., 1999b; Krajewski et al., 1999.) und Cytochrom c (Liu et al.,

1996; Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997; Kim et al., 1997; Kharbanda et al., 1997). Auf der Suche nach der mechanistischen Grundlage für den Zusammenbruch von  $\text{M}$  rückten Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie in den Vordergrund, die über porenbildende Domänen verfügen, die mit jenen Domänen bakterieller Toxine vergleichbar sind (Muchmore et al., 1996). Diese wachsende Familie von Apoptose-regulatorischen Genprodukten läßt sich in Apoptoseantagonisten wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1, Mcl-1 und A1, und in Apoptoseagonisten, zu denen Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bik und Hrk gehören (Kroemer, 1997), unterteilen. Diese Proteine unterscheiden sich sowohl in ihrem Gewebs- als auch in ihrem aktivierungsabhängigen Expressionsmuster. Weitere Unterschiede bestehen im strukturellen Aufbau. Die meisten Mitglieder dieser Familie besitzen eine Transmembranregion, während anderen diese Region fehlt. Diese Unterschiede beeinflussen die subzelluläre Verteilung dieser Moleküle.

Wie für Bax, Bak und Bid gezeigt, können diese Proteine in rekombinanter Form Membranpermeabilisierung auf isolierten Mitochondrien auslösen und repräsentieren somit eine Klasse proapoptotischer Moleküle, die über mitochondriale Porenbindung Apoptose auslösen können (Jürgensmeier et al., 1998; Marzo et al., 1998; Narita et al., 1998; Desagher et al., 1999; Pastorino et al., 1999). So transloziert Bax nach einer Vielzahl proapoptotischer Stimuli vom Zytoplasma zu den Mitochondrien und inseriert wahrscheinlich in Form eines Homodimers in die äußere mitochondriale Membran oder assoziiert als Monomer mit der äußeren Mitochondrienmembran in nicht-apoptotischen Zellen und zeigt nach Apoptoseinduktion eine Konformationsänderung, die zur Insertion in die Membran führt (Desagher et al., 1999; Griffith et al., 1999). Bim, ein weiteres proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie ist in nicht-apoptotischen Zellen durch Bindung an Dynein mit Mikrotubuli assoziiert und damit sequestriert, kann aber nach Apoptoseinduktion zu den Mitochondrien translozieren (Puthalakath et al., 1999). Die subzelluläre Lokalisation von Bad wird durch Kinasen und Phosphatasen reguliert. Nur nicht-phosphoryliertes Bad ist in der Lage mit antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zu interagieren, deren Funktion zu inhibieren und so die mitochondriale Membranpermeabilisierung zu induzieren. Bad kann an Serinrest 136 durch die Kinase Akt (auch als PKB oder RAC bezeichnet), durch die mitochondrial lokalisierte cAMP-anhängige Proteinkinase A an Ser112 oder durch Mitochondrien-assoziierte Kinase Raf phosphoryliert werden (Harada et al., 1999; Zha et al., 1996). Phosphorylierung von Bad führt dazu, daß es durch Bindung eines 14-3-3-Proteins im Zytoplasma und somit von seinem Wirkort, dem Mitochondrium, zurückgehalten wird (Zha et al., 1996). Bad kann auch durch die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert werden, woraufhin es seine proapoptotische Funktion, d.h. seine Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit antiapoptotischem Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> und damit zur Induktion der Membranpermeabilität wiedergewinnt (Wang et al., 1999). Bid ist ein weiteres proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie. Es wird durch Caspase-8 im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose gespalten, woraufhin das Spaltfragment p15Bid entsteht, welches zu den Mitochondrien transloziert und die Permeabilisierung induziert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999). Weitere Mechanismen, die zur Membranpermeabilisierung der Mitochondrien führen und Proteine der Bcl-2-Familie involvieren, sind die proteolytische Spaltung von Bcl-x<sub>L</sub>

und Bcl-2 durch Caspasen und die Phosphorylierung von Bcl-x<sub>L</sub>. Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> können durch Caspasen 1 und 3 gespalten werden, woraufhin Fragmente entstehen, die im Gegensatz zum ungespaltenen Protein proapoptotisch wirken (Kirsch et al., 1999). Bcl-x<sub>L</sub> kann zudem durch JNK (für “c-**J**un **N**-terminal **K**inase”) phosphoryliert und damit inaktiviert werden (Kharbanda et al., 2000). Es existiert somit eine Vielzahl verschiedener Mechanismen, die die Lokalisation und Funktion verschiedener pro- und antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie beeinflusst.

Welcher dieser Mechanismen ist nun verantwortlich für die Permeabilisierung sowohl der äußeren als auch der inneren Mitochondrienmembran? Drei Modelle werden diskutiert:

Das erste Modell führt die Verminderung von  $\Delta \psi_M$ , das osmotische Anschwellen der Matrix und die daraus resultierende Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran auf die Regulation von ANT (für “**A**denine **N**ucleotide **T**ranslocator”) zurück. Proapoptotische Mediatoren wie Calcium, Palmitat, Thiooxidantien, Bax, Bak oder das HIV-Protein Vpr interagieren mit ANT und wandeln dieses unter nicht-apoptotischen Bedingungen strikten Antiporter in eine nicht-spezifische Pore um (Marzo et al., 1998; Crompton et al., 1999; Brenner et al., 2000). Ein zweites Modell stellt Bax in den Mittelpunkt regulatorischer Mechanismen. Bax bildet dabei unabhängig von anderen mitochondrialen Proteinen einen Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran, dessen Aktivität durch Bid oder p15Bid verstärkt werden kann (Eskes et al., 1998; 2000). In einem dritten Modell wird VDAC (für “**V**oltage-**d**ependent **A**nion **C**hannel”) als Schlüsselmolekül für die mitochondriale Membranpermeabilisierung angesehen. Die Öffnung von VDAC und die damit direkt verbundene Cytochrom c-Freisetzung, kann durch Bax induziert und durch Bcl-2 *in vitro* inhibiert werden (Shimizu et al., 1999). Darüber hinaus steht VDAC in engem Kontakt mit ANT in der inneren Mitochondrienmembran. Beide Kanäle sind miteinander gekoppelt, so daß eine ANT-vermittelte Senkung von  $\Delta \psi_M$  dazu führt, daß VDAC geöffnet und damit die äußere Mitochondrienmembran permeabel wird (Vander Heiden und Thompson, 1999; Vander Heiden et al., 1999).

Die Entdeckung der sogenannten PT- (für “**P**ermeability **T**ransition-”) Pore gab neue Einblicke in die mechanistische Grundlage der mitochondrialen Membranpermeabilisierung. Es handelt sich dabei um einen komplex regulierten, dynamischen Multiproteinkomplex, der sich an Kontaktstellen von innerer und äußerer Mitochondrienmembran befindet (Beutner et al., 1996, 1998; O’Gorman et al., 1997). Die genaue Zusammensetzung dieses Komplexes ist noch nicht vollständig geklärt. Zytoplasmatische Proteine wie Hexokinase, Proteine der äußeren Mitochondrienmembran (wie ANT), der inneren mitochondrialen Membran (z.B. VDAC) und der Matrix (wie z.B. Cyclophilin D) sind Bestandteile dieses Komplexes (Susin et al., 1998). Die PT-Pore kann als ein Sensor und Integrator für eine Vielzahl pro- und antiapoptotischer Signale angesehen werden. Alle drei Modelle zur Erklärung der Membranpermeabilisierung in Mitochondrien während Apoptose betrachten isolierte Proteine in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran und basieren größtenteils auf Experimenten mit Liposomen. Sämtliche in diesen Modellen beschriebene Proteine liegen aber in der PT-Pore miteinander komplexiert vor und beeinflussen sich gegenseitig. Die Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen

scheint daher Folge eines komplexen Zusammenwirkens verschiedener miteinander interagierender Proteine zu sein. Die hier beschriebenen Modelle brauchen sich daher nicht auszuschließen, sondern ergänzen sich vielmehr.

Was sind die Konsequenzen der mitochondrialen Membranpermeabilisierung? Neben der verstärkten Produktion von Superoxidanionen und der damit verbundenen Oxidation einer Vielzahl zellulärer Metabolite, der Zerstörung der Ionen-Homöostase, des Redoxgleichgewichts und der dramatischen Veränderung des bioenergetischen Status, werden zwei wichtige Proteine aus den Mitochondrien freigesetzt, welche die Apoptosesignaltransduktion unterhalb der Mitochondrien initiieren: Cytochrom c und AIF (für "Apoptosis-Inducing Factor"). AIF ist ein Flavoprotein mit Homologie zu bakteriellen Oxidoreduktasen. In nicht-apoptotischen Zellen befindet es sich im Intermembranraum, wird nach Apoptoseinduktion freigesetzt und transloziert in den Kern, wo es Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auszulösen vermag (Susin et al., 1999a). Cytochrom c spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von Caspasen unterhalb der Mitochondrien. In Analogie zum Rezeptor/Adapter/Procaspase-Komplex an der Plasmamembran kann das sogenannte "Apoptosom" als mitochondrialer DISC angesehen werden. Dieser hochmolekulare Komplex besteht aus Apaf-1, Caspase-9, dATP und Cytochrom c und kann durch Bcl-x<sub>L</sub> reguliert werden (Hu et al., 1998; Pan et al., 1998). Apaf-1 ist ein Adaptermolekül, das Caspase-9 bindet und deren autoproteolytische Prozessierung gemäß dem "Induced proximity Model" bewirkt (Li et al., 1997). Cytochrom c und dATP sind notwendige Kofaktoren, die eine Konformationsänderung in Apaf-1 induzieren, die für die Aktivierung von Caspase-9 notwendig ist (Cecconi, 2000). Aktive Caspase-9 aktiviert Caspase-3 und Caspase-7 (Pan et al., 1998; Slee et al., 1999; Srinivasula et al., 1998). Caspase-3 kann entweder in einer Art Amplifikationsschritt Caspase-9 (Slee et al., 1999; Srinivasula et al., 1998) oder direkt Caspase-2 und Caspase-6 aktivieren. Caspase-6 kann daraufhin die Caspasen 8 und 10 prozessieren (Slee et al., 1999). Eine andere Studie schließt hingegen die Beteiligung der Caspase 2, 6, 8 und 10 an der Caspase-9/Apaf-1-initiierten postmitochondrialen Signalkaskade aus (Pan et al., 1998).

## 1.8 Zwei CD95-Signalwege

Welche Rolle spielen Mitochondrien und Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose? Einerseits wurde berichtet, daß die Transfektion von Bcl-2 in den Zielzellen zu vollständiger Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose führte (Jätelä et al., 1995), andererseits wurde eine teilweise Inhibition (Itoh et al., 1993; Martin et al., 1995; Enari et al., 1995) oder gar kein Schutz vor CD95-vermittelter Apoptose beobachtet (Strasser et al., 1995; Memon et al., 1995). Mit der Entdeckung zweier CD95-Signalwege konnten diese unterschiedlichen Ergebnisse auf Zelltyp-spezifische Unterschiede der CD95-Signaltransduktion zurückgeführt werden (Scaffidi et al., 1998). In sogenannten Typ I-Zellen werden große Mengen von Caspase-8 in kürzester Zeit am DISC aktiviert, während in Typ II-Zellen eine DISC-Bildung kaum nachweisbar und die Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zu Typ I-Zellen stark verzögert ist. Die geringen Mengen aktiver, am DISC gebildeter Caspase-8 reicht in Typ II-

Zellen nicht aus, um eine Caspasen-Kaskade durch direkte Aktivierung von Caspase-3 zu initiieren. Es bedarf eines Mitochondrien-abhängigen Amplifikationsschritts: Aktive Caspase-8 spaltet Bid, dessen Spaltfragment zu den Mitochondrien transloziert und dort Cytochrom c-Freisetzung und den Kollaps des Transmembranpotentials induziert. Sowohl CD95-vermittelte Apoptose als auch die Verringerung von  $m$  finden in beiden Zelltypen mit gleicher Kinetik statt. In Typ I-Zellen prozessiert die große Menge DISC-aktivierter Caspase-8 direkt Caspase-3. Zwar wird in Typ I-Zellen die apoptogene Aktivität der Mitochondrien ebenso wie in Typ II-Zellen induziert, die Signaltransduktion in diesen Zellen ist jedoch durch die direkte Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-8 schnell und Mitochondrien-unabhängig. Aufgrund dieser Tatsache läßt sich CD95-vermittelte Apoptose in Typ I-Zellen nicht durch mitochondriales Bcl-2/Bcl- $x_L$  blockieren. Demgegenüber zeigen Typ II-Zellen ein Blockade im CD95-Signalweg und damit keinen apoptotischen Phänotyp, wenn Bcl-2 oder Bcl- $x_L$  überexprimiert wird.

### 1.9 Der Zytolinker Plektin – Hauptintegrator zytoskelettaler Netzwerke

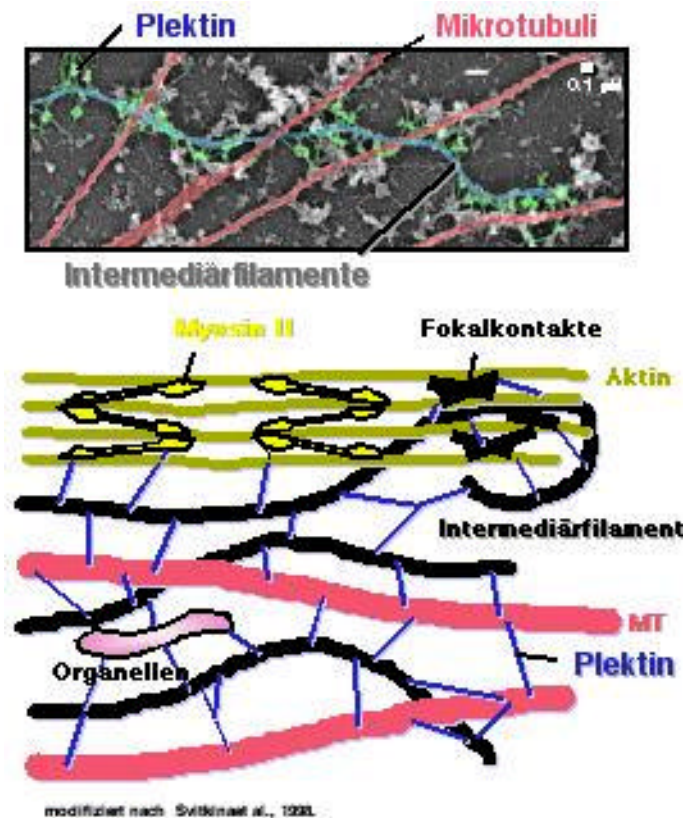
Caspasen können eine Vielzahl zytoskelettaler Proteine spalten (s. Punkt I.1.6.3). Wie diese Degradationsprozesse letztlich die zelluläre Desintegration während Apoptose hervorrufen, ist jedoch nur ansatzweise verstanden. Mit der Entdeckung der Zytolinker, einer neuartigen Proteinfamilie, revolutionierte die zellbiologische Forschung der letzten Jahre das Verständnis zytoskelettaler Strukturen und zeigte somit neue potentielle Mechanismen für die Morphologieveränderungen während Apoptose auf.

Das Zytoskelett von Eukaryonten ist in drei Netzwerken organisiert, die der Zelle eine stabilisierende und zugleich dynamische Infrastruktur verleihen. Mikrotubuli werden für den intrazellulären Transport von Vesikeln, Organellen und Proteinen genutzt, Aktinfilamente sind notwendig für Zellpolarität, Kontraktilität und Zellmigration. Das dritte zytoskelettale Netzwerk der Intermediärfilamente entstand evolutionär später und entwickelte sich aus exoskelettalen Strukturen zu einem Endoskelett, welches höheren Eukaryonten als mechanischer Integrator ihres Zytoplasma dient. Wie wichtig Intermediärfilamente für die Integrität zellulärer Strukturen sind, zeigte sich darin, daß eine Vielzahl degenerativer Erkrankungen auf Mutationen in Genen zurückzuführen ist, die für IF-Proteine kodieren.

Die Zytoarchitektur höherer Organismen zeigt eine enorme Vielfalt. Intermediärfilamente und ihre assoziierten Proteine sind maßgeblich für diese Heterogenität verantwortlich. Unterschiedliche Expressionsmuster verschiedener Intermediärfilamentproteine, unterschiedliche Splicevarianten und eine Vielzahl assoziierter Moleküle sorgen dafür, daß die physikalischen Eigenschaften des Zytoskelett in verschiedenen Geweben den jeweiligen gewebsspezifischen Ansprüchen genügt. Zellbiologische Forschung der letzten Jahre zeigte, daß die Mikrotubuli, die Mikrofilament- und die Intermediärfilamentnetzwerke nicht isoliert voneinander betrachtet werden können, sondern daß sie vielmehr in einer synergistischen Art und Weise funktionieren. Dabei spielen die sogenannten Zytolinker eine entscheidende Rolle, da sie mit einer Vielzahl zytoskelettaler Proteine der drei Netzwerke interagieren, sowie Mikrotubuli, Mikrofilamente und

Intermediärfilamente miteinander verbinden und somit maßgeblich nicht nur für die strukturelle Integrität, sondern auch für zelluläre Dynamik mitverantwortlich sind. Zu dieser Familie der Zytolinker, die auch als Plakinfamilie bezeichnet wird, gehören Desmoplakin, BPAG1e (für “**B**ullous **P**emphigoid **A**ntigen 1e”), Plektin, MAP1B, sowie das *Drosophila*-Plakin Kakapo und die Hefe Plakine Kar9p und Coronin. Dabei erwies sich Plektin als vielseitigstes und ubiquitär exprimiertes zytoskelettales Linkerprotein, das daher als Prototyp dieser Proteinfamilie angesehen werden kann. Plektin besitzt ein Molekulargewicht von etwa 500.000 Da. Aufgrund von Vorhersagen über die Sekundärstruktur basierend auf der Aminosäuresequenz und durch Elektronenmikroskopie von rekombinanten Plektinmolekülen konnten Aussagen über die

Domänenstruktur gemacht werden (Wiche et al., 1991; Foisner und Wiche, 1981): Plektin besteht aus einer etwa 200 nm langen, zentralen,  $\alpha$ -helikalen coiled-coil Stabdomäne, die von zwei C- bzw. N-terminalen globulären Domänen flankiert ist. Plektin interagiert mit einer Vielzahl zytoskelettaler Strukturen und Proteinen auf molekularer Ebene (Abbildung 4). Bisher konnte kein zweites Protein in der Zytolinkerfamilie identifiziert werden, das solch komplexe und vielfältige Bindungsaktivitäten besitzt. Plektin assoziiert mit den Intermediärfilamentproteinen Vimentin (Pytela und Wiche, 1980, Wiche et al., 1982), mit GFAP, epidermalen Zytokeratinen, Neurofilamentproteinen, Desmin (Foisner et al., 1988) und dem nuklearen Intermediärfilamentprotein Lamin B (Foisner et al., 1991). Die Bindungsstelle für Intermediärfilamente befindet sich in der C-terminalen globulären Domäne. Die Plektin/Intermediärfilamentassoziationen werden durch Phosphorylierungen reguliert: Die Bindungsaktivität von Plektin zu Lamin B kann durch PKA- und PKC-vermittelte Phosphorylierung beider Bindungspartner vermindert werden, während die Affinität zu Vimentin



**Abbildung 4. Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung der Bindungsaktivitäten von Plektin.** Plektin vernetzt die drei zytoskelettalen Netzwerke höherer Eukaryonten miteinander: das Mikrofilamentsystem, die Intermediärfilamente und die Mikrotubuli. Die einzelnen Filamentsysteme (Mikrotubuli, Intermediärfilamente, Mikrofilamente und Plektin) sind entsprechend gekennzeichnet.

durch PKA-vermittelte Phosphorylierung gesteigert, und durch PKC-vermittelte Phosphorylierung erniedrigt wird (Foisner et al., 1991). Während Mitose wird Plektin durch die Kinase p34<sup>cdc2</sup> phosphoryliert, woraufhin der Plektin/Vimentin-Komplex dissoziiert. Plektin kann dadurch Lamin B binden. Die Plektin/Lamin B-Interaktion kann zur Desintegration der Kernmatrix während Mitose und umgekehrt zum Wiederaufbau von Kernstrukturen nach der Zellteilung beitragen (Wiche, 1998). Plektin assoziiert fernerhin mit Mikrotubuli, wahrscheinlich indem es die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP1 und MAP2) bindet (Wiche et al., 1984; Zauner et al., 1992; Svitkina et al., 1996). Eine direkte Assoziation mit Tubulin ist jedoch nicht auszuschließen (Wiche, 1998). Am N-Terminus besitzt Plektin eine Aktin-bindende Domäne (ABD), die homolog zu jenen ABD ist, die in anderen Aktin-assoziiierenden Molekülen wie Spektrin oder Dystrophin gefunden wurde (Elliott et al., 1997) und die sich hinsichtlich Aktinbindung als funktional erwies (Foisner et al., 1995; Andrä et al., 1998). Neben der Quervernetzung zytoplasmatischer Netzwerke ist Plektin zudem essentieller Bestandteil des submembranösen Zytoskeletts, von Desmosomen und Hemidesmosomen (Wiche, 1998). Die Tatsache, daß Plektin in mehr als 20 verschiedenen Spliceformen mit unterschiedlichen Bindungsaktivitäten vorkommt, potenziert die ohnehin vorhandene Vielfalt von Interaktionen mit den verschiedenen zytoskelettalen Strukturen (Wiche, 1998).

Die gesamte Bedeutung von Plektin für eine funktionelle Zytoarchitektur zeigte sich, als Plektindefizienzen in Mensch und Maus näher untersucht wurden. Einige Studien berichteten, daß Patienten, die unter Epidermolysis bullosa simplex begleitet von Muskeldystrophie [(EBS)-MD] leiden, keine Plektinexpression in Haut und Muskel besitzen. Dieser Defekt wurde auf eine homozygote Mutation im Plektin zurückgeführt (Gache et al., 1996; Smith et al., 1996; McLean et al., 1996; Pulkkinen et al., 1996; Chavanas et al., 1996). Dieser mit (EBS)-MD assoziierte Phänotyp in Haut und Muskel wurde auch bei Plektin-defiziente Mäusen nachgewiesen (Andrä et al., 1997). Diese Mäuse sterben zwei bis drei Tage nach ihrer Geburt und zeigen schwere Hautabnormalitäten, da Keratinozyten vollkommen degeneriert sind. Eine detaillierte Studie des Phänotyps von Plektin<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte darüber hinaus, daß Plektin möglicherweise auch bei anderen Krankheiten ein wichtige Rolle spielt, wie z.B. Myopathien, insbesondere Kardiomyopathien, da die Mäuse Abnormalitäten im Herzmuskel zeigen, die durch eine Degeneration der Interkalationsscheiben zu erklären sind (Magliocco et al., 1989; Bertini et al., 1990; Andrä et al., 1997). Diese Studien an EBS-MD-Patienten und an Plektin-defizienten Mäusen unterstützen jenes Konzept, daß Plektin ein Stabilisator zellulärer Strukturen gegen mechanischen Streß darstellt. Die Analyse von Fibroblasten, die von Plektin-K.O.-Mäusen abgeleitet sind, erweiterte dieses Konzept. Diese primären embryonalen Fibroblasten zeigten im Gegensatz zu den entsprechenden, von Wildtyp-Mäusen abgeleiteten Zellen, keine Reorganisation des Aktinmikrofilamentsystems nach Aktivierung von Rho, Rac oder der Cdc42-Signalkaskade. Demzufolge konnte keine Aktinstreßfaser- (nach Rho-Aktivierung), keine Lamellipodien- (nach Rac-Stimulation) oder Filipodienbildung (durch Cdc42-Stimulation) beobachtet werden (Andrä et al., 1998). Plektin verleiht der Zelle daher nicht nur mechanische Stabilität, sondern fungiert darüber hinaus auch als Regulator dynamischer Prozesse.



## 1.10 Aufgabenstellung

Apoptose oder programmierter Zelltod stellt die häufigste Form von Zelltod im Organismus dar. Die Dysregulation dieses zellulären Prozesses, der an Gewebshomöostase und -entwicklung beteiligt ist, kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Eine Störung des Apoptosegleichgewichts insbesondere aufgrund einer Fehlregulation CD95-vermittelter Apoptose trägt zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Krebs oder AIDS bei. Um therapeutisch in solche Fehlregulationen eingreifen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die Signalwege des CD95-Rezeptors zu entschlüsseln.

Apoptoseinduktion durch den agonistischen anti-CD95-Antikörper oder durch den physiologischen CD95L führt zur Bildung des Tod-induzierenden Signalkomplexes (DISC), der die Aktivierung von Caspase-8 bewirkt. Während diese Rezeptor-proximalen Ereignisse CD95-vermittelter Apoptose detailliert charakterisiert wurden, ist jedoch wenig über die Effektorfunktion von Caspase-8 bekannt. Caspase-8 ist eine Initiatorcaspase, die durch Spaltung von Bid und Caspase-3 die Mitochondrien-abhängige bzw. -unabhängige Apoptosesignaltransduktion startet und durch Spaltung der Kinase RIP die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Rahmen TNF-vermittelter Apoptose inhibiert. Welche anderen Proteine kann Caspase-8 spalten und welche funktionelle Bedeutung haben diese Proteolyseereignisse? Es sollte zunächst die intrazelluläre Lokalisation insbesondere des aktiven Enzyms bestimmt werden, um so vom subzellulären Kompartiment Rückschlüsse auf potentielle *in vivo*-Substrate ziehen zu können.

Geninaktivierungsstudien in Mäusen sowie die Identifizierung als Tumorsuppressor zeigten die enorme Bedeutung von Caspase-8. Die Regulation dieser Aktivität muß daher verstanden werden, um ggf. therapeutisch eingreifen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher auch die Regulationsmechanismen von Caspase-8 näher untersucht werden, insbesondere ob und in welcher Weise Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie die Aktivität von Caspase-8 modulieren.

Caspase-8 verfügt über spezialisierte Protein-Protein-Interaktionsmodule, die als Todeseffektordomänen (DED) bezeichnet werden. Mit Hilfe dieser DED bindet Caspase-8 an den DISC. Caspase-8 ist nur ein Beispiel für eine Reihe von Proteinen, die über DED verfügen und Schlüsselfunktionen im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Signaltransduktion besitzen. Es sollten daher neuartige DED-Proteine identifiziert und molekular charakterisiert werden, die Effektorfunktionen im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose übernehmen können, um somit jene Prozesse besser verstehen zu können, die das an der Plasmamembran initiierte proapoptotische Signal in metabolische und morphologisch-sichtbare Effekte umwandeln.

## II. Material und Methoden

### 1 Allgemeine Materialien

#### 1.1 Chemikalien

**Amersham-Buchler, Braunschweig:** [  $^{32}$ -P]ATP; Rainbow<sup>TM</sup> coloured protein molecular weight markers (14.300 – 220.000 Da)

**Conco, Wiesbaden:** Fötales Kälberserum (FKS)

**Difco, Detroit, USA:** Bacto-Agar; Hefeextrakt; Trypton

**Gibco-BRL, Karlsruhe:** Agarose; Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); Gentamicin (G418); N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES); Hygromycin B; RPMI 1640 Zellkulturmedium

**Kodak, Rochester, USA:** Röntgenfilme X-Omat AR

**Perkin Elmer Cetus, New Jersey, USA:** GeneAmp<sup>R</sup> RNA PCR Core Kit

**Pharmacia Biotech, Freiburg:** Glutathion-Sepharose 4B, Protein A-Sepahrose, BrCN-aktivierte Sepahrose

**Qiagen, Düsseldorf:** QIAquick Gel Extraction Kit; QIAquick Nucleotide Removal Kit; QIAquick PCR Purification Kit; RNeasy Mini Kit

**Roth, Karlsruhe:** Rotiphorese Gel 30; Phenol

**Serva, Heidelberg:** Ammoniumpersulfat (APS); Isopropylthiogalactosid (IPTG); Rinderserumalbumin (BSA); Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Natriumdodecylsulfat (SDS); Tetraethylmethyldiamin (TEMED); Triton X-100; Trypanblau; Xylencyanol

**Sigma, München, St. Louis, USA:** Ampicillin; Cäsiumchlorid ( $\text{CsCl}_2$ ); Dithiothreitol (DTT); Ethidiumbromid; Diethylpyrocarbonat (DEPC); Glutathion (in reduzierter Form), Propidiumiodid

Standard-Chemikalien wurden in reiner Form (p.a.) von folgenden Firmen bezogen: Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma, München, St. Louis, USA; Fisher, Hanover Park, USA; Fluka, Neu-Ulm.

## 1.2 Häufig verwendete Puffer

DNA-Probenpuffer (10 x):	50 %	Glycerin (v/v)
	0,42 %	Bromphenolblau (w/v)
	0,42 %	Xylencyanol (w/v)
Fixierlösung	20%	MeOH (v/v)
	10%	Essigsäure (v/v)
Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM	Tris-Base
	1,9 M	Glycin
	0,1%	SDS (w/v)
Lysepuffer (Eukaryonten):	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1 mM	PMSF
	10 %	Glycerin (w/v)
	1 %	Triton X-100 (w/v)
	0,5 µg/ml	Antipain
	0,5 µg/ml	Chymostatin A
	0,5 µg/ml	Leupeptin
Nikolettipuffer:	0,1 %	Natriumcitrat (w/v)
	0,1 %	Triton X-100 (w/v)
	50 µg/ml	Propidiumiodid
PBS:	137 mM	NaCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 7,4
Probenpuffer reduz. (5 x):	50%	Glycerin
	10%	SDS (w/v)
	50mM	Tris, pH = 6,8
	25%	-Mercaptoethanol (v/v)

	0,25 mg/ml	Bromphenolblau	
TBE (10 x):	0,45 M	Tris	
	0,45 M	Borsäure	
	10 mM	EDTA	pH = 8,3
TE:	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	pH = 7,5
Sammelgel (5 %):	24 mM	Tris-HCl, pH = 6,8	
	5 %	Acrylamid (w/v)	
	0,1 %	SDS (w/v)	
	0,1 %	APS (w/v)	
	0,1 %	TEMED (w/v)	
Transferpuffer Westernblot:	25 mM	Tris-Base	
	0,19 M	Glycin	
	20 %	MeOH (v/v)	
	0,037 %	SDS (w/v)	
Trenngel:	37,5 mM	Tris-HCl, pH = 8,8	
	7,5-15 %	Acrylamid (w/v)	
	0,1 %	SDS (w/v)	
	0,03 %	APS (w/v)	
	0,1 %	TEMED (w/v)	

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

### 1.3 Geräte

Gerät		Hersteller
Autoradiographiekassetten		Fisher Scientific
Blotting-Apparatur	Trans-Blot	Owl
	Semi-Dry	Fisher Scientific
Brutschränke	Steri-Cult	Fisher Scientific
	Incubator	
Durchflußzytometer	FACScan	Becton Dickinson
ELISA-Reader		SLT Labinstruments

Gefrierschränke:	-20 °C -80 °C	GE Legaci Ref. Systems Series
Geiger-Müller-Zählrohr 900		Owl, CTI
Gelelektrophoresekammern		Köttermann
Heizbad		Eppendorf
Heizblock Thermostat 5320		Zeiss
Mikroskope:	Lichtmikroskop ID 02	Leitz
	Phasenkontrastmikroskop Labovert FS	
Mikrowellengerät HMG730B		GE
Minigelelektrophoresekammer		Owl
Netzgerät Electrophoresis Power Supply PS 500		EC Apparatus Corporation
pH-Meter Calimatic		Fisher Scientific
Photoeinheit:	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
	Kamera RA1	Fisher Scientific
	Video Graphic Printer UP- 860 CE	Sony
Photometer U-1100		Hitachi
Quarzküvetten Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsgerät Curix 160		Kodak
Schüttelinkubator Certomat HK		Fisher Scientific
Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Company
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Fisher Scientific
	Präzisionswaage PE 3600	Fisher Scientific
Zählkammer Neubauer		Sigma
Zentrifugen:	Allegra 6R	Beckmann
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS	DuPont

## 1.4 Biologisches Material

### 1.4.1 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Verwendung	Bezugsquelle
XL1 blue	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen
BL21	Produktion von Fusionsproteinen	Novagen
BL21 (DE3)	Produktion von Fusionsproteinen	Novagen

## 1.4.2 Eukaryontische Zellen

Alle verwendeten Zellen waren menschlichen Ursprungs.

Zelllinie	Herkunft
SKW6.4	B-lymphoblastoide Zelllinie
BJAB	EBV-negative humane Burkitt-ähnliche lymphoblastoide Zelllinie
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie-Linie
H9	humane T-Zell-Leukämie-Linie
CEM	humane T-Zell-Leukämie-Linie
HepG2	Hepatomazelllinie
MCF7	Mammakarzinomzelllinie
MCF7-vec, -Casp-3	Mammakarzinomzelllinie mit Vektor oder Caspase-3 transfiziert
MCF7-Fas-vec, -Fas-Bcl-x <sub>L</sub>	Mammakarzinomzelllinie mit CD95 (Fas) oder mit CD95 und Bcl-x <sub>L</sub> transfiziert
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 <sub>L</sub>	humane T-Zell-Leukämie-Linie mit Bcl-x <sub>L</sub> oder Vektor transfiziert
293T	embryonale Nierenzelllinie

## 1.5 Nährmedien

### 1.5.1 Medien für die Zellkultur

Die Zellkulturmedien RPMI 1640 und DMEM wurden von den Firmen Gibco BRL (Grand Island, NY), bzw. Cellgro (Boston) bezogen. Vor der Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen komplementiert.

10 % (v/v)	FKS	Gibco BRL (Grand Island, NY)
10 mM	HEPES	Gibco BRL (Grand Island, NY)
50 µg/ml	Gentamicin	Gibco BRL (Grand Island, NY)

Geneticin (Sigma, St. Louis, MO) und Hygromycin B (Sigma, St. Louis, MO) wurden zur Selektion von eukaryontischen Zellen eingesetzt.

### 1.5.2 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 (Amp; 100 µg/ml) zugegeben.

### 1.6 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind gegen menschliche Proteine gerichtet.

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-APO-1 (IgG3)	CD95	Trauth et al., 1989
FII23 (IgG3)	unbekannt	Trauth et al., 1989
1C4 (IgG1), 1B5 (IgG2a) (Maus, monoklonal)	FADD	Scaffidi et al., 2000
anti-FADD (IgG1) (Maus, monoklonal)	FADD	Transduction Laboratories
C15 (IgG2b) (Maus, monoklonal)	Caspase-8 p18 Untereinheit	Scaffidi et al., 1997
C1 (IgG1) (Maus, monoklonal)	Caspase-8 P18-Untereinheit	Scaffidi et al., 1997
N2 (IgG1) (Maus, monoklonal)	Caspase-8 Prodomäne	Scaffidi et al., 1997
NF-6 (IgG1) (Maus, monoklonal)	c-FLIP	Scaffidi et al., 1998
anti-DEDD (Kaninchen, polyklonal)	DEDD (AS 139-158: CRAFSDPEPRPPQPSKTGPPH)	Stegh et al., 1998
anti-Bcl-x <sub>L</sub> (Kaninchen, polyklonal)	Bcl-x <sub>L</sub>	Transduction Laboratories
anti-Bid (Ziege, polyklonal)	Bid	Santa Cruz Biotechnology
anti-Cytochrom c (IgG2b) (Maus, monoklonal)	Cytochrom c (AS 93-104)	Pharmingen, San Diego, USA

anti-p60 (Maus, monoklonal)	unbekanntes mitochondriales Antigen	BioGenex, San Ramon, USA
anti-PDI (Kaninchen, polyklonal)	Proteindisulfidisomerase	Dr. Söling, MPI Göttingen
anti-UBF (humanes Serum)	UBF	Prof. Dr. Ingrid Grummt, DKFZ, Heidelberg
anti-Gelsolin (Maus, monoklonal)	Gelsolin	Sigma
anti-Lamin B (Maus, monoklonal)	Lamin B	Promega
anti-CK18 (Maus, monoklonal)	Zytokeratin 18 (K <sub>s</sub> 18.174)	Prof. Werner Francke, DKFZ, Heidelberg
anti-CK8 (Maus, monoklonal)	Zytokeratin 8 (K <sub>s</sub> 8.17.2)	Prof. Werner Francke, DKFZ, Heidelberg
anti-Plectin-C (Hamster, polyklonal)	Plectin (6. Reptitionsdomäne)	Stegh et al., 2000
anti-Plectin-N (Hamster, polyklonal)	Plectin (AS 587-601: RLLFNDVQTLKDGRH)	Stegh et al., 2000
anti-FLAG (IgG1) (Maus, monoklonal)	FLAG Epitop	IBI Kodak
10F7	Glycophorin	Dr. Gijis van Seventer, University of Chicago
3G8	CD16	Dr. Gijis van Seventer, University of Chicago
FMC63	CD19	Dr. Gijis van Seventer, University of Chicago
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
anti-Maus IgG, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG, Fc-spezifisch	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG, FITC	Maus IgG, Fc-spezifisch	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG, PE	Maus IgG, Fc-spezifisch	Dianova, Hamburg



## 1.7 Caspaseninhibitoren

Name	Verbindung	Bezugsquelle
zVAD-FMK	Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Enzyme System Products (Dublin, Ca, USA)
zDEVD-FMK	Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Enzyme System Products (Dublin, Ca, USA)
zIETD-FMK	Benzoxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Enzyme System Products (Dublin, Ca, USA)
Ac-YVAD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Ac-DEVD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd	Bachem, Bubendorf, Schweiz

Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst und bei -70° C gelagert.

## 1.8 Caspasenpeptidsubstrate

Name	Verbindung	Bezugsquelle
zVDVAF-AFC	Benzoxycarbonyl-Val-Asp-Val-Asp-Phe-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
zDEVD-AFC	Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
zVEID-AFC	Benzoxycarbonyl-Val-Glu-Ile-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
zIETD-AFC	Benzoxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Ac-LEHD-AFC	Benzoxycarbonyl-Leu-Glu-His-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz

Die Peptidsubstrate wurden in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst und bei -70° C gelagert.

## 1.9 Molekularbiologische Materialien

### 1.9.1 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

### 1.9.2 Enzyme und Kits

Es wurden folgende Enzyme verwendet:

Enzym	Bezugsquelle
RNase (DNase frei)	Boehringer, Mannheim
Vent <sub>r</sub> <sup>TM</sup> DNA Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Murine LV Reverse Transkriptase	Perkin Elmer, New Jersey, USA
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas

Die verschiedenen Restriktionsenzyme wurden von Boehringer Mannheim und AGS (Heidelberg) bezogen. Für die *in vitro*-Translation von Proteinen wurde das TNT<sup>®</sup>-gekoppelte Retikulozytenlysat-System von Promega (Madison, USA) verwendet.

## 2 Molekularbiologische Methoden

### 2.1 Anzucht von Bakterien

*E. coli*-Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten bei 37°C angezogen. Für die Anzucht von Plasmid-tragenden Stämmen wurde Selektionsmedium verwendet, dem Ampicillin (100 µg/ml) hinzugefügt worden war. Für die Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit Zellen einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (200 UpM; 37°C) inkubiert. Einzelkulturen der Bakterienstämme wurden auf LB-Agar-Platten bei 4°C aufbewahrt und Glycerinkulturen der Bakterien angelegt, indem zu einer frischen Übernachtskultur Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50% gegeben wurde. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80°C.

### 2.2 Isolierung und Reinigung von RNA und DNA

#### 2.2.1 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien erfolgte mit Hilfe des "RNeasy-Kits" von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen (ca.  $2,5 \times 10^6$ ) wurden abzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 350 µl Lysepuffer RLT (mit 10 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol/ml) lysiert und homogenisiert. Um die DNA zu scheren, wurde die Lösung mehrmals durch eine Injektionsnadel (0,9 x 40 mm) gezogen. Danach wurde das Homogenisat mit dem gleichen Volumen an 70%igem Ethanol versetzt, auf eine RNeasy-Säule überführt und für 30 s bei 13000 UpM in der Tischzentrifuge (RT) zentrifugiert. Unter den Hochsalzbedingungen band die RNA an das Säulenmaterial. Die Säule mit der RNA wurde einmal mit 700 µl des Puffers RW1 und zweimal mit 500 µl des Puffers RPE gewaschen (Zentrifugation: jeweils 30 s; 13000 UpM; RT; Tischzentrifuge). Anschließend konnte die Gesamt-RNA mit 30 µl DEPC-Wasser von der Säule eluiert werden (Zentrifugation: 1 min, 13000 UpM, RT; Tischzentrifuge).

#### 2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

##### a) in kleinem Maßstab mit Hilfe der alkalischen Lyse

Die verwendete DNA-Minipräparationsmethode ist angelehnt an die „alkalische Lyse-Methode“ nach Birnboim und Doly (1979). Die gewonnene Plasmid-DNA ist hinreichend rein für Restriktionsanalysen und direkte Sequenzierungen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Tischzentrifuge. 1 ml einer 5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde pelletiert (1 min; 12000

UpM; RT) und in 200 µl GTE-Puffer (5 mM Glucose; 0,5 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Lyse-Puffer (0,2 N NaOH; 1% SDS), 5 min Inkubation auf Eis, Zugabe von 300 µl einer eiskalten 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,8) und einer weiteren fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden Zellfragmente und chromosomale DNA abzentrifugiert (10 min; 14000 UpM; 4°C). Zur Fällung der Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde dieser mit 1 bis 1,5 Vol. absolutem Ethanol (-20°C) versetzt und sofort zentrifugiert (10 min; 14000 UpM; 4°C). Das Pellet wurde einmal mit 70%igem EtOH gewaschen (5 min; 14000 UpM; 4°C) und in 40 µl TE-Puffer (plus 1µl RNase) aufgenommen.

### **b) in großem Maßstab mit dem Qiagen Maxiprep Kit**

Um große Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das Maxi Plasmid Reinigungsprotokoll von Qiagen verwendet. 400 ml einer über Nacht Bakterien-Kultur wurden abzentrifugiert (10 min; 3000 UpM; 4°C; Sorvall-Zentrifuge; GSA-Rotor), in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eiskalter Puffer P3 hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000 UpM; 30 min; 4°C; Sorvall-Zentrifuge; SS34-Rotor) wurde der Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 500 Säule gegeben und die Säule anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml des Puffers QF von der Säule eluiert. Das Eluat wurde zur DNA Fällung mit 10,5 ml Isopropanol vermischt, die DNA abzentrifugiert (6000 UpM; 30 min; 4°C), mit 70%igem Alkohol gewaschen und in 200 - 300 µl TE-Puffer gelöst.

## **2.3 Auftrennung und Elution von DNA-Fragmenten**

### **a) Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Agarose in einer Konzentration von 0,7% bis 2,0% eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer im Mikrowellenherd kurz aufgeköcht. Nach abkühlen auf ca. 55°C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in einen waagerechten Gelschlitten gegossen. Ein Kamm im Gel hielt Taschen frei. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer (5x) gemischt und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Laufpuffer bei 90 V (ca. 6 V pro cm) für 1 bis 3 h. Da Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren interkaliert und durch UV-Licht (315 nm) zur Fluoreszenz angeregt wird, konnte das Ergebnis der Elektrophorese fotografisch dokumentiert werden. Die Länge unbekannter DNA-Fragmente konnte durch den Vergleich mit einem DNA-Marker, der mit auf das Gel aufgetragen wurde, ermittelt werden.

### **b) Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel**

Um ein DNA-Fragment von anderen Fragmenten zu trennen, beispielsweise nach einem Restriktionsverdau (siehe Punkt II.2.4), wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (gemäß dem Protokoll des Herstellers) verwendet: Die DNA wurde in einem 1%igen "low-melting-point"-Agarosegel in TE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Auf dem UV-Leuchttisch (315 nm) wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten, gewogen und mit dem dreifachen Gewicht der Agarose (1 µg 1 µl) an Puffer QX1 versetzt. Um die Agarose zu schmelzen und die DNA in Lösung zu bringen, wurde der Ansatz für ca. 10 min bei 50° C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit einem Drittel des Volumens an QX1-Puffer versetzt, mit Isopropanol vermischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Durch Zentrifugation (13000 UpM; RT; Tischzentrifuge) wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden, die Säule anschließend einmal mit Puffer PE gewaschen und zur Entfernung von Ethanol-Resten noch einmal trocken zentrifugiert. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

## **2.4 Restriktionsspaltung von DNA**

Je nach Restriktionsenzym wurden die vom Hersteller (AGS, Heidelberg) empfohlenen Reaktionsbedingungen durch 10fache Verdünnung der entsprechenden Reaktionspuffer eingestellt. Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab erfolgte in 10 bis 20 µl, wobei 1 µg DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym 1-2 h bei 37°C inkubiert wurde. Das Ansatzvolumen für Spaltungen im präparativen Maßstab richtete sich nach der Menge der eingesetzten DNA (Endkonzentration: 0,1 bis 0,2 µg/µl). Vor der Gelelektrophorese wurde dem Restriktionsansatz die entsprechende Menge an 5x Probenpuffer hinzugefügt.

## **2.5 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden**

Die Entfernung von Phosphatgruppen an den 5'-Enden linearisierter Vektor-DNA verhindert die Religation des Vektors ohne das zu klonierende Insert (Ligation; siehe Punkt II.2.6) und erhöht damit die Klonierungseffizienz. 1 bis 2 µg linearisierte Vektor-DNA wurden mit 10x Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) in einem 50 µl-Ansatz vorgelegt. 75 U des Enzyms CIAP wurden hinzugegeben und 40 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Vektor-DNA durch Gelelektrophorese mit anschließender Gel-Extraktion (siehe Punkt II.2.3) gereinigt.

## 2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Bakteriophagen-T4-Ligase katalysiert in Gegenwart von ATP die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Vektor-DNA (0,05 bis 0,1 pM) wurde mit dem zweifachen molaren Überschuß der zu klonierenden DNA gemischt. Nach Zugabe von 10x Ligationspuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 5% Polyethylenglykol 8000; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6) und 1 U T4-DNA-Ligase (Volumen des Reaktionsgemisches: 15 - 20 µl) wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 16°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde schließlich in kompetente Bakterien transformiert (siehe Punkt II.2.9).

## 2.7 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 Hitzeeinwirkung 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. Auf diese Weise wurden die verschiedenen Deletionsmutanten hergestellt und die Klonierungen durchgeführt. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

10 µl	10x PCR-Puffer
4 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2 µl	Desoxynukleotide (je 10 mM)
10 µl	Primer 1 (10µM)
10 µl	Primer 2 (10µM)
20 ng	Template-DNA
1 µl	Vent DNA-Polymerase
ad 100 µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und die PCR wie folgt durchgeführt:

---

Start		4 min bei 94 °C
25-30 Zyklen	Denaturierung	1 min bei 94 °C
	Annealing	1 min bei 55 °C
	Elongation	1 min bei 72 °C
Termination		5 min bei 72 °C

## 2.8 RT/PCR

Die RT/PCR (Reverse Transkription/PCR) ermöglicht es, den kodierenden Bereich eines Gens ausgehend von der dazugehörigen mRNA in cDNA zu übersetzen und zu amplifizieren. Hierzu isoliert man zuerst Gesamt-RNA aus Zellen (siehe Punkt II.2.2.1) und übersetzt anschließend die Poly(A)-mRNA, mit Hilfe der reversen Transkription in einzelsträngige DNA (ssDNA). Im zweiten Schritt wird diese, wie unter Punkt II.2.7 beschrieben, mit Hilfe zweier spezifischer Primer amplifiziert. Bei der Reversen-Transkription wurden 1-2 µg Gesamt-RNA mit 2,5 µM Oligo dT16 (16-mer bestehend aus Thymin), 1 mM dNTPs, 1U RNase-Inhibitor, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 µl eines 10x PCR-Puffers in einem Ansatz von 18,5 µl gemischt. Dieser wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, um vorhandene Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören. Zum Ansatz wurden 1,5 µl (1U) MuLV- (“**M**urine **L**eukemia **V**irus-“) Reverse Transkriptase hinzugegeben, für 45 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 5 min auf 90°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Der so erhaltene Ansatz konnte zur Amplifikation der ssDNA direkt in einer PCR verwendet werden.

## 2.9 Transformation von Bakterien

### 2.9.1 Herstellung chemo-kompetenter Bakterien

200 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>260</sub> von 0,6 im Schüttler inkubiert (37°C; 200 UpM). Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min; 3000 UpM; 4°C; Heraeus Zentrifuge) und in 60 ml eiskalter TFB1-Lösung (100 mM RbCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach 90 min Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min; 3000 UpM; 4°C; Heraeus Zentrifuge) und anschließend wurde das Bakterienpellet in 8 ml eiskalter TFB2-Lösung (10 mM RbCl<sub>2</sub>; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin; 10 mM MOPS; pH 7,0) aufgenommen. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die nach dieser Methode hergestellten kompetenten Bakterien wiesen eine Transformationseffizienz von 1-5x10<sup>7</sup> Transformanten pro µg zirkulärer Plasmid-DNA auf.

## 2.9.2 Transformation chemo-kompetenter Bakterien

Tiefgefrorene chemo-kompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, 0,02 bis 0,05 pM Plasmid-DNA (in weniger als 5 µl) bzw. 15 bis 20 µl Ligationsansatz (siehe II.4.3.3) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 90 sec auf 42°C erwärmt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium und einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert (2 min; 6000 UpM; RT; Heraeus Zentrifuge) in ca. 50 µl resuspendiert, auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.10 Northern Blot-Analyse

Die radioaktive Markierung erfolgte mittels der T4-terminalen Polynukleotid-Kinase, die 5'-OH Enden von Nukleinsäuren mit einem Phosphatrest derivatisiert. 300 ng Oligonukleotid (N-DEDD, entspricht den ersten 407 bp der DEDD-cDNA) wurden mit Tris/HCl-MgCl<sub>2</sub> (20 mM; 10 mM), 0,4 µCi [ <sup>32</sup>-P]ATP dATP, 10 U T4-TPK in einem Volumen von 25 µl gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Das so radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde mit Hilfe des Nucleotide Removal Kits (Qiagen) gereinigt.

Eine Poly(A)<sup>+</sup> Northern Blot-Membran (MTN<sup>TM</sup>) (Clontech) wurde mit dieser <sup>32</sup>P-markierten N-DEDD-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt.

# 3 Proteinchemische Methoden

## 3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelen (Laemmli, 1970) mit einem 7,5-15%igen (w/v) Acrylamid-Trenngel und einem 5%igen (w/v) Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. Die Gelzusammensetzung ist in Punkt II.1.2 aufgeführt. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, der Alkohol nach erfolgter vollständiger Polymerisation mit Wasser entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und zur Ausbildung der Probenaschen ein Kamm in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragspuffer bei 95°C für 3 min gekocht, um sämtliche Proteine zu denaturieren. Es wurde ein elektrisches Feld von bis zu 30 mA/Gel angelegt.



### 3.2 Western Blot

Der Semidry-Blotter wurde mit Transferpuffer angefeuchtet. Die verschiedenen Lagen von Filterpapier, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel und Zellophanmembran wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet, um eine optimale Stromleitung zu gewährleisten. Bei einer Stromstärke von 0,8 A pro cm<sup>2</sup> Gel wurde 90 min geblottet. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in einer 2%igen BSA- oder einer 5%igen Magermilch-Lösung für mindestens 1h Stunde abgesättigt. Der Blot wurde mehrmals mit einer PBS/0,05% Tween - Lösung gewaschen. Der Primärantikörper wurde in PBS/Tween verdünnt und der Blot über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/Tween wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper (Maus-Anti-Kaninchen-IgG, 1:20000 in PBS/Tween verdünnt) unter Schütteln inkubiert. Der Blot wurde anschließend dreimal je 10 min mit TPBS gewaschen. Gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (ECL-Kit, Amersham-Buchler, Braunschweig) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

Zur Peptidkompetition wurde der polyklonale anti-DEDD-Antikörper mit 10 µM jenes Peptids für 30 min vorinkubiert, welches für die Immunisierung verwandt wurde (s. Punkt II.1.6). Der so behandelte anti-DEDD-Antikörper wurde anschließend wie ein nicht-behandeltes Antiserum auf die Western Blot-Membran gegeben.

### 3.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die behandelten oder unbehandelten Zellen in Lysepuffer (siehe Punkt II.1.2) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 14 000 UpM; 4°C; Heraeus Zentrifuge). Um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an Protein A-Sepharose bzw. anti-IgG1-Agarose binden, wurde das Lysat vorbehandelt (sogenannter „Preclear“): Das Lysat wurde zunächst zweimal mit Protein A-Sepharose, die zuvor 45 min mit NRS (Normal Rabbit Serum) oder Maus IgG inkubiert wurde, bei Raumtemperatur für 60 bis 80 min inkubiert. Die eigentliche Immunpräzipitation, d.h. die Inkubation des Lysats mit an PA bzw. an anti-IgG1-Agarose gekoppelten Antikörpern, erfolgt bei 4°C für 2 bis 3 Stunden. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer wurden die Protein A-Sepharose- bzw. anti-IgG1-Agarose-Beads mit 50 µl RSB versetzt und auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Eine Autoradiographie oder eine Western Blot-Analyse schloss sich an.

## **3.4 Herstellung von GST-Fusionsproteinen**

### **3.4.1 Induktion und Expression der GST-Fusionsproteine**

GST-Fusionsproteine, deren cDNAs in pGEX-4T kloniert waren, wurden bakteriell exprimiert. 100 ml einer Bakterien-Übernachtskultur, die mit dem entsprechenden pGEX-4T-Konstrukt transformiert war, wurden mit der zehnfachen Menge an LB/Amp-Medium verdünnt und im Schüttler 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 mM IPTG zugefügt und die Kultur für 2 bis 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Zur Überprüfung der Induktion wurden 200 µl der nicht-induzierten und induzierten Bakterien abzentrifugiert, in 20 µl 1x RSB aufgenommen, 3 min bei 95°C gekocht und jeweils 5 µl auf einem 12%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau-Färbung analysiert.

### **3.4.2 Lyse der Bakterien und Extraktion von GST-Fusionsproteinen**

Mit GST-Fusionsprotein transformierte, induzierte Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min; 6000 UpM; 4°C; Sorvall), in 20 ml Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% Glycerin; 1% Triton X-100; Proteaseinhibitoren) resuspendiert und sonifiziert (2x30 sec; Sonifier 250; breite Spitze; Output 6; Duty Cycle 50%). Ein 40 µl-Aliquot wurde entnommen und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (20 min; 6000 UpM; 4°C; Biofuge). Zum Überstand wurde 1 ml einer 50%igen Glutathion-Sepharose 4B-Suspension gegeben und beides zusammen für 30 Minuten bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert (3 min; 2000 UpM; 4°C; Sorvall) und einmal mit Lysepuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Das entnommene 40 µl-Aliquot diente zur Analyse der Löslichkeit der induzierten Proteine. Es wurde zentrifugiert (5 min; 13000 UpM; 4°C; Heraeus Zentrifuge), das Pellet mit den unlöslichen Bestandteilen in 50 µl 1x RSB aufgenommen, der Überstand mit 10 µl 5x RSB versetzt, beides kurz aufgeköcht (3 min; 95°C) und jeweils 5 µl mit Hilfe SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung analysiert.

### **3.4.3 Elution und Analyse von GST-Fusionsproteinen**

Um gebundene GST-Fusionsproteine von Glutathion-Sepharose zu eluieren wurde diese 30 Minuten bei 4°C im Überkopf-Schüttler mit 500 µl GSH-Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM reduziertes Glutathion) inkubiert. Anschließend wurde das Eluat durch Zentrifugation (1 min; 6000 UpM; RT; Eppendorf Zentrifuge) von der Sepharose getrennt und der Überstand bei 4°C gelagert. Dieser Vorgang wurde bis zu dreimal wiederholt. Um die Reinheit und die Menge der Proteine zu bestimmen, wurden 8 µl jedes Eluats mit 2 µl 5x RSB vermischt, aufgeköcht und zusammen mit jeweils 5 µl verschiedener BSA-Proteinstandards

(0,25 µg/µl; 0,5 µg/µl; 1 µg/µl) auf einem SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung analysiert.

## **4 Zellbiologische Methoden**

### **4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt. Eukaryontische Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um optimales Zellwachstum und -vitalität zu gewährleisten, wurden die Zellen bei einer Dichte von  $8 \times 10^5$  bis zu  $1 \times 10^6$  (nach ca. 2 bis 3 Tagen) mit frischem Kulturmedium auf eine Zelldichte von ca.  $2 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Die verwendeten Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

RPMI 1640 Medium: SKW6.4; BJAB; Jurkat; H9; CEM; HepG2; MCF7

DMEM Medium: 293T; HaCat

Transfizierte Zellen wurden mit folgenden Zusätzen kultiviert:

CEM-neo, CEM-Bcl-x<sub>L</sub>: 1 mg/ml Geneticin

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

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

MCF7-Transfektanten: 250 µg/ml G418, 150 µg/ml Hygromycin B

### **4.2 Präparation primärer humaner T-Zellen**

Alle Waschschritte wurden mit sterilem PBS oder RPMI ohne FKS durchgeführt. Jeweils ein Buffy Coat wurde mit 10 ml Ficoll (Gibco, Boston) langsam unterschichtet und zentrifugiert (20 min; 2000 UpM; RT; Allegra 6R). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal gewaschen (10 min; 1500 UpM; RT; Beckmann Allegra 6R) und mit RPMI-Medium auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurden Monozyten und Makrophagen, d.h. adhärenente Zellen, depletiert, indem die Zellen auf zwei große Kulturflaschen verteilt und für mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Nicht adhärenente Zellen, d.h. die Lymphozyten, wurde abgenommen und zentrifugiert (10 min; 1200 UpM; RT; Allegra 6R). Die Lymphozyten wurden mit PBS/FKS auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit einem Antikörpergemisch versetzt, das Antikörper gegen Oberflächenmoleküle auf Thrombozyten (Glykophorin, 10F7), NK-Zellen (anti-CD16, 3G8) und B-Zellen (anti-CD19, FMC63) enthält. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen dreimal gewaschen und mit an magnetischen Beads gekoppelten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörpern (BioMag<sup>®</sup>, Polysciences) gemischt. Thrombozyten, NK- und B-Zellen banden spezifisch die Antikörper und die an Magnetbeads gekoppelten Zweitantikörper und konnten somit mit Hilfe eines Magneten von den T-Zellen getrennt werden. Nach einer weiteren Inkubation bei 4°C wurden die magnetischen Beads mit Hilfe eines Magneten entfernt und die Zellsuspension (d0 T-Zellen) im Überstand

vorsichtig abgenommen. Eine Oberflächenfärbung mit einem PE-gekoppelten anti-CD3-Antikörper (Pharmingen) schloss sich an. Zur Aktivierung wurden die T-Zellen mit Phytohaemagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 1 µg/ml versetzt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Diese d1 T-Zellen wurden dreimal gewaschen und mit IL-2 (50 U/ml) für weitere 4 Tage bei 37°C inkubiert (d5 T-Zellen).

### 4.3 Herstellung von Antikörpern

Zur Herstellung von polyklonalen Kaninchenantikörpern wurde das entsprechende synthetisch hergestellte, HPLC gereinigte Peptid kovalent an das voraktivierte Protein KLH (“**K**eyhole **L**impet **H**emocyanin”) (Pierce) entsprechend den Herstellerangaben gekoppelt. Mit 500 µg des so erhaltenen Antigens in komplettem Freund'schen Adjuvant wurden ausgewachsene weibliche Kaninchen subkutan immunisiert. Diese Immunisierung wurde mit der gleichen Menge an Antigen in inkomplettem Freund'schen Adjuvant in monatlichen Abständen wiederholt. Der spezifische Titer wurde mittels ELISA kontrolliert und bei einer entsprechenden Immunantwort wurden die Antikörper aus dem Serum des Kaninchen über eine Affinitätsäule aufgereinigt. Dazu wurde das zur Immunisierung verwendete Peptid an voraktiviertes BSA (Pierce) gekoppelt und anschließend an CNBr-aktivierte Sepharose-4B 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 photometrischen Bestimmung der Konzentration und Überprüfung der Funktionalität im ELISA wurde der aufgereinigte Antikörper bei -20° C gelagert.

### 4.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die entsprechenden Hybridome wurden solange kultiviert, bis ein Zellkulturvolumen von ca. zwei Litern erreicht wurde, um eine ausreichende hohe Zellzahl und damit eine genügend große Antikörperproduktion zu gewährleisten. Die Zellen wurde bei 800g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat zur 45%igen Sättigung versetzt, um den Antikörper auszufällen. Ammoniumsulfat wurde über einen Zeitraum von einer Stunde zugegeben. Anschließend wurde für eine weitere Stunde gerührt. Es wurde erneut für 15 min bei 4000g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in möglichst wenig Wasser aufgenommen (ca. 40 ml) und über Nacht gegen Wasser dialysiert. Nach Zentrifugation bei 1000g und Filtration des Überstandes mit einem 0,8 µm - Millipore-Filter wurde dieser über eine Protein-A-Sepharosesäule bzw. über eine Protein-G-Sepharosesäule (für Antikörper des Isotyps IgG1) (Packungsvolumen ca. 5 ml) gegeben und mit 30 ml Waschpuffer (3 M NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>; 0,01 % (w/v) NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Der jeweilige Durchbruch wurde gesammelt und erneut über die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einer 100 mM Glycin-Lösung, pH 3. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen und die Absorption bei 280 nm bestimmt, um diejenigen

Fraktionen zu bestimmen, die den Antikörper enthalten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, auf einen pH von 7,4 eingestellt, und über Nacht gegen PBS dialysiert. Nach Sterilfiltration (Milliporefilter, 0,22 µm) wurden alle Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/ml bei 4 °C gelagert.

#### 4.5 Subzelluläre Fraktionierung

$1 \times 10^8$  Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde für die Präparation von Kernen bzw. Zytoplasma eingesetzt. Zur Präparation zytoplasmatischer Extrakte wurden die Zellen in Zyt-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM EDTA; 2 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM Dithiothreitol (DDT); 10 µM Zytochalin B; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Ein Aliquot des Lysats wurde mit Trypanblau gefärbt, um den prozentualen Anteil der bereits aufgebrochenen Zellen zu bestimmen. Nachdem etwa >95% der Zellen aufgeschlossen waren, wurde das Lysat bei 14000 g zentrifugiert und der klare Überstand wurde abgenommen und mit 5x RSB versetzt. Zur Darstellung von Kernen wurden die gewaschenen Zellen für 20 min auf Eis in Nuk-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DDT, 10 µM Zytochalin B, 1 mM PMSF) inkubiert und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Wiederum wurde die Anzahl lysierter Zellen durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Nachdem ein Lysegrad von mehr als 95% erreicht wurde, wurde die Suspension auf eine 30%ige Saccharose-Lösung vorsichtig aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 800g wurde das Kernpellet einmal in Nuk-Puffer gewaschen, erneut resuspendiert und mit 5x RSB versetzt. Die Fraktionen wurden anschließend durch 12%ige SDS-PAGE analysiert.

Zur Fraktionierung von Zellen in eine mikrosomale, zytoplasmatische und nukleare Fraktion wurden jeweils  $4 \times 10^8$  Zellen in hypotonem Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 38 mM NaCl, 1 mM PMSF und je 10µg/ml Proteaseinhibitoren Leupeptin Hemisulfat, Antipain Hydrochlorid, Chymostatin, Pepstatin A) aufgenommen. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden diese Zellen im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Die Kerne wurden bei 800g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 100000g für 2 h zentrifugiert. Der Überstand stellt das zytoplasmatische, das Pellet das Membrankompartiment dar.

#### 4.6 Isolierung von Mitochondrien

Zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in Mito-Puffer (250 mM Saccharose; 20 mM HEPES, pH 7,4; 10 mM KCl; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 17 µg/ml PMSF; 8 µg/ml Aprotinin; 2 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Dounce-Homogenisation wurden die Zellen aufgebrochen, wobei sich der Lysegrad von Zelllinie zu Zelllinie unterschied: MCF7- und T-Zellen wurden bis

zu einem Lysegrad von 80% homogenisiert, Suspensionszellen lymphoiden Ursprungs lediglich bis zu einem Lysegrad von etwa 1-2%. Kerne wurden bei 800g abzentrifugiert und der Überstand wurde erneut bei 10000g zentrifugiert. Das Pellet entsprach der an Mitochondrien angereicherten Schweren-Membran-Fraktion, der Überstand wurde als Zytoplasma bezeichnet.

#### 4.7 Präparation von Intermediärfilamenten

$1-5 \times 10^7$  Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit Extraktionspuffer I (25 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM  $MgCl_2$ ; 60 mM NaCl; 4 mM  $Na_2HPO_4$ ; 1,3 mM KCl; 0,75 mM  $KH_2PO_4$ ; 1 mM PMSF; 0,2% NP-40) für 2 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 5000 g für 10 min wurde das Pellet in Extraktionspuffer II (25 mM MOPS; pH 7,0; 10 mM  $MgCl_2$ ; 60 mM NaCl; 4 mM  $Na_2HPO_4$ ; 1,3 mM KCl; 0,75 mM  $KH_2PO_4$ ; 1 mM PMSF; 1% NP-40) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Salzkonzentration mit Hilfe einer 4M NaCl auf 1M eingestellt wurde, erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt auf Eis für 5 min. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 g für 15 min wurde das Pellet in 1xRSB aufgenommen, der mit 5M Harnstoff versetzt war.

#### 4.8 Caspasenaktivitätstest

Verschiedene Zellfraktionen oder Triton X-100-Zellysate wurden mit jeweils 40  $\mu M$  Aminotrifluoromethylcoumarin (AFC)-gekoppelten Caspasen-spezifischen Peptidsubstraten in Spaltungspuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM DDT, 1 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 10% Saccharose) bei 37°C für 1h inkubiert. Caspasenaktivitäten wurden anschließend fluorometrisch bestimmt. Die Werte für die unstimulierten Zellen wurden von jenen der aktivierten Zellen subtrahiert.

#### 4.9 Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von 293T-Zellen wurde die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode verwendet. Für eine 10 cm Petrischale wurde die DNA (1-6  $\mu g$ ) zu einer Lösung aus 438  $\mu l$   $H_2O$  und 61  $\mu l$  einer 2M  $CaCl_2$ -Lösung gegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch langsam in 500  $\mu l$  2xHBS (8g NaCl; 0,2g  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ; 6,5g HEPES;  $H_2O$  ad 500 ml, pH 7.0) getropft. Das dabei gebildete Präzipitat wurde daraufhin zu den am Tag zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 bis 48 h geerntet und weiterverarbeitet.

#### 4.10 Oberflächenfärbung zur FACS-Analyse

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wurde durch Färbung mit spezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern und anschließender Messung im Durchflußzytometer bestimmt. Alle Waschschritte wurden mit Waschpuffer (PBS mit 5 % FKS und 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten bei 4 °C im Dunkeln. Erstantikörper wurden mit Waschpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Die Zweitantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

$5 \times 10^5$  Zellen wurden geerntet, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (4 min; 3500 UpM; RT; Heraeus). Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in 50 µl Erstantikörperlösung resuspendiert und 5 min inkubiert. Zum Waschen wurde 1 ml Waschpuffer zugegeben, gemischt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden dann in 50 µl Zweitreagenz resuspendiert und nach 5 min Inkubation wurde erneut gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 300 µl Waschpuffer aufgenommen und die Proben einer Analyse im FACScan unterzogen. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden dazu in das Durchflußzytometer FACScan durch eine Kapillare eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge = 488 nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts war dann jeweils vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird dabei 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.

#### 4.11 Messung apoptotischer Zellen

Apoptose kann mit Hilfe verschiedener Techniken bestimmt werden, z. B. durch elektrophoretische bzw. kolorimetrische Methoden, die die DNA-Fragmentierung in Kernextrakten bestimmen. Der Nachteil dieser Methoden besteht darin, daß sie weder den Prozentsatz an apoptotischen Kernen, noch apoptotische Zellen in einer heterogenen Zellpopulation erkennen können. Mit Hilfe des Zytotoxizitätstests nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991), einer durchflußzytometrischen Methode, kann der prozentuale Anteil apoptotischer Zellkerne nach Propidiumiodid-Färbung in hypotonem Puffer bestimmt werden. Apoptotische Kerne erscheinen als ein breiter hypodiploider DNA-Peak, der leicht von dem sehr schmalen DNA-Doppelpeak nicht-apoptotischer Zellen mit diploidem und tetraploidem DNA-Gehalt unterschieden werden kann.

Es wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 250 µl eines hypotonen Fluorochrompuffers (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) für 16h bei 4 °C unter Lichtabschluß lysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff drang dabei in die Zellkerne ein und interkalierte in die DNA, so daß die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszierten. Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen ließen sich daher im FL-2-Detektor des Durchflußzytometers die apoptotischen Zellkerne als „subdiploider DNA-Peak“ ausmachen

und quantifizieren. Zur Quantifizierung von Apoptose in MCF7-Zellen wurde CELLocate-Glasplättchen (Eppendorf, Hamburg) verwendet, die ein Gitternetz auf ihrer Oberfläche besitzen. MCF7-Fas-vec und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen wurden mit anti-CD95 und TNF $\alpha$  stimuliert. Nicht-apoptotische Zellen blieben adhären, während apoptotische Zellen sich ablösen. Die Zahl adhärenter Zellen wurde nach unterschiedlichen Zeiträumen bestimmt. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde nach folgender Formel berechnet: (adhärente Zellen Zeitpunkt 0 – adhärente Zellen Zeitpunkt x)/(adhärente Zellen Zeitpunkt 0) x 100.

#### 4.12 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Eine Reduktion des Transmembranpotentials der inneren Mitochondrienmembran ( $\psi_m$ ) gehört zu den ersten irreversiblen Vorgängen im Verlauf des klassischen apoptotischen Zelltods (Zamzami et al., 1995). Sie läßt sich mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wie 3,3'-Dihexyloxacarboyanin (DiOC<sub>6</sub> (3)) oder 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarboyaniniodid (JC-1) bestimmen, welche sich in Abhängigkeit des Transmembranpotentials ausschließlich in die innere Mitochondrienmembran einlagern. Wird das Transmembranpotential der inneren Mitochondrienmembran zerstört, so entweicht der Farbstoff, und im Durchflußzytometer wird ein geringeres FL-1-Signal meßbar. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit bzw. ohne apoptotischen Stimulus für den gewünschten Zeitraum inkubiert und geerntet. Nach einmaligem Waschen mit Medium wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium resuspendiert und mit 5  $\mu$ g/ml JC-1 für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff durch Waschen mit eiskaltem PBS entfernt, die Zellen wurden in 100  $\mu$ l Medium resuspendiert und bis zur Messung im Durchflußzytometer auf Eis aufbewahrt. Das von JC-1 emittierte Licht der Wellenlänge 525 nm wurde mit dem FL-1-Detektor gemessen.

#### 4.13 Immunfluoreszenzmikroskopie

Adhärente Zellen wurden auf Glasplättchen bis zur einer Konfluenz von 20% ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit einer PBS-Lösung, die 1 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt (PBS/MgCl<sub>2</sub>) wurden die Zellen in einem 1:1 Gemisch von Methanol und Aceton bei -20°C für 5 min fixiert. Die Plättchen wurden mit PBS/MgCl<sub>2</sub> rehydriert. Der Primärantikörper wurde für mindestens 30 min auf das Plättchen aufgetragen. Die monoklonalen anti-Caspase-8-Antikörper wurden im Vorfeld mit dem Fluorochrom FITC direkt gekoppelt: 2 ml der entsprechenden Antikörperlösung (Konzentration von 1 mg/ml) wurden gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung (Volumen 50 ml) dialysiert, die 300  $\mu$ g FITC enthält. Dabei wurde der pH-Wert für 2 h bei 8,5 bis 8,9 durch wiederholte Zugabe von 0.01 N NaOH konstant gehalten. Es wurde über Nacht weiter dialysiert, wobei der pH-Wert weiter absank. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes wurde mehrere Tage gegen PBS dialysiert. Die PBS-Lösung wurde dabei mehrmals ausgetauscht. Der Primärantikörper wurde durch 3 maliges Waschen vom Präparat mit PBS/MgCl<sub>2</sub> entfernt. Bei nicht Fluorochrom-markierten Primärantikörpern schloss sich eine



Inkubation mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper an. Die Präparate wurden erneut mit PBS/MgCl<sub>2</sub> gewaschen, durch Schwenken in 100% Ethanol nochmals fixiert. Die getrockneten Plättchen wurden mit Eindecklösung (Vectorshield Mounting Medium, Vector Laboratories, Inc., New Haven) auf Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden mit Hilfe konfokaler Mikroskopie (LSM 310; Zeiss, Jena) analysiert.

Für die Aktinfärbung wurden Fibroblasten von Wildtyp- und Plektin-defizienten Mäusen auf Glasplättchen bis zu einer Konfluenz von 70% angezogen. Die Fixierung erfolgte mit einer 2%igen Formaldehydlösung. Nach dreimaligen Waschen mit 50 mM Ammoniumchlorid wurden die Zellen mit 0,1% NP-40 permeabilisiert und die Aktinstressfasern mit PE-gekoppeltem Phalloidin (Sigma, München) sichtbar gemacht.

#### **4.14 *In vitro*-Plektinspaltung durch DISC-gebundene Caspase-8 und rekombinante Caspasen**

Zur Darstellung des CD95-DISC wurden jeweils  $2 \times 10^8$  SKW6.4-Zellen auf zwei Ansätze verteilt: Für den stimulierten DISC wurden Zellen 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/ml anti-CD95-Antikörper versetzt. Anschließend wurden beide Lysate identisch behandelt. Der an anti-CD95-Antikörper gebundene stimulierte oder unstimulierte CD95-Rezeptor wurde mit 30 µl Protein A-Sepharose (Sigma) für 1-2 h bei 4° C präzipitiert. Anschließend wurden die Beads durch Zentrifugation (3000 g, 30 s, 4° C) entfernt und mehrfach in Lysepuffer gewaschen. Das Immunpräzipitat wurde daraufhin mit einer Intermediärfilamentpräparation für 24 h in Spaltungspuffer (20 mM HEPES, pH 7,4; 100 mM NaCl; 10 mM DDT; 1 mM EDTA; 0,1% CHAPS; 10% Saccharose) inkubiert, die anschließend durch 6%ige SDS-PAGE und nachfolgendem anti-Plektin-Western Blot analysiert wurde. Zur *in vitro*-Spaltung von Plektin mit den rekombinanten Caspasen 3, 6, 7, 8 und 10, wurden Intermediärfilamentpräparationen bzw. rekombinante Plektinfragmente (jeweils 4 µg) in Spaltungspuffer mit 40-60 µM aktiver Caspase für mindestens 24 h bei 4°C oder 25°C inkubiert und schließlich durch 6-12%ige SDS-PAGE analysiert.

#### **4.15 *In vitro* Bindungsexperiment mit Mitochondrien oder GST-Proteinen**

Mitochondrien (etwa 20 µg Protein) von MCF7-Fas-Zellen oder GST-Fusionsproteine (jeweils 1 µg) wurden wie beschrieben isoliert und mit 1 µl *in vitro*-translatierten Proteinen für 10 min bei 37°C in Bindungspuffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2; 0,3 mM Mannitol; 0,5 mg/ml BSA) inkubiert. Die Mitochondrien wurden pelletiert und Pellet und Überstand wurden mit 5x RSB versetzt und durch 12-15%ige SDS-PAGE analysiert und autoradiographiert.

## III. Ergebnisse

### III-1.

#### **IDENTIFIZIERUNG DES ZYTOLINKERS PLEKTIN ALS IN VIVO-SUBSTRAT VON CASPASE-8 IM RAHMEN CD95- UND TNF-R-VERMITTELTEN APOPTOSE**

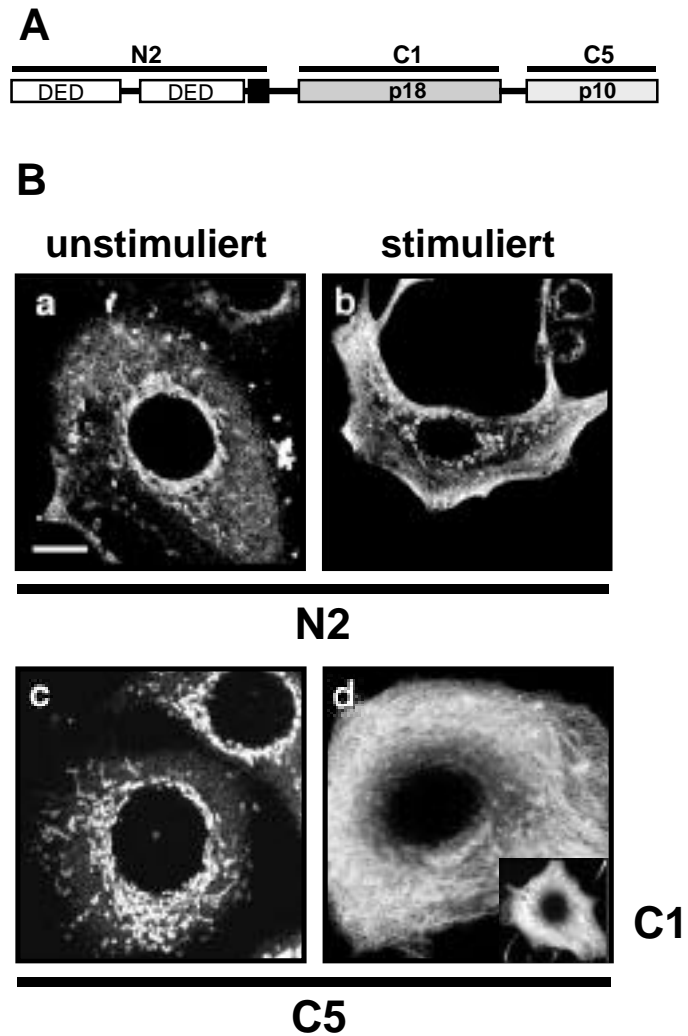
Caspase-8 ist ein potenter Tumorsuppressor (Teitz et al., 2000) und Schlüsselmolekül CD95-vermittelter Apoptose (Peter et al., 1999). Im Gegensatz zum Rezeptor-proximalen Aktivierungsmechanismus ist wenig über Substrate und damit über die Aktivität dieser Caspase bekannt. So weiß man lediglich, daß Caspase-8 in der Lage ist, Bid zu spalten und damit die apoptogene Aktivität der Mitochondrien zu induzieren (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999), Caspase-3 zu prozessieren (Scaffidi et al., 1998; Stennicke et al., 1998) sowie die Kinase RIP zu spalten (Lin et al., 1999; Martinon et al., 2000). Welche anderen Substrate kann Caspase-8 spalten und welche Rolle spielt diese proteolytische Degradation? Um diese Fragen zu beantworten, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation des Proenzym sowie des aktiven Enzyms im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose bestimmt.

#### **Intrazelluläre Translokation von Caspase-8 im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose**

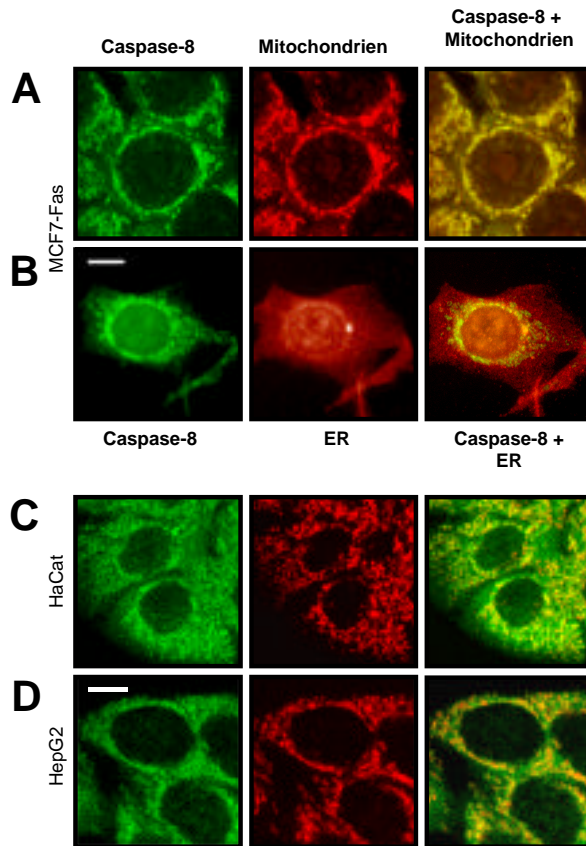
Die subzelluläre Lokalisation von Caspase-8 wurde in der Brustkarzinomzelllinie MCF7-Fas mit Hilfe konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dabei wurden monoklonale, mit dem Fluorochrom FITC gekoppelte anti-Caspase-8-Antikörper eingesetzt, die spezifisch bestimmte Domänen des Caspase-8-Moleküls erkennen (Scaffidi et al., 1998): Der Antikörper N2 erkennt die Caspase-8-Prodomäne mit den beiden DED, die Antikörper C1 und C5 erkennen die aktiven Untereinheiten p18 bzw. p10 (Abbildung 5A). In nicht-apoptotischen MCF7-Fas Zellen befand sich Caspase-8 preferentiell an stabförmigen Strukturen im perinuklearen Zytoplasma und zeigte eine schwache zytoplasmatische Lokalisation (Abbildung 5B-a und B-c). Nach Apoptoseinduktion mit Hilfe des agonistischen anti-CD95-Antikörpers und der damit verbundenen vollständigen Prozessierung des Proenzym in Prodomäne und die aktiven Untereinheiten veränderte sich das Färbungsmuster, sichtbar gemacht mit den C-terminalen Antikörpern C1 und C5, dramatisch: Die für nicht-apoptotische Zellen charakteristischen stabförmigen Strukturen waren nicht mehr nachweisbar. Statt dessen wurde ein sehr dichtes Netzwerk sichtbar (Abbildung 5B-d). Dieses Färbungsmuster wurde nur mit den gegen die aktiven Caspase-8-Untereinheiten gerichteten Antikörpern C1 und C5 beobachtet. Die durch den N-terminalen Antikörper N2 erkannte Prodomäne zeigte eine dem Proenzym vergleichbare

Färbung mit einer leicht verstärkten zytoplasmatischen Lokalisation (Abbildung 5B-b). Ein vergleichbares Ergebnis wurde nach Stimulation der MCF7-Fas-Zellen mit TNF erhalten (Daten nicht gezeigt). Auch hier konnte ein netzwerkartiges Färbungsmuster mit den C-terminalen anti-Caspase-8-Antikörpern in apoptotischen Zellen beobachtet werden.

Es zeigte sich, daß die Anzahl der Zellen mit einer apoptotischen Morphologie im gleichen Maße zunahm wie die Anzahl der Zellen, die jenes netzwerkartige Färbungsmuster zeigten: Nach 8 stündiger Inkubation mit dem anti-CD95-Antikörper waren 30% (+/- 7%) der Zellen apoptotisch und 30% (+/- 6%) zeigten das retikuläre Färbungsmuster. Nach 16 h stieg die Zahl der apoptotischen Zellen um weitere 40% (+/- 7%) auf insgesamt 70% und auch die Anzahl der Zellen mit einer netzwerkartigen Färbung nahm um 38% (+/- 9%) auf insgesamt 68% zu. Nach 24 h waren sämtliche Zellen apoptotisch und lösten sich von der Zellkulturschale ab (Daten nicht gezeigt). Diese statistische Analyse zeigte, daß das retikuläre, ausschließlich mit den C-terminalen anti-Caspase-8-Antikörpern erhaltene Färbungsmuster spezifisch für apoptotische Zellen ist, bevor sie die charakteristische kondensierte Morphologie annehmen und sich von der Zellkulturschale ablösen.



**Abbildung 5. Intrazelluläre Lokalisation von Caspase-8 und ihren Spaltprodukten in MCF7-Fas-Zellen im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose.** (A) Bindungsspezifitäten der monoklonalen anti-Caspase-8-Antikörper. N2 erkennt die Prodomäne mit den beiden Todeseffektordomänen (DED). C1 und C5 sind gegen die aktiven Untereinheiten p18 und p10 gerichtet. (B) MCF7-Fas-Zellen wurden unbehandelt ("unstimuliert") oder nach Apoptoseinduktion mit dem anti-CD95-Antikörper (2 µg/ml) für 16h ("stimuliert") mit Hilfe der anti-Caspase-8-Antikörper immungefärbt. Immunfluoreszenzen wurden mit Hilfe konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Linie in (B-a)



**Abbildung 6. Caspase-8 ist mitochondrial lokalisiert.** (A), (B) Doppelfärbung der Brustkarzinomzelllinie MCF7-Fas mit dem anti-Caspase-8-Antikörper C5 ("Caspase-8", FITC-gekoppelt) und dem anti-mitochondrialen Antikörper anti-p60 ("Mitochondrien", Zweitantikörper PE-gekoppelt) (A) oder mit anti-Caspase-8-Antikörper C5 und dem gegen ER-lokalisierte PDI gerichteten anti-PDI-Antikörper ("ER", Zweitantikörper PE-gekoppelt) (B). Die Überlagerung der Einzelfluoreszenzen ist in den rechten Abbildungen zu sehen. (C), (D) Die Keratinozytenzelllinie HaCat und die hepatozelluläre Karzinomzelllinie HepG2 wurden für Caspase-8 und Mitochondrien doppelgefärbt wie in (A). Linie in (B) und (D) entspricht 10 µm.

### Pro-Caspase-8 ist in MCF7-Zellen mitochondrial lokalisiert

In nicht-apoptotischen MCF7-Fas-Zellen kolokalisierte Pro-Caspase-8 mit stabförmigen Strukturen im perinuklearen Zytoplasma. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Mitochondrien, da eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen anti-Caspase-8-Antikörper C5 (Abbildung 6A, "Caspase-8") und einem Mitochondrien-spezifischen monoklonalen Antikörper (Abbildung 6A, "Mitochondrien"; s. auch Material und Methoden) identisch waren (Abbildung 6A, "Caspase-8 + Mitochondrien"). Diese Kolokalisation wurde bestätigt, indem ein monoklonaler anti-Cytochrom c-Antikörper zur Mitochondrienfärbung verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression von CD95 in MCF7-Fas-Zellen hatte keinen Einfluß auf die mitochondriale Lokalisation von Caspase-8, da untransfizierte MCF7-Zellen das gleiche Färbungsmuster zeigten. Auch hier konnte eine vollständige Überlagerung der Einzelfluoreszenzen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund einer Deletion im Caspase-3-Gen besitzen MCF7-Zellen keine Caspase-3, ein putatives Caspase-8-Substrat. In MCF7-

Zellen, die mit Caspase-3 rekonstituiert wurden, konnte ebenfalls eine Mitochondrienassoziation von Caspase-8 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), d.h. die Mitochondrienassoziation von Caspase-8 ist unabhängig davon, ob das Substrat Caspase-3 anwesend ist oder nicht.

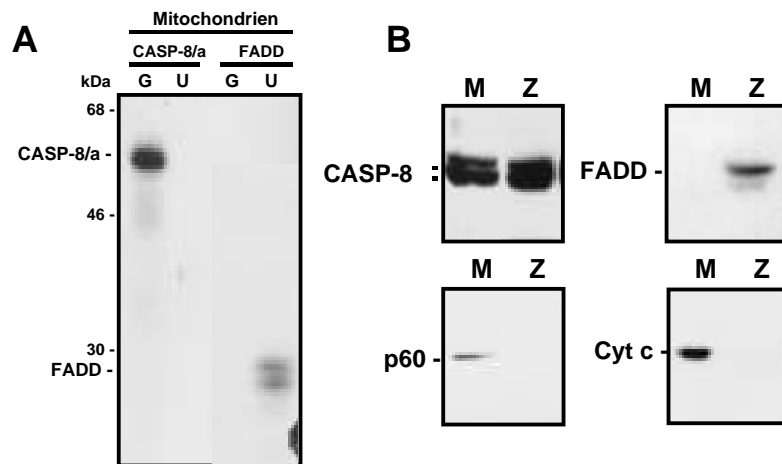
Eine kürzlich publizierte Studie zeigte, daß Caspase-8 mit dem im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierten Adapterprotein p28BAP31 nach Überexpression in 293T-Zellen wechselwirkt (Ng et al., 1997, 1998). Dies legte den Schluß nahe, daß Caspase-8 möglicherweise im ER lokalisiert ist. Es wurde daher in MCF7-Fas-Zellen eine Doppelfärbung für Caspase-8 und

für das ER-Markerenzym Proteindisulfidisomerase (PDI) durchgeführt (Abbildung 6B). Dieses Experiment zeigte, daß Caspase-8 in MCF7-Fas-Zellen mitochondrial und nicht im ER lokalisiert ist.

Die mitochondriale Lokalisation von Caspase-8 ist nicht nur auf die Brustkarzinomzelllinie MCF7 beschränkt. Zelllinien, die von anderen Geweben abgeleitet sind, zeigten ebenfalls eine Mitochondrienassoziation von Caspase-8. Die humane Keratinozytenzelllinie HaCat und die hepatozelluläre Karzinomzelllinie HepG2 wurden wie MCF7-Zellen mit dem monoklonalen anti-Caspase-8-Antikörper C5 und mit dem Mitochondrien-spezifischen Antikörper doppelgefärbt (Abbildung 6C und D). In beiden Zelllinien war ein signifikanter Anteil an Mitochondrien positiv für

Caspase-8. Es ist jedoch anzumerken, daß Caspase-8 insbesondere in HepG2-Zellen eine prominentere zytoplasmatische Lokalisation zeigte (Abbildung 6D). In Zelllinien abgeleitet von verschiedenen Geweben ist somit eine unterschiedlich große, aber stets signifikante Menge von Caspase-8 mitochondrial lokalisiert.

Um die Immunfluoreszenzdaten biochemisch zu bestätigen, wurde ein *in vitro*-Bindungsexperiment durchgeführt, bei dem Mitochondrien aus MCF7-Zellen auf die Fähigkeit hin getestet wurden, <sup>35</sup>S-markierte, *in vitro*-translatierte Caspase-8/a zu binden (Abbildung 7A). Caspase-8/a besitzt eine signifikante Affinität zu Mitochondrien (Abbildung 7A, "G" für "gebunden"), wohingegen FADD, das wie Caspase-8 über eine DED verfügt, keinerlei Bindung zeigte (Abbildung 7A, "U" für "ungebunden"). Um auch biochemisch nachzuweisen, daß endogene Caspase-8 mitochondrial lokalisiert ist, wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit MCF7-Fas-Zellen durchgeführt. Mitochondrien und Zytoplasma wurden voneinander getrennt. Diese Fraktionen wurden daraufhin in einer Western Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Caspase-8 hin überprüft (Abbildung 7B). Signifikante Mengen von Caspase-8 konnten in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch



**Abbildung 7. Caspase-8 assoziiert mit Mitochondrien.** (A) *In vitro*-translatierte, <sup>35</sup>S-markierte Caspase-8/a und <sup>35</sup>S-FADD wurden mit aufgereinigten Mitochondrien von MCF7-Fas-Zellen inkubiert und der gebundene (G) und ungebundene (U) Anteil von Caspase-8/a und FADD wurde mit Hilfe 12%iger SDS-PAGE und nachfolgender Autoradiographie bestimmt. Die Laufpositionen von Caspase-8/a und FADD sind angegeben. (B) Subzelluläre Fraktionierung von MCF7-Fas-Zellen in Mitochondrien (M) und Zytoplasma (Z). Der Western Blot wurde mit Hilfe des anti-Caspase-8-Antikörpers C15 durchgeführt, der die aktive Untereinheit p18 erkennt. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Western Blot-Analyse für die mitochondrialen Markerproteine Cytochrom c und p60, und für das zytoplasmatische Molekül FADD überprüft. Die Laufpositionen der einzelnen Proteine sind angegeben.

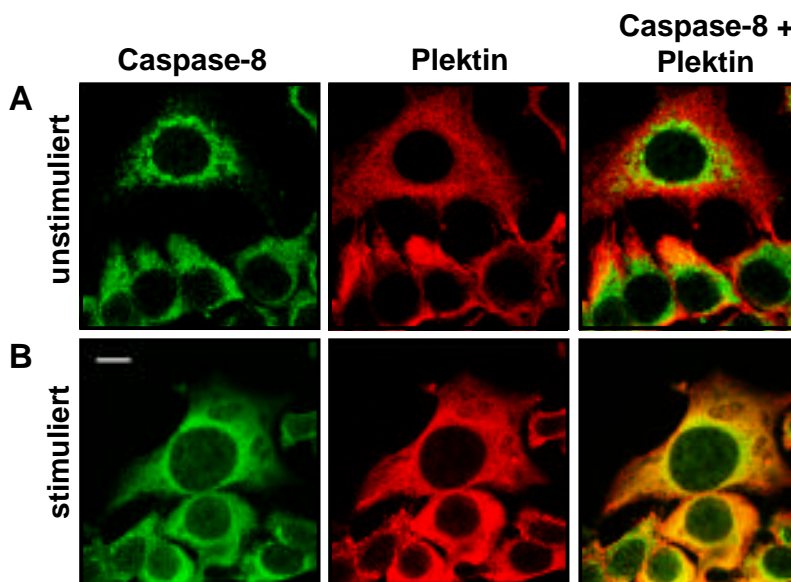
Western Blot-Analysen bestätigt, bei denen die Proteine p60 (nachgewiesen durch den in der Immunfluoreszenz eingesetzten monoklonalen anti-mitochondrialen Antikörper; s. Material und Methoden) und Cytochrom c als mitochondrial und FADD als zytoplasmatisch identifiziert wurden (Abbildung 7B). Diese subzelluläre Fraktionierung wurde auch in anderen Zelllinien, insbesondere lymphoiden Zelllinien durchgeführt. Auch hier konnten unterschiedliche Mengen an Caspase-8 im mitochondrialen Kompartiment gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Somit ist die Lokalisation von Caspase-8 an Mitochondrien ein generelles Phänomen.

### Aktive Caspase-8 transloziert zu Plektin

Im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose konnte gezeigt werden, daß aktive Caspase-8 im Gegensatz zur Prodomäne und zum Proenzym nicht länger mitochondrial lokalisiert war, sondern eine netzwerkartige Verteilung zeigte, die an eine zytoskelettale Struktur erinnert (Abbildung 5B-d). So war das in anti-CD95-stimulierten MCF7-Zellen beobachtete Färbungsmuster für Caspase-8 vergleichbar mit demjenigen, das für das zytoskelettale Linkerprotein Plektin beschrieben wurde (Wiche und Baker, 1982) und unterschied sich deutlich von Immunfluoreszenzen der drei Filamentsysteme in MCF7-Zellen, d.h. den Mikrofilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli (Moll et al., 1982 und Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob aktive Caspase-8-

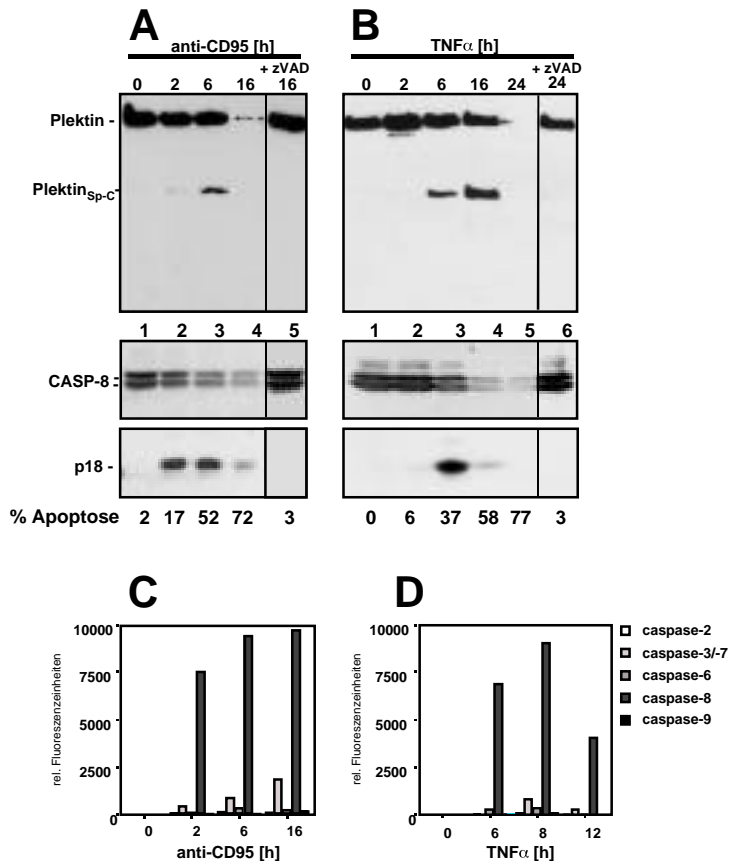
Untereinheiten mit Plektin kolokalisierten, wurde ein Doppelfärbungsexperiment mit dem anti-Caspase-8-Antikörper C5 und einem polyklonalen anti-Plektinserum durchgeführt, welches den C-Terminus des Plektin-Polypeptids erkennt (anti-Plektin-C-Antikörper, Abbildung 8; zur Verfügung gestellt von Dr. Harald Herrmann, DKFZ, Heidelberg). In nicht-apoptotischen MCF7-Zellen war die mitochondriale anti-Caspase-8-Färbung eindeutig vom netzwerkartigen Plektin-

Färbungsmuster zu unterscheiden (Abbildung 8A). Eine Überlagerung der beiden Einzelfluoreszenzen war nicht zu beobachten. Nach Stimulation mit dem agonistischen anti-



**Abbildung 8. Kolokalisation von aktiver Caspase-8 und Plektin.** Unbehandelte (A) oder anti-CD95-behandelte MCF7-Fas-Zellen (B) wurden für Caspase-8 (links) und Plektin (Mitte) doppelgefärbt. Die rechten Abbildungen repräsentieren die Überlagerung der Einzelfluoreszenzen. Linie in (B) entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

CD95-Antikörper änderte sich die Lokalisation aktiver Caspase-8 deutlich und zeigte eine signifikante Überlagerung mit der anti-Plektin-Färbung (Abbildung 8B). Diese Immunfluoreszenzdaten zeigten somit erstmalig die Translokation aktiver Caspasenuntereinheiten zu einem putativen Substrat und legten nahe, daß der Zytolinker Plektin mit aktiver Caspase-8 assoziiert und möglicherweise durch diese enzymatische Aktivität gespalten wird.



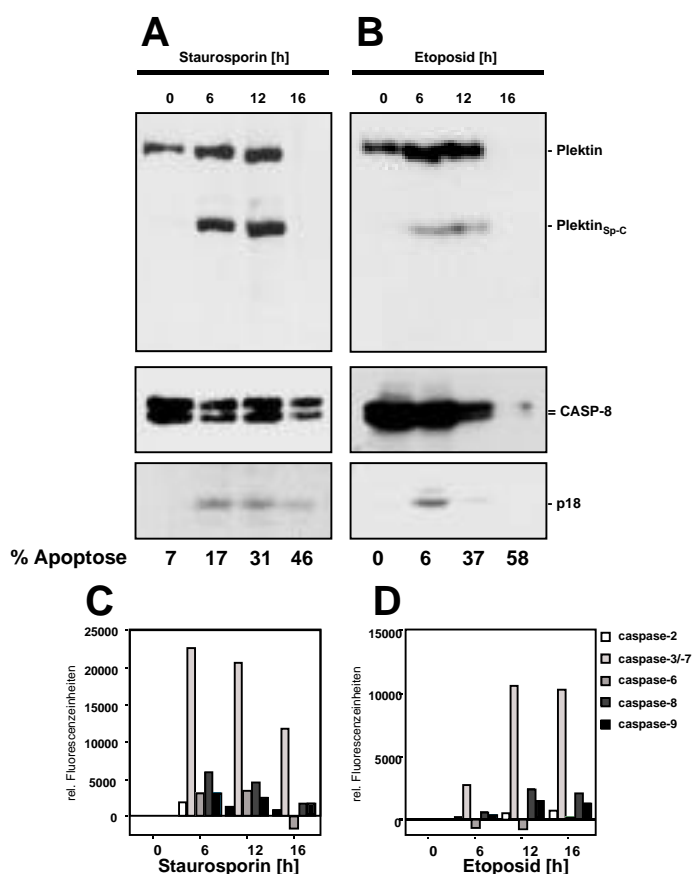
**Abbildung 9. Spaltung von Plektin im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose.** (A) MCF7-Fas-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit dem anti-CD95-Antikörper (2  $\mu$ g/ml) behandelt. Plektin wurde durch eine Intermediärfilamentpräparation (s. Material und Methoden) angereichert. Die Spaltung von Plektin und Caspase-8 wurde mit Hilfe von C15 und dem anti-Plektin-C-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Zur Inhibition der Caspase-8-Prozessierung wurden die Zellen mit 20  $\mu$ M zVAD-fmk für 30 min vorbehandelt, um anschließend mit dem anti-CD95-Antikörper stimuliert zu werden. Apoptose wurde mit Hilfe von CELLocate Glasplättchen quantifiziert (s. Material und Methoden). (B) wie in (A) beschrieben. Zellen wurden jedoch mit 20 ng/ml TNF und 1  $\mu$ g/ml Cycloheximid (CHX) stimuliert. (C), (D) Caspasenaktivierungsprofile für CD95- und TNF-vermittelte Apoptose. Die Caspasenaktivitäten wurden mit für einzelne Caspasen spezifischen und mit einem Fluorochrom gekoppelten Peptidsubstraten bestimmt (s. Material und Methoden).

### Plektin wird spezifisch durch Caspasen *in vivo* gespalten

Um zu testen, ob Plektin ein *in vivo*-Substrat für Caspasen im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose darstellt, wurden Intermediärfilamente von CD95- und TNF-stimulierten MCF7-Fas-Zellen präpariert und im Western Blot mit Hilfe des polyklonalen anti-Plektin-C-Serums analysiert (Abbildung 9). Nach 6 stündiger anti-CD95-Behandlung konnte neben dem ungespaltenen, etwa 500 kDa großen Plektinmolekül ein prominentes Spaltprodukt von etwa 200 kDa (Plektin<sub>Sp-C</sub>) nachgewiesen werden (Abbildung 9A, Bahn 3), das der C-terminalen Hälfte des Plektinmoleküls entspricht und erstmalig nach 2h nachweisbar war. Dieser Spaltung ging die Aktivierung von Caspase-8 voraus, deren Spaltprodukte bereits nach 2h auftraten (Abbildung 9A, Bahn 2). Nach 16-stündiger Inkubation mit dem anti-CD95-Antikörper war Plektin größtenteils gespalten und das 200 kDa-große Spaltfragment

unspezifisch degradiert (Abbildung 9A, Bahn 4). Vorinkubation mit dem pan-spezifischen Caspaseninhibitor zVAD-fmk (Abbildung 9A, Bahn 5) oder dem Caspase-8-spezifischen Inhibitor zIETD-fmk (Daten nicht gezeigt) blockierte sowohl die Caspase-8-Prozessierung als auch die Plektinspaltung. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit TNF -stimulierten MCF7-Fas-Zellen erhalten (Abbildung 9B). Auch hier konnte das etwa 200 kDa große C-terminale Spaltfragment nachgewiesen werden, dessen Auftreten parallel zur Caspase-8-Aktivierung beobachtbar war. Diese Daten weisen darauf hin, daß die Plektinspaltung ein generelles Phänomen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose ist.

Um die Rolle von Caspase-8 im Rahmen dieser Apoptoseform näher zu charakterisieren, wurde ein Caspasenaktivierungsprofil nach anti-CD95- bzw. nach TNF -Stimulation erstellt, d.h. der Aktivierungsstatus der Caspasen 2, 3, 6, 7, 8 und 9 wurde nach unterschiedlichen Stimulationszeiträumen mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter, für die einzelnen Caspasen



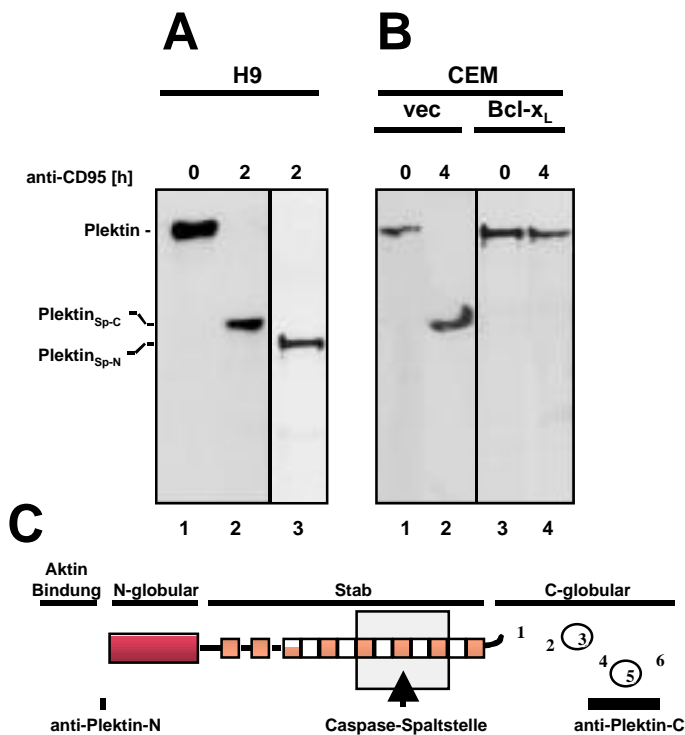
**Abbildung 10. Spaltung von Plektin im Rahmen anderer Apoptoseformen.** (A), (B) Jurkat-Zellen wurden mit Stausporin (1  $\mu$ M) (A) und mit Etoposid (20  $\mu$ g/ml) (B) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Spaltung von Plektin und Caspase-8 wurde wie in Abbildung 9 beschrieben durchgeführt. Apoptose wurde durch Messung der DNA-Fragmentierung nach der Nicoletti-Methode (s. Material und Methoden) bestimmt. (C), (D) Caspasenaktivierungsprofile im Rahmen Stausporin- und Etoposid-vermittelter Apoptose (s. Abbildung 9 und Material und Methoden).

spezifischer Peptidsubstrate bestimmt (s. Material und Methoden). Dabei wurden folgende Peptide für die verschiedene Caspasen verwendet: zVDVAF-AFC für Caspase-2, zDEVDAFC für Caspasen-3 und -7, zVEID-AFC für Caspase-6, zIETD-AFC für Caspase-8 und AcLEHD-AFC für Caspase-9. Die Peptide mit den optimalen Caspase-Spaltsequenz sind mit dem Fluorochrom Aminofluoromethylcoumarin (AFC) gekoppelt. Ist die entsprechende Caspase aktiv, so wird dieses Peptid hinter dem Aspartatrest gespalten und das Fluorochrom AFC wird freigesetzt, dessen Fluoreszenz daraufhin meßbar wird. Sowohl bei CD95- als auch bei TNF -vermittelter Apoptose besaß Caspase-8 die mit Abstand größte Aktivität (Abbildung 9 C,D). Dies deutete darauf hin, daß Caspase-8 die Plektin-spaltende Aktivität darstellt.

Um zu überprüfen, ob die Spaltung des Plektinmoleküls auch im Rahmen anderer Apoptoseformen



stattfindet, wurden Jurkat-Zellen mit Staurosporin, einem Serin-/Threonin-Proteinkinaseinhibitor, und mit Etoposid, einem Topoisomerase II-Inhibitor, behandelt. Beide Reagenzien induzieren Apoptose und Caspase-8-Aktivierung (Abbildung 10). Wie bei



### Abbildung 11. Plektin wird in lymphoiden Zelllinien gespalten.

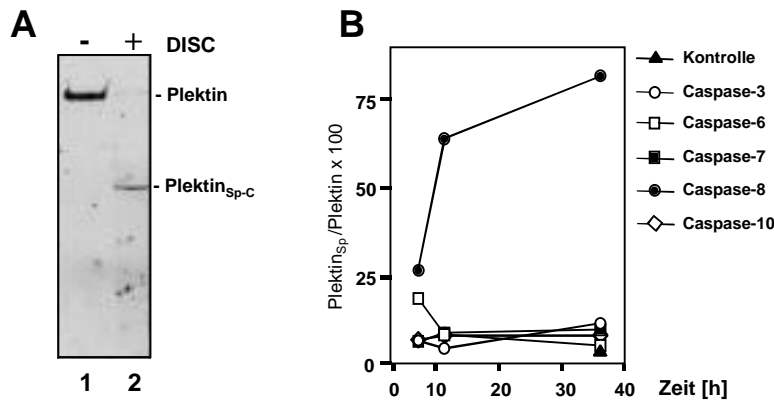
(A) Die T-Lymphomazelllinie H9 wurde mit dem anti-CD95-Antikörper (2 µg/ml) für die angegebenen Zeiträume behandelt. Spaltung von Plektin wurde mit Hilfe des anti-Plektin-C-Antiserum (gerichtet gegen den C-Terminus von Plektin) und des anti-Plektin-N-Antikörpers (erkennt den N-Terminus) verfolgt. Die Laufpositionen von Plektin, des C-terminalen Spaltfragments (Plektin<sub>sp-C</sub>) und des N-terminalen Spaltfragments (Plektin<sub>sp-N</sub>) sind angegeben. (B) Die T-Lymphomazelllinie CEM, die mit Vektor ("vec") oder mit Bcl-x<sub>L</sub> transfiziert wurde, wurde mit anti-CD95-Antikörper (2 µg/ml) für die angegebenen Zeiträume behandelt. Die Western Blot-Analyse wurde wie unter (A) beschrieben durchgeführt. (C) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Plektin. Die Position der vermuteten Caspase-Spaltstelle sowie die Bindungsregionen der anti-Plektin-Antikörper sind angegeben. Die grau unterlegte Fläche markiert jene Region im Plektinmolekül, die dem rekonbinanten Plektinfragment entspricht, das in den Experimenten zu Abbildung 13 verwendet wurde.

Todesrezeptor-vermittelter Apoptose konnte ein 200 kDa C-terminales Spaltfragment detektiert werden, das nach 16 stündiger Inkubation degradierte. Sowohl die Western Blot-Analyse für Caspase-8 (Abbildung 10 A,B) als auch das Caspasenaktivierungsprofil (Abbildung 10 C,D) zeigten eine nur schwache Caspase-8-Aktivierung. Auch andere Studien zeigten, daß Caspase-8 zwar essentiell für Todesrezeptor-vermittelte Apoptose ist, aber daß deren Aktivierung für den Staurosporin- oder Etoposid-induzierten Zelltod ein eher sekundäres Ereignis darstellt (Boesen-de Cock et al., 1999). Die Aktivierung insbesondere der Caspasen 3 und 7 ist deutlich stärker (Abbildung 10 C,D). Es ist möglich, daß entweder die geringen Mengen an aktiver Caspase-8 ausreichen, um Plektin zu spalten, oder, daß unter diesen Bedingungen andere Effektorcaspasen ebenso eine Plektin-spaltende Aktivität besitzen.

### Caspase-8 ist die proteolytische Aktivität, die Plektin spaltet

Caspasen-vermittelte Spaltung von Plektin im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose ist nicht auf MCF7-Fas-Zellen beschränkt. In der T-lymphoiden Zelllinie H9 konnte ebenfalls nach Apoptoseinduktion das C-terminale Spaltfragment detektiert werden (Abbildung 11A, Bahn 1 und 2). Um zu überprüfen, ob die Spaltung nur an einer definierten Stelle im Plektinmolekül erfolgt, wurde ein anti-Plektin-Antiserum verwendet, das

den N-Terminus erkennt (anti-Plektin-N-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Dr. H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg). Mit dessen Hilfe konnte ein Fragment detektiert werden, das eine im Vergleich zum C-terminalen Spaltfragment leicht erhöhte elektrophoretische Mobilität besitzt (Abbildung 11A, Bahn 3). Während CD95-vermittelter Apoptose wird Plektin somit Caspasenvermittelt in der Mitte des Moleküls gespalten, woraufhin zwei Spaltfragmente ähnlicher Größe entstehen (Abbildung 11C).



**Abbildung 12. Plektin wird durch Caspase-8 in der Mitte des Moleküls gespalten.** (A) Aktiver von SKW6.4-Zellen präparierter DISC wurde mit einer Intermediärfilamentpräparation von MCF7-Fas-Zellen für 16h bei 4°C inkubiert. Die Plektinspaltung wurde durch Western Blot-Analyse mit dem anti-Plektin-C-Antikörper verfolgt. Die Laufpositionen von Plektin und dem C-terminalen Spaltfragment (Plektin<sub>Sp-C</sub>) sind angegeben. (B) *In vitro*-Spaltung von Plektin durch rekombinante Caspasen. Eine Intermediärfilamentpräparation von MCF7-Fas-Zellen wurde mit rekombinanten aktiven Caspasen (jeweils 10 µM) für 8, 12 und 36 h bei 4°C inkubiert. Der Western Blot wurde mit dem anti-Plektin-C-Antikörper entwickelt. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung dieses Western Blots. Es ist das Verhältnis von gespaltenem zu ungespaltenem Plektin (Plektin<sub>Sp</sub>/Plektin x 100) gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

Prozessierung und damit auch die Plektindegradation (Abbildung 11B, Bahnen 3,4) (Scaffidi et al., 1998). Vollständige Plektinspaltung wurde auch in anderen Zelllinien wie der T-Lymphomazelllinie Jurkat, der B-lymphoblastoiden Zelllinie SKW6.4 und der Burkitt-Lymphomazelllinie BJAB beobachtet (Daten nicht gezeigt). Somit ist die Spaltung dieses Zytolinkers ein generelles Phänomen CD95-vermittelter Apoptose, sowohl in Zelllinien lymphoiden als auch nicht-lymphoiden Ursprungs.

Caspase-8 ist die einzige Caspase in MCF7-Fas-Zellen, die nach 2 stündiger Stimulation mit dem anti-CD95-Antikörper bzw. nach 6 stündiger TNF -Behandlung aktiviert wird (Abbildung 9 C,D), d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem Plektinspaltung bereits beobachtbar ist. Um zu zeigen, daß Caspase-8 tatsächlich diejenige Caspase ist, die Plektin spaltet, wurde eine an Plektin angereicherte Intermediärfilamentpräparation mit aktiver durch den DISC gebildeter Caspase-8 inkubiert und mit Hilfe des polyklonalen anti-Plektin-C-Serums im Western Blot analysiert (Abbildung 12A). Es bildete sich ein C-terminales Fragment mit dem gleichen

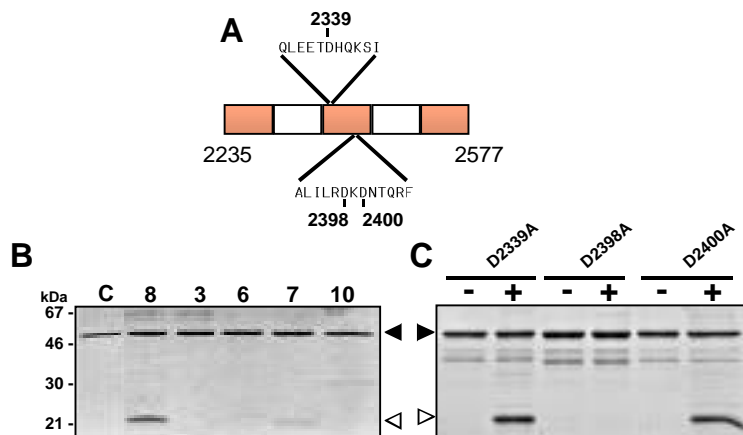
In der Typ I-Zelllinie H9 wird Caspase-8 am DISC aktiviert (Medema et al., 1997). Vollständige Plektinspaltung in diesen Zellen erfolgt innerhalb eines Zeitraums, in der Caspase-8-Aktivierung maximal ist (Daten nicht gezeigt). In CEM-Zellen, bei denen der größte Teil der zellulären Caspase-8-Menge unterhalb der Mitochondrien und damit im Vergleich zu H9-Zellen verzögert aktiviert wird, wurde Plektin erst 2 h später vollständig gespalten (Abbildung 11B, Bahnen 1,2). Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert Caspasen-

Molekulargewicht wie jenes, das *in vivo* in verschiedenen Zelllinien nach anti-CD95-Stimulation zu beobachten war (Plectin<sub>sp-C</sub> in Abbildung 12A, Bahn 2). Dies deutete darauf hin, daß Caspase-8 die enzymatische Aktivität ist, die Plectin in der Mitte des Moleküls spaltet.

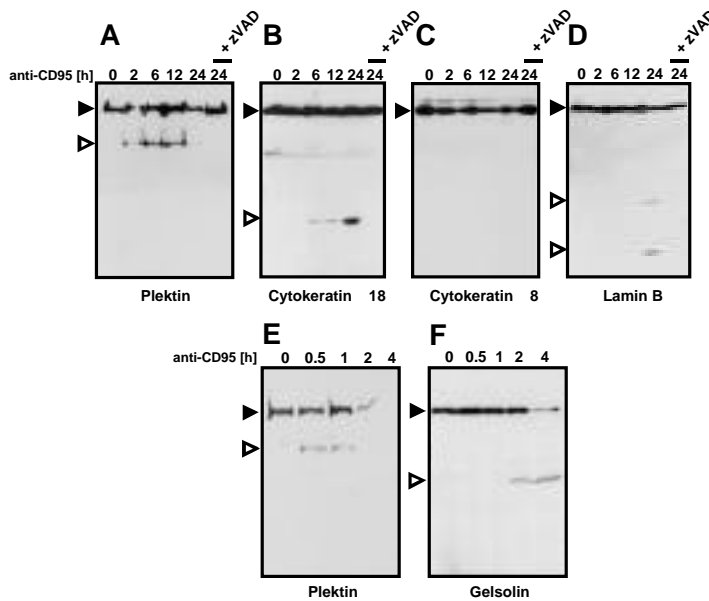
Die meisten Todessubstrate werden durch Caspase-3, zu einem geringeren Anteil auch durch Caspasen 6 oder 7 gespalten (siehe Übersichtsartikel Tan und Wang, 1998). Da Plectin in Caspase-3-defizienten MCF7-Zellen gespalten wurde, kann diese Effektorcaspase nicht essentiell für die Plectindegradation sein. Um diejenige Caspase zu identifizieren, die die höchste Plectin-spaltende Aktivität besaß, wurde eine an Plectin angereicherte Intermediärfilamentpräparation mit rekombinanten aktiven Caspasen für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Abbildung 12B zeigt eine densitometrische Auswertung einer Western Blot-Analyse, die mit dem anti-Plectin-C-Serum durchgeführt wurde (s. auch Legende zu Abbildung 12). Es wurde der Quotient der Schwärzungsintensität des C-terminalen Spaltprodukts und der des ungespaltenen Plectins berechnet und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Caspase-8 stellte sich dabei als die einzige Plectin-degradierende Aktivität heraus.

Sämtliche *in vitro*-Spaltungen wurden mit Intermediärfilamentpräparationen durchgeführt, die sehr stark an Plectin angereichert waren. Es ist daher nicht auszuschließen, daß Caspase-8 Plectin nicht direkt spaltet, sondern eine proteolytische Aktivität induziert, die mit Intermediärfilamentproteinen

mit aufgereinigt wurde. Daher wurde ein Fragment des Ratten-Plectins mit einem Molekulargewicht von 47 kDa rekombinant hergestellt (Abbildung 13A). Dieses Fragment umfaßt das letzte Drittel der stabförmigen Domäne mit der vermuteten Caspase-8-Spaltstelle (grau unterlegt in Abbildung 11C). Die Primärstrukturen von humanem und Ratten-Plectin sind in diesem Bereich zu 96,2% identisch und alle möglichen Caspase-8-Spaltstellen sind konserviert. Dieses Plectinfragment wurde mit verschiedenen rekombinanten Caspasen inkubiert. (Abbildung 13B). Auch in diesem Experiment



**Abbildung 13. Caspase-8 spaltet Plectin an Aspartat 2398.** (A) Schematische Darstellung des rekombinanten Plectinfragments, das den Aminosäuren 2235 bis 2577 im gesamten Plectinmolekül entspricht. Die putativen Caspasenspaltstellen mit den entsprechenden Positionen der Aspartate sind angegeben. (B) *In vitro*-Spaltung des rekombinanten Plectinfragments mit rekombinanten aktiven Caspasen 3, 6, 7, 8 und 10 (jeweils 40  $\mu$ M). Die Spaltung wurde durch Coomassiefärbung des 12%igen Polyacrylamidgels sichtbar gemacht. Sequenzierung des Spaltfragments durch Edman-Abbau zeigte, daß das Spaltfragment den N-Terminus des rekombinanten Plectinmoleküls darstellt. Die C-terminale Hälfte konnte vermutlich aufgrund sekundärer Proteolyse nicht detektiert werden. (C) *In vitro*-Spaltung verschiedener Mutanten des rekombinanten Plectinfragments durch Caspase-8 (jeweils 40  $\mu$ M). Die Mutanten, in denen jeweils ein Aspartatrest gegen einen Alaninrest ausgetauscht worden war, wurden für 24h mit rekombinanter aktiver Caspase-8 (40  $\mu$ M) bei 25°C inkubiert. Die Laufpositionen des ungespaltenen (schwarzer Pfeilkopf) und des gespaltenen Fragments (weißer Pfeilkopf) sind angegeben.



**Abbildung 14. Plektinspaltung geht der Spaltung von Zytokeratin 18, Lamin B und Gelsolin im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose voraus.** (A) MCF7-Fas-Zellen wurden mit anti-CD95-Antikörper (2 µg/ml) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert oder vor Zugabe des Antikörpers mit 20 µM zVAD-fmk vorbehandelt. Die entsprechenden Intermediärfilamentpräparationen wurden durch Western Blot mit dem anti-Plektin-C-Antikörper analysiert. (B)-(D) MCF7-Fas-Zellen wurden wie in (A) behandelt. Anstelle von Intermediärfilamenten wurden Triton-X100-Lysate präpariert und mit Antikörpern gegen die Zytokeratine 18 (B) und 8 (C) sowie gegen Lamin B (D) im Western Blot entwickelt. (E), (F) Jurkat T-Zellen wurden mit anti-CD95 (2 µg/ml) für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Intermediärfilamentpräparationen (E) wurden mit dem anti-Plektin-C-Antikörper und Triton-X100-Lysate (F) mit einem anti-Gelsolin-Antikörper analysiert. Die Laufpositionen der ungespaltenen (schwarze Pfeilköpfe) und der Spaltfragmente (weiße Pfeilköpfe) sind angegeben. Die Spaltfragmente besitzen folgende Molekulargewichte: Plektin (200 kDa), Zytokeratin 18 (28 kDa), Lamin B (28 und 21 kDa), Gelsolin (48 kDa).

erwies sich Caspase-8 als aktivste Caspase. Caspase-8 ist somit in der Lage, Plektin direkt zu spalten. Die Spaltung konnte durch zVAD-fmk blockiert werden, so daß eine unspezifische Proteolyse auszuschließen ist (Daten nicht gezeigt). Die beobachtete Spaltung war jedoch unvollständig, vermutlich weil die stabförmige Domäne eine hohe intrinsische aggregierende Aktivität besitzt. Daher konnte die Spaltungseffizienz weder durch größere Mengen noch durch wiederholte Zugabe von rekombinanter Caspase-8 erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Sequenzierung des etwa 22 kDa-großen Spaltproduktes ergab, daß es den N-Terminus des rekombinanten Plektinfragmentes repräsentiert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des Molekulargewichts konnte somit jene Region und damit potentielle Spaltsequenzen innerhalb des Fragmentes eingegrenzt werden, an denen die Spaltung stattfindet (Abbildung 13A). Um jene Sequenz eindeutig zu identifizieren, an der die

Spaltung erfolgt, wurden sämtliche Aspartat-Reste in der so bestimmten Region durch Alanin-Reste ausgetauscht (Abbildung 13A). Alle Mutanten wurden mit rekombinanter Caspase-8 inkubiert (Abbildung 13C). Mutanten D2339A und D2400A wurden gespalten, Mutante D2398A war jedoch vollständig resistent gegenüber Caspase-8-vermittelter Spaltung. Somit konnte Asp2398 in einem ILRD-Motiv als Caspase-8-Spaltstelle identifiziert werden. Diese Position entspricht Position Asp2395 im humanen Plektin (GenBank-Zugriffsnummer: Z54367) (Liu et al., 1996a). Ein ILRD-Sequenzmotiv stellt eine sehr unübliche Spaltstelle für Caspase-8 dar, deren optimale Spaltsequenz mit P4(ADEILPV) P3(E) P2(ITV) P1(D) bestimmt wurde (Thornberry et al., 1997). Plektin beinhaltet in der Tat eine solche Sequenz, EETD, deren P1-

Position Asp2336 in der Plektinprimärstruktur entspricht und in direkter Nachbarschaft zu dem ILRD-Motiv liegt. Mutation dieses Aspartat-Restes zu Alanin (D2339A in Abbildung 13C) hatte jedoch keinen Einfluß auf die Caspase-8-vermittelte Spaltung des rekombinanten Plektinfragments. Somit wird Plektin spezifisch durch Caspase-8 innerhalb eines IRLD-Sequenzmotivs im Zentrum des Moleküls gespalten.

### **Plektin ist das früheste Substrat, das im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose gespalten wird**

Während Apoptose wird eine Vielzahl zytoskelettaler Proteinstrukturen reorganisiert, wie z.B. die Intermediärfilamente. Diese Reorganisation wird als Voraussetzung für die morphologischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle angesehen (Caulin et al., 1997).

MCF7-Zellen

exprimieren

hauptsächlich die Zytokeratine 8 und 18 (CK8 und CK18) (Moll et al., 1982).

CK18 gehört zu den Typ I-Keratinen und wird Caspase-6-

vermittelt im Rahmen einer Vielzahl von Apoptoseformen

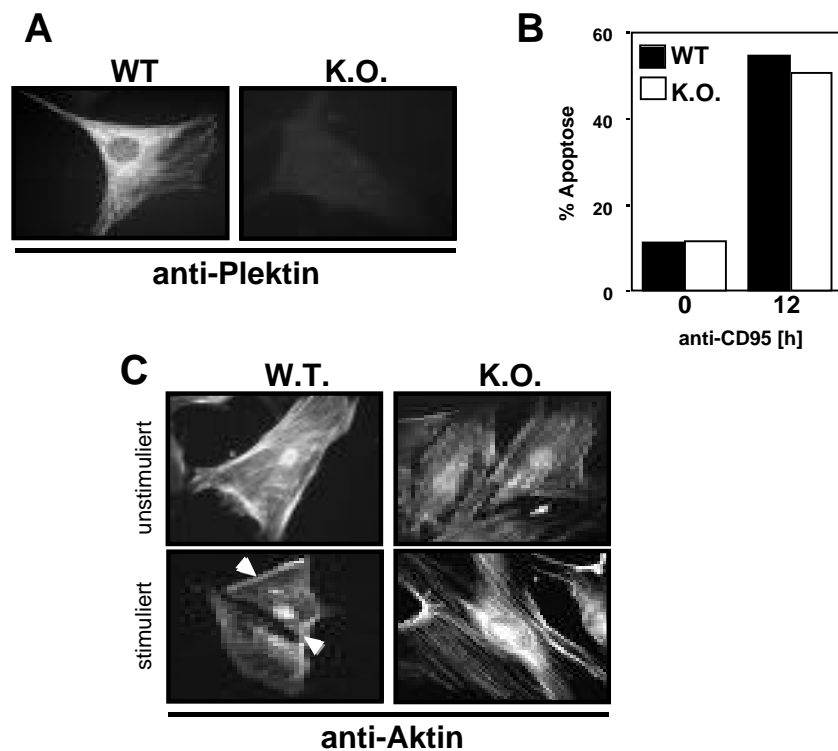
gespalten (Ku et al., 1997; Caulin et al., 1997). CK8 ist ein

Typ II-Zytokeratin, das kein Spaltungsmotiv für Caspasen besitzt und

daher während Apoptose nicht degradiert wird (Caulin et al., 1997).

In Übereinstimmung mit der Vorhersage wurde CK18 im

Rahmen CD95-



**Abbildung 15. Plektin ist notwendig für die Reorganisation des Aktinfilamentsystems im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose.** (A) Immunfluoreszenzfärbung von primären Fibroblasten von Wildtyp (W.T.)- und Plektin-K.O.-Mäusen mit dem anti-Plektin-C-Antikörper. (B) Sensitivität von IFN- $\beta$ -behandelten primären Fibroblasten gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Zellen wurden mit IFN- $\beta$  für 36 h stimuliert und Apoptose wurde durch Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml anti-CD95-Antikörper (Jo2, Pharmingen), 10 ng/ml Protein A (PA) und 1  $\mu$ g/ml Cycloheximid (CHX) induziert. Apoptose wurde durch Messung der DNA-Fragmentierung nach der Nicoletti-Methode quantifiziert. (C) Färbung der Aktinfilamente primärer Fibroblasten mit FITC-gekoppeltem Phalloidin. Zellen wurden unbehandelt oder nach Stimulation mit anti-CD95-Antikörper/PA/CHX gefärbt.

vermittelter Apoptose in MCF7-Fas-Zellen gespalten, woraufhin ein N-terminales Spaltfragment von 29 kDa entstand, während CK8 nicht degradiert wurde (Abbildung 14B, C). Diese Spaltung war Caspasen-vermittelt, da sie durch Vorinkubation der Zellen mit dem Caspaseninhibitor zVAD-fmk blockiert werden konnte (Abbildung 14B). Ein Vergleich der Spaltungskinetik von CK18 und Plektin zeigte, daß Plektin deutlich vor CK18 gespalten wurde (Abbildung 14A). Das nukleare IF-Protein Lamin B wurde ebenfalls im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose proteolytisch degradiert. Eine Western Blot-Analyse zeigte, daß Spaltprodukte von 21 und 28 kDa nach 24 stündiger Inkubation mit dem anti-CD95-Antikörper nachweisbar waren (Abbildung 14D). Ein weiteres zytoskelettales Protein, das Caspase-3-vermittelt gespalten wird, ist Gelsolin, ein Mikrofilament-assoziiertes Protein, das die Aktinpolymerisation reguliert (Kothakota et al., 1997). Da MCF7-Zellen Caspase-3-defizient sind, wurde die Spaltungskinetik von Gelsolin und Plektin in anti-CD95-stimulierten Jurkat T-Zellen verglichen (Abbildung 14E, F). Die Spaltung von Plektin ging auch der Gelsolin-Spaltung deutlich voraus: Plektin wurde bereits nach 30 min, Gelsolin erst nach 2h anti-CD95-induzierter Apoptose degradiert. Somit konnte mit Plektin ein Caspasensubstrat identifiziert werden, das früh und vor allen anderen Substraten während CD95-vermittelter Apoptose gespalten wird.

### **Plektin ist für die Aktin-Reorganisation während Apoptose verantwortlich**

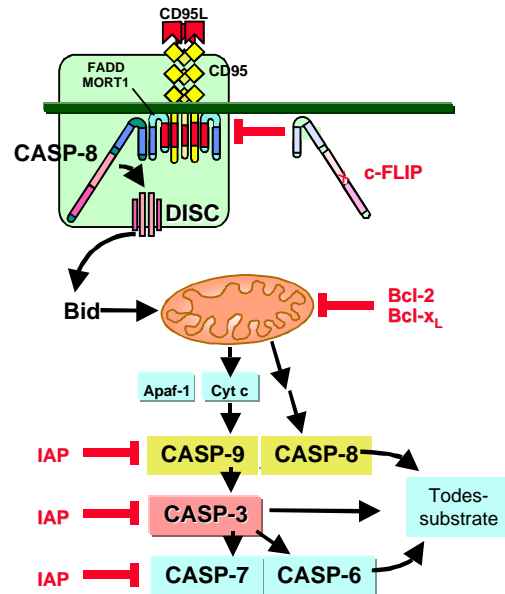
Um die Rolle von Plektin während Apoptose zu bestimmen, wurden embryonale Fibroblasten von Plektin-defizienten Mäusen (Abbildung 15A) mit INF- $\gamma$  behandelt, um die CD95-Expression hochzuregulieren und sie gegenüber CD95-vermittelter Apoptose zu sensitivieren. Nach Inkubation mit murinem anti-CD95-Antikörper (Jo2, Pharmingen) wurde DNA-Fragmentierung nach der Nicoletti-Methode quantifiziert (Abbildung 15B). Sowohl Wildtyp- (W.T.)- als auch Plektin-defiziente (K.O.-) Zellen waren gleich sensitiv, so daß Plektin keine Rolle in dem Signalweg spielt, der zur Aktivierung von Endonukleasen führt.

Plektin bindet Aktinfilamente über seine N-terminale ABD und ist aktiv an deren Reorganisation nach Stimulation von Rho, Rac und Cdc42 beteiligt (Andrä et al., 1998). Da die Aktinreorganisation im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose eine signifikante Rolle spielt (Nicholson et al., 2000), wurden Aktinstreßfasern durch Phalloidin-Färbung in anti-CD95-behandelten W.T.- und K.O.-Fibroblasten sichtbar gemacht (Abbildung 15C). Nach Apoptoseinduktion in W.T.-Fibroblasten konnte eine vollständige Reorganisation der Aktinstreßfasern beobachtet werden, die in den K.O.-Fibroblasten jedoch nicht stattfand. Diese Daten zeigen, daß Plektin eine aktive Rolle in der Aktindepolymerisation im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose spielt.

## III-2.

## MITOCHONDRIALES BCL-2/BCL-X<sub>L</sub> REGULIERT CYTOPLASMATISCHE AKTIVE CASPASE-8

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist Caspase-8 nicht nur eine Initiatorcaspase, die am Rezeptor aktiviert wird und die apoptogene Aktivität von Mitochondrien sowie eine Caspasen-Kaskade induzieren kann, sondern auch eine Effektorcaspase, die den Zytolinker Plektin spalten und damit zur zellulären Desintegration während Apoptose beiträgt. Apoptoseinduktion über den Todesrezeptor CD95 führt zur Aktivierung von Caspase-8 am DISC (Abbildung 16; Kischkel et al., 1995). In CD95-Typ II-Zellen wird die apoptogene Aktivität der Mitochondrien durch DISC-aktivierte Caspase-8 induziert (Scaffidi et al., 1998). Dies geschieht wahrscheinlich über Spaltung von Bid, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie (Abbildung 16; Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1998). CD95-vermittelte Apoptose kann in Typ II-Zellen durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert werden (Scaffidi et al., 1998). Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> sind jedoch nicht in der Lage, die Aktivierung von Caspase-8 am DISC zu verhindern (Medema et al., 1998). Wie lässt sich erklären, daß eine Zelle potentiell zytotoxische Mengen aktiver Caspase-8 produziert und intrazellulär akkumuliert, jedoch resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose ist? Daß aktive Caspasen durch antiapoptotische Moleküle inhibiert werden können, zeigte die Identifikation und Charakterisierung der c-IAP-Proteinfamilie, die spezifisch Caspasen inhibieren können, indem sie neben der Prozessierung der Procaspase auch direkt das bereits prozessierte und damit aktive Enzym inhibieren (Abbildung 16; Ekert et al., 1999). Die c-IAP-Proteine wurden als regulatorische Moleküle für Caspase-3, -7 und -9 beschrieben, ein c-IAP, das spezifisch Caspase-8 inhibiert, konnte bislang jedoch noch nicht identifiziert werden (Ekert et al., 1999).

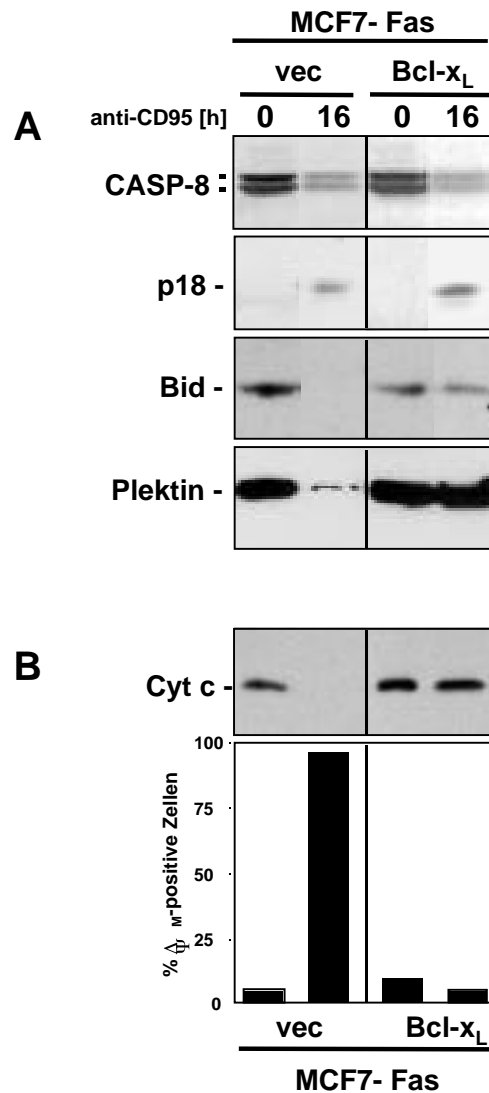


**Abbildung 16. Inhibitoren CD95-vermittelter Apoptose.** CD95-vermittelte Apoptose kann oberhalb der Mitochondrien, d.h. auf DISC-Ebene, durch c-FLIP, auf der Ebene von Mitochondrien durch Bcl-2-Proteine und unterhalb der Mitochondrien durch IAP blockiert werden. Für Details s. Text.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Mechanismus detailliert untersucht werden, wie mitochondriales Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> aktive Caspase unterhalb des DISC regulieren.

### **Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid und Plektin, nicht aber die Caspase-8-Prozessierung in MCF7-Zellen**

Die Brustkarzinomzelllinie MCF7-Fas verhält sich einerseits wie eine Typ I-Zelle, da signifikante Mengen an Caspase-8 am DISC gebildet werden (Medema et al., 1998). Andererseits wirkt die Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> in diesen Zellen inhibitorisch. Die apoptogene Aktivität von Mitochondrien ist dementsprechend ein notwendiger Amplifikationsschritt der CD95-vermittelten Signaltransduktion in diesen Zellen, die daher als Typ II-Zelllinie identifiziert wurde (Scaffidi et al., 1998). Die Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> oder Bcl-2 inhibiert in einer Typ II-Zelle sämtliche proapoptotischen Signalereignisse wie DNA-Fragmentierung, Verminderung des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\psi_M$ ), Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Aktivierung von Caspase-3 und der größten Menge von Caspase-8 (Scaffidi et al., 1998). In MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen war dementsprechend DNA-Fragmentierung inhibiert und eine apoptotische Morphologie nicht zu beobachten (Medema et al., 1998). Darüber hinaus inhibierte Bcl-x<sub>L</sub> die Verminderung von  $\Delta\psi_M$  sowie die Freisetzung von Cytochrom c (Abbildung 17B). Unerwartet war jedoch, daß in der MCF7-Bcl-x<sub>L</sub>-



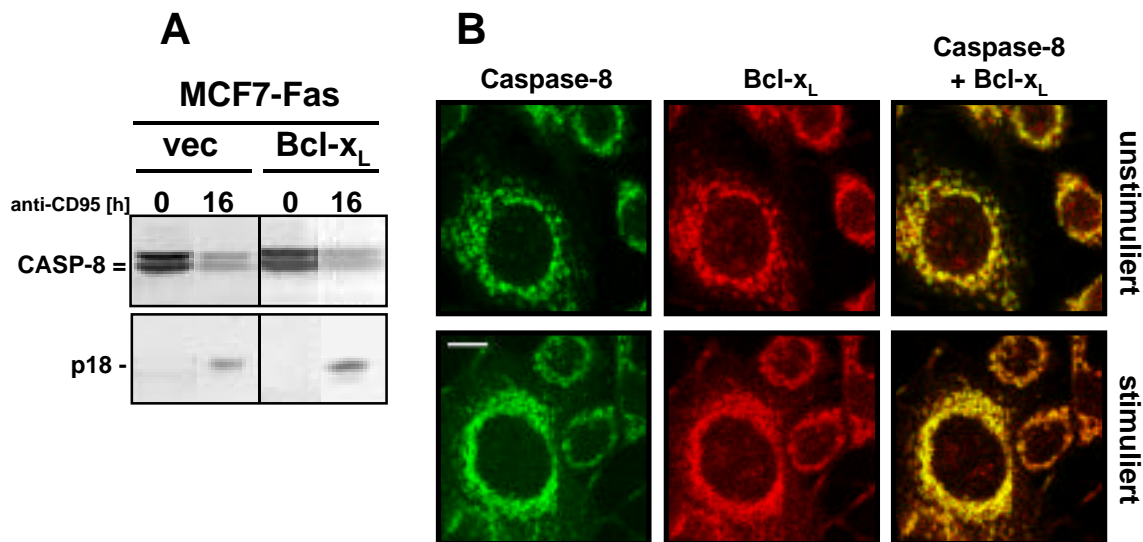
**Abbildung 17. Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> verhindert mitochondriale Veränderungen und die Spaltung von Caspasen-Substraten, nicht aber die Aktivierung von Caspase-8.** (A) Triton-X100-Lysate von MCF7-Fas-vec und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen (unstimuliert und anti-CD95-behandelt, 2 µg/ml) wurden im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. Die Laufpositionen von Caspase-8/a, -8/b (CASP-8), der aktiven Untereinheit p18, sowie von Bid und Plektin sind angegeben. (B) Bcl-x<sub>L</sub> blockiert Cytochrom c-Freisetzung und Verminderung von  $\Delta\psi_M$ . Mitochondrien von MCF7-Fas-vec und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub> (behandelt wie unter (A) beschrieben) wurden isoliert und im Western Blot auf die Anwesenheit von Cytochrom c untersucht. Das mitochondriale Transmembranpotential ( $\Delta\psi_M$ ) wurde mit Hilfe einer JC-1-Färbung (s. Material und Methoden) bestimmt.



Transfektante Bid nicht gespalten wurde (Abbildung 17A), dessen Degradation durch DISC-aktivierte Caspase-8 die apoptogene Aktivität der Mitochondrien induziert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999). Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression verhinderte auch, daß das Caspase-8-Substrat Plektin degradiert wurde (Abbildung 17A). Dabei wurde Caspase-8 sowohl in der korrespondierenden Vektor- als auch in der Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektante in einem gleichen Ausmaß prozessiert (Abbildung 17A). Die vollständige Umsetzung von Procaspase-8 in das aktive Enzym vermochte in der Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektante jedoch keine Apoptose auszulösen. Diese Daten stehen in Einklang mit einer Studie, die zeigte, daß selbst Mikroinjektion rekombinanter aktiver Caspase-8 in MCF-7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen nicht zum Tod dieser Zellen führte (Srinivasan et al., 1998). Aktive Caspase-8 ist in MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen entweder inaktiviert oder nicht in der Lage, potentielle Substrate im Zytoplasma, wie Bid oder Plektin, zu erreichen.

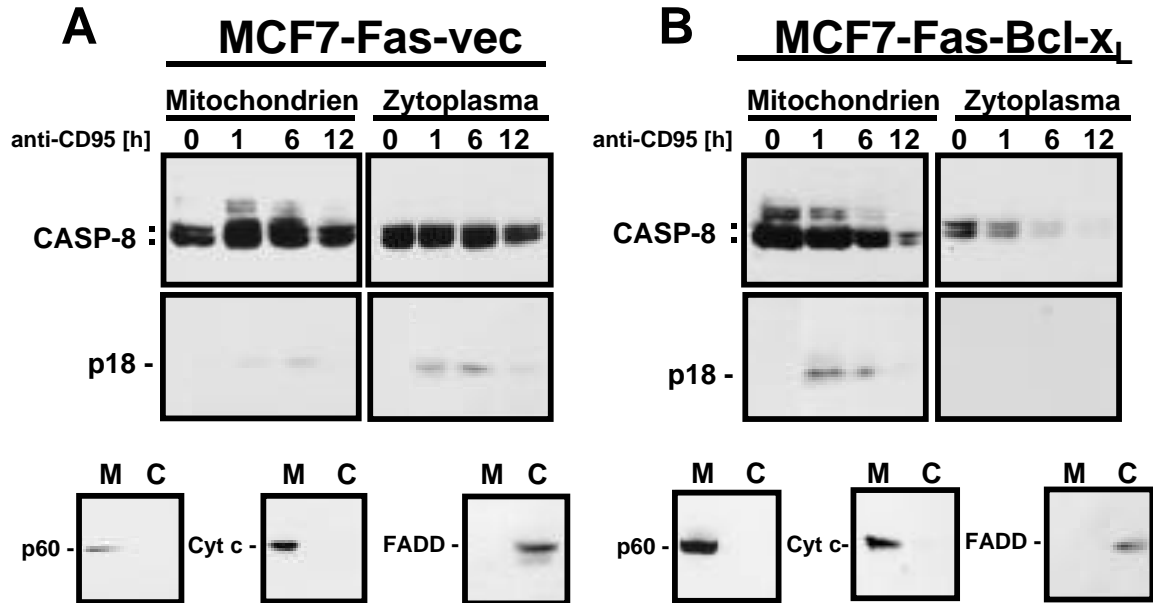
### Aktive Caspase-8 ist in MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub> Zellen mitochondrial lokalisiert

Mit Hilfe konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, daß aktive Caspase-8 in MCF7-Fas-Zellen nach Apoptoseinduktion zum Zytolinker Plektin translozierte, der daraufhin quantitativ durch Caspase-8 gespalten wurde. Mit Hilfe dieser Technik wurde die Lokalisation in jenen MCF7-Fas-Zellen analysiert, die durch Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression gegenüber Apoptose geschützt sind (Abbildung 18B). Mit Hilfe des monoklonalen anti-Caspase-



**Abbildung 18. Aktive Caspase-8 kolokalisiert mit mitochondrialem Bcl-x<sub>L</sub>.** (A) Western Blot-Analyse von Triton-X100-Lysaten von MCF7-Fas-vec und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen (unstimuliert und stimuliert mit anti-CD95, 2 µg/ml) mit Hilfe des anti-Caspase-8-Antikörpers C15. Die Laufpositionen von Caspase-8 (CASP-8) und der aktiven Untereinheit p18 sind angegeben. (B) Immunfluoreszenzfärbung von unstimulierten und anti-CD95-stimulierten MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen. Zellen wurden für Caspase-8 (FITC-gekoppelter C5-Antikörper, links) und Bcl-x<sub>L</sub> (Sekundärantikörper PE-gekoppelt, Mitte) doppelfärbt. In den rechten Abbildung ist die Überlagerung der Einzelfluoreszenzen zu sehen. Linie in (B) entspricht 10 µm.

Antikörpers C5, der ein Epitop in der aktiven Untereinheit p18 erkennt, konnte gezeigt werden, daß Procaspase-8 in nicht-apoptotischen MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen mitochondrial lokalisiert ist ("unstimuliert, Caspase-8" in Abbildung 18B). Bcl-x<sub>L</sub> wurde ebenfalls nahezu ausschließlich mit Mitochondrien assoziiert gefunden ("Bcl-x<sub>L</sub>" in Abbildung 18B). Nach 16 stündiger



**Abbildung 19. Aktive Caspase-8 assoziiert mit Mitochondrien in MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen.** MCF7-Fas-vec (A) und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen (B) wurden für die angegebenen Zeiträume mit anti-CD95-Antikörper stimuliert. Durch subzelluläre Fraktionierung wurden daraufhin Zytoplasma und Mitochondrien präpariert. Die Spaltung von Caspase-8 wurde durch Western Blot-Analyse mit dem C15-Antikörper verfolgt. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Western Blot-Analyse der mitochondrialen Markerproteine p60 und Cytochrom c (Cyt c), sowie des zytoplasmatischen Proteins FADD überprüft. Die Laufpositionen von Caspase-8 (CASP-8), p18, p60, Cytochrom c und FADD sind angegeben.

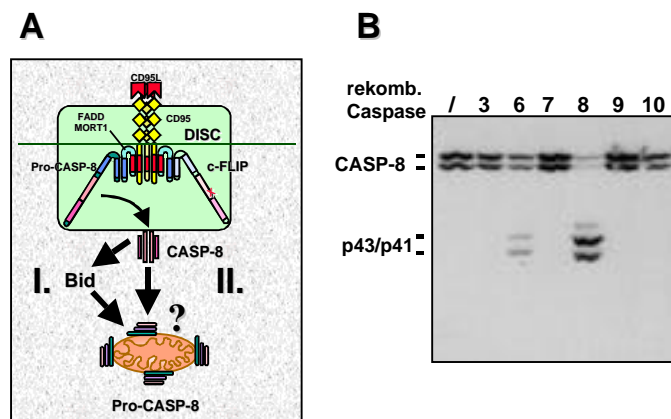
Apoptoseinduktion durch den agonistischen anti-CD95-Antikörper und vollständiger Prozessierung von Caspase-8 (wie durch Western Blot-Analyse mit Hilfe des anti-Caspase-8-Antikörpers C15 in Abbildung 18A gezeigt), wurden die aktiven Untereinheiten ähnlich dem Proenzym an Mitochondrien gefunden (Abbildung 18B, "stimuliert"). Aktive Caspase-8 wird daher von mitochondrialem Bcl-x<sub>L</sub> darin gehindert, zu seinen zytoplasmatischen Substraten wie Bid oder Plektin zu translozieren.

Daß aktive Caspase-8 in MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub> mitochondrial lokalisiert ist, konnte auch mit Hilfe subzellulärer Fraktionierung gezeigt werden (Abbildung 19). MCF7-Fas-vec und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit dem anti-CD95-Antikörper behandelt. Die mitochondriale Fraktion wurde anschließend vom Zytoplasma getrennt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden auf die Anwesenheit sowohl von Procaspase-8 als auch von aktiver Caspase-8 durch Western Blot-Analyse untersucht. Procaspase-8 fand sich zum größten Teil in der mitochondrialen Fraktion beider Zelllinien, wobei die Menge in der Bcl-x<sub>L</sub>- im Vergleich zur Vektortransfektante leicht erhöht war. Nach Apoptoseinduktion wurden in beiden

Zelllinien aktive p18-Untereinheiten gebildet, die sich in der Vektortransfektante im Zytoplasma befanden (Abbildung 19A), in der Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektante in Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzdaten jedoch mitochondrial lokalisiert waren (Abbildung 19B). Die Reinheit der mitochondrialen und zytoplasmatischen Fraktion wurde durch Western Blot-Analyse bestimmt: Die Markerproteine p60 und Cytochrom c befanden sich ausschließlich in den Mitochondrien, während FADD zytoplasmatisch lokalisiert war (Abbildung 19 A,B).

### Mitochondriale Procaspase-8 kann durch aktive Caspase-8 aktiviert werden

Wie wird mitochondriale Procaspase-8 durch DISC aktivierte Caspase-8 prozessiert (Abbildung 20A)? Dies könnte auf direktem und damit Bid-unabhängigen Weg geschehen (II. in Abbildung 20A) oder auf indirektem Weg durch Spaltung von Bid mit nachfolgender Translokation von p15Bid zu Mitochondrien. Mit der Induktion der apoptogenen Aktivität der Mitochondrien könnte p15Bid indirekt zur Caspase-8-Aktivierung beitragen. Um diese generelle Frage zu beantworten, wurden Mitochondrien von MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen mit verschiedenen rekombinanten aktiven Caspasen inkubiert (Abbildung 20B). Caspase-8 besaß die größte Aktivität mitochondriale Procaspase-8 zu prozessieren. Inkubation der Mitochondrien mit rekombinanter aktiver Caspase-8 in Gegenwart naiver zytoplasmatischer Extrakte von Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen hatte keinen additiven Effekt auf die Caspase-8-Prozessierung (Daten nicht gezeigt). In einer kinetischen Analyse konnte gezeigt werden, daß diese Prozessierung in Gegenwart jener zytoplasmatischen Extrakte auch nicht früher erfolgte (Daten nicht gezeigt). *In vitro*-translatiertes p15Bid oder rekombinantes AIF waren nicht in der Lage, mitochondriale Procaspase-8 zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Diese Daten legen nahe, daß DISC-aktivierte zytoplasmatische Caspase-8 mitochondriale Procaspase-8 direkt, d.h. Bid-unabhängig, prozessieren kann.

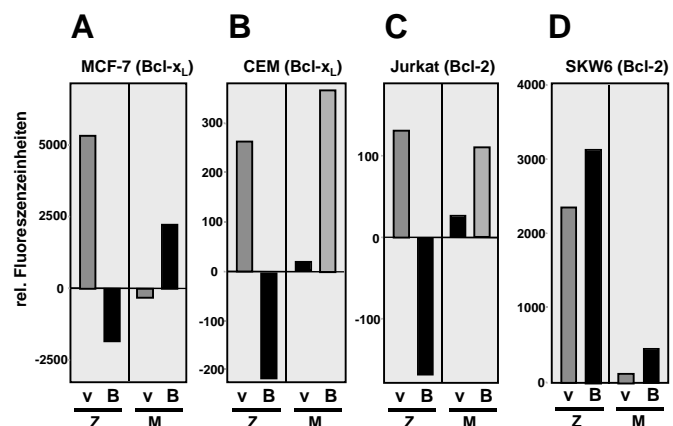


**Abbildung 20. Aktive Caspase-8 kann mitochondriale Procaspase-8 aktivieren.** (A) Schematische Darstellung des CD95-Signalwegs oberhalb der Mitochondrien. Nach Trimerisierung des Rezeptors durch den CD95L bildet sich der DISC, der zur Aktivierung von Caspase-8 führt. Aktive Caspase-8 (CASP-8) kann entweder Bid spalten und somit die apoptogene Aktivität der Mitochondrien und damit möglicherweise über einen indirekten Mechanismus die Aktivierung von Procaspase-8 induzieren (I.), oder Procaspase-8 auf den Mitochondrien direkt aktivieren (II.). (B) Aktive Caspase-8 prozessiert mitochondriale Procaspase-8. Mitochondrien von MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen wurden mit verschiedenen rekombinanten Caspasen inkubiert und die Spaltung von Procaspase-8 wurde durch Western Blot-Analyse mit dem anti-Caspase-Antikörper N2 verfolgt. N2 erkennt die Prodomäne von Caspase-8 und kann daher nicht die zugegebene rekombinante aktive Caspase-8 nachweisen. Die Laufpositionen von Caspase-8 (CASP-8) und der Spaltfragmente p43, p41 sind angegeben.

### Mitochondrien-gebundene aktive Untereinheiten von Caspase-8 sind enzymatisch aktiv

Führt die Bindung aktiver Untereinheiten an Mitochondrien zur Inaktivierung von Caspase-8 oder wird aktive Caspase-8 sequestriert ohne deren Aktivität zu beeinflussen? Um diese Frage zu beantworten, wurden MCF7-Fas-vec- und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen für 3h mit dem agonistischen Antikörper anti-CD95 behandelt. Zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen stimulierter und unstimulierter Zellen wurden voneinander getrennt und auf Caspase-8-Aktivität hin getestet (Abbildung 21A). Die Aktivität in den Fraktionen unstimulierter Zellen wurde als Hintergrund definiert und von jenen Werten der stimulierten Zellen subtrahiert. In MCF7-Fas-vec-Zellen wurde die gesamte zelluläre Caspase-8-Aktivität im Zytoplasma gefunden ("v, Z" in Abbildung 21A), Mitochondrien dieser Zellen zeigten keinerlei Aktivität ("M, v" in Abbildung 32A). In der entsprechenden Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektante waren die Verhältnisse genau umgekehrt: Das Zytoplasma zeigte negative Werte, während ein signifikanter Anteil aktiver Caspase-8 in der mitochondrialen Fraktionen nachgewiesen wurde ("M, B" in Abbildung 21A). Um zu testen, ob Mitochondrien anderer Zelllinien, die Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, ebenfalls die Fähigkeit besitzen, aktive Caspase-8 zu sequestrieren, wurden zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen aus den Typ II-Zelllinien CEM-Bcl-x<sub>L</sub> (Abbildung 21B) und Jurkat-Bcl-2 (Abbildung 21C), sowie aus der Typ I-Zelllinie SKW6-Bcl-2 (Abbildung 21D) isoliert und Caspase-8-Aktivität wurde mit Hilfe des Fluoreszenzaktivitätstest bestimmt.

Wiederum wurden die Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2-Transfektanten mit den entsprechen Kontrolltransfektanten verglichen. Mit den CEM-Bcl-x<sub>L</sub> und den Jurkat-Bcl-2-Transfektanten wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten, wie bereits für die MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen beschrieben: In den Kontrolltransfektanten war die gesamte Caspase-8-Aktivität größtenteils zytoplasmatisch, in Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2-Transfektanten ausschließlich mitochondrial nachweisbar. Die Signalstärke war in den Jurkat und CEM-Zellen deutlich geringer als in den MCF7-Zellen, da diese Zellen als Typ II-Zellen nur geringe Mengen an aktivierter Caspase-8 besitzen, die



**Abbildung 21. Aktive Caspase-8 bindet an Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>-exprimierende Mitochondrien.** MCF7-Fas-vec- und MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>- (A), CEM-vec- und CEM-Bcl-x<sub>L</sub>- (B), Jurkat-vec- und Jurkat-Bcl-2- (C), SKW6-vec- und SKW6-Bcl-2-Zellen wurden mit anti-CD95-Antikörper für 3h (MCF7-Zellen) oder für 30 min (CEM-, Jurkat-, SKW6-Zellen) stimuliert und in Mitochondrien (M) und Zytoplasma (Z) getrennt. Die Menge aktiver Caspase-8 wurde mit Hilfe des spezifischen Caspase-8-Peptidsubstrats zIETD-AFC fluorimetrisch bestimmt. Werte von unstimulierten Zellen wurden von jenen Werten subtrahiert, die mit anti-CD95-stimulierten Zellen erhalten wurden. Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten. v, Vektor-Transfektante, B, Bcl-x<sub>L</sub> bzw. Bcl-2-Transfektante.

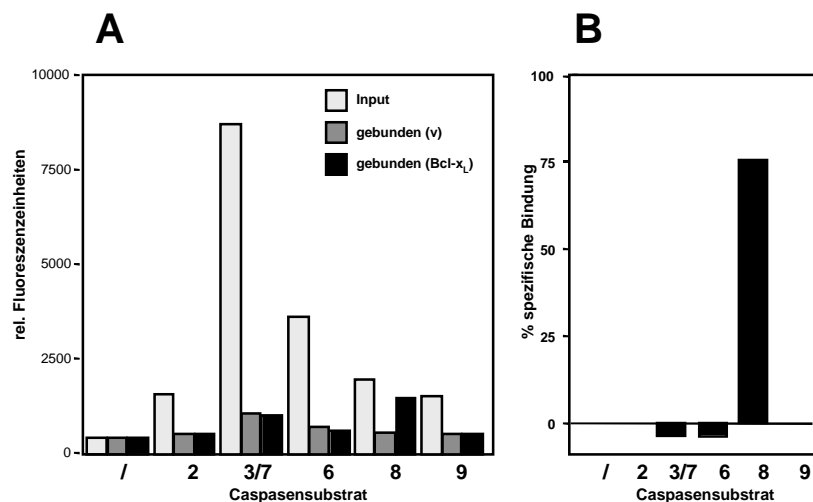
am DISC gebildet werden (Scaffidi et al., 1998). In der Typ I-Zelllinie SKW6 wurde deutlich mehr DISC-aktivierte Caspase-8 gebildet (Scaffidi et al., 1998), so daß die Kapazität der Bcl-2-exprimierenden Mitochondrien nicht ausreichte, um die gesamte Menge zytoplasmatischer aktiver Caspase-8 zu binden. Im Gegensatz zu CEM-Bcl-x<sub>L</sub> und Jurkat-Bcl-2-Zellen sind SKW6-Bcl-2 nicht vor Apoptose geschützt (Scaffidi et al., 1998). Da Caspase-8 in der Bcl-2-Transfektante stärker aktiviert wurde, konnte dementsprechend mehr im Zytoplasma und damit auch mehr an den Mitochondrien nachgewiesen werden. Der zweifelsfreie Nachweis, daß Bcl-2-überexprimierende Mitochondrien aktive Caspase-8 tatsächlich binden können, wurde in einem im nächsten Abschnitt

beschriebenen Experiment erbracht (s.u.). Mitochondrien haben also in Anwesenheit von Bcl-x<sub>L</sub> oder Bcl-2 die Fähigkeit, aktive Caspase-8 aus dem Zytoplasma zu sequestrieren. Diese Fähigkeit ist nicht alleine auf MCF7-Zellen beschränkt, sondern stellt vielmehr ein generelles Phänomen dar.

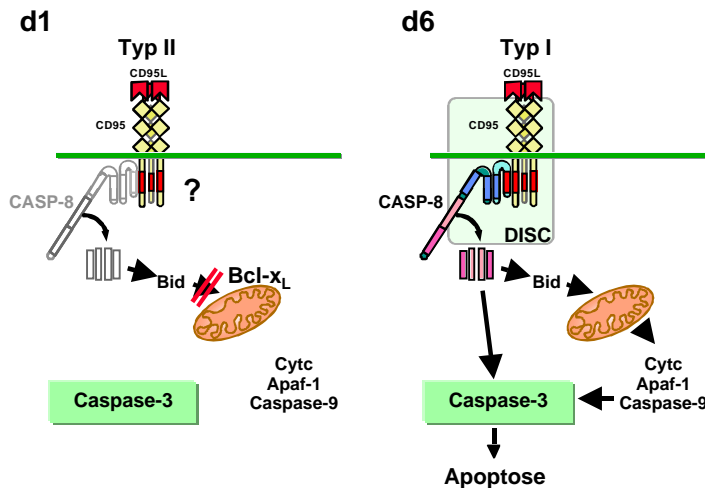
### Die Bindung aktiver Caspase-Untereinheiten ist spezifisch für Caspase-8

Um zu testen, ob Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2-exprimierende

Mitochondrien spezifisch aktive Caspase-8 binden oder ob auch andere Effektorcaspasen eine Affinität zu Mitochondrien besitzen, wurde folgendes Bindungsexperiment durchgeführt (Abbildung 22): Ein Lysat von apoptotischen SKW6.4-Zellen wurde hergestellt, welches sämtliche aktive Caspasen beinhaltet. Dieses Lysat wurde mit Mitochondrien aus MCF7-Fas-vec bzw. MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen inkubiert und die Menge an gebundener Caspase wurde wiederum mit einem Fluoreszenzaktivitätstest bestimmt. Die am stärksten aktivierte Caspase im SKW6.4-Lysat war Caspase-3/7. Es ist anzumerken, daß das Substrat zDEVD sowohl durch Caspase-3 als auch durch Caspase-7 gespalten werden kann. Unter den experimentellen



**Abbildung 22. Die Bindungsaktivität Bcl-x<sub>L</sub>-exprimierender Mitochondrien ist spezifisch für aktive Caspase-8.** (A) Mitochondrien von MCF7-Fas-vec und von MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen wurden mit zytosolischen Extrakten von SKW6.4-Zellen inkubiert, die für 20 min mit anti-CD95-Antikörper behandelt worden waren. Die Menge aktiver Caspasen wurde fluorimetrisch an Mitochondrien beider Transfektanten und im ursprünglichen aktivierten SKW6.4-Extrakt bestimmt. (B) Prozentsatz an gebundener Caspase-8 aus dem Experiment, das in (A) beschrieben ist. Die Menge an aktiver Caspase-8, die an Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Mitochondrien gebunden wurde, wurde von jener Menge aktiver Caspase an Mitochondrien der Vektortransfektante subtrahiert und zur Gesamtmenge aktiver Caspase im ursprünglichen SKW6.4-Extrakt in Beziehung gesetzt. Der prozentuale Anteil gebundener aktiver Caspase-8 im Vergleich zur eingesetzten Menge wurde als % spezifische Bindung definiert.



**Abbildung 23. T-Zellen ändern ihren Apoptosephänotyp in Abhängigkeit ihres Aktivierungsstatus von Typ II nach Typ I.** Frisch isolierte periphere T-Zellen werden durch Inkubation mit PHA für 24h aktiviert. Diese kurzzeit-aktivierten T-Zellen werden als d1 T-Zellen bezeichnet. Diese Zellen zeichnen sich durch eine geringe DISC-Bildung aus und können daher als Typ II-Zellen klassifiziert werden. Darüberhinaus regulieren sie Bcl-x<sub>L</sub> auf Proteinebene hoch, das die apoptogene Aktivität der Mitochondrien und damit einen apoptotischen Phänotyp inhibiert. d1 T-Zellen sind also gegenüber CD95-vermittelter Apoptose resistent und ähneln einer Bcl-x<sub>L</sub>-transfizierten Typ II-Zelllinie, wie CEM-Bcl-x<sub>L</sub>. Diese kurzzeit-aktivierten d1 T-Zellen können in Gegenwart von IL-2 weiterkultiviert werden. Nach einigen Tagen spricht man von langzeit-aktivierten T-Zellen, die als d5-T-Zellen bezeichnet werden. Bcl-x<sub>L</sub> ist herunterreguliert und die Menge an DISC-aktivierter Caspase-8 reicht aus, um direkt und Mitochondrien-unabhängig Caspase-3 zu aktivieren. Diese Zellen können daher als Typ I-Zellen bezeichnet werden. Sie sind sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose.

Bcl-2 als auch Bcl-x<sub>L</sub> geben Mitochondrien somit die Fähigkeit, spezifisch aktive Caspase-8-Untereinheiten zu binden.

### Mitochondrien von kurzzeit-aktivierten und Bcl-x<sub>L</sub>-hochregulierenden T-Zellen binden aktive Caspase-8

Unter welchen physiologischen Bedingungen kann diese neuartige Aktivität von Mitochondrien eine Rolle spielen? Für eine Vielzahl von physiologischen Situationen wurde gezeigt, daß die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> oder Bcl-2 Resistenz gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose vermittelt. Naive, periphere humane T-Zellen regulieren CD95 und Bcl-x<sub>L</sub> hoch, wenn sie *in vitro* in der Gegenwart von Phytohaemagglutinin (PHA) kultiviert werden (Klas et al., 1993; Peter et al., 1997c; Scaffidi et al., 1999). Diese T-Zellen, die als d1 T-Zellen bezeichnet werden, sind resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Klas et al., 1993; Irmeler et al., 1997; Refaeli et al., 1998), werden aber nach längerer Kultivierung (etwa 3-4 Tage) in Gegenwart von IL-2 sensitiv. Diese langzeit-aktivierten T-Zellen wurden als d5/d6 T-Zellen bezeichnet (Klas et al., 1993). d1 T-Zellen zeichnen sich desweiteren dadurch aus, daß sie wenig

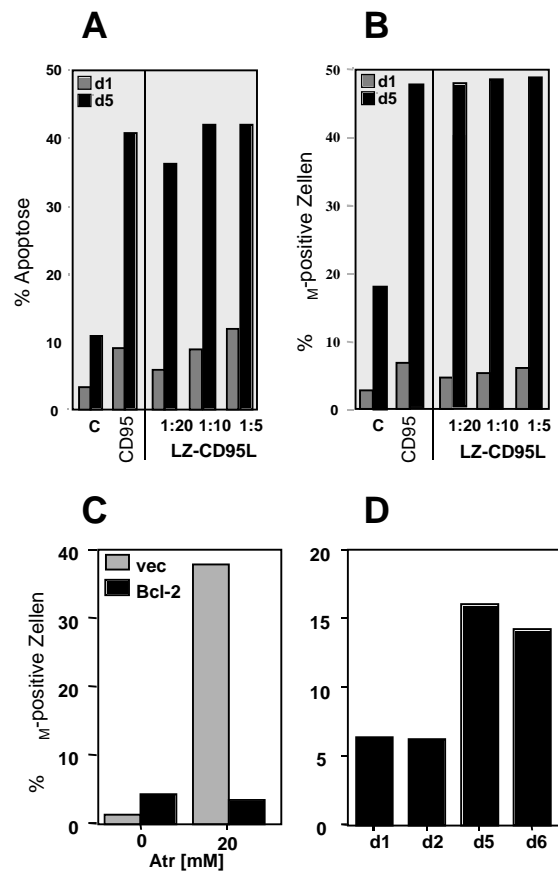
Bedingungen repräsentiert die gemessene Aktivität zum größten Teil aktive Caspase-3 (Slee et al., 1999). Caspase-8 stellte sich als die einzige Caspase heraus, die an Bcl-x<sub>L</sub>-exprimierende Mitochondrien gebunden wurde. Mehr als 75% der im Lysat vorliegenden aktivierten Caspase-8-Menge fand sich an Mitochondrien von MCF7-Fas-Bcl-x<sub>L</sub>-Zellen,

wohingegen alle übrigen getesteten Caspasen keine im Vergleich zu Mitochondrien der Kontrolltransfektante erhöhte Bindung an Bcl-x<sub>L</sub>-exprimierende Mitochondrien zeigten (Abbildung 22). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Mitochondrien aus SKW6-Bcl-2-Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt). Sowohl

DISC und damit geringe Mengen an DISC-aktivierter Caspase-8 bilden (Peter et al., 1997c). Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> schützt diese Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose. Sie besitzen daher Eigenschaften, die einer Typ II-Zelle zugeschrieben wurden (Abbildung 23, links) (Scaffidi et al., 1998). d5/d6 T-Zellen hingegen bilden signifikante Mengen an DISC und scheinen daher einen Typ I-Apoptosephänotyp zu besitzen (Abbildung 23, rechts) (Scaffidi et al., 1998). Sind Bcl-x<sub>L</sub> hochexprimierende Mitochondrien von d1 T-Zellen in der Lage, aktive, am DISC generierte Caspase-8 zu binden und somit zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beizutragen?

Um dies zu testen, wurde zunächst die Apoptosesensitivität von d1 und d5 T-Zellen sowohl gegenüber dem anti-CD95-Antikörper als auch gegenüber dem CD95L durch Quantifizierung der DNA-Fragmentierung nach der Nicoletti-Methode bestimmt (Abbildung 24A). d1 T-Zellen erwiesen sich als resistent, d5 T-Zellen waren sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Wie aufgrund erhöhter Bcl-x<sub>L</sub>-Mengen in d1 T-Zellen erwartet, ergab die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\psi_M$ ), daß Mitochondrien von anti-CD95-stimulierten d1 Zellen im Gegensatz zu Mitochondrien von apoptotischen d5 Zellen protektiert sind (Abbildung 24B). Dies zeigte sich auch in einem Experiment, in dem d1, d2, d5 und d6 Zellen mit Digitonin permeabilisiert und mit Atraktolysid (Atr) inkubiert wurden (Abbildung 24C).

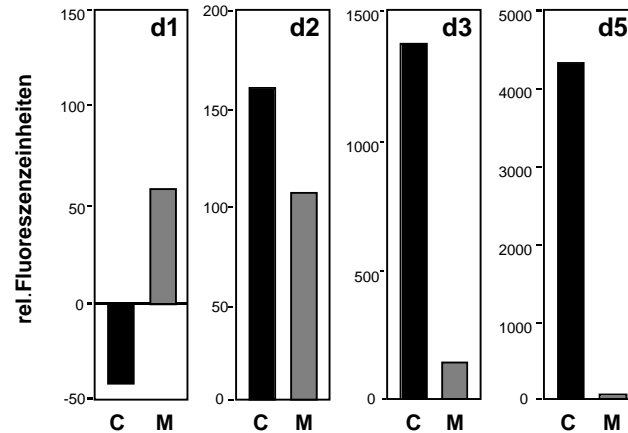
Atr öffnet die PT-Pore und bewirkt somit eine Verminderung von  $\psi_M$ . Mitochondrien von d1 und d2 T-Zellen waren vollständig protektiert, während Mitochondrien von d5 und d6 T-Zellen eine Verminderung ihres Transmembranpotentials zeigten. Jurkat T-Zellen, entweder Vektor- oder



**Abbildung 24. Sensitivität humaner peripherer T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose.** (A) d1 und d5 T-Zellen wurden entweder mit anti-CD95-Antikörper (10  $\mu$ g/ml) plus 10 ng/ml Protein A (CD95) oder mit verschiedenen Verdünnungen eines Leuzinzipper-CD95L (LZ-CD95L)-haltigen Zellüberstandes inkubiert. DNA-Fragmentierung wurde nach der Nicoletti-Methode quantifiziert. (B) Mitochondriale Veränderungen gehen einher mit DNA-Fragmentierung. d1 und d5 T-Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Das mitochondriale Transmembranpotential wurde mit Hilfe des Farbstoffs JC-1 bestimmt (s. Material und Methoden). (C), (D) Bcl-x<sub>L</sub> blockiert die apoptogene Aktivität von Mitochondrien von d1 und d2 T-Zellen. Jurkat-T-Zellen (Vektor ("vec")- oder Bcl-2-transfiziert) (C) oder T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen (D) wurden mit Digitonin permeabilisiert und mit Atraktolysid inkubiert. Die Verminderung von  $\psi_M$  wurde mit Hilfe von JC-1 quantifiziert.

Bcl-2-transfiziert, dienten als Spezifitätskontrolle für dieses Experiment: Die Vektor-Transfektante zeigte eine Verminderung ihres mitochondrialen Transmembranpotentials, die entsprechende Bcl-2-Transfektante zeigte keine Reduktion von  $\psi_M$ , da die Überexpression von Bcl-2 die apoptotgen Aktivität der Mitochondrien blockierte.

Es erschien daher wahrscheinlich, daß d1 T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose z.T. deshalb geschützt sind, weil ihre Bcl- $x_L$ -hochexprimierenden Mitochondrien DISC-aktivierte Caspase-8 sequestrieren. Um dies direkt zu testen, wurden Mitochondrien und zytoplasmatische Fraktionen von T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen isoliert und die Caspase-8-Aktivität nach 6 stündiger Stimulation mit dem agonistischen Antikörper anti-CD95 bestimmt (Abbildung 25). In d1 T-Zellen war eine geringe, aber signifikante Menge aktiver Caspase-8 mit Mitochondrien assoziiert. Das Zytoplasma zeigte



**Abbildung 25. Mitochondrien von T-Zellen, die resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind, binden aktive Caspase-8 an ihre Mitochondrien.** Periphere T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen wurden mit anti-CD95-Antikörper behandelt (10  $\mu\text{g/ml}$  plus 10 ng/ml Protein A). Die Menge an aktiver Caspase-8 an Mitochondrien (M) und im Zytoplasma (Z) wurde fluorimetrisch mit Hilfe des Caspase-8-spezifischen Peptidsubstrats zIETD-AFC bestimmt. Werte von unstimulierten Zellen wurden als Hintergrund definiert und von jenen Werten subtrahiert, die mit stimulierten Zellen erhalten wurden.

wie im Fall Bcl- $x_L$ /Bcl-2-transfizierter Typ II-Zellen negative Aktivitätswerte. Somit sind Bcl- $x_L$ -hochexprimierende Mitochondrien von kurzzeit-aktivierten T-Zellen in der Lage, aktive Caspase-8 aus dem Zytoplasma zu binden und damit zum Resistenzphänotyp dieser Zellen beizutragen. *In vitro*-Kultivierung dieser T-Zellen in Gegenwart von IL-2 bewirkte, daß die Menge an zellulärer Caspase-Aktivität stark anstieg und die Bindungskapazität der Mitochondrien schnell überschritt (Abbildung 25). Es ist anzumerken, daß Mitochondrien von d2 T-Zellen mehr aktive Caspase-8 binden als Mitochondrien von d1 T-Zellen. In Einklang mit ihrer Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose befand sich die gesamte Caspase-8-Aktivität in d5 Zellen im Zytoplasma. Diese Aktivitätsverteilung erinnerte dabei stark an jene Verteilung, die in der Typ I-Zelllinie SKW6 gefunden wurde. Diese Daten unterstützen somit jenes Modell, das die T-Zellaktivierung als einen Prozeß ansieht, in dem sich eine periphere humane T-Zelle von einer CD95-apoptoseresistenten Typ II- in eine apoptosesensitive Typ I-Zelle umwandelt (Scaffidi et al., 1998).





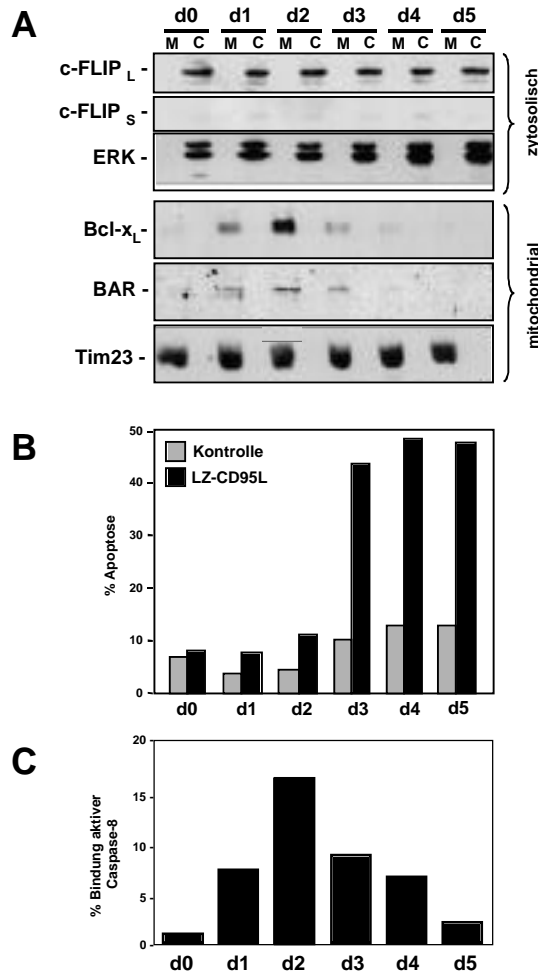
inkubiert. C-CASP-8 wurde vollständig in die aktiven Untereinheiten p18 und p10 konvertiert. Eine größere Untereinheit (p18\*) wurde ebenfalls gebildet, die wahrscheinlich durch Spaltung von C-CASP-8\* entstand. Aktive Caspase-8-Untereinheiten wurden von Mitochondrien gebunden. Ähnlich wie C-CASP-8\* wurde p18\* zusammen mit einer geringen Menge von p10 nicht gebunden. P18\* und p10 bildeten offensichtlich ein "inkorrektes" p10/p18\*-Heterodimer, das im Gegensatz zum p10/p18-Heterodimer nicht die Fähigkeit besaß, an Mitochondrien zu binden (Abbildung 26A, Bahnen 10-12).

Welches Protein ist der mitochondriale Bindungspartner für aktive Caspase-8? Immunpräzipitationsstudien zeigten, daß Bcl-x<sub>L</sub> aktive Caspase-8 nicht direkt binden kann (Medema et al., 1998). Es muß daher ein mitochondriales Protein postuliert werden, das aktive Caspase-8 Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2-abhängig komplexiert. Ein möglicher Bindungspartner für aktive Caspase-8 stellt das BAR (für "**B**ifunctional **A**ppoptosis **R**egulator")-Protein dar (Abbildung 26B,C), welches mitochondrial lokalisiert ist. Es konnte bereits gezeigt werden, daß BAR in der Lage ist, sowohl Procaspase-8 über seine DED-ähnliche Domäne als auch Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2 über seine SAM-Domäne zu binden und CD95-vermittelte Apoptose zu inhibieren (Zhang et al., 2000). Der Mechanismus für diese Inhibition ist jedoch unklar. Diese Studie zeigte darüber hinaus, daß BAR auch N-CASP-8 binden kann, jedoch in geringerem Ausmaß als Procaspase-8 (Zhang et al., 2000). Dies deutete bereits darauf hin, daß der Caspase-8-C-Terminus eine Affinität zu BAR besitzt. In einem *in vitro*-Bindungsexperiment wurde GST-BAR-DED (korrespondierend zu Aminosäuren 167-358 des BAR-Polypeptids) und GST als nicht-bindende Kontrolle mit <sup>35</sup>S-markierten, *in vitro*-translatierten Caspase-8-Konstrukten inkubiert (Abbildung 26B). Wie isolierte Mitochondrien so zeigte auch GST-BAR-DED eine schwache Bindung zu N-CASP-8, aber eine signifikante Affinität zu C-CASP-8, sowie zu den aktiven Untereinheiten p18 und p10. Wiederum zeigten die aberranten Formen C-CASP\* und p18\* keinerlei Bindung. Die Bindungscharakteristika von Mitochondrien einerseits und BAR andererseits waren daher identisch. Dies legte den Schluß nahe, daß BAR auch *in vivo* ein möglicher Bindungspartner von aktiver Caspase-8 an den Mitochondrien ist und somit im Zusammenwirken mit Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2 CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen inhibieren kann.

### **Die Expression von BAR und Bcl-x<sub>L</sub>, nicht aber von c-FLIP, korreliert mit der Apoptoseresistenz peripherer T-Zellen**

Um zu testen, ob die Bindung aktiver Caspase-8-Untereinheiten an Mitochondrien peripherer T-Zellen mit der Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und/oder BAR korrelierte, wurden zytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen von T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen isoliert und im Western Blot analysiert (Abbildung 27A). Bcl-x<sub>L</sub>, welches ausschließlich mitochondrial lokalisiert war, wurde in kurzzeit-aktivierten d1 T-Zellen hochreguliert, zeigte maximale Expression an d2 und war in den apoptosesensitiven d5 T-Zellen kaum mehr nachweisbar (Abbildung 27A). Die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression korrelierte somit mit der Sensitivität peripherer T Zellen im Laufe der Aktivierung (Abbildung 27B). BAR konnte ebenso in der

Mitochondrienfraktion nachgewiesen werden. Wie Bcl-x<sub>L</sub> war die Expression von BAR an d2 maximal und in langzeitaktivierten T-Zellen nicht mehr detektierbar (Abbildung 27A). Das integrale Mitochondrienprotein Tim23 diente als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen (Abbildung 27A). Somit korrelierte die höchste Expression von mitochondrialem Bcl-x<sub>L</sub> und BAR mit der größten Bindungskapazität für endogene aktive Caspase-8, die wie die Expression beider Proteine an d2 maximal war (s. Abbildung 25). Eine Studie zeigte, daß c-FLIP, ein Inhibitor CD95-vermittelter Apoptose, in d1 T-Zellen hochreguliert wird und somit für den resistenten Phänotyp verantwortlich ist (Irmeler et al., 1997). Eine andere Arbeitsgruppe fand jedoch keinerlei Veränderung in der Expression weder von CD95, FADD, Caspase-8 noch von c-FLIP, so daß auszuschließen ist, das eines dieser Moleküle für die unterschiedlichen Phänotypen im Zuge der T-Zellaktivierung verantwortlich sein könnte (Scaffidi et al., 1999). Mit Hilfe eines monoklonalen anti-FLIP-Antikörpers konnte bestätigt werden, daß sich die Expressionsniveaus der rein zytoplasmatischen Proteine c-FLIP<sub>L</sub> und c-FLIP<sub>S</sub> während der T-Zellaktivierung nicht ändern (Abbildung 27A). Ein Western Blot für die Kinase ERK diente als Ladekontrolle (Abbildung 27A).



**Abbildung 27. Die Expression von BAR und Bcl-x<sub>L</sub>, nicht aber von c-FLIP, korreliert mit der Apoptoseresistenz von peripheren T-Zellen.** (A) Mitochondrien und Zytoplasma wurden von T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen isoliert und durch Western Blot analysiert. Die Laufpositionen von c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub>, ERK, Bcl-x<sub>L</sub>, BAR und Tim23 sind angegeben. Die Markerproteine ERK (Zytoplasma) und Tim23 (Mitochondrien) dienen dazu, die Reinheit der Fraktionen zu überprüfen und zeigten, daß gleiche Proteinmengen geladen wurden. (B) Apoptosesensitivität gegenüber LZ-CD95L wurde in T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen mit Hilfe der Nicoletti-Methode bestimmt. (C) Mitochondrien von Bcl-x<sub>L</sub>- und BAR-hochexprimierenden d2 T-Zellen haben die größte Bindungsaktivität für aktive Caspase-8. Mitochondrien von T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen wurden mit anti-CD95-stimulierten SKW6.4-Lysaten inkubiert. Die Menge an gebundener Caspase-8 wurde fluorimetrisch mit Hilfe des Peptidsubstrats zIETD-AFC bestimmt. Werte von Mitochondrien, die mit unstimulierten SKW6.4-Lysaten erhalten worden waren, wurden von jenen Werten der stimulierten Extrakten subtrahiert. Der so erhaltene Zahlenwert wurde zur im Extrakt vorhandenen Caspase-8-Aktivität prozentual in Beziehung gesetzt und als “% Bindung” von aktiver Caspase-8 definiert.

Es ist daher unwahrscheinlich, daß diese Proteine die Resistenz kurzzeit-aktivierter T-Zellen vermitteln.

### **Mitochondrien von d2 T-Zellen besitzen die höchste Bindungskapazität für aktive Caspase-8-Untereinheiten**

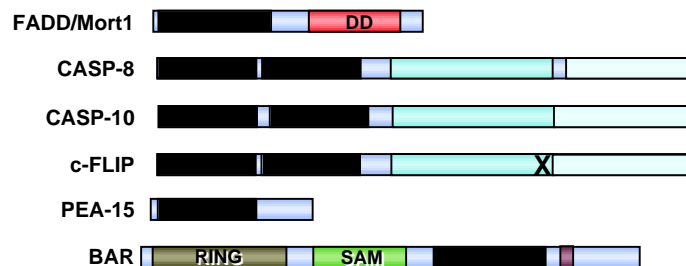
Um die Caspase-8-Bindungskapazität von Mitochondrien peripherer T-Zellen unterschiedlicher Aktivierungsstufen direkt zu bestimmen und miteinander vergleichen zu können, wurden Mitochondrien von unterschiedlich lange aktivierten T-Zellen isoliert und mit anti-CD95-stimulierten SKW6.4-Extrakten inkubiert (Abbildung 27C). Somit war garantiert, daß stets die gleiche Menge an aktiver Caspase-8 vorlag. Die höchste Bindung wurde in Mitochondrien von d2 T-Zellen beobachtet, in denen die Expression von BAR und Bcl-x<sub>L</sub> maximal war. Somit konnte gezeigt werden, daß Mitochondrien peripherer T-Zellen die Fähigkeit besitzen, aktive Caspase-8 zu binden, wenn BAR und Bcl-x<sub>L</sub> anwesend sind.

### III-3.

## DEDD, EIN NEUARTIGES, NUKLEOLARES DED-PROTEIN

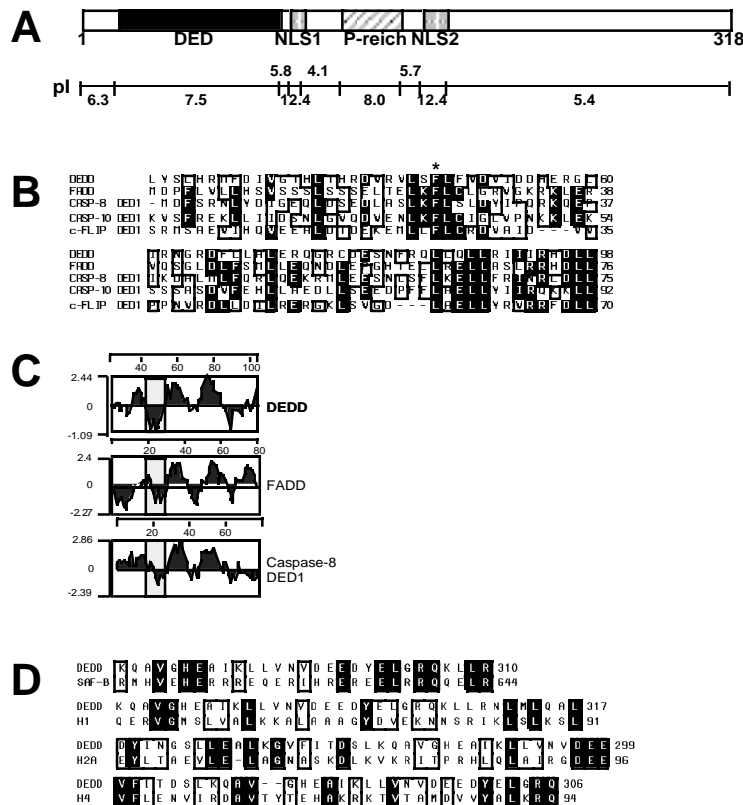
DED-haltige Proteine spielen eine wichtige Rolle insbesondere im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose (Abbildung 28). Diese Arbeit konnte zeigen, daß Caspase-8 einerseits ein Initiator-molekül ist, das am Todesrezeptor das proapoptische Signal in das Zellinnere weiterleitet, andererseits ein Effektor-molekül darstellt, welches ein wichtiges zytoskelettales Protein spaltet und somit die zelluläre Integrität reguliert. Ein weiteres DED-Protein ist FADD/Mort1, ein Adaptermolekül, das über eine DD-DD-Wechselwirkung die zytoplasmatische Domäne von CD95 bindet, und über eine DED-DED-Interaktion Caspase-8 an den Rezeptor rekrutiert (Kischkel et al., 1995). C-FLIP, das wie Caspase-8 über eine N-terminale Tandem-DED verfügt, wirkt inhibitorisch, indem es die Rekrutierung von Caspase-8 an den DISC inhibiert (Scaffidi et al., 1999). BAR ist wie FADD ein Adapterprotein. Es ist größtenteils mitochondrial lokalisiert und bindet sowohl Procaspase-8 als auch aktive Caspase-8 in einer durch Bcl-2-Familienmitglieder regulierten Art und Weise (Zhang et al., 2000). PEA-15 inhibiert wie c-FLIP CD95- aber auch TNF -vermittelte Apoptose hauptsächlich im zentralen Nervensystem, wo es vorwiegend in Astrozyten exprimiert ist (Kitsberg et al., 1999).

Aufgrund der großen Bedeutung dieser Proteinfamilie für die Apoptosesignaltransduktion wurde daher versucht, neuartige DED-haltige Effektor-moleküle zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. So wurde im Vorfeld dieser Arbeit mit Hilfe der Sequenz von 22 verschiedenen DED ein Algorithmus erzeugt, der es ermöglichte, die nicht-redundanten EMBL- und GenBank- Datenbanken nach neuartigen DED-haltigen Proteinen zu durchsuchen. Es wurde ein EST-Klon murinen Ursprungs gefunden (DDBJ/EMBL/GenBank Zugriffsnummer Aa124451), der eine N-terminale DED mit Homologie zur DED von FADD und Caspase-8 aufwies (Peter et al., 1997a). Mit Hilfe der entsprechenden Proteinsequenz dieses EST-Klones wurden andere EST-Sequenzen mit z.T. identischen und daher überlappenden



**Abbildung 28. Die Familie der DED-Proteine.** Die Todeseffektor-domäne ist als schwarzes Rechteck dargestellt. DD, **D**eath **D**omain; CASP-8, Caspase-8; CASP-10, Caspase-10, c-FLIP, cellular **FL**ICE-inhibitory **P**rotein; BAR, **B**ifunctional **A**poptosis **R**egulator; X, Position der Sequenzmotive, die für die enzymatische Aktivität von Caspase-8 verantwortlich sind, in c-FLIP aber nicht vorliegen.





**Abbildung 30. Strukturelle Organisation des DEDD-Polypeptids. (A)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von DEDD. DED, Todeseffektordomäne; NLS, Kernlokalisierungssignal; P-reich, Prolin-reiche Region. Die isoelektrischen Punkte (pI) sind für die einzelnen Domänen angegeben. **(B)** Die DED von DEDD ist homolog zur DED von FADD, zur ersten DED von Caspase-8, zur ersten DED von Caspase-10 und zur ersten DED von c-FLIP. Identische Aminosäuren sind mit schwarzen Rechtecken, konservierte Austausche durch nicht-gefüllte Rechtecke gekennzeichnet. Der Stern (\*) markiert jenen Phenylalaninrest, der für die durch DED/DED-Wechselwirkung hervorgerufene Zytotoxizität einer DED verantwortlich ist (Eberstadt et al., 1998 und Daten nicht gezeigt). **(C)** Hydrophathie-Indizes der DED von DEDD, FADD und Caspase-8. Die hydrophoben Bereiche, die für die DED/DED-Wechselwirkung verantwortlich sind und die den konservierten Phenylalaninrest tragen (Eberstadt et al., 1998), sind grau unterlegt. **(D)** Der C-Terminus von DEDD besitzt Homologie zu den Histonen H1 (36 Aminosäuren, 19,4% Identität, 55,5% Konservierung), H2A (38 Aminosäuren, 25,6% Identität, 52,6% Konservierung) und H4 (43 Aminosäuren, 28,6% Identität, 55,9% Konservierung), sowie zu dem SAR-bindenden Protein SAF-B (29 Aminosäuren, 34,5 % Identität, 44,8% Konservierung).

unterschiedlichen Aminosäuren in der Sequenz der einen Spezies durch homologe Reste in der cDNA-Sequenz der anderen Spezies ausgetauscht sind (Abbildung 29B). Eine derart starke Homologie zwischen murinen und humanen Proteinen wird häufig bei solchen Polypeptiden gefunden, die intrazelluläre Schlüsselfunktionen übernehmen, wie z.B. als Teil der Atmungskette (Cytochrom c und Cytochrom c Oxidase), der Proteinsynthese (ribosomale Proteine) oder strukturelle Aufgaben im Kern (Histone) erfüllen.

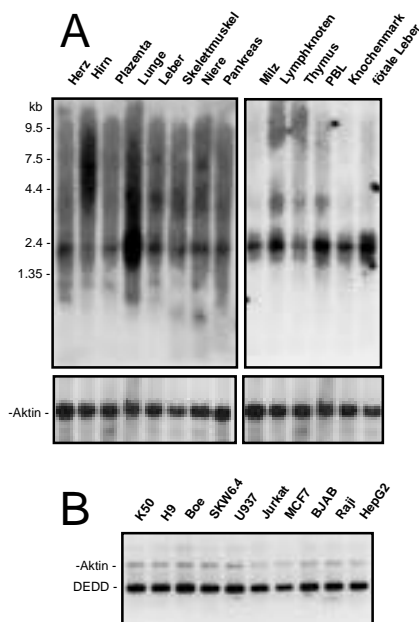
**DEDD besitzt eine Multi-Domänenstruktur**

DEDD ist ein Protein mit vorwiegend sauren Aminosäuren (Abbildung 30A). Lediglich zwei putative Kernlokalisierungssignale (NLS) mit einem pI von 12,4 sowie eine Prolin-reiche Region zwischen beiden NLS (pI 8,0) zeichnen sich durch eine eher basische Zusammensetzung aus. Ein Sequenzvergleich von DEDD mit Proteinen, die im Rahmen

Todesrezeptor-vermittelter

Signaltransduktion wichtige Funktionen erfüllen, zeigte, daß DEDD am N-Terminus über eine DED verfügt, die homolog zu den DED von FADD (18,4% Identität; 48,7% Konservierung), Caspase-8 (21,0% Identität; 40,7% Konservierung), Caspase-10 (18,4% Identität; 42,3%

Konservierung) und c-FLIP (19,7% Identität; 41,7% Konservierung) ist (Abbildung 30B). Eine Analyse der Hydropathie-Indizes der 22 verschiedenen DED zeigte, daß diese Domänen über zwei sehr charakteristische hydrophile Bereiche verfügen (Peter et al., 1997a). Diese hydrophilen Regionen finden sich auch in der putativen DED von DEDD und sind in Bezug auf ihre Lokalisation der DED von FADD und Caspase-8 sehr ähnlich (Abbildung 30C). Unabhängige Sequenzvergleiche nach der Lipman-Pearson-Methode zeigten, daß sich DEDD zudem durch eine C-terminale Domäne auszeichnet, die signifikante Homologie zu DNA-bindenden Proteinen wie SAF-B, einem SAR-bindenden Protein (Renz und Fackelmayer, 1996) und zu den Histonen H1, H2A und H4 innerhalb der Histonfaltung (Luger und Richmond, 1998) besitzt (Abbildung 30D).



**Abbildung 31. mRNA-Verteilung von DEDD in verschiedenen Geweben und Zelllinien.** (A) Northern Blot-Analyse mit einer poly(A)<sup>+</sup>RNA-Membran, die mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert wurde, die dem N-Terminus von DEDD (N-DEDD) entspricht. Die einzelnen Gewebe sind angegeben. -Aktin ist als Ladekontrolle gezeigt. (B) RT-PCR von DEDD in verschiedenen Zelllinien lymphoiden und nicht-lymphoiden Ursprungs. -Aktin ist als interne Kontrolle gezeigt.

### DEDD ist auf mRNA-Ebene ubiquitär exprimiert

Die Tatsache, daß 23 DEDD-EST-Klone aus verschiedenen Geweben im Rahmen der Datenbanksuchen gefunden werden konnten, deutete bereits darauf hin, daß DEDD auf mRNA-Ebene ubiquitär exprimiert ist. Dies wurde durch eine Northern Blot-Analyse verschiedener Gewebe bestätigt. In allen Fällen konnte ein Transkript von 2.3 kb identifiziert werden, das besonders prominent im Lungengewebe auftrat (Abbildung 31A). Einige Gewebe zeigten zudem ein zusätzliches Transkript von 4.2 kb. Eine RT-PCR wies darüber hinaus DEDD-mRNA in allen getesteten Zelllinien nach (Abbildung 31B) und bestätigte nochmals die ubiquitäre Expression der DEDD-mRNA.

### DEDD induziert Apoptose mit Hilfe seiner DED

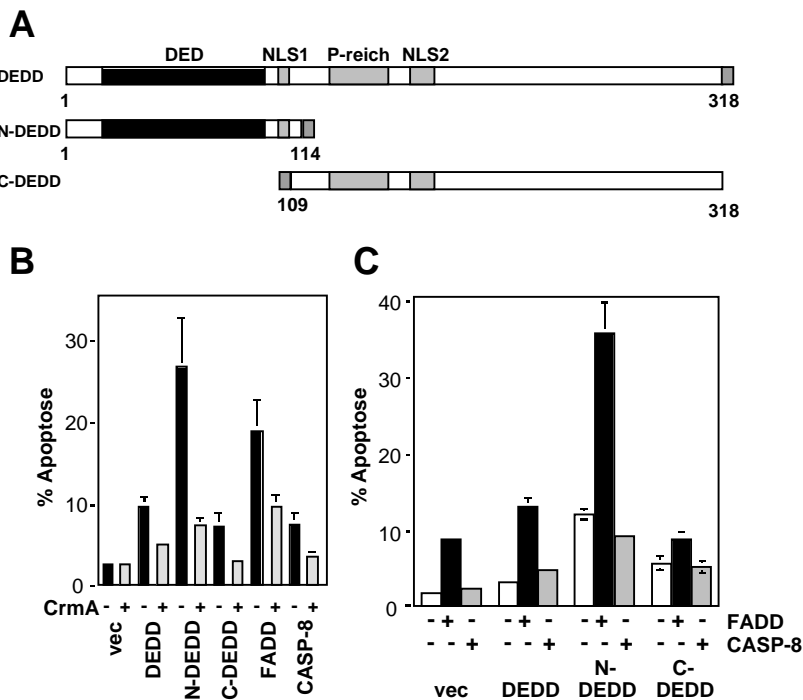
Proapoptotische DED-haltige Proteine, wie Caspase-8 oder FADD, induzieren nach Überexpression Caspasen-vermittelt Apoptose, wahrscheinlich durch Oligomerisierung über homophile DED-DED-Wechselwirkung (Siegel et al., 1998). Voraussetzung für diese Oligomerisierung ist eine funktionelle DED. In einem Überexpressionssystem läßt sich daher leicht zeigen, ob eine putative, aufgrund von

Sequenzvergleichen identifizierte DED *in vivo* funktional ist. Um die Funktionalität der DED in DEDD zu bestimmen, wurden zwei Mutanten hergestellt (Abbildung 32A): N-DEDD umfaßt Aminosäuren 1-114 und damit die DED und die erste NLS. C-DEDD beinhaltet Aminosäuren



109-318 und enthält die Prolin-reiche Region, NLS2 sowie den C-Terminus mit Homologie zu DNA-bindenden Proteinen. Beide Konstrukte wurden mit einem FLAG-Tag versehen, der bei N-DEDD am C-Terminus, bei C-DEDD am N-Terminus angebracht wurde. So konnte vermieden werden, daß der Tag möglicherweise mit der N-terminalen DED oder der C-terminalen DNA-Bindungsregion interferierte.

Um zu testen, ob DEDD nach Überexpression Caspasen-vermittelt Apoptose auslöst, wurden 293T-Zellen mit einem DEDD-Expressionsplasmid transient transfiziert und DNA-Fragmentierung nach der Nicoletti-Methode quantifiziert. DEDD induziert schwach Apoptose,

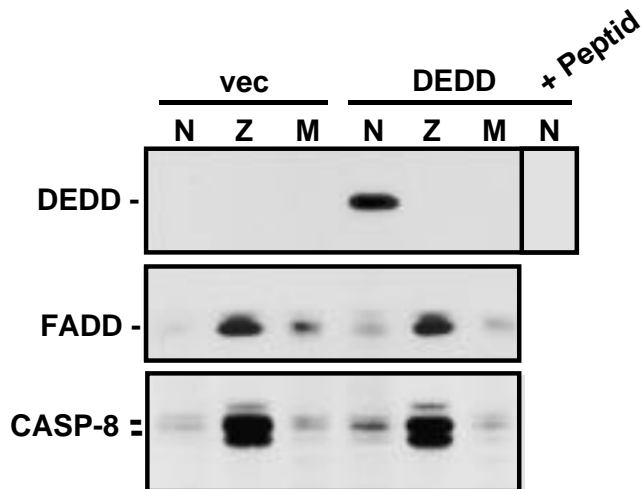


**Abbildung 32. Die DED in DEDD ist funktional.** (A) Schematische Darstellung der in (B) und (C) verwendeten Konstrukte. Ein FLAG-Tag befindet sich am C-Terminus von DEDD und N-DEDD und am N-Terminus von C-DEDD. (B) Apoptoseinduktion von DEDD-Mutanten im 293T-Überexpressionssystem. Jeweils 3 µg Vektorkontrolle oder 3 µg der DEDD-Konstrukte und 4 µg pFM91-CrmA wurden in 293T-Zellen transfiziert. DNA-Fragmentierung wurde nach der Nicoletti-Methode quantifiziert. Es wurden auch DEDD-Konstrukte transfiziert, die keinen FLAG-Tag besaßen. Das Ergebnis war identisch, sodaß ein Einfluß des Tags auf die Apoptoseinduktion der verschiedenen Konstrukte auszuschliessen ist. (C) Verstärkung von N-DEDD-vermittelter Apoptose durch FADD. Suboptimale, nicht-zytotoxische DNA-Mengen von DEDD, N-DEDD und C-DEDD (jeweils 0,5 µg) wurden mit ebenfalls suboptimalen DNA-Mengen von Caspase-8 und FADD (jeweils 0,3 µg) kotransfiziert. DNA-Fragmentierung wurde wiederum mit Hilfe der Nicoletti-Methode bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

vergleichbar zu Caspase-8, aber in einem deutlich geringeren Maße als FADD (Abbildung 32B). N-DEDD hingegen wirkt sehr stark proapoptotisch und induziert eine um Faktor 3 erhöhte DNA-Fragmentierung (Abbildung 32B). Dies zeigt, daß die DED in DEDD funktional ist und daß der C-Terminus antiapoptotische Aktivität besitzt. Sowohl DEDD- als auch N-DEDD-induzierte Apoptose ist Caspasen-vermittelt, da sie sich durch Kotransfektion mit dem Serpin-Caspaseninhibitor CrmA blockieren ließ (Abbildung 32B). Caspase-8 und FADD sind Schlüsselmoleküle im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose (Peter et al., 1999). Um

eine funktionelle Assoziation von DEDD mit diesen DED-haltigen Proteinen zu zeigen, wurden suboptimale und daher nicht-zytotoxische Plasmidmengen von FADD und Caspase-8 mit

ebenfalls suboptimalen Plasmidkonzentrationen von DEDD und den Deletionsmutanten N-DEDD und C-DEDD in 293T- Zellen transient kotransfiziert (Abbildung 32C). Apoptose wurde



**Abbildung 33. DEDD befindet sich im Kernkompartiment.** 293T-Zellen wurden mit Vektor oder DEDD (jeweils 5 µg) transfiziert und durch subzelluläre Fraktionierung in Kern (N), Zytoplasma (Z) und Membrankompartiment (M) aufgetrennt und durch Western Blot-Analyse mit Hilfe des polyklonalen anti-DEDD-Antikörpers, des anti-Caspase-8-Antikörpers C15 und des anti-FADD-Antikörpers analysiert. Für die Peptidkompetition wurde der DEDD-Antikörper mit Peptidüberschuss vorinkubiert und dann im Western Blot eingesetzt (“+Peptid”). Die Laufpositionen von DEDD, FADD und Caspase-8 sind angegeben.

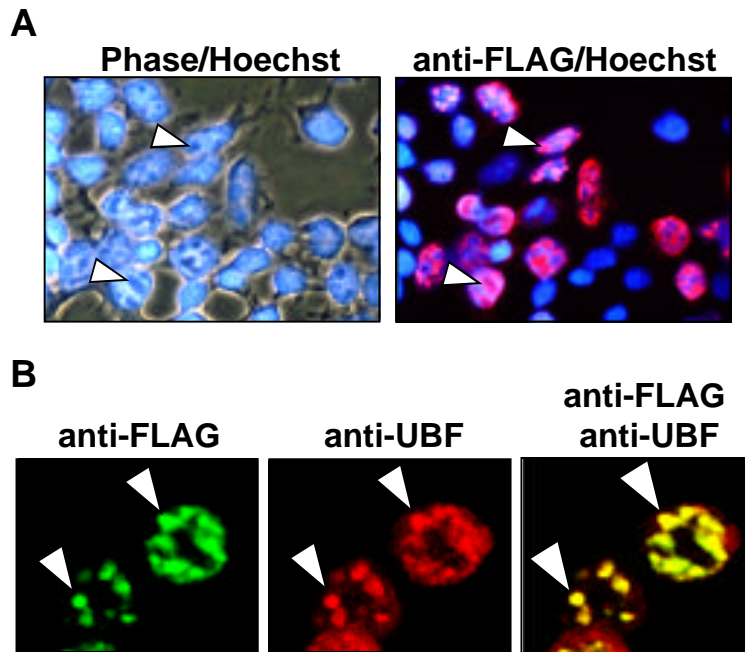
wie in Abbildung 32B durch quantitative Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt. FADD potenzierte DEDD-induzierte Apoptose nur in Abwesenheit des C-Terminus von DEDD, d.h. N-DEDD war deutlich zytotoxischer in Gegenwart geringer Mengen von FADD als DEDD oder C-DEDD. Kotransfektion von suboptimalen Plasmidkonzentrationen von Caspase-8 hatte keinen Effekt. Selbst höhere Caspase-8-Mengen zeigten keine Verstärkung von N-DEDD-induzierter Apoptose (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, daß die ohnehin schwache Apoptoseinduktion von C-DEDD durch FADD nicht potenziert werden konnte, zeigte, daß die N-terminale DED in DEDD tatsächlich für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist. Die synergistische Verstärkung N-DEDD-induzierter Apoptose durch FADD deutete darauf hin, daß DEDD in

der Tat eine wichtige Rolle im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose spielt. Um eine direkte Assoziation zwischen FADD und/oder Caspase-8 mit DEDD nachzuweisen, wurden Präzipitationsexperimente mit GST-FADD und GST-Caspase-8-Fusionsproteinen sowie mit <sup>35</sup>S-markiertem, *in vitro*-translatiertem DEDD durchgeführt. In diesem *in vitro*-Experiment zeigte DEDD Bindung an FADD und in deutlich geringerem Maße an Caspase-8 (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente deuteten daraufhin, daß FADD ein möglicher Interaktionspartner von DEDD ist.

### DEDD befindet sich in Nukleoli

Die Anwesenheit zweier Kernlokalisierungssignale (NLS) legte nahe, daß DEDD möglicherweise im Kern lokalisiert ist. Um die subzelluläre Lokalisation zu bestimmen, wurden 293T-Zellen transient mit dem DEDD-Expressionsplasmid transfiziert. Das Expressionsplasmid ohne die DEDD-cDNA (“vec” in Abbildung 33) diente als Kontrolle. In den so transfizierten Zellen wurde das Kernkompartiment vom Zytoplasma und der mikrosomalen Fraktion getrennt.

Die einzelnen Kompartimente wurden im Western Blot mit Hilfe eines polyklonalen, affinitätsgereinigten anti-DEDD-Kaninchenserums auf die Anwesenheit des DEDD-Proteins untersucht (Abbildung 33). DEDD befand sich ausschließlich in der Kernfraktion (Abbildung 33). Um die Spezifität des Antiserums zu überprüfen, wurde eine Peptidkompetition durchgeführt, d.h. der Antikörper wurde mit einem 100fachen molaren Überschuß an Peptid vorinkubiert, bevor er in der Western Blot-Analyse eingesetzt wurde. Die im Kern auftretende Proteinbande konnte spezifisch kompetitiert werden (Abbildung 33).



**Abbildung 34. DEDD ist in Nukleoli lokalisiert.** (A) 293T-Zellen wurden mit FLAG-getagtem DEDD transfiziert und mit Hilfe des monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers und eines PE-gekoppelten Zweitantikörpers gefärbt und durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Zellen wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258 gefärbt, um die Position und Form der Kern sichtbar zu machen (links). Globuläre Strukturen im Kern, die durch anti-FLAG-Antikörper angefärbt und in Phasenkontrast/Hoechstfärbung sichtbar waren, sind durch Pfeile gekennzeichnet (rechts). (B) Kolokalisation von DEDD mit UBF. 293T-Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Diese Zellen wurden für DEDD ("anti-FLAG", FITC gekoppelter Zweitantikörper) und für den nukleolaren Transkriptionsfaktor UBF ("anti-UBF", PE-gekoppelter Zweitantikörper) doppelgefärbt. Die Überlagerung der Einzel fluoreszenzen ist in der rechten Abbildung gezeigt. Die Lokalisation von DEDD und UBF ist durch Pfeilköpfe gekennzeichnet.

FLAG Antikörpers in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abbildung 34). DEDD akkumulierte in distinkten globulären Strukturen, die sich in Phasenkontrast/Hoechstfärbung als dunkle, subnukleare Strukturen darstellten (Abbildung 34A) und bei denen es sich um Nukleoli handelt. Um zu zeigen, daß sich DEDD tatsächlich in Nukleoli befindet, wurden DEDD-transfizierte 293T-Zellen sowohl mit einem anti-FLAG-Antikörper (Zweitantikörper FITC-gekoppelt, grüne Fluoreszenz, "anti-FLAG" in Abbildung 34B) als auch mit einem Antiserum,

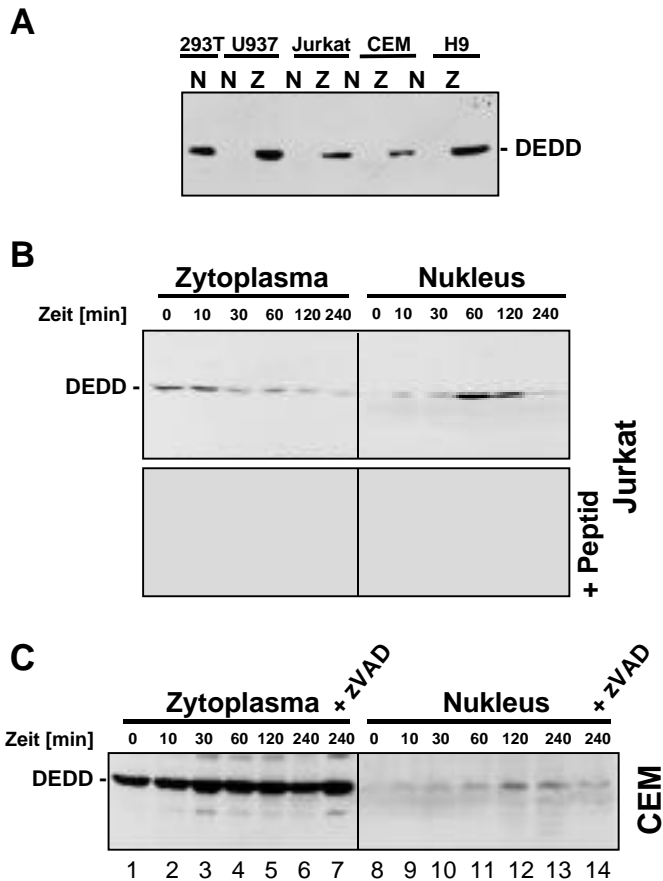
durchgeführt, d.h. der Antikörper wurde mit einem 100fachen molaren Überschuß an Peptid vorinkubiert, bevor er in der Western Blot-Analyse eingesetzt wurde. Die im Kern auftretende Proteinbande konnte spezifisch kompetitiert werden (Abbildung 33). Western Blot-Analysen für Caspase-8 und FADD zeigten, daß beide Proteine rein zytoplasmatisch lokalisiert sind (Abbildung 33).

Um das subnukleare Kompartiment zu identifizieren, in dem sich DEDD befindet, wurden erneut 293T-Zellen transient mit einem DEDD-Expressionsplasmid transfiziert, welches für ein mit einem FLAG-Tag versehenes DEDD-Protein kodiert. Somit konnte das transfizierte Protein mit Hilfe eines monoklonalen anti-

das sich gegen UBF (für “Upstream Binding Factor”) richtet (Zweitantikörper PE-gekoppelt, rote Fluoreszenz, “anti-UBF” in Abbildung 34B), doppelgefärbt. Die Überlagerung beider Einzelfluoreszenzen zeigte, daß beide Proteine kolokalisierten (“anti-FLAG/anti-UBF” in Abbildung 34B).

### Im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose transloziert DEDD vom Zytoplasma in den Kern

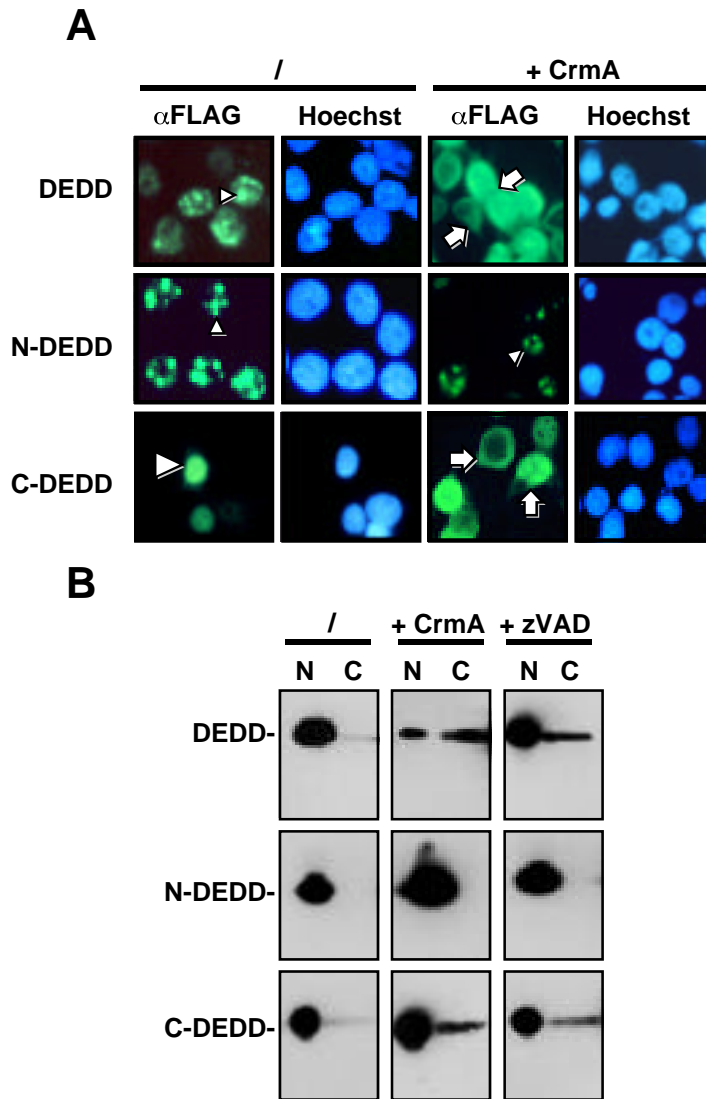
Die bisher beschriebenen Experimente wurden mit einer Zelllinie durchgeführt, in der



**Abbildung 35. In vivo-Lokalisation von DEDD.** (A) Expression von endogenem DEDD in Zytoplasma (Z) und Kernfraktion (N) lymphoider Zelllinien. Für diesen Western Blot mit dem polyklonalen anti-DEDD-Antikörper wurden  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet, während die Kernfraktion von 293T-Zellen aus  $10^5$  Zellen präpariert wurde. (B), (C) Translokation von DEDD aus dem Zytoplasma in den Kern im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose. Jeweils  $5 \times 10^6$  Jurkat- (B) und CEM-Zellen (C) wurden für die angegebenen Zeiträume mit anti-CD95-Antikörper stimuliert, woraufhin Zytoplasma und Kernfraktionen isoliert und im Western Blot mit Hilfe des anti-DEDD-Antikörpers analysiert wurden. Die Peptidkompetition wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk ( $20 \mu\text{M}$ ) wurde 30 min vor der Stimulation mit dem anti-CD95-Antikörper zugegeben.

DEDD überexprimiert wurde. Um die Lokalisation von endogenem DEDD zu bestimmen, wurde sowohl Kernkompartiment als auch Zytoplasma durch subzelluläre Fraktionierung aus verschiedenen lymphoiden Zelllinien präpariert. In allen getesteten Zellen konnte durch Western Blot-Analyse ein Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa detektiert werden, welches die gleiche elektrophoretische Mobilität besaß wie in 293T-Zellen überexprimiertes DEDD (Abbildung 35A). Im Gegensatz zum überexprimierten DEDD befand sich das endogene Protein jedoch ausschließlich im Zytoplasma.

Da sowohl die Überexpressionsexperimente als auch die *in vitro*-Bindungsstudien eine Assoziation von DEDD insbesondere mit FADD und zu einem geringeren Maße mit Caspase-8 aufzeigten und damit den Schluß nahelegten, daß DEDD im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose eine Rolle spielen könnte, wurden Jurkat und CEM T-Zellen mit dem agonistisch-wirkenden anti-CD95-Antikörper stimuliert. Die Lokalisation von DEDD in den



**Abbildung 36. Die Translokation von DEDD in den Kern ist Caspasen-abhängig.** (A) Analyse der subzellulären Lokalisation von DEDD und DEDD-Deletionsmutanten. FLAG-getagtes DEDD, N-DEDD und C-DEDD (jeweils 3  $\mu$ g) wurden alleine oder zusammen mit CrmA (jeweils 4  $\mu$ g) in 293T-Zellen transfiziert. Diese Zellen wurden mit Hilfe des monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers (FITC-gekoppelter Zweitantikörper) gefärbt und durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Kerne wurden durch eine Hoechst 33258-Färbung sichtbar gemacht. Nukleolare Lokalisation ist durch kleine Pfeilköpfe, nukleoplasmatische Lokalisation durch große Pfeilköpfe und zytoplasmatische Lokalisation durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Lokalisation von DEDD, N-DEDD und C-DEDD. 293T-Zellen wurden wie in (A) beschrieben transfiziert. Kern- (N) und Zytoplasma- (Z) Fraktionen wurden im Western Blot mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers analysiert. Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk wurde 4h nach der Transfektion zugegeben. Die Laufpositionen von DEDD und den Deletionsmutanten N-DEDD und C-DEDD sind angegeben.

unterschiedlich lange stimulierten Zellen wurde durch Western Blot-Analyse bestimmt. In beiden Zelllinien translozierte DEDD vom Zytoplasma in den Kern, wo es etwa 10 Minuten nach erfolgter anti-CD95-Stimulation erstmalig nachweisbar war (Abbildung 35B und C). Die Spezifität des anti-DEDD-Antikörpers wurde erneut durch Peptidkompetition nachgewiesen (“+Peptid” in Abbildung 35C). *In vivo*-Translokation von DEDD in den Kern ist Caspasen-vermittelt, da die Zugabe des Caspaseninhibitors zVAD-fmk das Auftreten von DEDD im Kern größtenteils inhibiert (Abbildung 35B, Bahn 14). Diese Experimente zeigen, daß in Jurkat-Zellen bis zu 80% des zytoplasmisch-lokaliserten DEDD-Proteins im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose in den Kern translozieren. Mit Hilfe einer quantitativen Western Blot-Analyse wurde die Anzahl der DEDD-Moleküle pro Zelle mit ca. 200.000 Kopien bestimmt (Daten nicht gezeigt). D.h. nach Apoptoseinduktion über den Todesrezeptor CD95 akkumulieren bis zu 160.000 Moleküle im Kern.

### **Translokation von DEDD in den Kern ist Caspasen-vermittelt**

DEDD transloziert in den Kern sowohl *in vivo* als auch in einem Überexpressionssystem, wobei die Translokation von endogenem DEDD eindeutig Caspasen- und damit Apoptose-vermittelt stattfindet. Um zu überprüfen, ob die quantitative Translokation von überexprimiertem DEDD auf dessen proapoptische Aktivität zurückzuführen ist, wurde der Effekt von Caspaseninhibitoren auf die DEDD-Translokation in 293T-Zellen untersucht. DEDD transfizierte 293T-Zellen, die mit dem Caspaseninhibitor CrmA kotransfiziert und mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper gefärbt wurden, zeigten neben der typischen nukleolaren Verteilung zu etwa 50% auch eine zytoplasmatische Lokalisation des DEDD-Proteins (Abbildung 36A, obere Reihe). Eine subzelluläre Fraktionierung der DEDD-transfizierten und CrmA-kotransfizierten Zellen in Kern- und Zytoplasma-Kompartiment bestätigte die Immunfluoreszenzdaten (Abbildung 36B, obere Reihe). Vorbehandlung der Zellen mit zVAD-fmk bewirkte ebenso wie CrmA eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation von DEDD (Abbildung 36A, B, obere Spalten). Induktion von Apoptose bzw. von Caspasenaktivität ist somit für die Translokation von DEDD notwendig. Diese Daten legen den Schluß nahe, daß DEDD durch seine Apoptose-auslösende Aktivität Caspasen aktiviert und damit seine eigene Translokation in den Kern induziert, wo es dann in nukleolaren Substrukturen akkumuliert. Die DEDD-Deletionsmutanten N-DEDD und C-DEDD beinhalten NLS1 bzw. NLS2 und waren daher ebenfalls im Kern lokalisiert. N-DEDD zeigte dabei eine nukleolare Verteilung vergleichbar mit DEDD, wohingegen C-DEDD nukleoplasmatisch war (Abbildung 36A, mittlere und untere Spalten). Inhibition von Apoptose bzw. Caspasenaktivierung durch CrmA bzw. zVAD-fmk beeinflusste lediglich die Lokalisation von C-DEDD, welches wie DEDD zu etwa 40% im Zytoplasma zurückgehalten wurde (Abbildung 36A, B, untere Spalten). N-DEDD hingegen zeigte auch nach Kotransfektion mit CrmA oder Vorbehandlung mit zVAD-fmk eine nukleolare Verteilung (Abbildung 36A, B mittlere Spalten).

Diese Daten zeigen, daß Caspasenaktivität für die Translokation von DEDD notwendig ist. Zudem konnten erste Hinweise auf die Bedeutung der NLS für die Translokation und subnukleäre Lokalisation gefunden werden. Beide Kernlokalisierungssignale leiten DEDD in den Kern. NLS1 ist konstitutiv aktiv und ist für die nukleolare Verteilung von DEDD verantwortlich. NLS2 ist nur in Anwesenheit von Caspasenaktivität funktional und stellt somit ein Caspasen-aktivierbares Kernlokalisierungssignal dar.

### **DEDD assoziiert mit FADD *in vivo***

Die Translokation von DEDD in einem Überexpressionssystem kann durch Caspaseninhibition teilweise blockiert werden (Abbildung 36). Da DEDD *in vitro* mit FADD und Caspase-8 assoziiert, wurde unter den Bedingungen, in denen DEDD zytoplasmatisch lokalisiert war, die Assoziation von überexprimiertem DEDD mit endogenem FADD und endogener Caspase-8 *in vivo* näher untersucht. Dazu wurde DEDD mit CrmA in 293T-Zellen

überexprimiert. FADD und Caspase-8 wurden mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper immunpräzipitiert und die Menge an koimmunpräzipitiertem und damit assoziiertem DEDD wurde durch Western Blot-Analyse mit Hilfe des polyklonalen anti-DEDD-Antikörpers bestimmt (Abbildung 37A). Ähnlich wie in dem *in vitro*-Bindungsexperiment mit GST-Fusionsproteinen assoziiert DEDD schwach mit Caspase-8 und deutlich stärker mit FADD, war aber nicht im Immunpräzipitat des monoklonalen Kontrollantikörpers FII23 nachweisbar (Abbildung 37A). Welches sind die physiologischen Interaktionspartner von DEDD im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose? Um dies zu

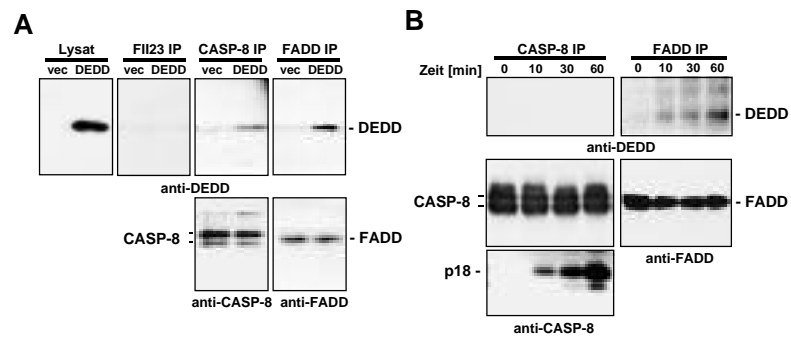
untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper für unterschiedliche Zeiträume stimuliert. Caspase-8 und FADD wurden immunpräzipitiert und die Assoziation mit DEDD wurde wiederum durch Western Blot-Analyse bestimmt (Abbildung 37B). Es zeigte sich, daß endogenes DEDD lediglich mit FADD assoziierte, nicht aber mit Caspase-8. Erste

Assoziation mit FADD

konnte nach 10 minütiger anti-CD95-Stimulation gefunden werden und korrelierte somit mit der *in vivo*-Translokation von DEDD im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose. Diesen Daten zeigten darüber hinaus, daß die bereits *in vitro* gefundene Funktionalität der DED in DEDD auch *in vivo* zu finden ist.

### DEDD ist ein DNA- und Nukleosom-bindendes Protein, das die Transkription von rDNA inhibiert

Die Sequenzhomologie von DEDD mit DNA-bindenden Proteinen wie SAF-B oder den Histonen H1, H2A und H2B legte nahe, daß DEDD ein DNA-bindendes Protein ist. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Grummt (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) wurde daher ein *in vitro*-Bindungsexperiment mit GST-DEDD und einem 248 bp langen DNA-Oligonukleotid durchgeführt und in einem



**Abbildung 37. *In vivo*-Assoziation von DEDD mit FADD.** (A) 293T-Zellen wurden mit FLAG-DEDD oder Kontrollvektor (jeweils 6 µg) zusammen mit CrmA (9 µg) kotransfiziert. Zellen wurden lysiert und entweder direkt im Western Blot analysiert ("Lysat") oder Proteine wurden zunächst mit Kontrollantikörper ("FII23-IP"), anti-Caspase C15-Antikörper ("CASP-IP") oder anti-FADD-Antikörper ("FADD-IP") immunpräzipitiert und danach im Western Blot mit Hilfe des anti-DEDD-Antikörpers ("anti-DEDD") untersucht. Zur Kontrolle, ob gleiche Mengen an Proteinen immunpräzipitiert wurden, wurde ein Western Blot mit anti-Caspase-8- und anti-FADD-Antikörper durchgeführt ("anti-CASP-8" bzw. "anti-FADD"). (B) Jurkat-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit anti-CD95-Antikörper stimuliert. Caspase-8 und FADD wurden immunopräzipitiert und im Western Blot wie unter (A) beschrieben analysiert. Die Laufpositionen von DEDD, FADD und Caspase-8 sind angegeben.

Elektromobilitätstest analysiert. Es zeigte sich, daß GST-DEDD mit der DNA einen hochmolekularen Komplex bildet, der nach Inkubation mit GST-FADD nicht zu beobachten war (Stegh et al., 1998). DEDD besitzt eine sehr hohe Affinität zu DNA, da der DEDD/DNA Komplex selbst in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (bis zu 2M NaCl) stabil ist (Stegh et al., 1998). Eukaryontische DNA liegt jedoch nicht als freie DNA vor, sondern ist mit Histonen in sogenannten Nukleosomen komplexiert. Daher wurde die Bindung von GST-DEDD an physiologisch relevante nukleosomale DNA getestet. Im Gegensatz zur freien DNA bildet GST-DEDD mit nukleosomaler DNA zum größten Teil einen definierten Komplex mit im Vergleich zum freien Nukleosom geringerer Mobilität (Stegh et al., 1998).

Die Nukleosomenbindung und -komplexierung zusammen mit der nukleolaren Lokalisation deuten darauf hin, daß DEDD Prozesse im Nukleolus beeinflussen könnte. Eine sehr wichtige nukleolare Funktion ist die Transkription von rDNA, die Voraussetzung für die Bildung von Ribosomen und damit für die biosynthetische Aktivität einer Zelle ist. Daher wurde der Einfluß von DEDD auf die rDNA-Transkription näher untersucht. Ein artifizielles, ribosomales Minigenkonstrukt wurde benutzt, das 5'-terminal einen rDNA-Promotor und 3'terminal eine Terminationssequenz besitzt (Längst et al., 1998). Diese Plasmid-DNA wurde mit Extrakten von frühen *Drosophila*-Embryonen zu Chromatin assembliert und als Templat für eine *in vitro*-Transkription verwendet. In Anwesenheit von Polymerase I sowie weiterer Transkriptionsinitiationsfaktoren, darunter UBF, aber in Abwesenheit des Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I war die *in vitro*-Transkriptionsreaktion reprimiert (Längst et al., 1998). Wurde TTF-I hinzugefügt, konnte die Transkriptionsreaktion starten und das 180 nt lange RNA-Transkript wurde synthetisiert. Die *in vitro*-Transkription wurde vollständig reprimiert, wenn GST-DEDD in geringen Mengen anwesend war, wohingegen FADD in 24fach höherer Menge keinen Einfluß auf die Synthese des RNA-Transkripts besaß (Stegh et al., 1998). Somit konnte gezeigt werden, daß DEDD eine sehr hohe Histon-ähnliche Affinität zu DNA besitzt und wahrscheinlich aufgrund dieser Eigenschaft die Transkription ribosomaler DNA in einem *in vitro*-Transkriptionsexperiment mit rekonstituiertem Chromatin inhibieren konnte.

Mit DEDD wurde somit ein Protein identifiziert, das zytoplasmatische Signalereignisse mit Effektormechanismus im Kern verbindet. Nach Apoptoseinduktion transloziert DEDD Caspasen-abhängig in den Kern, wo es in Nukleoli akkumuliert und dort die Transkription von rDNA inhibieren kann.



## IV. Diskussion

Apoptose oder programmierter Zelltod ist der physiologische Mechanismus, der geschädigte, alternde, Virus-infizierte, sowie autoreaktive T- und B-Zellen eliminiert. Erkenntnisse der letzten Jahre zeigten, daß eine Dysregulation dieses Prozesses mit einer Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden kann. Exzessive Apoptose bedingt degenerative und Autoimmunerkrankungen, bei denen gesunde und/oder protektive Zellen sterben. Beispiele sind multiple Sklerose, Typ-I Diabetes mellitus, AIDS, Hashimotos Thyroiditis oder das Sjögrens Syndrom. Umgekehrt kann eine zu geringe Apoptoserate ebenfalls schwerwiegende Konsequenzen haben. Erkrankungen wie das Canale-Smith Syndrom, ein lymphoproliferatives Syndrom, Lymphome, Leukämie sowie verschiedene Autoimmunerkrankungen (wie z.B. Lupus erythematosus oder rheumatoide Arthritis) sind nur einige Beispiele (Peter et al., 1997b). Die Apoptoseforschung der letzten Jahre konzentrierte sich daher darauf, pro- und antiapoptotische Faktoren zu identifizieren und ihren Beitrag zur Entstehung, Entwicklung und Chronizität von degenerativen, Krebs- und Autoimmunerkrankungen zu bestimmen. Grundvoraussetzung für die Entwicklung rationaler Therapiekonzepte zur Heilung solcher Erkrankungen ist es daher, die Signaltransduktionsmechanismen pro- und antiapoptotischer Schlüsselmoleküle zu verstehen bzw. neuartige Moleküle zu identifizieren, die wichtige Funktionen übernehmen.

Caspase-8 ist eines dieser Schlüsselmolekül, dessen enorme Bedeutung durch Geninaktivierungsstudien in Mäusen (Varfolomeev et al., 1998) und in einer kürzlich publizierten Studie aufgezeigt wurde, die Caspase-8 als Tumorsuppressor in aggressiven Neuroblastomen identifizierte (Teitz et al., 2000). Die Aktivität dieses Enzyms und dessen Regulation muß daher verstanden werden, um ggf. therapeutisch eingreifen zu können. Während ihr Rezeptor-proximaler Aktivierungsmechanismus sehr gut verstanden ist, ist wenig über Substrate und über regulative Mechanismen ihrer Aktivität bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst versucht, mögliche *in vivo*-Substrate von Caspase-8 zu identifizieren.

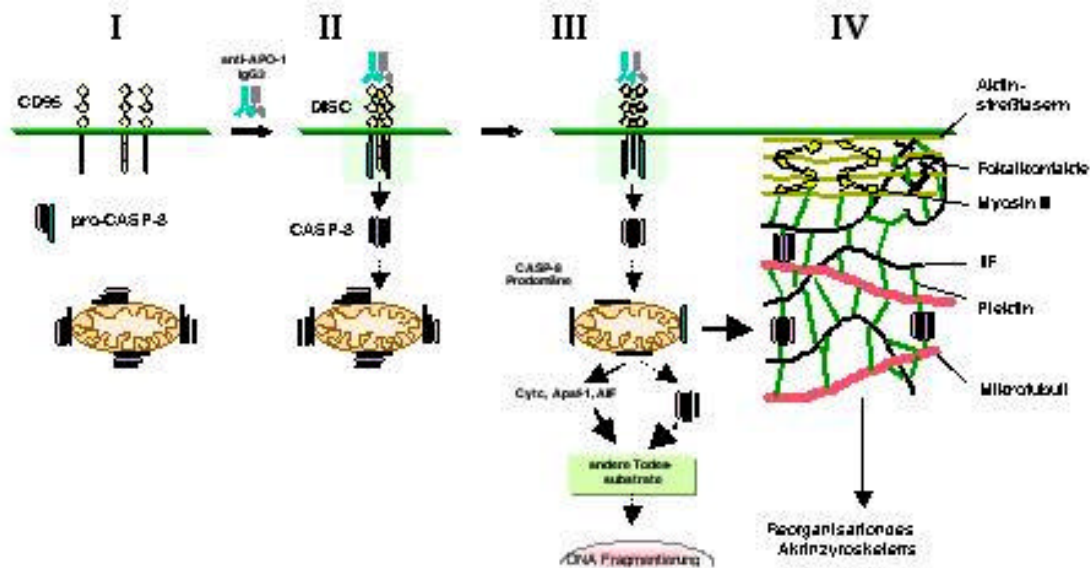
In bisherigen Publikationen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden angewandt, um Substrate und die korrespondierenden Caspasen zu ermitteln. Die Spaltung eines Proteins wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper verfolgt. Da keiner der verfügbaren Caspaseninhibitoren spezifisch die Aktivität einer einzelnen Caspase blockiert (Garcia-Calvo et al., 1998), erlaubte es diese Methode nicht, die aktive Caspase eindeutig zu identifizieren, die für die Spaltung jenes Proteins verantwortlich ist. Daher wurden häufig bakteriell produzierte, rekombinante aktive Caspasen eingesetzt und mit dem potentiellen Substrat inkubiert, um so zumindest *in vitro* die spaltende Aktivität zu identifizieren. Dieses artifizielle *in vitro*-System muß jedoch nicht der *in vivo*-Situation entsprechen, da sowohl die Caspasen als auch die entsprechenden Substrate in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt wurden, als sie intrazellulär tatsächlich vorliegen. Zudem besitzen die

rekombinanten Caspasen keine Prodomänen, die unter Umständen regulatorische Funktionen besitzen könnten. All diese Methoden erlauben es daher nicht, *in vivo*-Substrate von Caspasen direkt und eindeutig zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die spezifisch für Subdomänen des Caspase-8-Polypeptids sind, die Lokalisation von Procaspase-8 und der nach Prozessierung gebildeten Untereinheiten *in situ* durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt.

### **Procaspase-8 ist mitochondrial lokalisiert und kann durch DISC-aktivierte Caspase-8 prozessiert werden**

Konfokale Immunfluoreszenz zeigte, daß Procaspase-8 in nicht-apoptotischen MCF7-Zellen nahezu ausschließlich an Mitochondrien gebunden vorliegt (Abbildung 38 I). In Zelllinien abgeleitet von anderen Geweben, wie der Keratinozytenzelllinie HaCat oder der Hepatokarzinomzelllinie HepG2 war Caspase-8 ebenfalls zum Teil mitochondrial lokalisiert, zeigte jedoch insbesondere in HepG2-Zellen eine verstärkte zytoplasmatische Lokalisation. In Zelllinien lymphoiden Ursprungs wurde ebenfalls ein gewisser Anteil der zellulären Caspase-8-Menge an Mitochondrien nachgewiesen, so daß diese Organellassoziation von Caspase-8 ein generelles Phänomen darstellt. Die Immunfluoreszenzdaten wurden darüber hinaus durch *in vitro*-Bindungsexperimente mit isolierten Mitochondrien und durch Zellfraktionierungsexperimente bestätigt. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete, daß Caspase-8 eine diffuse zytoplasmatische und perinukleare Lokalisation besitzt, während die Prodomäne filamentartige Strukturen ausbildet (Siegel et al., 1998). Diese Studie beruht jedoch auf transienter Überexpression von Caspase-8 und deren Deletionsmutanten in HeLa-Zellen, während im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation endogener Caspase-8 analysiert wurde.

Die Rolle von Mitochondrien im Rahmen der Apoptosesignaltransduktion wurde im Laufe der letzten Jahre immer klarer definiert. Sie sind nicht nur passive Zuschauer, sondern aktive Teilnehmer. Während Apoptose werden mitochondriale Moleküle freigesetzt, die aktiv in die Signaltransduktion eingreifen. AIF und Cytochrom c sind die vielleicht wichtigsten Beispiele für mitochondriale Moleküle, die sowohl Signalereignisse initiieren als auch wichtige Effektorfunktionen besitzen (Susin et al., 1999b; Liu et al., 1996b). Daneben wurden mit Caspase-2, Caspase-9 und Caspase-3 Mitglieder der Caspasenfamilie identifiziert, die in nicht-apoptotischen Zellen im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert sind (Mancini et al., 1998; Krebs et al., 1999; Susin et al., 1999b). Somit konnte mit Caspase-8 ein weiteres Mitglied dieser Familie beschrieben werden, das mit Mitochondrien assoziiert ist. Im Gegensatz zu den Caspasen 2, 3 und 9 befindet sich Caspase-8 jedoch an der äußeren Mitochondrienmembran (Daten nicht gezeigt). Wie wird Caspase-8 dort gebunden? In einer kürzlich publizierten Studie wurde ein mitochondriales Protein identifiziert, BAR (für „**B**ifunctional **A**poptosis **R**egulator“), das mit Hilfe einer Transmembranregion in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist und Procaspase-



**Abbildung 38. Modell der Apoptosesignaltransduktion in MCF7-Fas-Zellen.** MCF7-Fas-Zellen exprimieren CD95 auf der Zelloberfläche. Der größte Anteil von Caspase-8 ist mitochondrial lokalisiert (I). Nach Stimulation mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper wird Procaspase-8 zum DISC rekrutiert und durch Autoproteolyse aktiviert. Das aktive Enzym wird daraufhin vom DISC freigesetzt (II). Aktive Caspase-8 (orange und violett) kann direkt mitochondriale Procaspase aktivieren (III). Im Gegensatz zur Prodomäne (grün), die an Mitochondrien gebunden bleibt, transloziert aktive Caspase-8 zu Plektin und spaltet dieses Molekül (IV). Diese Spaltung ist wahrscheinlich für die Reorganisation des Aktinfilamentsystems während Apoptose verantwortlich. Der DISC ist vereinfacht ohne FADD dargestellt. Cyt c, Cytochrom c; AIF, Apoptosis Inducing Factor.

8 mit Hilfe seiner DED-ähnlichen Domäne bindet (Zhang et al., 2000; Daten nicht gezeigt). Diese Assoziation wurde mit Hilfe von bakteriell exprimierten rekombinanten Proteinen und nach Überexpression in 293T-Zellen gezeigt. Ob ein solcher BAR-Procaspase-8-Komplex auch *in vivo* existiert, und welche Bedeutung diese Assoziation hat, muß noch gezeigt werden.

Eine weitere Frage, die die mitochondriale Lokalisation von Caspase-8 aufwarf, war diejenige nach ihrem Aktivierungsmechanismus. Es zeigte sich, daß mitochondrial lokalisierte Procaspase-8 durch DISC-aktivierte Caspase-8 prozessiert werden kann (Abbildung 38 II). Diese Aktivierung ist unabhängig von Bid. Auch die apoptogene Aktivität der Mitochondrien verbunden mit der Permeabilisierung der mitochondrialen Membranen ist für die Aktivierung von Caspase-8 nicht notwendig, da Caspase-8 in MCF7-Fas-Zellen auch in Gegenwart von Bcl-x<sub>L</sub> gespalten wird, das die apoptogene Aktivität der Mitochondrien inhibiert und die Membranpermeabilisierung verhindert (Kroemer, 1997). Die Caspasen 2, 3 und 9 werden durch einen proapoptotischen Stimulus, der zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembranen führt, aus dem Intermembranraum freigesetzt und im Zytoplasma prozessiert. Die Freisetzung und damit die Aktivierung dieser Caspasen kann demzufolge durch mitochondriales Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert werden (Susin et al., 1999b; Krebs et al., 1999). Der Aktivierungsmechanismus von Caspase-8 unterscheidet sich daher grundlegend von dem anderer mitochondrial lokalisierter Caspasen.

### **Aktive Caspase-8 transloziert zu und spaltet Plektin**

Aktive Caspase-8 transloziert im Rahmen CD95- und TNF-RI-vermittelter Apoptose zu Plektin, das quantitativ durch Caspase-8 an einem ILRD-Motiv in der Mitte des Moleküls gespalten wird (Abbildung 38 III und IV). Plektin gehört zur Multigenfamilie der Plakine (Ruhrberg und Watt, 1997; Fuchs und Yang, 1999), für die auch die Bezeichnung "Zytolinker" verwendet wird, da Mitglieder dieser Familie eine Vielzahl zytoskelettaler Strukturen miteinander vernetzen (Wiche, 1998). Neben Plektin sind vier weitere humane Familienmitglieder bekannt: Desmoplakin, BPAG1e, Envoplakin und Periplakin (Fuchs und Yang, 1999). Mit Ausnahme von Periplakin, das nur in epithelialen Zellen exprimiert wird, besitzt keines dieser Proteine eine potentielle Caspase-8-Spaltstelle oder das Sequenzmotiv ILRD, so daß Plektin bislang der einzige Zytolinker ist, der Caspase-8-vermittelt gespalten wird. In einer kürzlich publizierten Studie konnte gezeigt werden, daß Plektin mit Mitochondrien assoziiert und wichtig für die Positionierung und Formgebung dieser Organellen insbesondere in Muskelgeweben ist (Reipert et al., 1999). Mitochondriale Caspase-8, die größtenteils an den Mitochondrien aktiviert wird, könnte somit direkt zu ihrem Substrat Plektin translozieren und es proteolytisch degradieren.

### **Ist Plektin ein spezifisches Caspase-8-Substrat?**

Eine Reihe von Daten sprechen für die spezifische Spaltung von Plektin durch Caspase-8: Im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose ist Caspase-8 die einzige signifikante Caspasenaktivität in MCF7-Zellen, die aufgrund einer Gendelektion keine Caspase-3 besitzen. Aber auch Caspase-3-exprimierende Jurkat-Zellen zeigten früh nach Induktion CD95-vermittelter Apoptose und damit vor massiver Aktivierung von Caspase-3 eine signifikante Aktivierung von Caspase-8. Alle anderen Caspasen waren zu diesem Zeitpunkt noch inaktiv, das Plektinspaltfragment war aber bereits nachweisbar. Darüber hinaus wurde Plektin quantitativ durch den DISC gespalten, der lediglich aktive Caspase-8 enthält, und nur rekombinante aktive Caspase-8 war in der Lage sowohl Plektin als auch ein rekombinant hergestelltes Plektinfragment zu degradieren. All diese Daten legen den Schluß nahe, daß Plektin ein spezifisches Caspase-8-Substrat während Todesrezeptor-vermittelter Apoptose ist. Dies könnte anders sein im Fall von Apoptose, die durch Chemotherapeutika ausgelöst wird. Staurosporin und Etoposid, die Todesrezeptor-unabhängig die apoptogene Aktivität der Mitochondrien induzieren, bewirken eine nur schwache Aktivierung von Caspase-8, aber eine ähnlich effiziente Plektin-Spaltung wie im Rahmen CD95- und TNF-RI-vermittelter Apoptose beobachtet. Entweder reicht die geringe Aktivität von Caspase-8 aus, um Plektin quantitativ zu degradieren oder andere Caspasen, wie z.B. Caspase-3, die massiv im Rahmen dieser Apoptoseformen aktiviert werden, sind unter diesen *in vivo*-Bedingungen in der Lage, Plektin im Zentrum des Moleküls zu spalten, auch wenn sie *in vitro* eine nur geringfügige Plektin-spaltende Aktivität besitzen. Präliminäre Daten mit

Caspase-8-defizienten Jurkat T-Zellen zeigte, daß nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin Plektin ebenfalls gespalten wird. Dabei wurde ein Spaltfragment gebildet, das die gleiche elektrophoretische Mobilität besaß, wie jenes, welches im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter und Chemotherapeutika-induzierter Apoptose in Wildtyp-Jurkat T-Zellen gefunden wurde. Dies deutet darauf hin, daß in der Tat auch andere Caspasen Plektin im Rahmen Todesrezeptor-unabhängiger Apoptose spalten können.

### **Die proteolytische Degradation zytoskelettaler Strukturen während Apoptose ist hierarchisch organisiert**

Plektin wird in sehr vielen Geweben exprimiert und kann bis zu 1% der gesamten zellulären Proteinmenge repräsentieren (Wiche et al., 1998). Mit Hilfe der terminalen Proteininteraktionsdomänen besitzt Plektin die einzigartige Eigenschaft, zytoskelettale Strukturen wie Myosin II, Aktin, Intermediärfilamente oder Mikrotubuli miteinander zu verbinden und damit verschiedene zytoskelettale Netzwerke zu einem großen Netzwerk zu vereinigen (Wiche, 1998). Eine Vielzahl jener mit Plektin interagierender Proteine wird während Apoptose durch Caspasen gespalten: Während Cytokeratin 8 resistent gegenüber Caspasen-vermittelter Degradation war, wurde Cytokeratin 18 als Caspase-6-Substrat identifiziert, das während Daunomycin- und Anisomycin-vermittelter Apoptose gespalten wird (Caulin et al., 1997; Ku et al., 1997). Wie CK18, so wird auch Lamin B, ein nukleäres Intermediärfilamentprotein, durch Caspase-6 an einer VEVD-Sequenz gespalten. Eine kinetische Analyse der Spaltung von CK18, Lamin B und Plektin zeigte, daß Plektin etwa 4 h vor CK18 und etwa 20 h vor Lamin B gespalten wird. Auch Gelsolin, das wie Plektin Aktin bindet und die Aktinpolymerisation/-depolymerisation reguliert und während Apoptose Caspase-3-vermittelt gespalten wird (Kotahoka et al., 1998), wurde ebenfalls später als Plektin degradiert. Korrespondierend mit der hierarchischen Aktivierung von Caspasen erfolgt auch die Spaltung zellulärer Proteine in einer definierten Reihenfolge: Caspase-8 wird als erste Caspase aktiviert und demzufolge wird Plektin als Caspase-8-Substrat zuerst gespalten. Die Caspasen 3 und 6 werden später in der Signalkaskade prozessiert, so daß deren Substrate wie CK18, Lamin B oder Gelsolin erst zu einem späteren Zeitpunkt degradiert werden. Die zelluläre Desintegration während Apoptose kann somit in zwei Phasen unterteilt werden: In der ersten Phase wird Plektin als Verbindungselement der drei zytoskelettalen Netzwerke gespalten, woraufhin in der zweiten Phase bestimmte Komponenten der einzelnen Filamentsysteme proteolytisch degradiert werden. Die Spaltung der Verbindungselemente zytoskelettaler Netzwerke geht somit der Desintegration individueller Filamentsysteme voraus.

### **Plektin ist essentiell für die Aktinreorganisation während Apoptose**

Apoptose ist durch dramatische strukturelle Veränderungen gekennzeichnet. Eine Reorganisation des Intermediärfilamentsystems, insbesondere in epithelialen Geweben, und des Mikrofilamentsystems ist vermutlich daran beteiligt. Die Spaltung von Plektin, die der Degradation von CK18 und Gelsolin vorausgeht, könnte diese Prozeß maßgeblich initiieren. Plektin ist wichtig für die Aktinreorganisation nach Stimulation von Rho, Rac und Cdc42 (Andrä et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Plektin ebenfalls notwendig für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts während Apoptose ist, da in Plektin-defizienten Fibroblasten jene Reorganisation blockiert war. Der direkte Beweis dafür, daß nicht nur die Anwesenheit von Plektin, sondern daß dessen Spaltung essentiell für die Aktinreorganisation ist, muß noch erbracht werden. Um dies direkt zeigen zu können, müßte ein nicht-spaltbares Plektinmolekül (Plektin D2398A) in Plektin-defiziente Fibroblasten transfiziert werden. Wäre die Aktinreorganisation nach Apoptoseinduktion mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper in diesen rekonstituierten Fibroblasten blockiert, so stünde die Caspase-8-vermittelte Plektinspaltung in kausalem Zusammenhang mit der Reorganisation des Mikrofilamentsystems. Es wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die zeigten, daß eben jene Rekonstitution nicht möglich ist:

- 1.) Die Transfektion von Plektin in Plektin-defiziente Fibroblasten war mit einem Kollaps des Intermediärfilament- und des Mikrofilamentsystems verbunden (Andrä et al., 1998; Andrä und Wiche, Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt wurde auch mit Plektinfragmenten beobachtet, die über die Intermediärfilamentbindungs- bzw. über die Aktinbindungsdomäne verfügen. Ursache für die Desintegration dieser Filamentsysteme könnte darin bestehen, daß überexprimiertes Plektin Intermediärfilamente bzw. Aktinfilamente derart stark miteinander vernetzt, daß sie unphysiologisch kollabieren. Dieser Effekt wurde auch *in vitro* beobachtet (Nikolic et al., 1996). Es ist damit unmöglich, jene Effekte voneinander zu unterscheiden, die die Transfektion bzw. die Apoptoseinduktion auf das Aktinfilamentsystem besitzt.
- 2.) Plektin besitzt ein Molekulargewicht von 500 kDa. Die entsprechende cDNA umfaßt mehr als 15.000 Basenpaare. Die Transfektionseffizienz in primären Fibroblasten ist derart gering, daß eine statistische Analyse nahezu unmöglich ist (Prof. Dr. Gerhard Wiche, persönliche Kommunikation). Die Expression des Plektinmoleküls ist zudem nur transient möglich. Um die Aktinreorganisation in transfizierten Fibroblasten untersuchen zu können, müßten die Zellen für mindestens 24h mit INF- vorinkubiert und mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper für mindesten 12h behandelt werden. Nach etwa 10 bis 12 Stunden sind jedoch keine Plektin-transfizierten primären Fibroblasten mehr zu sehen (Prof. Dr. Gerhard Wiche, persönliche Kommunikation).

Die Tatsache, daß Plektin im Rahmen einer Vielzahl von Apoptoseformen spezifisch und sehr früh gespalten wird, legt jedoch den Schluß nahe, daß in der Tat die Plektinspaltung die Aktinreorganisation während Apoptose induziert. Die Caspase-8-

vermittelte Spaltung von Plektin im Zentrum des Moleküls scheint daher der erste Schritt in der Signalkaskade zu sein, der das stabile zytoskelettale Gerüst der Zelle desintegriert und damit jene strukturellen Reorganisationen initiiert, die typisch für den Apoptoseprozeß sind. Dies kann wiederum die hierarchisch-organisierte Fragmentierung der Zelle während Apoptose erleichtern. Diese Daten unterstreichen damit die zentrale Bedeutung von Plektin als mechanischer Integrator zytoskelettaler Strukturen und als Mediator dynamischer Reorganisationsprozesse.

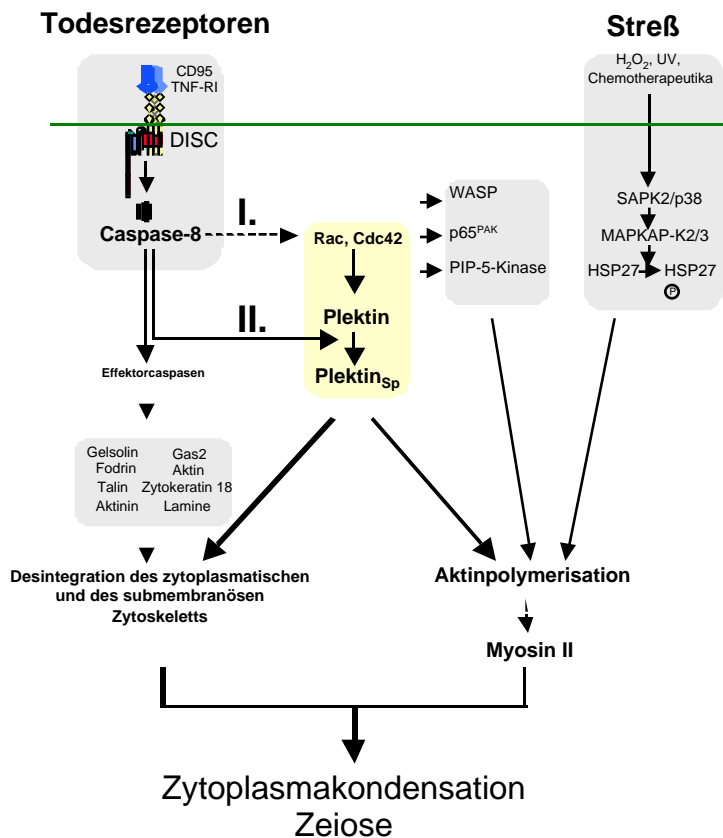
### **Ein Modell für die Morphologieveränderungen während Apoptose – Plektin und die Aktinreorganisation**

Die Aktinreorganisation wird als wichtiger morphologischer Effektormechanismus während Apoptose angesehen. So konnte gezeigt werden, daß pharmakologische Substanzen, wie Cytochalasin B, das die Aktinpolymerisation inhibiert, auch Zeiose und die Bildung apoptotischer Körperchen während Apoptose blockiert (Rao et al., 1999). Zellbiologische Forschung der letzten Jahre konzentrierte sich vornehmlich auf das Mikrofilamentsystem, um dessen Beteiligung an den Morphologieveränderungen während Apoptose zu bestimmen.

Zeiose und die Bildung apoptotischer Körperchen wird als biphasischer Prozeß angesehen: Zunächst reorganisiert sich das Mikrofilamentsystem, um in der zweiten Phase im Zusammenwirken mit Myosin II die Zytoplasmakondensation und die Bildung apoptotischer Körperchen zu induzieren (Mills et al., 1998). Wie bewirkt ein proapoptotischer Stimulus die Reorganisation des Aktinfilamentsystems? Entscheidender Schritt für die Reorganisation des Aktinfilamentsystems ist die Polymerisation von monomeren Aktin (G-Aktin) zu Aktinfilamenten (F-Aktin) (Rao et al., 1999), die sich daraufhin in einem Ring entlang der Plasmamembran erstrecken (Pitzer et al., 1996). Abbildung 39 faßt die dabei diskutierten Signalwege zusammen.

Streß-induzierte Apoptose führt zur Aktivierung von sogenannten Streß-aktivierten Proteinkinase (SAPK), insbesondere von SAPK2/p38. Diese Kinase aktiviert ihrerseits MAPKAP („**M**itogen-**a**ktiviert **P**rotein **K**inase **a**ssociated **P**rotein“-Kinase-2/3, die das Heatshock-Protein HSP27, ein Aktinpolymerisationsinhibitor, phosphoryliert und damit inaktiviert (Huot et al., 1998).

Wie die Aktinpolymerisation im Rahmen Todesrezeptor-vermittelte Apoptose induziert wird, ist kaum verstanden. Einige Studien zeigten, daß Cdc42 und Rac, zwei GTPasen der Ras-Superfamilie, während Apoptose eine Rolle spielen (Subauste et al., 2000; Gulbins et al., 1996). Inhibition von Rac oder Cdc42 blockiert CD95-vermittelte Apoptose. Überexpression von dominant-aktiven Formen von Rac oder Cdc42 fördert Apoptose, während dominant-negative Formen antiapoptotisch wirken (Subauste et al., 2000). Wie diese GTPasen aktiviert werden ist noch unklar, ihre Aktivierung scheint jedoch unabhängig von Caspase-3 zu sein (Subauste et al., 2000; Gulbins et al., 1996). Im Rahmen



**Abbildung 39. Modell der Aktinreorganisation während Apoptose.** Streß-induzierte Apoptose aktiviert den SAPK-Signalweg, der über Phosphorylierung und damit verbundener Inaktivierung von HSP27 Aktinpolymerisation induziert. Die GTPasen Rac und Cdc42 sind ebenfalls in der Lage, die Umwandlung von G- in F-Aktin durch Aktivierung von PIP-5-Kinase, p65<sup>PAK</sup> und WASP zu induzieren. Todesrezeptor-vermittelte Apoptose führt zur Spaltung von Plektin, das über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Reorganisation induziert. Zudem werden verschiedene zytoskeletale Proteine Caspase-vermittelt gespalten. Diese proteolytischen Spaltungen tragen zu einer partiellen Destabilisierung des submembranösen und des zytoskeletalen Gerüsts bei. Diese Destabilisierung, die Aktinpolymerisation in Zusammenarbeit mit Myosin II führt dann zu Zeiose und zu Zytoplasmakondensation. Für Details siehe Text. SAPK, Stress-activated protein kinase; MAPKAP, Mitogen-activated protein kinase activated protein; HSP, heat shock protein; PIP, Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat; WASP, Wiskott Aldrich Syndrom Protein.

Aktinreorganisation, da nach Aktivierung dieser GTPasen durch Bardykinin bzw. durch PDGF (für „platelet-derived growth factor“) in Plektin-defizienten Zellen jene Reorganisation nicht zu beobachten war (Andrä et al., 1998). Demzufolge fungiert Plektin in jenem Signalweg, der zur Polymerisation von Aktin führt, unterhalb von Rac und Cdc42 (Abbildung 39). Caspase-8 könnte zwei Funktionen besitzen: Einerseits könnte sie Rac und Cdc42 aktivieren, die daraufhin die Aktinpolymerisation induzieren (I. in Abbildung 39).

Todesrezeptor-unabhängiger Apoptoseformen, wie Streß-induzierter, c-myc-, Bak- oder Etoposid-vermittelter Apoptose, in denen Caspasenaktivierung ein sekundäres und spätes Signalereignis darstellt (Boesen-de Cock et al., 1999), ist die Aktinpolymerisation unabhängig von Caspasen (McCarthy et al., 1997; Mills et al., 1997; Huot et al., 1998).

Zytoplasmakondensation und Bildung apoptotischer Körperchen während Todesrezeptor-vermittelter Apoptose, im Rahmen derer Caspasenaktivierung ein primäres Ereignis darstellt, können durchaus auf der Aktivität von Caspasen beruhen. Welche Rolle spielt hier Caspase-8 und die Plektinsspaltung?

Plektin ist essentiell für die Rac- und Cdc42-vermittelte



Eine Voraussetzung für diese Aktinpolymerisation-induzierende Aktivität von Rac und Cdc42 könnte darin bestehen, daß Plektin proteolytisch gespalten wird. Die dabei entstehenden Spaltfragmente besitzen die eigentliche Aktivität, um die Aktinpolymerisation auszulösen. Die Aktinreorganisation könnte auch unabhängig von Rac und Cdc42 sein. Die Spaltung von Plektin und die damit verbundene Bildung eines N- und eines C-terminalen Spaltfragments könnten direkt die Polymerisation von Aktin induzieren (II. in Abbildung 39).

Plektin ist zudem wichtiger Bestandteil des submembranösen Zytoskeletts, so daß dessen Spaltung die Desintegration jenes Netzwerkes initiieren könnte. Darüber hinaus stellt das Plektinmolekül einen wichtigen Integrator zytoplasmatischer Netzwerkstrukturen dar, so daß dessen Degradation einen Startpunkt für die Fragmentierung des Zytoplasmas darstellen könnte. Es wird nicht nur eine Beteiligung des Aktinfilamentsystems, sondern darüber hinaus auch eine Rolle der Mikrotubuli bei Morphologieveränderungen während Apoptose diskutiert. Das Mikrotubuli-destabilisierende Reagenz Nocodazol verstärkte die Zeiose (Keller et al., 1985; Keller und Zimmermann 1986; Mills et al., 1998), und Mikrotubulstrukturen desintegrierten während Apoptose (Bonfoco et al., 1996; Mills et al., 1998). Die Spaltung des Zytolinkers Plektin, der u.a. Mikrotubuli mit Aktinfilamenten zu einem synergistischen Netzwerk vereint, könnte wiederum diesen Desintegrationsprozeß initiieren.

Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von Caspase-vermittelten Proteolyse-Ereignissen, die jene Prozesse unterstützen. So werden die Aktin-bindenden Proteine Gelsolin und Fodrin durch Caspase-3, sowie Talin und Aktinin Calpain-vermittelt gespalten (siehe Übersichtsartikel Nicholson, 2000; Tan und Wang, 1998). Die Spaltung von Fodrin, Talin und Aktinin könnte dazu beitragen, die kortikalen Aktin-Membranverbindungen aufzubrechen und somit die Zytoplasmakondensation und nachfolgende Bildung apoptotischer Körperchen zu induzieren. Da Plektin das erste zytoskelettale Protein ist, das während Apoptose Caspasen-vermittelt gespalten wird, könnte dessen Spaltung das zytoplasmatische und submembranöse Zytoskelett destabilisieren, woraufhin andere Proteine einer Caspasen- oder Calpain-vermittelten Spaltung erst zugänglich werden. So könnte die Plektinspaltung nicht nur an der Aktinpolymerisation, sondern auch an jenen sekundären Prozessen beteiligt sind, die zur Desintegration zellulärer Strukturen während Apoptose führen.

Nach Reorganisation der Mikrofilamentsystems wird in einer zweiten Phase der Ring von Aktinfilamenten, der sich entlang der Plasmamembran gebildet hat, Myosin II-vermittelt kontrahiert. Diese Kontraktion ruft eine zentripetale Kraft hervor, die das Zytoplasma komprimiert. Dort, wo die Plasmamembran (z.B. durch Spaltung von Plektin oder Fodrin) destabilisiert und über Aktinfilamente nur noch schwach mit dem Zytoplasma in Verbindung steht, bilden sich Protrusionen des Zytoplasmas, die letztlich in der Bildung von apoptotischen Körpern resultieren (Mills et al., 1998). Die kontraktile Aktivität von Myosin II wird dabei durch Phosphorylierung der Myosin-regulatorischen

leichten Kette (MLC) durch MLC-Kinase (MLCK) vermittelt. Diese Phosphorylierung katalysiert die Interaktion des Myosinkopfes mit Aktin und erlaubt der Myosin-ATPase eine Gleitkraft zu entwickeln, die letztlich die Kontraktion bedingt (siehe Kohama et al., 1996; Gallagher et al., 1997; Mills et al., 1998). MLC kann auch durch Rho-Kinase (ROK) phosphoryliert werden. Wie ROK oder MLCK während Apoptose aktiviert werden, ist noch unklar. Plektin assoziiert mit Myosin II und kann nach Spaltung durch Caspase-8 die Myosin II-Aktivität ggf. beeinflussen. Die Plektinspaltung könnte somit auch in der zweiten Phase der Morphologieveränderungen während Apoptose eine wichtige Rolle spielen (siehe Schröder et al., 2000; Hijikata et al., 1999).

Caspasen-vermittelte Spaltung verschiedener zytoskelettaler Proteine, und hier vor allem die initiale Spaltung von Plektin, kann somit eine zentrale Rolle in jenen Prozessen spielen, die zur Aktinreorganisation, zur Myosin II-vermittelten Aktinkontraktion und damit zu Membranveränderungen und Bildung apoptotischer Körperchen führen.

### **Caspase-8 wird durch mitochondriales Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> reguliert**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Caspase-8 nicht nur eine Initiatorcaspase ist, die Rezeptor-aktiviert eine Caspasenkaskade oder die apoptogene Aktivität von Mitochondrien induziert, sondern auch eine Effektorcaspase darstellt, die mit Plektin ein wichtiges Integratormolekül zytoskelettaler Strukturen spaltet und damit zu Morphologieveränderungen während Apoptose beitragen kann. Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-hochexprimierende Typ II-Zellen sind resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, bilden aber potentiell zytotoxische Mengen aktiver Caspase-8 am DISC. Warum sind diese Typ II-Zellen aber resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, wenn sie aktive Caspase-8 im Zytoplasma akkumulieren?

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß mitochondriales Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> aktive Caspase-8 sequestrieren und damit verhindern kann, daß sie potentielle Substrate im Zytoplasma, wie Bid oder Plektin, spalten kann (Abbildung 40). Diese neuartige Funktion von mitochondrialem Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> erklärt, warum Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierende Typ II-Tumorzelllinien gegenüber CD95-vermittelter Apoptose geschützt sind, obwohl potentiell zytotoxische Mengen aktiver Caspase-8 am DISC gebildet werden. Ein Resistenzmechanismus, der auf der Sequestrierung aktiver Caspase-8 beruht, wurde bereits in einer publizierte Studie diskutiert (Martin et al., 1998). Die Autoren fusionierten C-Caspase-8, welche die beiden aktiven Untereinheiten p18 und p10 enthält, mit der Transmembran- und der extrazellulären Domäne der humanen CD8 -Kette. CD8 bildet ein über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer und induziert die Autoaktivierung von Caspase-8. Es wurde eine Punktmutante dieses Konstrukts hergestellt, welches zwischen den aktiven Untereinheiten p18 und p10 gespalten werden konnte, aber die Abspaltung der aktiven Caspase vom CD8-Molekül nicht länger erlaubte. Diese nur teilweise prozessierte Caspase-8 ist aktiv, wird aber an der Plasmamembran zurückgehalten und kann daher

potentielle Substrate im Zytoplasma nicht erreichen. Im Gegensatz zum nicht-mutierten Protein war die Mutante daher unfähig, Apoptose in den transfizierten Zellen auszulösen.

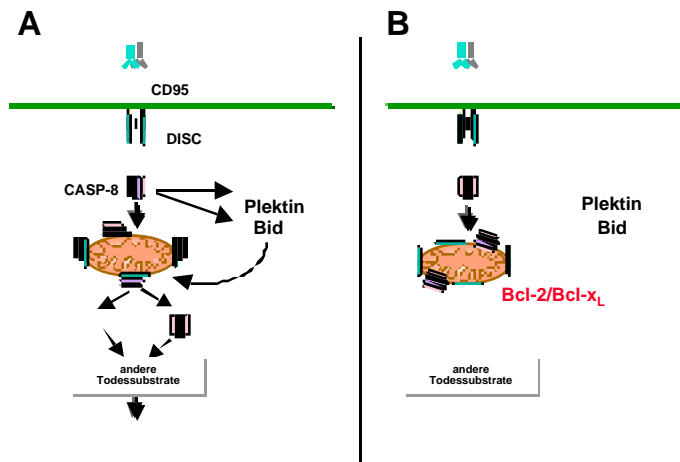
Die durch Immunfluoreszenz und subzelluläre Fraktionierung gefundene Assoziation von Caspase-8 an Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Mitochondrien warf eine Reihe von Fragen auf, die in der vorliegenden Arbeit experimentell beantwortet wurden:

- 1.) Führt die Bindung aktiver Caspase-8-Untereinheiten an Mitochondrien zur deren Inaktivierung, oder handelt es sich um einen Sequestrierungsmechanismus, der die Aktivität von Caspase-8 nicht beeinflusst?
- 2.) Ist dieser neuartige Mechanismus auf bestimmte Zelltypen beschränkt oder handelt es sich um ein generelles Phänomen?
- 3.) Ist diese neuartige Aktivität von Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierenden Mitochondrien spezifisch für Caspase-8 oder werden auch andere aktive Caspasen gebunden?
- 4.) Welches mitochondriale Protein ist der Bindungspartner für Caspase-8?

Die Bindung aktiver Caspase-8 an Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierende Mitochondrien ist ein generelles und nicht auf bestimmte Zelltypen beschränktes Phänomen. Die Bindung an Mitochondrien führt dabei nicht zum Verlust ihrer enzymatischen Aktivität. Welche Funktion das Organell-assoziierte aktive Enzym besitzt, ist jedoch noch unklar. Es ist denkbar, daß es bestimmte mitochondriale Substrate spalten und damit aktivieren kann, die eine antiapoptotische Funktion besitzen und/oder synergistisch mit Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> ihre zytoprotektive Wirkung entfalten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß lediglich aktive Caspase-8, nicht aber andere aktive Caspasen Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-vermittelt an Mitochondrien gebunden wird. Dies ist sinnvoll, da Caspase-8 die einzige Caspase ist, die oberhalb der Mitochondrien aktiviert wird (Scaffidi et al., 1998). Wird ihre Aktivität inhibiert, so werden auch keine weiteren Caspasen aktiviert.

Mit Hilfe eines *in vitro*-Bindungsexperiments konnte das Protein BAR (für „**B**ifunctional **A**poptosis **R**egulator“) als möglicher Bindungspartner für aktive Caspase-8 identifiziert werden. BAR besitzt jene Charakteristika, die für ein Protein postuliert werden müssen, das aktive Caspase-8 Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-vermittelt binden kann: BAR befindet sich an der äußeren Mitochondrienmembran und daher im gleichen subzellulären Kompartiment wie Caspase-8 (Daten nicht zeigt). Es kann über seine SAM-Domäne Bcl-2-Familienmitglieder binden und ist am stärksten in MCF7-Zellen exprimiert, deren Mitochondrien auch die größte Aktivität besitzen, aktive Caspase-8 zu binden. Ob diese Interaktion zwischen aktiver Caspase-8 und BAR auch *in vivo* vorliegt, ist jedoch noch zu klären.

In welchen Zelltypen kann dieser neuartige Mechanismus Resistenz gegenüber Apoptose vermitteln? In CD95-Typ I-Zellen ist die Apoptosesignalkaskade unabhängig von Mitochondrien und kann somit durch Bcl-2-Familienmitglieder nicht inhibiert werden. Bcl-2-überexprimierende Mitochondrien von Typ I-Zellen sind zwar auch in der Lage, aktive Caspase-8 zu binden. Die Menge an DISC-aktivierter Caspase-8 ist jedoch so groß, daß die Bindungskapazität der Mitochondrien schnell überschritten wird und ausreichende Mengen



**Abbildung 40. Mitochondriales Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> sequestriert aktive Caspase-8 aus dem Zytoplasma.** DISC-aktivierte Caspase-8 spaltet Plektin und Bid und aktiviert direkt mitochondrial-gebundene Caspase-8. In Anwesenheit von Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> wird aktive Caspase-8 in Typ II-Zellen von Mitochondrien wahrscheinlich über BAR gebunden und somit daran gehindert, potentielle Substrate im Zytoplasma zu erreichen und zu spalten. Der DISC ist vereinfacht ohne FADD dargestellt.

aktiver Caspase-8 im Zytoplasma vorliegen, um potentielle Substrate, wie Bid oder Caspase-3, zu spalten und somit Apoptose auszulösen. Typ II-Zellen sind durch Überexpression von Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> gegenüber CD95-vermittelter Apoptose geschützt, da deren Signalkaskade

Mitochondrien-abhängig ist. Diese Zellen bilden wenig DISC und damit eine geringe Menge aktiver Caspase-8, die lediglich ausreicht, Bid zu spalten

und damit die apoptogene Aktivität der Mitochondrien zu induzieren, nicht aber um direkt eine Caspasenkaskade durch direkte Prozessierung von Caspase-3 zu initiieren (Scaffidi et al., 1998). Da nur wenig DISC-aktivierte Caspase-8 gebildet wird, können Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierende Mitochondrien von Typ II-Zellen die aktiven Caspase-Untereinheiten quantitativ binden. Die Resistenz von Typ II-Zellen wird daher auf zwei Ebenen bestimmt:

- 1.) auf Rezeptorebene, da im Vergleich zu Typ I-Zellen wenig DISC und damit eine geringe, aber stets signifikante Menge aktiver Caspase-8 gebildet wird und
- 2.) auf mitochondrialer Ebene, wo Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> die apoptogene Aktivität der Mitochondrien inhibieren, aktive Caspase-8 binden und damit eine potentiell zytotoxische Aktivität aus dem Zytoplasma entfernen kann.

### Sequestrierung aktiver Caspase-8 als Resistenzmechanismus kurzzeit-aktivierter peripherer T-Zellen

Unter welchen physiologischen Bedingungen spielt dieser Typ II-Resistenzmechanismus eine Rolle? Kurzzeit-aktivierte T-Zellen zeigen die typischen Charakteristika einer Typ II-Zelle: Sie bilden wenig DISC und damit eine geringe, aber signifikante Menge aktiver Caspase-8 und sind möglicherweise aufgrund großer Mengen von mitochondrialem Bcl-x<sub>L</sub> resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Klas et al., 1993).

Zunächst wurde getestet, ob Mitochondrien von T-Zellen verschiedener Aktivierungsstufen eine Öffnung der PT-Pore zeigten. In kurzzeit-aktivierten d1 und d2 T-Zellen ließ sich keine Verminderung des mitochondrialen Transmembranpotentials nach

Atraktylosid-Behandlung nachweisen. Atraktylosid ist ein Ligand des Adenin-Nukleotid-Translokators (ANT), das nach Bindung an ANT die Öffnung der PT-Pore induziert (Kroemer, 1997). Langzeit-aktivierte d5 und d6 T-Zellen waren hingegen sensitiv gegenüber Atraktylosid. D.h. Mitochondrien kurzzeit-aktivierter T-Zellen sind potentiell in der Lage, Resistenz gegenüber Apoptose zu vermitteln. In einem zweiten Schritt wurde die Bindung DISC-aktivierter Caspase-8 an Mitochondrien von T-Zellen unterschiedlicher Aktivierungsstufen untersucht. In d1 T-Zellen, die im Vergleich zu naiven T-Zellen Bcl-x<sub>L</sub> und BAR hochregulierten, wurden geringe Mengen aktiver Caspase-8 gebildet, die nicht im Zytoplasma, sondern an den Mitochondrien vorlagen. Bcl-x<sub>L</sub> blockiert die apoptogene Aktivität der Mitochondrien und vermittelt wahrscheinlich über BAR die Bindung aktiver Caspase-8. Langzeit-aktivierte T-Zellen differenzierten in eine Typ I-Zelle, in der eine größere Menge aktiver Caspase-8 am DISC gebildet und sowohl Bcl-x<sub>L</sub> als auch BAR herunterreguliert wurden. Aktive Caspase-8 war zytoplasmatisch und die Zellen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Somit stellt die T-Zellaktivierung einen Prozeß dar, in dessen Verlauf ein Typ II-Zelle in eine Typ I-Zelle differenziert. Resistenz in kurzzeit-aktivierten T-Zellen kann dabei auf Rezeptorebene durch reduzierte DISC-Bildung und auf Mitochondrienebene durch Hochregulation von BAR und Bcl-x<sub>L</sub> und die dadurch bedingte Bindung aktiver Caspase-8 vermittelt werden. Die c-FLIP-Expression ändert sich während der T-Zellaktivierung nicht und kann daher für die Resistenz von d1/d2 T-Zellen nicht verantwortlich sein.

### **DEDD, ein neuartiges DED-Protein**

Caspase-8 ist nur ein Beispiel für ein DED-Protein, das eine essentielle Rolle im Rahmen der Apoptosesignaltransduktion spielt. Aufgrund der stetig wachsenden Bedeutung der DED-Proteinfamilie wurde nach neuartigen Mitgliedern gesucht, die potentielle Effektorfunktionen während Apoptose übernehmen können. Mit DEDD konnte in einer Datenbanksuche ein solches Molekül gefunden werden. Es ist durch eine Multidomänenstruktur gekennzeichnet: Es verfügt über eine N-terminale DED, zwei Kernlokalisierungssignale, eine Prolin-reiche Region sowie über einen am C-Terminus lokalisierten Homologiebereich zu DNA-bindenden Proteinen.

### **DEDD besitzt eine funktionelle DED**

Überexpression von DED-Proteinen resultiert oftmals in Apoptoseinduktion. Dabei aggregieren DED-Proteine über DED-DED-Wechselwirkungen, welche zur Aktivierung von Caspasen führen (Siegel et al., 1998). DEDD induziert schwach Apoptose, während die Deletionsmutante N-DEDD, der die C-terminale Domäne mit Homologie zu DNA-bindenden Proteinen fehlt, deutlich effektiver Apoptose auslöste. Darüber hinaus konnte N-DEDD, nicht aber DEDD-vermittelte Apoptose durch Kotransfektion von FADD

synergistisch verstärkt werden. Diese Daten zeigen, daß der C-Terminus offensichtlich die Bindung anderer DED-Proteinen durch Maskierung der DED verhindert und somit anti-apoptotisch wirkt. FADD konnte darüber hinaus als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden. Diese FADD/DEDD-Interaktion wurde durch eine *in vivo*-Immunpräzipitation bestätigt, in dem gezeigt werden konnte, daß FADD, nicht aber Caspase-8, stimulationsabhängig mit DEDD im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose interagiert.

### **DEDD ist ein hochkonserviertes, DNA-bindendes Protein**

Humanes und murines DEDD sind auf Proteinebene nahezu identisch (98,7% Identität). Dieser hohe Grad an Konservierung beschränkt sich nicht auf einzelnen Domänen, sondern erstreckt sich über das gesamte Molekül. Andere DED-Proteine, wie Caspase-8 oder FADD, zeigen eine deutlich geringere Homologie zwischen Mensch und Maus, und insbesondere die DED dieser Proteine sind nur zu etwa 70-80% identisch (70,7% Identität für die erste DED von Caspase-8; 81,8% Identität für die DED von FADD). Proteine, die Schlüsselfunktionen in der Zelle übernehmen, zeichnen sich durch eine starke evolutionäre Konservierung aus. Solche Proteine finden sich in der Atmungskette (z.B. Cytochrom c, 91,3% Identität; Cytochrom c-Oxidase (Untereinheit I), 90,4%), in Ribosomen (z.B. L7, 95,9%; L12, 98,8%; L18, 90,4%; L19, 99,5%; L28, 97,8%; S2, 98,2%; S16, 97,3%) oder unter den Histonen (H3, 100%; H4, 100%). Die hohe Homologie von DEDD legt den Schluß nahe, daß es neben seiner Funktion als Signalmolekül im Rahmen der Apoptosesignaltransduktion weitere elementare Aufgaben übernimmt, die eine derart hohe Konservierung nötig machen. Diese Aufgaben scheinen für alle Zellen wichtig zu sein, da DEDD ubiquitär auf mRNA- und Proteinebene exprimiert ist.

DEDD verfügt über zwei Kernlokalisierungssignale sowie über eine Sequenzhomologie zu SAR-bindenden Proteinen und Histonen. Wie aufgrund dieser Eigenschaften erwartet, bindet DEDD DNA mit sehr hoher Affinität und ohne jegliche Sequenzspezifität. Dabei werden hochmolekulare Protein/DNA-Komplexe gebildet. Diese Komplexbildung legt den Schluß nahe, daß DEDD entweder mehrere DNA-Moleküle miteinander vernetzt und so über mehr als eine DNA-bindende Domäne verfügt, oder daß DNA eine Aggregation von DEDD-Molekülen induziert.

### **DEDD beinhaltet Kernlokalisierungssignale und transloziert in den Nukleolus**

Zwei putative NLS, ein klassisches Hexapeptidmotiv sowie ein Bipartite-Motiv, wurden in der Primärsequenz von DEDD identifiziert. Eine Vielzahl von Proteinen, darunter vor allem Transkriptionsfaktoren, besitzt zwei NLS, wie bestimmte HMG-Box-Proteine (z.B. SRY oder SOX9; Sudbeck und Scherer, 1997) oder die Familie der Krüppel-ähnlichen Faktoren (Shields und Yang, 1997). Einige Proteine besitzen sogar multiple NLS,

wie die Östrogen- und Progesteronrezeptoren (Ylikomi et al., 1992). Wie bei DEDD potenziert oder komplementiert eine NLS die Funktion der anderen. Durch Überexpression der Deletionsmutanten N-DEDD und C-DEDD konnte gezeigt werden, daß NLS2 für die Kernlokalisierung, NLS1 für die nukleolare Lokalisation von DEDD mitverantwortlich zu sein scheint. Durch weiterführende Experimente konnte kürzlich eine weitere NLS (NLS3) identifiziert werden, die aus drei basischen Aminosäuren besteht (Aminosäuren 5-7; KRR) (Olaf Schickling, persönliche Mitteilung). Diese NLS scheint maßgeblich für die nukleolare Lokalisation von DEDD verantwortlich zu sein. Während eine Doppelmutante, in der NLS1 und NLS2 mutiert und damit inaktiviert wurden, zu einem großen Anteil nukleoplasmatisch und nukleolar lokalisiert war, zeigte eine Trippelmutante (DEDD NLS1-3) eine rein zytoplasmatische Verteilung (Olaf Schickling, persönliche Mitteilung). Diese Daten unterstreichen, daß DEDD in der Tat ein nukleares Effektorprotein ist, das im Gegensatz zu anderen Kern-lokalisierten Apoptosesignalmolekülen mit eher schwachen Kernlokalisierungssequenzen, wie z.B. Caspase-1, Caspase-2 oder Caspase-9 (Mao et al., 1998; Colussi et al., 1998; Krajewski et al., 1999) über drei funktionelle und starke NLS verfügt.

### **DEDD inhibiert die Transkription ribosomaler DNA**

Die nukleolare Lokalisation von DEDD legte den Schluß nahe, daß DEDD wichtige nukleolare Funktionen moduliert und so mit der Biosynthese von Ribosomen interferiert. Im Nukleolus findet die Transkription, Modifikation, Prozessierung und die Assemblierung von prä-rRNA statt, die letztlich im Zytoplasma als wichtige Komponenten für Ribosomen dienen. Der Nukleolus stellt somit ein Organell dar, dessen Aktivität durch apoptotische Effektormechanismen bevorzugt moduliert werden könnte, da die Inhibition der o.g. nukleolaren Prozesse die Bildung von Ribosomen und damit die zelluläre Biosynthese inhibieren würde. Eine Vielzahl von Caspasensubstraten sind Proteine, die wichtige Funktionen im Rahmen der biosynthetischen Aktivität einer Zelle besitzen, wie z.B. DNA-Replikation, Transkription, RNA-Prozessierung und Translation. So wird RF-C140, ein wichtiger Bestandteil der DNA-Replikationsmaschinerie Caspase-3-vermittelt gespalten (Rheaume et al., 1997; Song et al., 1997; Ubeda und Habener, 1997) und führt während CD95-vermittelter Apoptose zu Zellzyklusarrest. Komponenten der Proteinsynthesemaschinerie werden ebenso Caspasen-vermittelt gespalten. Kurz nach Apoptoseinduktion über das CD95-System desintegrieren die Polysomen und verlieren ihre biosynthetische Aktivität (Zhou et al., 1998). Darüber hinaus wird die 28S rRNA in Ribosomen spezifisch degradiert, woraufhin die Ribosomen inaktiviert werden (Houge et al., 1995). Eine weitere Studie zeigte, daß nukleolares UBF, ein wichtiger regulatorischer Faktor der rDNA-Transkription, nach Induktion von Apoptose mit Hilfe von anti-CD95-Antikörpern proteolytisch gespalten wird (Casiano und Tan, 1996; Casiano et al., 1996,

1998). Inhibition der rDNA-Transkription ist somit ein wichtiger Schritt im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose.

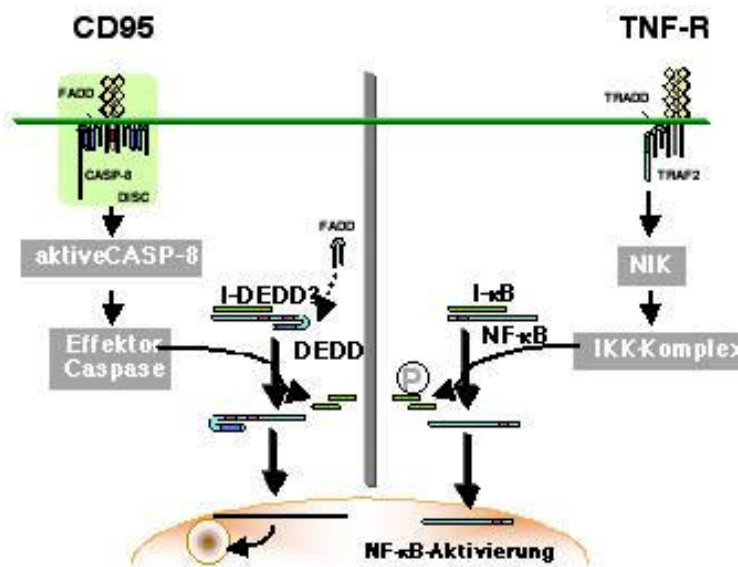
Es wurde daher der Effekt von rekombinantem DEDD auf die Pol I-vermittelte Transkription eines ribosomalen Chromatintemplates bestimmt. Das dabei verwendete *in vitro*-Transkriptionssystem bestand aus einem artifiziellen ribosomalen Minigen, das zu Chromatin assembliert wurde, sowie aus rekombinanter Pol I, Pol I-spezifischen Transkriptionsinitiationsfaktoren und dem ebenfalls Pol I-spezifischen Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I (Längst et al., 1997, 1998). Bereits geringe Mengen an rekombinantem DEDD inhibierten die rDNA-Transkription, während FADD in 24fachem Überschuß keinen Effekt zeigte. Ob diese Transkriptionshemmung spezifisch für rDNA ist, ist ebenso ungeklärt wie die Frage, ob DEDD auch *in vivo* Transkription reprimieren kann. Weiterführende Experimente, die den Effekt von DEDD auf die Transkription von rDNA *in vivo* z.B. durch die Quantifizierung naszierender prä-rRNA-Ketten in stabilen oder transisienten DEDD-Transfektanten analysieren, können hier Aufschluß geben.

### **Ein Modell für die Translokation von DEDD in den Kern**

Überexpression von DEDD induzierte schwach Apoptose, wahrscheinlich durch Aggregation mit FADD und/oder Caspase-8 und nachfolgender Caspasenaktivierung. Im Gegensatz zu Caspase-8 oder FADD konnte DEDD nicht im CD95-DISC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so daß es eine Funktion unterhalb dieser Rezeptor-proximalen Ereignisse haben muß. Überexprimiertes DEDD wurde ausschließlich in der Kernfraktion gefunden, während endogenes DEDD zytoplasmatisch lokalisiert war. Die Translokation in den Kern ließ sich durch die Inhibition von Caspasen durch CrmA oder zVAD-fmk blockieren, so daß eine Caspasenaktivität für diesen Prozeß verantwortlich zu sein scheint. Aufgrund dieser Daten kann folgendes Modell für die Translokation von DEDD formuliert werden (Abbildung 41):

In nicht-apoptotischen Zellen befindet sich DEDD im Zytoplasma. DEDD ist mit einem Inhibitor (I-DEDD) assoziiert, der den C-Terminus von DEDD bindet und somit NLS2 maskiert. Nach Apoptoseinduktion wird die Caspasenkaskade induziert und führt zur Spaltung des Inhibitors I-DEDD, der daraufhin inaktiviert wird und/oder seine Bindung an DEDD verliert. DEDD wird freigesetzt und kann in den Kern translozieren. Welche Rolle die DEDD/FADD-Assoziation für die Translokation spielt, muß noch geklärt werden.





**Abbildung 41. Translokationsmechanismus von DEDD (links) im Vergleich zur Translokation von NF-κB (rechts).** Während CD95-vermittelter Apoptose spaltet eine Caspase den postulierten Inhibitor von DEDD, I-DEDD, der daraufhin von DEDD dissoziiert und die Translokation von DEDD in den Kern ermöglicht. Nach TNF-Stimulation und Aktivierung von NIK und IKK wird I-κB phosphoryliert und damit degradiert. NF-κB kann nach Dissoziation seines Inhibitors I-κB in den Kern translozieren. NIK, NF-κB-inducing kinase; IKK, I-κB kinase.

jedoch nicht auf proteolytischen, sondern auf Phosphorylierungsprozessen beruht. Stimulation von TNF-RI durch TNF führt zur Rekrutierung von TRADD und nachfolgend von TRAF2, das die Kinase NIK („NF-κB-inducing Kinase“) bindet und aktiviert. NIK aktiviert ihrerseits den IKK („I-κB-Kinase“)-Komplex, der I-κB phosphoryliert. I-κB dissoziiert von NF-κB und wird durch das 26S-Proteasom degradiert. NF-κB kann nun in den Kern translozieren und dort die Transkription einer Vielzahl von Genen induzieren (Wallach et al., 1999).

Die Identifizierung von DEDD und die Postulierung eines I-CAD-ähnlichen Inhibitors legt nahe, daß es sich hierbei um ein System translozierender Proteine handelt, das ein für die Apoptosesignaltransduktion generelles Prinzip repräsentiert und in ähnlicher Form auch im Rahmen anderer Signalkaskaden zu finden ist. DEDD ist somit ein Molekül, das Signalereignisse in den Kern übermittelt, indem es als Verbindungsglied zwischen der auf Rezeptorebene initiierten Caspasenkaskade und Effektormechanismen im Kern fungiert.

Dieses Konzept eines Caspasen-spaltbaren Inhibitors wurde erstmalig von Enari et al., 1998 und Sakahira et al., 1998 postuliert. Die Endonuklease CAD liegt im Zytoplasma mit ihrem Inhibitor I-CAD komplexiert vor. I-CAD wird nach Apoptoseinduktion durch Caspase-3 gespalten, dissoziiert von CAD, das daraufhin in den Kern transloziert und DNA endonukleolytisch degradiert. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die Translokation von NF-κB beschrieben, der

## V. Literaturverzeichnis

- Adachi S, Cross AR, Babior BM, Gottlieb RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:21878-82.
- Andrä K, Lassmann H, Bittner R, Shorny S, Fassler R, Propst F, Wiche G. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* 1997;11:3143-56.
- Andrä K, Nikolic B, Stocher M, Drenckhahn D, Wiche G. Not just scaffolding: plectin regulates actin dynamics in cultured cells. *Genes Dev.* 1998;12:3442-51.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305-8.
- Azuma T, Kohts K, Flanagan L, Kwiatkowski D. Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. *J Biol Chem.* 2000;275:3761-6.
- Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1172-6.
- Bertini E, Bosman C, Bevilacqua M, Ricci E, Gagliardi GM, Parisi F, Servidei S, Dionisi-Vici C, Ballerini L. Cardiomyopathy and multicore myopathy with accumulation of intermediate filaments. *Eur J Pediatr.* 1990;149:856-8.
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 1996;396:189-95.
- Bird PI. Serpins and regulation of cell death. *Results Probl Cell Differ.* 1998;24:63-89.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;24:1513-23.
- Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grutter MG. The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des.* 1999;7:1125-33.
- Boesen-de Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 1999;274:14255-61.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996;85:803-15.
- Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem.* 1996;67:2484-93.
- Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* 1995;14:5179-90.
- Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclohier H, Reed JC, Kroemer G. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene.* 2000;19:329-36.
- Brown SB, Bailey K, Savill J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J.* 1997;323: 233-7.

- Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*. 1995;373:441-4.
- Casiano CA, Tan EM. Antinuclear autoantibodies: probes for defining proteolytic events associated with apoptosis. *Mol Biol Rep*. 1996;23:211-6.
- Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1996 1;184:765-70.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;138:1379-94.
- Cecconi F. Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ*. 1999;6:1087-98.
- Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem*. 1998;273(18):10815-8.
- Chavanas S, Pulkkinen L, Gache Y, Smith FJ, McLean WH, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G. A homozygous nonsense mutation in the PLEC1 gene in patients with epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 1996;98:2196-200.
- Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T. Activation of actin-cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 1996;56:5224-9.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994;263:1759-62.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995;81:505-12.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*. 1997;275:1122-6.
- Colussi PA, Harvey NL, Kumar S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem*. 1998;273:24535-42.
- Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotidetranslocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*. 1998;258:729-35.
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993;67:2168-74.
- Debatin KM, Goldmann CK, Bamford R, Waldmann TA, Krammer PH. Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukemia. *Lancet*. 1990;335:497-500.
- Debatin KM, Krammer PH. Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a Bcl-2 independent anti-apoptotic program. *Leukemia*. 1995;9:815-20.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;144:891-901.
- Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol*. 1992;149:3166-73.
- Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res*. 1999;59:5386-91.

- Drake CG, Kotzin BL. Genetic and immunological mechanisms in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol.* 1992;4:733-40
- Drappa J, Brot N, Elkon KB. The Fas protein is expressed at high levels on CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:10340-4.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997;57:1835-1840
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999;6:1081-6.
- Elkon KB. Apoptosis in SLE - too little or too much? *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12:553-9.
- Elliott CE, Becker B, Oehler S, Castanon MJ, Hauptmann R, Wiche G. Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics.* 1997;42:115-25.
- Enari M, Hase A, Nagata S. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J.* 1995;14:5201-8.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391:43-50.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol.* 1998;143:217-24.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 2000;20:929-35.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 1998;281:1317-22.
- Farrah T, Smith CA. Emerging cytokine family. *Nature.* 1992;358:26.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:7464-9.
- Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 1995;81:935-46.
- Foisner R, Leichtfried FE, Herrmann H, Small JV, Lawson D, Wiche G. Cytoskeleton-associated plectin: in situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. *J Cell Biol.* 1988;106:723-33.
- Foisner R, Wiche G. Intermediate filament-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1991;3:75-81.
- Foisner R, Traub P, Wiche G. Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:3812-6.
- Foisner R, Bohn W, Mannweiler K, Wiche G. Distribution and ultrastructure of plectin arrays in subclones of rat glioma C6 cells differing in intermediate filament protein (vimentin) expression. *J Struct Biol.* 1995;115:304-17.
- Fraser AG, James C, Evan GI, Hengartner MO. *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol.* 1999;9:292-301.
- Fuchs E, Yang Y. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell.* 1999;98:547-50.

- Gache Y, Chavanas S, Lacour JP, Wiche G, Owaribe K, Meneguzzi G, Ortonne JP. Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 1996;97:2289-98.
- Gallagher PJ, Stull JT. Localization of an actin binding domain in smooth muscle myosin light chain kinase. *Mol Cell Biochem.* 1997;173:51-7.
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med.* 1995;182:1223-30.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem.* 1998;273:32608-13.
- Geng YJ, Azuma T, Tang JX, Hartwig JH, Muszynski M, Wu Q, Libby P, Kwiatkowski DJ. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol.* 1998;7:294-302.
- Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem.* 1997;272:19641-4.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995;270:1189-92.
- Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* 1996;5:7-16.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while Bcl-x<sub>L</sub> prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* 1999;274:1156-63.
- Gulbins E, Coggeshall KM, Brenner B, Schlottmann K, Linderkamp O, Lang F. Fas-induced apoptosis is mediated by activation of a Ras and Rac protein-regulated signaling pathway. *J Biol Chem.* 1996;271:26389-94.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science.* 1996;274:1363-6.
- Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol.* 1998;8:537-40.
- Hall A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science.* 1998;280:2074-5.
- Hamazaki K, Gochi A, Matsubara N, Mori M, Orita K. Expression of Fas antigen and Bcl-2 protein in hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama.* 1995;49:227-30.
- Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, Hood L. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and Bcl-x<sub>L</sub> and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:11333-8.
- Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara N, Matsuzawa A, Nishimura Y, Kobayashi Y, Yonehara S, Yagita H, Okumura K. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:4930-4.
- Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ. Phosphorylation and inactivation of Bad by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell.* 1999;3:413-22.
- Hay BA, Wolff T, Rubin GM. Expression of baculovirus p35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development.* 1994;120:2121-9.

- Hijkata T, Murakami T, Imamura M, Fujimaki N, Ishikawa H. Plectin is a linker of intermediate filaments to Z-discs in skeletal muscle fibers. *J Cell Sci.* 1999;112:867-76.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1994;19:1354-9.
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:17255-7.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-x<sub>L</sub> interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4386-91.
- Huang, B, Eberstadt, M, Olejniczak, ET, Meadows, RP, Fesik, SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature.* 1996;384:638-41.
- Hughes DP, Crispe IN. A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J Exp Med.* 1995;182:1395-401.
- Houge G, Robaye B, Eikhom TS, Golstein J, Mellgren G, Gjertsen BT, Lanotte M, Doskeland SO. Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1995;15:2051-62.
- Huot J, Houle F, Rousseau S, Deschesnes RG, Shah GM, Landry J. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 1998;143:1361-73.
- Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10717-22.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997;388:190-5.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991;66:233-43.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* 1993;268:10932-7.
- Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of Bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol.* 1993;151:621-7.
- Izquierdo M, Grandien A, Criado LM, Robles S, Leonardo E, Albar JP, de Buitrago GG, Martinez-A C. Blocked negative selection of developing T cells in mice expressing the baculovirus p35 caspase inhibitor. *EMBO J.* 1999;18:156-66.
- Jäättelä M, Benedict M, Tewari M, Shayman JA, Dixit VM. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene.* 1995;10:2297-305.
- Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* 1995;373:444-8.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):4997-5002.
- Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med.* 1995;181:2029-36.

- Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2234-8.
- Kharbanda S, Pandey P, Yamauchi T, Kumar S, Kaneki M, Kumar V, Bharti A, Yuan ZM, Ghanem L, Rana A, Weichselbaum R, Johnson G, Kufe D. Activation of MEK kinase 1 by the c-Abl protein tyrosine kinase in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4979-89.
- Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Role for Bcl-x<sub>L</sub> as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:6939-42.
- Keller HU, Zimmermann A, Cottier H. Phorbol myristate acetate (PMA) suppresses polarization and locomotion and alters F-actin content of Walker carcinosarcoma cells. *Int J Cancer*. 1985;36:495-501.
- Keller HU, Zimmermann A. Shape changes and chemokinesis of Walker 256 carcinosarcoma cells in response to colchicine, vinblastine, nocodazole and taxol. *Invasion Metastasis*. 1986;6:33-43.
- Kerr, JFR, Wyllie, A H, Currie, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57
- Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, Bhalla K. Overexpression of Bcl-x<sub>L</sub> inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res*. 1997;57:3115-20.
- Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lim DS, de Souza-Pinto NC, Hansford R, Kastan MB, Lazebnik YA, Hardwick JM. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem*. 1999;274:21155-61.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14:5579-88.
- Kitsberg D, Formstecher E, Fauquet M, Kubes M, Cordier J, Canton B, Pan G, Rolli M, Glowinski J, Chneiweiss H. Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNFalpha-induced apoptosis. *J Neurosci*. 1999;19:8244-51.
- Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol*. 1993;5:625-30.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-6.
- Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon KB. Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38:1735-7.
- Kohama K, Ye LH, Hayakawa K, Okagaki T. Myosin light chain kinase: an actin-binding protein that regulates an ATP-dependent interaction with myosin. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:284-7.
- Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-classinhibition. *J Biol Chem*. 1994;269:19331-7.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe S, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997;278:294-8.
- Koya RC, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 2000;275:15343-9.

- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5752-7.
- Krebs JF, Armstrong RC, Srinivasan A, Aja T, Wong AM, Aboy A, Sayers R, Pham B, Vu T, Hoang K, Karanewsky DS, Leist C, Schmitz A, Wu JC, Tomaselli KJ, Fritz LC. Activation of membrane-associated procaspase-3 is regulated by Bcl-2. *J Cell Biol*. 1999;144:915-26.
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997;3:614-20
- Kroemer G. The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol* 1995;58:211-296
- Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem*. 1997;272:33197-203.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998;17:3247-59.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
- Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenstrom P, Bridges T, Chant J, Hall A. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*. 1996;87:519-29.
- Längst G, Becker PB, Grummt I. TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J*. 1998;17:3135-45.
- Längst G, Blank TA, Becker PB, Grummt I. RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *EMBO J*. 1997 17;16:760-8.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Exp Med* 1997;185:1481-1486
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489
- Li R. Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1997;136:649-58.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:2514-26.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94:491-501.
- Liu CG, Maercker C, Castanon MJ, Hauptmann R, Wiche G. Human plectin: organization of the gene, sequence analysis, and chromosome localization (8q24). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996a;93:4278-83.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996b;86:147-57.
- Liu QA, Hengartner MO. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:92-104.
- Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer PH, Fiers W, Schulze-Osthoff K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature*. 1995;375:81-3.
- Luger K, Richmond TJ. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:140-6.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94:481-90.



- Magliocco AM, Mitchell LB, Brownell AK, Lester WM. Dilated cardiomyopathy in multicore myopathy. *Am J Cardiol.* 1989;63:150-1.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol.* 1998;140:1485-95.
- Mao PL, Jiang Y, Wee BY, Porter AG. Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. *J Biol Chem.* 1998;273:23621-4.
- Mariani SM, Matiba B, Baumler C, Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol.* 1995; 25:2303-7.
- Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem.* 1998;273:4345-9.
- Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995;82:349-52.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995;182:1545-56.
- Martinon F, Holler N, Richard C, Tschopp J. Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett.* 2000;468:134-6.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 1998;281:2027-31.
- Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene.* 1997;14:1007-12.
- Mashima T, Naito M, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene.* 1999;18:2423-30.
- Matsumoto Y, Shinzato T, Amano I, Takai I, Kimura Y, Morita H, Miwa M, Nakane K, Yoshikai Y, Maeda K. Relationship between susceptibility to apoptosis and Fas expression in peripheral blood T cells from uremic patients: a possible mechanism for lymphopenia in chronic renal failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215:98-105.
- McCarthy MJ, Rubin LL, Philpott KL. Involvement of caspases in sympathetic neuron apoptosis. *J Cell Sci.* 1997;110:2165-73.
- McCloskey TW, Oyaizu N, Kaplan M, Pahwa S. Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Cytometry.* 1995;22:111-4.
- McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJ, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM, Uitto J. Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* 1996;10:1724-35.
- Medema JP, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME. Bcl-x<sub>L</sub> acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 1998;273:3388-93.
- Memon SA, Moreno MB, Petrak D, Zacharchuk CM. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol.* 1995;155:4644-52.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol.* 1998;140:627-36.

- Mittl PR, Di Marco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ, Grutter MG. Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethylketone. *J Biol Chem.* 1997;272:6539-47.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982;31:11-24.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-x<sub>L</sub>, an inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 1996;381:335-41.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 1996;85:817-27.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 1998;273:2926-30.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000;403:98-103.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14681-6.
- Natoli G, Ianni A, Costanzo A, De Petrillo G, Ilari I, Chirillo P, Balsano C, Levrero M. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene.* 1995;11:1157-64.
- Ng FW, Shore GC. Bcl-x<sub>L</sub> cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. *J Biol Chem.* 1998;273:3140-3.
- Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, Shore GC. p28Bap31, a Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub>- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1997;139:327-38.
- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6:1028-42.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139:271-9.
- Nigg EA. The nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 1989;1:435-40.
- Nikolic B, Mac Nulty E, Mir B, Wiche G. Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic plectin-vimentin network junctions. *J Cell Biol.* 1996;134:1455-67.
- Nishimura T, Akiyama H, Yonehara S, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Kosaka K. Fas antigen expression in brains of patients with Alzheimer-type dementia. *Brain Res.* 1995;695:137-45.
- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte-Hermann R. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *Hepatology.* 1993;18:1238-46.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med.* 1996;184:1075-82.
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 1992;267:10709-15.

- O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997;414:253-7.
- Ohtsu M, Sakai N, Fujita H, Kashiwagi M, Gasa S, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Sakiyama Y, Kobayashi K, Kuzumaki N. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J.* 1997;16:4650-6.
- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem.* 1996;271:16443-6.
- Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-x<sub>L</sub>, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.* 1998;273:5841-5.
- Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL, Marcineviciute A. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 1999;274:31734-9.
- Perlman H, Pagliari LJ, Georganas C, Mano T, Walsh K, Pope RM. FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med.* 1999;190:1679-88.
- Peter ME, Medema JP and Krammer PH. Does the *Caenorhabditis elegans* Protein CED-4 Contain a Region of Homology to the Mammalian Death Effector Domain? *Cell Death and Different.* 1997;4:523-525.
- Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F, Krammer PH. The death receptors. *Results Probl Cell Differ.* 1999;23:25-63.
- Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12736-7.
- Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CG, Medema JP, Debatin KM, Krammer PH. 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.* 1997;27:1207-12.
- Pitzer F, Dantes A, Fuchs T, Baumeister W, Amsterdam A. Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. *FEBS Lett.* 1996;394:47-50.
- Prasad SC, Thraves PJ, Dritschilo A, Kuettel MR. Protein expression changes associated with radiation-induced neoplastic progression of human prostate epithelial cells. *Electrophoresis.* 1997;18:629-37.
- Pulkkinen L, Smith FJ, Shimizu H, Murata S, Yaoita H, Hachisuka H, Nishikawa T, McLean WH, Uitto J. Homozygous deletion mutations in the plectin gene (PLEC1) in patients with epidermolysis bullosa simplex associated with late-onset muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1996;5:1539-46.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999;3:287-96.
- Pytela R, Wiche G. High molecular weight polypeptides (270,000-340,000) from cultured cells are related to hog brain microtubule-associated proteins but copurify with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:4808-12.
- Rao JY, Jin YS, Zheng Q, Cheng J, Tai J, Hemstreet GP 3rd. Alterations of the actin polymerization status as an apoptotic morphological effector in HL-60 cells. *J Cell Biochem.* 1999;75:686-97.
- Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.* 1996;135:1441-55.
- Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW. 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.* 1998;5:271-88.
- Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature.* 1995;376:181-4.
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell.* 1992;69:597-604.
- Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity.* 1998;8:615-23.
- Reipert S, Steinbock F, Fischer I, Bittner RE, Zeold A, Wiche G. Association of mitochondria with plectin and desmin intermediate filaments in striated muscle. *Exp Cell Res.* 1999;252:479-91.
- Renz A. and Fackelmayer F.O. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucl. Acids Res.* 1996; 24:43-849.
- Rheaume E, Cohen LY, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sekaly RP, Denis F. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 *in vitro* and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 1997;1:6346-54.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995;268:1347-9.
- Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity.* 1994;17:271-8.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol.* 1996;3:619-25.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997;16:6914-25.
- Ruhrberg C, Watt FM. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7:392-7.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature.* 1999;401:168-73.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998;391:96-9.
- Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem.* 1997;272:26953-8.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675-87.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:1541-8.
- Scaffidi C, Volkland J, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME. Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol.* 2000;164:1236-42.
- Schattner EJ, Elkon KB, Yoo DH, Tumang J, Krammer PH, Crow MK, Friedman SM. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med.* 1995;182:1557-65.

- Schröder R, Furst DO, Klasen C, Reimann J, Herrmann H, van der Ven PF. Association of plectin with Z-discs is a prerequisite for the formation of the intermyofibrillar desmin cytoskeleton. *Lab Invest.* 2000;80:455-64.
- Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PH. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol.* 1994;127:15-20.
- Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, Ambrose DM, Bokoch GM, Chernoff J. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol.* 1997;7:202-10.
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, Brancolini C. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 *in vitro*: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999;112:4475-82.
- Shields JM and Yang VW Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Krüppel-like factor define a subfamily of closely related Krüppel proteins. *J Biol Chem.* 1997;272:18504-18507.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999;399:483-7.
- Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity.* 1997;6:751-63.
- Siegel RM, Martin DA, Zheng L, Ng SY, Bertin J, Cohen J, Lenardo MJ. Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol.* 1998;141:1243-53.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999;144:281-92.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 1994;76:959-62.
- Smith FJ, Eady RA, Leigh IM, McMillan JR, Rugg EL, Kelsell DP, Bryant SP, Spurr NK, Geddes JF, Kirtschig G, Milana G, de Bono AG, Owaribe K, Wiche G, Pulkkinen L, Uitto J, McLean WH, Lane EB. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nat Genet.* 1996;13:450-7.
- Song Q, Lu H, Zhang N, Luckow B, Shah G, Poirier G, Lavin M. Specific cleavage of the large subunit of replication factor C in apoptosis is mediated by CPP32-like protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;233:343-348.
- Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt R Jr, Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ. Bcl-x<sub>L</sub> functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1998;273:4523-9.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:18542-5.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998;1:949-57.
- Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4<sup>+</sup> T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1994;152:1127-33.
- Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem.* 1998;273:27084-90.
- Steinberg AD. Systemic lupus erythematosus: theories of pathogenesis and approach to therapy. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;72:171-6.

- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med*. 1996;2:1361-6.
- Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J*. 1995;14:6136-47.
- Stricker K, Knipping E, Bohler T, Benner A, Krammer PH, Debatin KM. Anti-CD95 (APO-1/Fas) autoantibodies and T cell depletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children. *Cell Death Differ*. 1998;5:222-30.
- Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, Chamberlain CE, Chuang TH, Chu K, Bokoch GM, Hahn KM. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem*. 2000;275:9725-33.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993;75:1169-78.
- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*. 1995;154:3806-13.
- Sudbeck P, Scherer G. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272:27848-52.
- Sulston J, Du Z, Thomas K, Wilson R, Hillier L, Staden R, Halloran N, Green P, Thierry-Mieg J, Qiu L, et al. The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature*. 1992;356:37-41
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366:151-65.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999a;397:441-6.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*. 1999b;189:381-94.
- Svitkina TM, Verkhovskiy AB, Borisy GG. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1996;135:991-1007.
- Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8395-400.
- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*. 1998;273:7787-90.
- Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol*. 1994;6:1567-74.
- Tan X, Wang JY. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol*. 1998;8:116-20.
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 1995;14:1129-35.
- Tartaglia, LA, Ayres, TM, Wong, GH, Goeddel, DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993;74:845-53.
- Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*. 2000;6:529-35.

- Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem.* 1995;270:3255-60.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997;386:517-21.
- Thompson CB Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462
- Thornberry NA. Inflammation. Key mediator takes shape. *Nature.* 1994;370:251-2.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:17907-11.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281:1312-6.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989;245:301-5.
- Trump DL, Ettinger DS, Feldman MJ, Dragon LH. 'Sarcoidosis' and sarcoid-like lesions. Their occurrence after cytotoxic and radiation therapy of testis cancer. *Arch Intern Med.* 1981;141:37-8.
- Ubeda M, Habener JF. The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:19562-8.
- Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci.* 1998;23:159-62.
- Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:10170-5.
- Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol.* 1999;1:E209-E216.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-x<sub>L</sub> prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell.* 1999;3:159-67.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. 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.* 1998;9:267-76.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenaabee P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *Exp Med* 1998;187:1477-1485
- Vignaux F, Vivier E, Malissen B, Depraetere V, Nagata S, Golstein P. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med.* 1995;181:781-6.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell.* 1994;78:343-52.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:331-67.
- Wang J, Lobito AA, Shen F, Hornung F, Winoto A, Lenardo MJ. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol.* 2000;30:155-63.
- Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, Klip A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol.* 1999;19:4008-18.

- Watanabe H, Kanbe K, Shinozaki T, Hoshino H, Chigira M. Apoptosis of a fibrosarcoma induced by protein-free culture involves DNA cleavage to large fragments but not internucleosomal fragmentation. *Int J Cancer*. 1995; 62:191-8.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol*. 1992b;148:1274-9.
- Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD. The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*. 1999;7:1135-43.
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 1995;375:497-500.
- Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, Der CJ. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol*. 1997;17:1324-35.
- Whisstock J, Lesk AM, Carrell R. Modeling of serpin-protease complexes: antithrombin-thrombin, alpha 1-antitrypsin (358Met-->Arg)-thrombin, alpha 1-antitrypsin (358Met-->Arg)-trypsin, and antitrypsin-elastase. *Proteins*. 1996;26:288-303.
- White K, Tahaoglu E, Steller H. Cell killing by the Drosophila gene reaper. *Science*. 1996;271:805-7.
- Wiche G, Herrmann H, Leichtfried F, Pytela R. Plectin: a high-molecular-weight cytoskeletal polypeptide component that copurifies with intermediate filaments of the vimentin type. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1982;46:475-82.
- Wiche G, Baker MA. Cytoplasmic network arrays demonstrated by immunolocalization using antibodies to a high molecular weight protein present in cytoskeletal preparations from cultured cells. *Exp Cell Res*. 1982;138:15-29.
- Wiche G, Briones E, Koszka C, Artlieb U, Krepler R. Widespread occurrence of polypeptides related to neurotubule-associated proteins (MAP-1 and MAP-2) in non-neuronal cells and tissues. *EMBO J*. 1984;3:991-8.
- Wiche G, Becker B, Lubber K, Weitzer G, Castanon MJ, Hauptmann R, Stratowa C, Stewart M. Cloning and sequencing of rat plectin indicates a 466-kD polypeptide chain with a three-domain structure based on a central alpha-helical coiled coil. *J Cell Biol*. 1991;114:83-99.
- Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci*. 1998;111:2477-86.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 1994;370:270-5.
- Wright ME, Han DK, Carter L, Fields S, Schwartz SM, Hockenbery DM. Caspase-3 inhibits growth in *Saccharomyces cerevisiae* without causing cell death. *FEBS Lett*. 1999;446:9-14.
- Xerri L, Carbuccia N, Parc P, Hassoun J, Birg F. Frequent expression of FAS/APO-1 in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphomas. *Histopathology*. 1995;27:235-41.
- Xue D, Horvitz HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*. 1995;377:248-51.
- Xue D, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature*. 1997 Nov 20;390:305-8.
- Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A, Stern D. An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1997;389:689-95.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132
- Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*. 1996 Jul 15;88:386-401.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990;250:279-82.



- 
- Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*. 2000;12:633-42.
- Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J*. 1992; 11:3681-3694.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J Exp Med*. 1995;18:1661-72.
- Zauner W, Kratz J, Staunton J, Feick P, Wiche G. Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur J Cell Biol*. 1992;57:66-74.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x. *Cell*. 1996;87:619-28.
- Zhang J, Reedy MC, Hannun YA, Obeid LM. Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;145:99-108.
- Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Godzik A, Reed JC. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2597-602.
- Zhivotovsky B, Gahn A, Orrenius S. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;233:96-101.
- Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1998;95:6785-6790.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90:405-413.

## VI. Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
AICD	Aktivierungs-Induzierter Zelltod
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ALPS	Analog des <i>lpr</i> -Syndroms beim Menschen, Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BH	Bcl-2-Homologiedomäne
BSA	Rinderserumalbumin
c-FLIP	" <b>c</b> ellular <b>FLI</b> CE-inhibitory <b>P</b> rotein"
CD	" <b>C</b> luster of <b>D</b> ifferentiation"
CED	" <b>C. elegans D</b> eath Gene"
Ci	Curie
crmA	" <b>C</b> ytokine <b>R</b> esponse <b>M</b> odifier <b>A</b> "
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
	mitochondriales Transmembranpotential
ECL	" <b>E</b> nhanced <b>C</b> hemol <b>u</b> minescence"
ELISA	" <b>E</b> nzyme- <b>L</b> inked <b>I</b> mmunoabsorbant <b>A</b> ssay"
FADD	" <b>F</b> as- <b>A</b> ssociated <b>D</b> eath <b>D</b> omain Protein"
FKS	fötales Kälberserum
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
ICE	Interleukin-1-konvertierendes Enzym
IgG	Immunglobulin Typ G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lpr	" <b>l</b> ympho <b>p</b> roliferation"
lpr <sup>cg</sup>	" <b>l</b> ympho <b>p</b> roliferation <b>c</b> omplementing <b>g</b> ld"

---

pI	isoelektrischer Punkt
M	molar
mA	Miliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
p	Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
UpM	Umdrehungen pro Minute
v-FLIP	" <b>v</b> iral <b>FL</b> ICE-inhibitory <b>P</b> rotein"
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
z.B.	zum Beispiel

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

## VII. Publikationsliste

**Alexander H. Stegh**, Joerg Volkland, Ning Ke, John Reed and Marcus E. Peter (2000). Mitochondrial Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2 regulate cytoplasmic caspase-8 through BAR. Zur Publikation eingereicht.

**Alexander H. Stegh** (2000). Apoptotic effector mechanisms. *Futura*. In Druck.

**Alexander H. Stegh** and Marcus E. Peter (2001). Apoptosis and caspases, one does not depend on the other. *Cardiology Clinics*. In Druck.

**Alexander H. Stegh**, Harald Herrman, Dieter Weisenberger, Stefan Lampel, Kerstin Andrä, Martin Seper, Gerhard Wiche, Peter H. Krammer and Marcus E. Peter (2000). Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase-8 during TNF-R and CD95 mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. **20**:5665-5679.

**Alexander H. Stegh** (1999). Characterization of effector mechanisms during CD95 mediated apoptosis. *Futura*, **14**:155-157.

**Alexander H. Stegh**, Olaf Schickling, Andreas Ehret, Carsten Scaffidi, Christoph Peterhänsel, Thomas G. Hofmann, Ingrid Grummt, Peter H. Krammer and Marcus E. Peter (1998). DEDD, a novel DED containing protein that is targeted to the nucleolus. *EMBO J*. **20**: 5974-5986.

## Lebenslauf

Name:	Alexander Stegh
Geburtsdatum:	15. Mai 1973
Geburtsort:	Hürth-Hermülheim
1980 - 1984	Erich-Kästner-Grundschule in Erftstadt-Bliesheim
1984 - 1992	Besuch des Ville Gymnasiums in Erftstadt-Liblar
Juni 1992	<b>Abitur</b>
1992 - 1994	<b>Grundstudium der Biochemie</b> an der Universität Hannover
September 1994	<b>Vordiplom</b>
1994 - 1997	<b>Hauptstudium der Biochemie</b> an der Universität Hannover
1997	<b>Diplom-Biochemiker</b> Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland Abteilung für Tumorummunologie, Prof. Dr. Peter H. Krammer <i>Titel:</i> "Untersuchungen zur Aktivität von FLICE (Caspase-8) im Rahmen CD95-vermittelter Apoptose" Fächerkombination: Biochemie/Immunologie/ Biophysikalische Chemie
1997 -2000	<b>Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)</b> The Ben May Institute for Cancer Research and The Committee on Immunology The University of Chicago, USA, Prof. Dr. Marcus E. Peter Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland Abteilung für Tumorummunologie, Prof. Dr. Peter H. Krammer Universität Hannover und Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland