

Das zelluläre FLICE-inhibitorische Protein (c-FLIP): Mechanismen der Regulation CD95-vermittelter Apoptose in der T-Zell-Immunantwort

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biochemiker Andreas Krueger
geboren am 20.11.1973 in Alfeld (Leine)

2002

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

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

Tag der Promotion: 01.07.2002

*„... und alles, was man weiß, nicht
bloß rauschen und brausen gehört
hat, lässt sich in drei Worten sagen.“*

Kürnberger

Danksagung

Nach fast drei Jahren ist wieder einmal die Zeit für eine Danksagung in schriftlicher Form gekommen.

Zunächst möchte ich Marei nennen, die mich in dieser Zeit durch alle Hochs und Tiefs begleitet hat und mir immer unterstützend zur Seite stand. Auch meinen Eltern und Großeltern danke ich für ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Peter Krammer möchte ich für die Themenstellung und die intensive Betreuung dieser Arbeit danken. Ferner bin ich ihm dankbar für sein Vertrauen, mich mit zunehmend verantwortungsvolleren Aufgaben zu betrauen. Dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Der Erfolg dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die intensive Betreuung durch Dr. Sabine Kirchhoff.

Bedanken möchte ich mich für die teils sehr intensive Zusammenarbeit mit Dr. Ingo Schmitz, Sven Baumann, Christine Stumpf, Wolfgang Müller, Uschi Matiba, Dr. Devasis Chatterjee, Dr. Hannes Hentze, Dr. Sören Eichhorst, Marco Giaisi und Dr. Min Li-Weber. Besonders erwähnt sei Dr. Henning Schulze-Bergkamen, durch dessen Hände unzählige Liter Blut flossen.

Auch Katrin Kappes, Marc Matuszewska und Andrea Hinz seien bedankt. Sie haben mir gezeigt, dass Lehre Spaß macht. Ferner möchte ich mich beim gesamten Labor Krammer und insbesondere der T-Zell-Gruppe für die einmalige Arbeitsatmosphäre bedanken.

Schließlich soll auch die Vielzahl der freiwilligen Blutspender nicht unerwähnt bleiben, ohne die diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.

DANKE!

Zusammenfassung

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

Das CD95-vermittelte Todessignal wird nach Aktivierung des Rezeptors durch Anlagerung von cytosolischen Signalmolekülen übertragen. Durch Bindung des CD95-Liganden wird CD95 oligomerisiert, und es bildet sich ein Tod-induzierender Signalkomplex (engl.: DISC). Am DISC wird Procaspase-8 durch autoproteolytische Spaltung aktiviert. Dies ist der erste enzymatische Schritt der CD95-Signaltransduktion. Die Fähigkeit, einen DISC zu bilden, ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich. Typ I-Zellen bilden den DISC effizient, was zur Aktivierung großer Mengen von Procaspase-8 führt. Typ II-Zellen dagegen zeigen nur eine geringe DISC-Bildung. Aufgrund dieser geringen DISC-Bildung sind Typ II-Zellen von Mitochondrien als Verstärker des Apoptosesignals abhängig. Deshalb lässt sich CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen durch antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren. Ein weiterer Regulator CD95-vermittelter Apoptose ist c-FLIP, ein Protein, das an den CD95-DISC rekrutiert wird und dort die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert. C-FLIP existiert in zwei Splicevarianten, c-FLIP_S und c-FLIP_L.

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der Inhibition Todesrezeptor-vermittelter Apoptose der beiden Splicevarianten von c-FLIP analysiert. Es wurde gezeigt, dass c-FLIP_L und c-FLIP_S die autoproteolytische Spaltung und Aktivierung von Procaspase-8 auf verschiedenen Ebenen am DISC inhibieren. Dies führt zur Freisetzung unterschiedlicher Spaltprodukte von Caspase-8 und c-FLIP_L ins Cytosol.

Die Regulation Todesrezeptor-vermittelter Apoptose durch c-FLIP wird kontrovers diskutiert. Anhand eines *in vitro*-Modells der Aktivierung primärer humaner T-Zellen wurde der Mechanismus der IL-2-vermittelten Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, einem Haupteffektormechanismus des Aktivierungs-induzierten Zelltods, untersucht. Es wurde gezeigt, dass IL-2 den Wechsel vom CD95-Typ II- zum

CD95-Typ I-Signalweg induziert und zudem den mitochondrialen Apoptosesignalweg öffnet. Die Kombination dieser Effekte führt letztlich zur Sensitivierung primärer humaner T-Zellen gegenüber dem Aktivierungs-induzierten Zelltod, während c-FLIP innerhalb dieses Systems keine wesentliche Rolle zuzukommen scheint.

HTLV-1 war das erste humane Retrovirus, das mit der malignen Transformation von humanen Zellen assoziiert werden konnte. Für diese Transformation ist das Transaktivatorprotein Tax verantwortlich, das über die Aktivierung von Transkriptionfaktoren wie CREB/ATF oder NF- κ B wirkt. NF- κ B vermittelt Überlebenssignale in Zellen. Mit Hilfe eines induzierbaren Expressionssystems wurde gezeigt, dass Tax in stimulierten Jurkat-T-Zellen die Expression von c-FLIP induziert, was zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose führt. Die Induktion von Resistenz gegenüber Apoptose kann sowohl zur malignen Transformation als auch zum Überleben einer cytotoxischen Immunantwort führen. Somit stellt die Induktion von c-FLIP einen möglichen Mechanismus dar, der zur viralen Persistenz oder zur Transformation beiträgt.

Stichworte: Apoptose / CD95 / Signaltransduktion

Abstract

Apoptosis plays an important role in oncogenesis and tissue homeostasis of multicellular organisms. CD95 is a member of a family containing six receptors capable of directly inducing apoptosis, the so-called death receptors. CD95-mediated apoptosis is of critical importance for homeostasis of the immune system. Dysregulation of CD95-mediated apoptosis contributes to the pathophysiology of several diseases, such as autoimmune syndromes, cancer or AIDS.

The CD95-induced death signal is transduced by recruitment of cytosolic signaling molecules. Upon binding of CD95 ligand CD95 oligomerizes leading to formation of the death-inducing signaling complex (DISC). At the DISC autocatalytic cleavage leads to activation of pro-caspase-8. This is the first enzymatic step during CD95 signal transduction. The extent of DISC formation varies between different cell types. Type I cells are characterized by efficient DISC formation yielding high amounts of active caspase-8. In contrast, type II cells only form small amounts of DISC. These cells are dependent on mitochondria as amplifiers of the apoptotic signal. Therefore, CD95-mediated apoptosis can be inhibited by anti-apoptotic Bcl-2 family members in type II cells. Another regulator of CD95-mediated apoptosis is c-FLIP, which is recruited to the DISC where it inhibits the activation of pro-caspase-8. C-FLIP is expressed as two splice variants, c-FLIP_S and c-FLIP_L.

Here, the mechanisms underlying the inhibition of death receptor-mediated apoptosis by the two splice variants of c-FLIP were analyzed. It was shown that c-FLIP_L and c-FLIP_S block autoproteolytic cleavage and concomitant activation of pro-caspase-8 at different levels at the DISC leading to the release of different cleavage products of caspase-8 and c-FLIP_L into the cytosol.

The regulation of death receptor-mediated apoptosis by c-FLIP is controversially discussed. Using an *in vitro* model for the activation of primary human T cells the mechanism of IL-2-mediated sensitization towards CD95-mediated apoptosis was analyzed. The CD95 pathway is one of the major effectors of activation-induced cell death (AICD). It was shown that IL-2 induces a switch from the CD95 type II to the type I pathway in primary human T cells. In addition, it enables signal amplification via the mitochondrial apoptosis pathway by down-regulation of Bcl-x_L. The combination of both effects finally leads to sensitization of primary human T cells

towards AICD. It was shown that c-FLIP apparently does not play an essential role in this system.

HTLV-1 was the first human retrovirus to be associated with malignant transformation of human cells. This transformation is mediated by the transactivator protein Tax, which acts through the transcription factors CREB/ATF and NF- κ B. NF- κ B induces cellular survival signals. Using an inducible expression system, it was demonstrated that Tax induces the expression of c-FLIP in stimulated Jurkat T cells, leading to resistance towards CD95-mediated apoptosis. Induction of apoptosis resistance can lead to malignant transformation as well as to survival of a cytotoxic immune response. Thus, induction of c-FLIP by HTLV-1 Tax is a potential mechanism leading to viral persistence and malignant transformation.

key words: apoptosis / CD95 / signal transduction

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	7
Inhaltsverzeichnis	9
I. Einleitung.....	12
1. Apoptose - Der programmierte Zelltod.....	12
2. Todesrezeptoren.....	13
3. Die Signaltransduktion von CD95	15
3.1 Rezeptoraggregation als Stimulus	15
3.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex.....	16
3.3 Die Bcl-2 Familie.....	20
3.4 Die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose.....	21
3.5 Zwei CD95-Signalwege	26
3.6 Die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren.....	27
3.7 FLICE-inhibitorische Proteine (FLIP)	29
3.7.1 Virale FLIPs (v-FLIP)	29
3.7.2 Zelluläre FLIPs (c-FLIP)	30
3.7.3 Regulation der Expression von c-FLIP	32
3.7.4 Transkriptionelle Aktivierung durch c-FLIP.....	32
4. Die Rolle der Apoptose im Immunsystem.....	33
4.1 Die physiologische Rolle von c-FLIP im Immunsystem	35
5. Das Humane T-Zell-Leukämie Virus-1 (HTLV-1)	38
5.1 HTLV-1 Tax.....	40
6. Aufgabenstellung	42
II. Material und Methoden.....	43
1. Material.....	43
1.1 Chemikalien	43
1.2 Häufig verwendete Puffer	43
1.3 Biologisches Material.....	45
1.3.1 Bakterienstämme	45
1.3.2 Eukaryontische Zellen	46
1.4 Nährmedien.....	46
1.4.1 Medien für die Zellkultur	46
1.4.2 Medien für Bakterien.....	47
1.5 Antikörper.....	47
1.7 Molekularbiologische Materialien	49
1.7.1 Vektoren	49
1.7.2 Synthetische Oligonukleotide.....	50
1.7.3 Enzyme und Kits	50

1.8	Geräte.....	51
1.9	Software	52
2.	Methoden.....	53
2.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	53
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	53
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	53
2.2.2	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	55
2.2.3	Restriktionsspaltung von DNA	55
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....	56
2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel	56
2.2.6	Dephosphorylierung und Ligation von DNA	56
2.2.7	Transformation von Bakterien	57
2.2.8	Ortsgerichtete Mutagenese	58
2.3	Zellbiologische Methoden.....	59
2.3.1	Präparation primärer humaner T-Zellen	59
2.3.2	Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen	60
2.3.3	Messung proliferierender Zellen (CFSE).....	61
2.3.4	Messung apoptotischer Zellen (Nicoletti <i>et al.</i> , 1991).....	61
2.3.5	Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials	62
2.3.6	Transfektion von Zellen	62
2.3.7	Präparation von cytosolischen Extrakten	63
2.4	Proteinchemische Methoden.....	64
2.4.1	ELISA	64
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	65
2.4.3	Western Blot.....	65
2.4.4	Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....	66
2.4.5	Kopplung von Antikörpern an Sepharose.....	66
2.4.6	Immunpräzipitation	67
2.4.7	DISC-Analyse.....	67
2.4.8	<i>In vitro</i> -Caspase-8-Spaltung.....	68
III.	Ergebnisse	69
1.	Splicevarianten von c-FLIP inhibieren verschiedene Schritte der Caspase-8-Aktivierung am CD95-DISC.....	69
1.1	c-FLIP _S inhibiert Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in BJAB-Zellen	69
1.2	Vollständige Inhibition der Spaltung von Caspase-8 durch c-FLIP _S	72
1.3	Vollständige Inhibition der DISC-Aktivität durch c-FLIP _S	74
1.4	Der initiale Spaltungsschritt von Caspase-8 am DISC wird durch c-FLIP _L ermöglicht.....	75
1.5	c-FLIP _L und c-FLIP _S koexistieren in derselben DISC-Spezies	78
2.	Ein Interleukin (IL)-2-abhängiger Wechsel der CD95-Signalwege von Typ II nach Typ I sensitiviert primäre humane T-Zellen für den Aktivierungs-induzierten Zelltod	80
2.1	Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind resistente CD95-Typ II-Zellen	80

2.2	IL-2 sensitiviert primäre humane T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose	81
2.3	Charakterisierung des Aktivierungsstatus primärer T-Zellen in Abhängigkeit von IL-2.....	83
2.4	IL-2 beeinflusst nicht die Expression von bekannten Komponenten des CD95-DISC.....	85
2.5	IL-2 beeinflusst die DISC-Bildung und die Protektion der Mitochondrien	86
3.	Modulation CD95-vermittelter Apoptose durch das HTLV-1 Transaktivator Protein Tax in T-Zellen.....	90
3.1	HTLV-1 Tax inhibiert CD95-vermittelte Apoptose in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen	90
3.2	HTLV-1 Tax induziert die Expression von c-FLIP _S , c-FLIP _L und Bcl-x _L in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen	92
3.3	Tax-induziertes c-FLIP _S wird verstärkt an den CD95-DISC rekrutiert.....	94
3.4	Die Tax-induzierte Expression von c-FLIP führt zu einer Verringerung der Bid-Spaltung	95
IV.	Diskussion	97
1.	Splicevarianten von c-FLIP inhibieren verschiedene Schritte der Caspase-8-Aktivierung am CD95-DISC	97
2.	Ein Interleukin (IL)-2-abhängiger Wechsel der CD95-Signalwege von Typ II nach Typ I sensitiviert primäre humane T-Zellen für den Aktivierungs-induzierten Zelltod.....	101
3.	Modulation CD95-vermittelter Apoptose durch das HTLV-1 Transaktivator Protein Tax in T-Zellen	106
V.	Anhang	110
1.	Literatur	110
2.	Abkürzungen	142
3.	Publikationsverzeichnis	144
4.	Lebenslauf.....	146
5.	Erklärung	147

I. Einleitung

1. *Apoptose - Der programmierte Zelltod*

Bereits im zweiten nachchristlichen Jahrhundert hatte Galenus Galen die Regression von larvalen und fetalen Strukturen im Laufe der Ontogenese beschrieben (Barclay *et al.*, 1944; Clarke und Clarke, 1996). In der Mitte des letzten Jahrhunderts erkannte Carl Vogt, dass Zellen einen vorhersagbaren, „programmierten“ Tod sterben können (Vogt, 1842). 1951 konnte der Embryologe Glucksmann die Regression fetaler Strukturen auf den Tod einzelner Zellen zurückführen (Glucksmann, 1951). Kerr, Wyllie und Currie schließlich beobachteten an toxinbehandelten Leberzellen eine den sterbenden Embryonalzellen vergleichbare Morphologie und prägten hierfür den Begriff „Apoptose“ (Kerr *et al.*, 1972).

Schon bald wurde erkannt, dass Apoptose nicht nur in der Entwicklung von Bedeutung ist (Los *et al.*, 1999; Vaux und Korsmeyer, 1999). Eine besondere Rolle spielt sie bei der Erhaltung der Gewebshomöostase. Des Weiteren werden durch virale Infektion oder genomische Mutation geschädigte Zellen mittels Apoptose entfernt (Thompson, 1995).

Eine weitere Form des Zelltods bezeichnet man als Nekrose. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose durch die Aktivierung regulierter katabolischer Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen, charakterisiert. Apoptose ist unter anderem durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen definiert. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, welches im Bereich der nukleären Peripherie aggregiert. Bei den meisten Formen von Apoptose wird in den kondensierten Chromosomen die DNA durch spezielle Endonukleasen abgebaut, sodass sich nach Elektrophorese eine charakteristische „DNA-Leiter“ bildet (Wyllie *et al.*, 1980). Diese entsteht durch die internukleosomale Spaltung von DNA, die zur Entstehung von DNA-Stücken mit einer Länge von 200 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen davon führt. Ein Verlust der Membranstabilität führt zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose). Dies mündet schließlich im Abschnüren membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden.

Parallel dazu wird ein Verlust der Membranasymmetrie beobachtet, der zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Über dieses Merkmal werden die apoptotischen Körperchen von Makrophagen oder anderen benachbarten Zellen erkannt, aufgenommen und abgebaut (Savill *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu ist die Nekrose keinem geregelten Mechanismus zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren unterworfen. Nekrose ist durch ein Anschwellen der Zelle (Oncoose) charakterisiert, was zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Cytosols und von Zellorganellen in den interzellularen Raum führt. Eine inflammatorische Reaktion mit Gewebsschädigungen ist die Folge. Trotz der gegensätzlichen Charakteristika von Nekrose und Apoptose gibt es Hinweise dafür, dass beide Prozesse miteinander gekoppelt sein können. So kann die Blockade eines apoptotischen Signalweges zum Zelltod über einen nekrotischen Weg führen (Vercammen *et al.*, 1998).

2. Todesrezeptoren

Mit CD95 (APO-1/Fas) wurde 1989 zum ersten Mal ein Oberflächenmolekül beschrieben, das in der Lage ist, Apoptose auszulösen (Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.*, 1989; Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992). CD95 ist ein differentiell glykosyliertes Typ I-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 42 - 52 kDa, welches in den meisten Säugetiergeweben exprimiert wird (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992b; Leithauser *et al.*, 1993). Es gehört zur stetig wachsenden TNF-/NGF-Rezeptorfamilie (Locksley *et al.*, 2001; Bodmer *et al.*, 2002). Charakteristisch für diese Familie ist das Vorhandensein von zwei bis sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen. Die biologischen Effekte, die von den Rezeptoren dieser Familie vermittelt werden umfassen so verschiedene Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Aktivierung oder Apoptose (Locksley *et al.*, 2001).

Eine Subfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren, die sich durch die gemeinsame Eigenschaft auszeichnen, Apoptose auslösen zu können (Peter *et al.*, 1998). Derzeit sind sechs Todesrezeptoren bekannt: TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1/Fas), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) und DR6. Strukturell zeichnen sie sich durch eine ungefähr 80 Aminosäuren lange, homologe intrazelluläre Domäne aus, die als Todes-

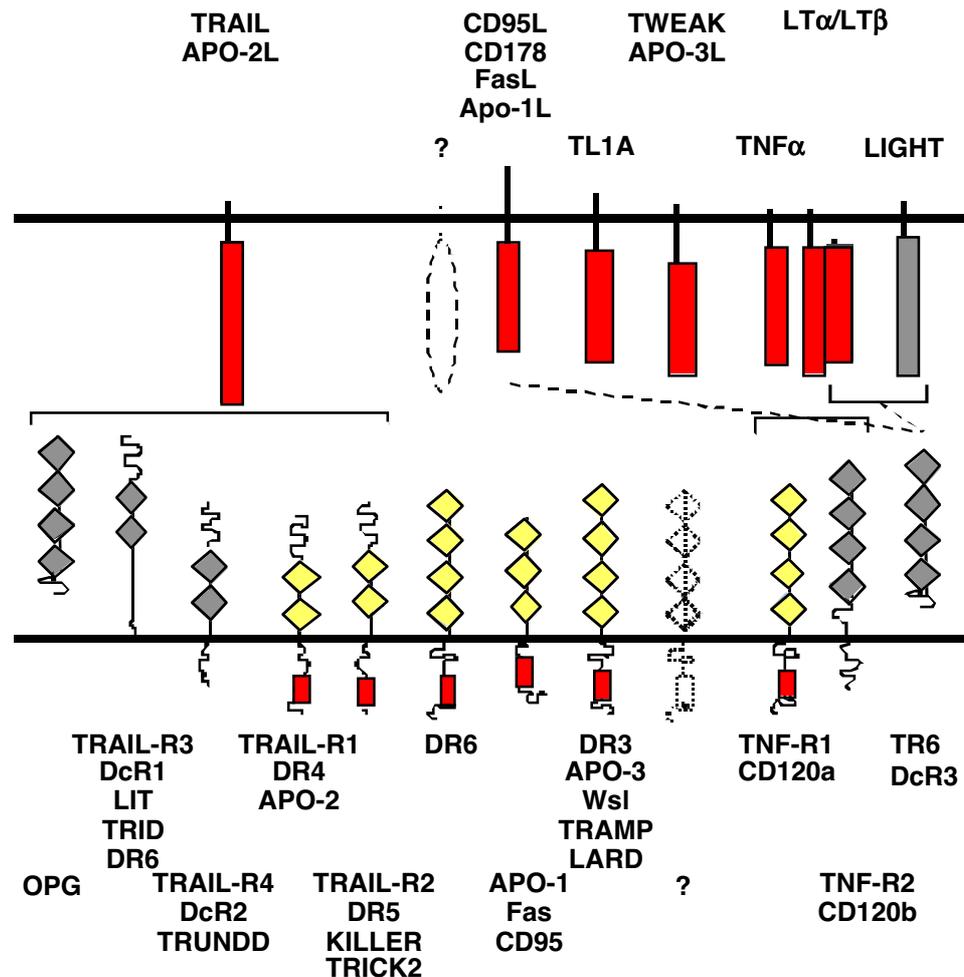


Abb. I.1: Die Familie der Todesrezeptoren und ihre Liganden. Todesrezeptoren sind gelb unterlegt, Rezeptoren, die keine Apoptose induzieren können, grau. Bislang unbekannte Interaktionspartner bekannter Rezeptoren bzw. Liganden sind gestrichelt dargestellt.

domäne (engl.: death domain, DD) bezeichnet wird und für die Apoptoseinduktion essentiell ist (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993).

Todesrezeptoren wie CD95 und TNF-R1 können durch agonistische Antikörper aktiviert werden (Trauth *et al.*, 1989). Unter physiologischen Bedingungen vollzieht sich die Aktivierung der Rezeptoren der NGF-/TNF-Rezeptorfamilie durch die Bindung spezifischer Liganden. Wie die Rezeptoren bilden auch die Liganden mit Ausnahme von NGF eine Familie, die TNF-Familie. Der Ligand von CD95, CD95L (CD178/APO-1L/FasL), ist ein glykosyliertes Typ II-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 40 kDa (Suda *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994b; Yu *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu CD95 ist die Expression von CD95L auf aktivierte T-, B- und NK-Zellen, sowie auf einige nicht-lymphoide Organe wie Hoden (Yu *et al.*, 1999) und die

vordere Augenkammer beschränkt (Griffith *et al.*, 1995). Ferner wurde die Expression in verschiedenen neoplastischen Zellen gezeigt (Hahne *et al.*, 1996; O'Connell *et al.*, 1996; Strand *et al.*, 1996). Neben der membranständigen wurde auch eine lösliche Form von CD95L beschrieben, die durch die Aktivität einer Metalloprotease erzeugt wird (Kayagaki *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998).

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

3. Die Signaltransduktion von CD95

3.1 Rezeptoraggregation als Stimulus

Mit der Entdeckung von spezifischen Rezeptoren, die Apoptose auslösen können, war eine Grundlage geschaffen, um die zur Apoptose führenden Signalwege zu studieren. Erste Hinweise auf den Ursprung des Signals lieferte die Strukturanalyse des TNF-R1 im Komplex mit LT α . Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nach Bindung des Liganden als Trimer vorliegt (Banner *et al.*, 1993), wodurch das Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet wird. Vergleichende Modellstudien ergaben, dass CD95 und andere Familienmitglieder ebenfalls durch ihre trimerisierten Liganden in eine Dreierkonformation gezwungen werden können (Peitsch und Tschopp, 1995). Funktionelle Studien zeigten, dass ein CD95-Dimer keine Apoptose auslösen kann, wohingegen ein multimerisierter Rezeptor in der Lage ist, das apoptotische Signal in die Zelle weiterzuleiten (Dhein *et al.*, 1992). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors das erste Signal zur Apoptoseinduktion durch CD95 darstellt. Vor kurzem wurde eine Region in der äußersten cysteinreichen Domäne verschiedener Todesrezeptoren, u.a. CD95, beschrieben, über welche die Rezeptoren bereits vor Stimulation interagieren und Trimere bilden (Papoff *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2000b). Diese

Domäne wird PLAD (engl.: pre-ligand binding assembly domain) genannt. Die Bindung des Todesliganden an den Rezeptor könnte dann entweder eine Konformationsänderung des präexistierenden Trimers mit Aggregation der intrazellulären Todesdomänen induzieren oder Trimere zu Multimeren vernetzen.

3.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex

Nach Stimulation von CD95 durch Trimerisierung oder Multimerisierung bildet sich innerhalb von Sekunden ein Proteinkomplex, der Tod-induzierender Signalkomplex (engl.: death-inducing signaling complex, DISC) genannt wird (Abb. I.2) (Kischkel *et al.*, 1995). CD95 verfügt im cytoplasmatischen Teil über die in allen Todesrezeptoren vorkommende Todesdomäne. Diese stellt eine aus sechs α -Helices bestehende Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar (Aravind *et al.*, 1999; Weber und Vincenz, 2001). Im DISC bindet FADD (engl.: Fas-associated death domain containing protein) homotypisch über seine DD an die DD von CD95 (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995). FADD besitzt zusätzlich zu seiner DD noch eine weitere

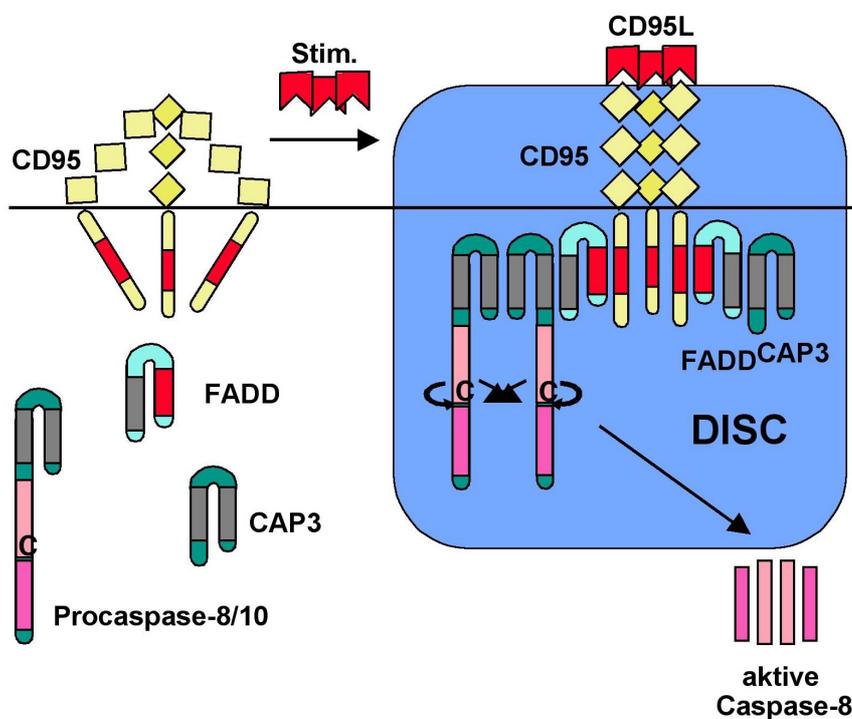


Abb. I.2: Der CD95-DISC. Erläuterungen siehe Text.

Protein-Protein-Interaktionsdomäne am N-Terminus, die strukturelle Ähnlichkeiten zur DD aufweist und Todeseffektordomäne (engl.: death effector domain, DED) genannt wird. Diese Domäne ist notwendig für die Rekrutierung von Caspasen (s.u.), die ebenfalls DEDs enthalten, an den DISC. Caspase-8 ist die am besten charakterisierte und eine von zwei DED-enhaltenden Caspasen. (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Caspasen sind Cystein-Proteasen, die nach einer wenig spezifischen Sequenz von vier Aminosäuren spalten. Diese muss jedoch unbedingt ein Aspartat in der Position P1 aufweisen (Earnshaw *et al.*, 1999). Caspasen sind verantwortlich für die Ausführung der Apoptose. Sie werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert. Die Aktivierung der Caspasen geschieht durch proteolytische Spaltung nach definierten Aspartatresten, was zur Freisetzung einer großen und einer kleinen Untereinheit führt. Die große Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum. Analysen der Kristallstruktur von Caspase-1, -3 und -8 ergaben, dass das aktive Enzym aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten in Form eines $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers aufgebaut ist (Walker *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Rotonda *et al.*, 1996; Mittl *et al.*, 1997; Blanchard *et al.*, 1999; Watt *et al.*, 1999). Verschiedene Caspasen erfüllen unterschiedliche Rollen bei der Initiation oder der Exekution der Apoptose. Die sogenannten Effektor-Caspasen, zu denen Caspase-3, -6 und -7 gehören, spalten den Großteil der an der Apoptose beteiligten Proteine, unter anderem auch diejenigen, deren Spaltung die charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen auslöst (Earnshaw *et al.*, 1999; Slee *et al.*, 1999). Die Initiator-Caspasen, zu denen Caspase-8, -9 und -10 gehören, übermitteln frühe apoptotische Signale. Caspase-8 wird auf Proteinebene in zwei Splicevarianten exprimiert, Caspase-8/a und Caspase-8/b. Beide Splicevarianten werden an den stimulierten CD95 Rezeptor rekrutiert (Scaffidi *et al.*, 1997). FADD und Caspase-8 sind die zentralen Bestandteile des CD95-DISC. Das unprozessierte Zymogen von Caspase-8, Procaspase-8, ist im wesentlichen im Cytoplasma lokalisiert, befindet sich in bestimmten Zelltypen aber auch an den Mitochondrien (Stegh *et al.*, 2000; Stegh *et al.*, 2002). Caspase-8 besitzt zwei aufeinanderfolgende DEDs (Tandem-DED), über die sie durch Bindung an die DED von FADD an den DISC rekrutiert wird. Sobald Procaspase-8 mit dem DISC assoziiert ist, setzt die autoproteolytische Prozessierung und damit Aktivierung ein, vermutlich aufgrund der hohen lokalen Konzentration (engl.: induced-proximity model) (Medema *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1998; Salvesen und Dixit, 1999) oder durch induzierte Dimerisierung (Yang *et al.*, 1998).

Nach autoproteolytischer Prozessierung verlässt das aktive Caspase-8-Heterotetramer, bestehend aus je zwei p18- und p10-Untereinheiten, den DISC. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die beiden prozessierten Caspase-8-Untereinheiten am DISC detektiert werden können (Lavrik *et al.*, zur Publikation eingereicht) Das deutet darauf hin, dass das aktive Heterotetramer direkt am DISC gebildet wird und erst anschließend ins Cytosol freigesetzt wird. Eine weitere Komponente des DISC stellt CAP3 dar (Kischkel *et al.*, 1995). CAP3 besitzt die Tandem-DED von Caspase-8 und einen bislang nicht charakterisierten C-Terminus, was darauf schließen lässt, dass es sich bei CAP3 um eine Splicevariante von Caspase-8 handelt (Muzio *et al.*, 1996). Neben Caspase-8 wird, wie kürzlich beschrieben wurde, auch Caspase-10 über homotypische Interaktionen mit der DED von FADD an den DISC rekrutiert und dort aktiviert (Kischkel *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Caspase-10 ist homolog zu Caspase-8 und enthält ebenfalls Tandem-DEDs (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Vincenz und Dixit, 1997). Allerdings ist ihre Funktion bislang weitgehend unklar. Möglicherweise trägt eine unterschiedliche Substratspezifität zu einer von Caspase-8 abweichenden Funktion bei (Wang *et al.*, 2001). Eine Mutation im *caspase-10*-Gen, die zum Verlust des aktiven Enzyms führt, spielt vermutlich eine Rolle in der Pathogenese des Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) Typ II (Wang *et al.*, 1999). Das Fehlen eines Caspase-10-Orthologen in der Maus erschwert die funktionelle Analyse dieser Caspase beträchtlich. Neben FADD, Caspase-8, -10 und

CD95-assoziiertes Molekül	Referenz
RIP	(Stanger <i>et al.</i> , 1995)
DAXX	(Yang <i>et al.</i> , 1997b)
FAF1	(Chu <i>et al.</i> , 1995)
UBC-FAP (UBC9)	(Wright <i>et al.</i> , 1996)
FAP-1	(Sato <i>et al.</i> , 1995)
Sentrin	(Okura <i>et al.</i> , 1996)
FLASH	(Imai <i>et al.</i> , 1999)
Ezrin	(Parlato <i>et al.</i> , 2000)
Btk	(Jackson und Puck, 1999)
SHP-1	(Daigle <i>et al.</i> , 2002)
TRAF-1	(Kataoka <i>et al.</i> , 2000)
TRAF-2	(Kataoka <i>et al.</i> , 2000)
Raf-1	(Kataoka <i>et al.</i> , 2000)

Tabelle I.1: CD95-assoziierte Proteine.

c-FLIP (s.u.) wurden noch eine Reihe weiterer Proteine als DISC-Komponenten oder CD95-assoziierte Moleküle beschrieben (Tabelle I.1). Deren Rolle ist allerdings noch weitgehend unklar. So wurde RIP mit Hilfe des

Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als CD95-interagierendes Protein identifiziert (Stanger *et al.*,

1995). Untersuchungen an RIP-defizienten Zellen zeigten jedoch, dass RIP keine Rolle bei CD95-vermittelter Apoptose spielt (Ting *et al.*, 1996; Kelliher *et al.*, 1998). Dagegen waren die Zellen sensitiver gegenüber TNF-vermittelter Apoptose und waren darüber hinaus nicht in der Lage, NF- κ B nach TNF-Stimulation zu aktivieren (Ting *et al.*, 1996; Kelliher *et al.*, 1998). Dies deutete auf eine Rolle für RIP in der TNF-vermittelten NF- κ B-Aktivierung hin. In der Tat wird RIP nach Stimulation von TNF-RI in den Rezeptorkomplex rekrutiert (Hsu *et al.*, 1996a). RIP kann seinerseits den I κ B-Kinase-Komplex (IKK) an TNF-RI rekrutieren (Devin *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Eine neuere Studie schreibt RIP eine Rolle in einem Caspase-8-unabhängigen Signalweg zu, der nach Stimulation von CD95 zu nekrotischem Zelltod führt (Holler *et al.*, 2000). Ein solcher Signalweg wurde für den Aktivierungs-induzierten Zelltod von T-Zellen vorgeschlagen, wenn Caspasen inhibiert sind. Ebenfalls über das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde DAXX als ein mit CD95 interagierendes Protein kloniert (Yang *et al.*, 1997b). DAXX soll über ASK1 c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) aktivieren und Apoptose auslösen (Yang *et al.*, 1997b; Chang *et al.*, 1998). Jedoch ist CD95-vermittelte Apoptose in DAXX-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt (Michaelson *et al.*, 1999; Michaelson, 2000). In der Tat konnte endogenes DAXX nie im CD95-DISC nachgewiesen werden, vielmehr ist das Protein im Kern lokalisiert (Pluta *et al.*, 1998; Michaelson *et al.*, 1999; Torii *et al.*, 1999). Neuere Studien weisen darauf hin, dass DAXX im Zellkern an der Regulation der Transkription während der Apoptose beteiligt ist (Torii *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000). Ein weiteres, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziertes Protein, das mit dem CD95-DISC interagieren soll, ist FLASH (Imai *et al.*, 1999). FLASH verstärkt die Rekrutierung und Prozessierung von Caspase-8. Die zunächst berichtete Homologie zu Apaf-1/CED-4 konnte nach einer gründlichen Analyse der Primärstrukturen nicht mehr aufrecht erhalten werden (Koonin *et al.*, 1999). Vor kurzem wurde gezeigt, dass Todesrezeptoren ein konserviertes Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv innerhalb der DD besitzen, welches durch Bindung an die Src-Homologie (SH)-2-Domänen von SHP-1, SHP-2 und SHIP inhibitorisch wirken kann (Daigle *et al.*, 2002).

Aggregation von CD95 und damit einhergehende DISC-Bildung stellen die ersten Schritte der CD95-Signaltransduktion dar. DISC-Bildung scheint von einem funktionellen Actin-Cytoskelett abhängig zu sein (Parlato *et al.*, 2000; Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002). Zur initialen Phase der CD95-Signaltransduktion gehören ferner als dritter Schritt die Caspase-8-abhängige Bildung großer CD95-Cluster auf der Zell-

oberfläche und schließlich viertens die Actin-abhängige Internalisierung des DISCs über einen endosomalen Weg (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2002). Die hier beschriebene Komplexität eröffnet viele Möglichkeiten, über die Apoptosesensitivität reguliert werden kann. Eine Zusammenfassung der mit CD95 interagierenden Proteine mit Ausnahme der zentralen DISC-Komponenten findet sich in Tabelle I.1.

3.3 Die Bcl-2 Familie

Eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose spielen die Proteine der Bcl-2-Familie, deren Namensgeber das Onkogen *bcl-2* ist, welches als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist (Tsujimoto *et al.*, 1985). Im Gegensatz zu anderen Onkogenen besteht die Funktion von Bcl-2 nicht darin, Proliferation zu stimulieren, sondern Zellen vor Apoptose zu schützen (Vaux *et al.*, 1988; Hockenbery *et al.*, 1990). Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine umfasst antiapoptotische Moleküle (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, BOO/DIVA, NR-13) und Moleküle, die Apoptose auslösen oder verstärken können (Bax, Bak, Bok/MTD, Bcl-x_S, Bad, Bid, Bik/NBK, Blk, Hrk/DP5, Bim/Bod, NIP3, NIX, NOXA, PUMA, Bmf) (Gross *et al.*, 1999a; Vander Heiden und Thompson, 1999). Strukturell zeichnen sich alle Mitglieder durch ein bis vier Bcl-2-Homologie (BH)-Motive aus (Gross *et al.*, 1999a). Die proapoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie werden weiter unterteilt in Proteine, die mehr als ein BH-Motiv, aber kein antiapoptotisches BH4-Motiv besitzen (wie Bax, Bak und Bok) und solche, die lediglich über das BH3-Motiv verfügen wie (Bid, Bim, Blk, Hrk/DP-5, Bmf und Noxa) und dementsprechend „BH3-only“-Proteine genannt werden (Huang und Strasser, 2000). Diese Proteine scheinen eher an der Initiation der Apoptose durch verschiedene Stimuli beteiligt zu sein und fungieren möglicherweise als Schadenssensoren, die an verschiedene zelluläre Kompartimente gebunden sind (Huang und Strasser, 2000). Bax und Bak dagegen nehmen eher eine Effektorfunktion wahr. Obwohl bisher viele Funktionen für Bcl-2 beschrieben sind, ist der Mechanismus der antiapoptotischen Wirkung dieses Proteins bisher ungeklärt. Bcl-2 besitzt eine Transmembrandomäne am C-Terminus, die zu einer Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, die Kernmembran und das Endoplasmatische Retikulum führt (Monaghan *et al.*, 1992; Jacobson *et al.*, 1993;

Krajewski *et al.*, 1993). Durch Deletion dieser Domäne verliert Bcl-2 weitgehend seine antiapoptotische Wirkung (Tanaka *et al.*, 1993).

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

Obwohl Bcl-2 ein genereller Inhibitor von Apoptose ist, gibt es widersprüchliche Berichte über seine Fähigkeit, CD95-vermittelte Apoptose zu inhibieren. Berichte reichen von Inhibition (Jäättelä *et al.*, 1995; Takayama *et al.*, 1995; Armstrong *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Mandal *et al.*, 1996; Vander Heiden *et al.*, 1997), über einen partiellen Effekt (Itoh *et al.*, 1993; Memon *et al.*, 1995; Boise und Thompson, 1997) bis hin zu fehlendem Effekt von Bcl-2 auf CD95-vermittelte Apoptose (Chiu *et al.*, 1995; Memon *et al.*, 1995; Strasser *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996b; Moreno *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2000).

3.4 Die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose

Neuere Studien weisen Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Apoptose zu (Kroemer *et al.*, 1997). So kann während der Apoptose ein Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_M$) noch vor der DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Petit *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1995). Dieser Verlust von $\Delta\Psi_M$ ist nach nahezu allen Apoptosestimuli zu beobachten und stellt daher ein universelles Ereignis dar (Kroemer *et al.*, 1997). Verursacht wird dieser Abfall des Transmembranpotentials durch einen Vorgang, den man Permeabilitäts-Transition (PT) nennt und der durch das Öffnen von Poren der inneren Mitochondrienmembran gekennzeichnet ist (Bernardi *et al.*, 1994). Diese Poren sind permeabel für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ca. 1500 Da. Die molekulare Zusammensetzung der PT-Poren ist

noch nicht vollständig bekannt. Es wurde eine Beteiligung von Hexokinase, Cyclophilin D, dem Adeninnukleotid-Translokator (ANT), sowie dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) gezeigt (Kroemer *et al.*, 1997). Eine Blockierung der PT-Bildung inhibiert verschiedene Formen der Apoptose (Petit *et al.*, 1996; Kroemer *et al.*, 1997). Mit AIF (engl: apoptosis inducing factor) konnte ein Faktor aus dem Intermembranraum von Mitochondrien isoliert werden, der in den Kern transloziert und dort DNA-Kondensation und DNA-Fragmentierung in Stücke von 50 kBp induziert (Susin *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1999b). Ferner verursacht AIF die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran. Diese Apoptose-Charakteristika werden von AIF Caspase-unabhängig ausgelöst (Susin *et al.*, 1999b; Daugas *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die Translokation in den Kern unabhängig von ATP, so dass dies auch beim nekrotischen Tod auftreten kann (Daugas *et al.*, 2000). Neben AIF enthält der Intermembranraum von Mitochondrien auch die Caspasen-2 und -9, sowie eine DNase-Aktivität (Susin *et al.*, 1999a). Neben AIF werden noch eine Reihe weiterer Proteine aus Mitochondrien apoptotischer Zellen freigesetzt (Van Loo *et al.*, 2002). Dazu gehören Endonuclease G, eine weitere an der Apoptose beteiligte Nuclease, die auf noch unbekannte Weise den apoptotischen Prozess verstärken kann (Li *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2001), die Serinprotease HtrA2/Omi sowie Smac/DIABLO, die beide verstärkend auf die Apoptose einwirken, indem sie mit den Caspase-Inhibitoren der IAP-(engl.: inhibitor of apoptosis)-Familie interagieren (Deveraux und Reed, 1999; Chai *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002; van Loo *et al.*, 2002). Smac/DIABLO-defiziente Mäuse weisen allerdings keine Veränderungen hinsichtlich der Apoptosesensitivität gegenüber verschiedenen Stimuli auf (Okada *et al.*, 2002).

Ein weiterer Faktor, der von Mitochondrien apoptotischer Mitochondrien freigesetzt wird, ist Cytochrom *c* (Liu *et al.*, 1996). Dies ist ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, der Elektronen von der Cytochrom *c*-Reduktase auf die Cytochrom *c*-Oxidase überträgt. Cytochrom *c* ist mit der inneren Mitochondrienmembran auf der Seite des Intermembranspalts assoziiert. Das Cytochrom *c*-Apoprotein, das nicht proapoptotisch wirkt, wird im Cytoplasma synthetisiert und gelangt über einen speziellen Mechanismus in die Mitochondrien, wo es an eine Hämgruppe gekoppelt wird und zum komplett gefalteten Holocytochrom *c* wird. Holocytochrom *c* kann unter normalen Umständen den Intermembranspalt nicht mehr

verlassen. Ins Cytoplasma freigesetzt, trägt es jedoch zur Caspasenaktivierung bei. Für seine Freisetzung werden drei verschiedene Modelle diskutiert: Eines der Modelle wurde an rekonstituierten PT-Poren in Liposomen entwickelt und postuliert einen Einstrom von Wasser und kleinen Molekülen nach Öffnung der PT-Pore. Die damit verbundene Schwellung und anschließende Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von Cytochrom *c* (Marzo *et al.*, 1998b).

Mit der Regulation dieses Prozesses konnte den Mitgliedern der Bcl-2-Familie eine neue Rolle in der Regulation der Apoptose zugewiesen werden: So sind die antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder in der Lage, PT-Bildung und die Freisetzung von AIF und Cytochrom *c* aus Mitochondrien zu inhibieren (Susin *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996; Kluck *et al.*, 1997; Susin *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997a). Die Grundlage für den Bcl-2-vermittelten, generellen Schutz von Mitochondrien vor apoptotischen Veränderungen ist noch unklar. Jedoch könnte die Fähigkeit von Bcl-2 und Bcl-x_L, Poren in Membranen zu bilden, und die partielle Lokalisation dieser Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran mit dieser Funktion verknüpft sein (Zamzami *et al.*, 1998). Für das proapoptotische Familienmitglied Bax konnte eine direkte Interaktion mit dem an der PT-Porenbildung beteiligten ANT nachgewiesen werden, die als essentiell für die PT-Bildung postuliert wird (Marzo *et al.*, 1998a). Das zweite Modell der Freisetzung von Cytochrom *c* basiert ebenfalls auf der direkten Interaktion von Bcl-2-Familienmitgliedern mit einem Molekül der PT-Pore: VDAC. Der Nachweis direkter Interaktion von Bax/Bak/Bcl-x_L mit VDAC und die Fähigkeit von Bax/Bak-VDAC-Komplexen, Cytochrom *c* in Liposomen aufzunehmen, führte zu der Hypothese, daß Bax/Bak in der Lage seien, VDAC zu modulieren. Durch diese Modulation soll eine Freisetzung von Cytochrom *c* ohne die Zerstörung der Mitochondrienmembran möglich sein (Shimizu *et al.*, 1999). Ein drittes, erst kürzlich postuliertes Modell, beschreibt einen von der PT-Pore unabhängigen Mechanismus der Freisetzung von Cytochrom *c*. Translokation von Bax aus dem Cytoplasma an die Mitochondrien und anschließende Oligomerisierung zu einem hochmolekularen Komplex zusammen mit Bak kann zur Porenbildung führen, die die Freisetzung von Cytochrom *c* ermöglicht (Saito *et al.*, 2000; Antonsson *et al.*, 2001; Nechushtan *et al.*, 2001). Diesem Komplex gehören weder ANT noch VDAC an (Antonsson *et al.*, 2001). Das Zusammenspiel von proapoptotischen BH3-only und antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern bei der Regulation der Bax/Bak-Oligomerisierung ist komplex. Während Bid in der Lage ist, direkt eine Oligomerisierung auszulösen, scheinen

andere „BH3-only“ Proteine wie Bim, Bad oder Noxa mit Bax und Bak um Bcl-2 und Bcl-x_L zu kompetieren, woraufhin freigesetztes Bax und Bak oligomerisieren können. Hierbei ist allerdings noch unklar, ob eher den proapoptotischen BH3-only oder den antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern die dominierende Rolle zukommt (Cheng *et al.*, 2001). In Knockout-Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Bax und Bak einander in der proapoptotischen Funktion substituieren können. Defizienz von Bax und Bak führt jedoch zur vollständigen Inhibition des mitochondrialen Apoptose-signalweges unabhängig vom Stimulus (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001). Die Bedeutung der direkten Oligomerisierung von gespaltenem Bid und seiner Porenbildung scheint unabhängig von Bax und Bak zu sein und ist daher vor dem Hintergrund der Bax/Bak-doppeldefizienten Mäuse noch unklar (Grinberg *et al.*, 2002).

Der Mechanismus der Cytochrom c-induzierten Caspasenaktivierung wurde mittels zellfreier Systeme aufgeklärt und führte zu der Identifizierung des menschlichen CED-4-Homologs Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997). Cytochrom c bindet an Apaf-1, welches unter Verbrauch von ATP mit Caspase-9 über die an beiden Molekülen vorhandenen Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomänen (engl.: caspase activation and recruitment domains, CARD) assoziiert (Li *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1999). Die CARD-Domäne besitzt eine ähnliche Struktur wie die DD und die DED (Day *et al.*, 1999; Weber und Vincenz, 2001). Der Komplex aus Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9 wird Apoptosom genannt und hat eine Masse von 700 kD bis 1,4 MD (Cain *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2000). Wie kryoelektronenmikroskopische Daten zeigen, ist das Apoptosom ein radialsymmetrischer Partikel mit siebenfacher Symmetrie, der Procaspase-9 im Zentrum enthält (Acehan *et al.*, 2002). Die Assoziation von Procaspase-9 und Apaf-1 führt zu der autoproteolytischen Aktivierung von Caspase-9 (Srinivasula *et al.*, 1998), was die Aktivierung weiterer Caspasen, wie z.B. Caspase-3, zur Folge hat und letztlich über die Spaltung von DFF45/ICAD zur DNA-Fragmentierung führt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Caspase-9 auch ohne Proteolyse aktiv sein kann (Stennicke *et al.*, 1999).

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

tion zwischen Bcl-x_L, CED-4/Apaf-1 und verschiedenen Caspasen gezeigt (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998). In dem sich daraus ergebenden Modell verhindert Bcl-x_L über die Wechselwirkung mit Apaf-1 die Aktivierung von Caspase-9 durch Apaf-1. Das proapoptotische Molekül Bax ist in der Lage, Bcl-x_L aus dem Komplex mit Apaf-1 und Caspase-9 zu lösen (Chinnaiyan *et al.*, 1997). Dies kann zu einer Aktivierung von Caspase-9 durch Apaf-1 und somit zur Apoptose führen. Jedoch berücksichtigt dieses Modell nicht die Notwendigkeit der Cytochrom *c*-Bindung für die Aktivierung von Apaf-1. Ferner sind diese Interaktionen nur durch transiente Überexpression der Bindungspartner bestimmt worden und konnten *in vivo* nicht bestätigt werden (Moriishi *et al.*, 1999). Mit Hilfe eines zellfreien Systems konnte weiterhin gezeigt werden, dass Bcl-x_L und Apaf-1 bei ausreichend hohen Konzentrationen zwar miteinander interagieren können, dass die Funktion von Apaf-1 aber nicht durch Bcl-x_L inhibiert wird (Newmeyer *et al.*, 2000). Somit scheinen Apaf-1 und Bcl-x_L in Säugetieren nicht die gleichen Funktionen zu haben wie CED-4 und CED-9 in *C. elegans*.

3.5 Zwei CD95-Signalwege

Wie oben dargestellt, wird die Rolle von Bcl-2 ebenso wie die DISC-Bildung in der Regulation der CD95-vermittelten Apoptose kontrovers diskutiert. Eine Annäherung an die Auflösung dieser Widersprüche gelang durch die Identifikation zweier CD95-Signalwege, die in jeweils unterschiedlichen Zelltypen aktiviert werden (Abb. I.3) (Scaffidi *et al.*, 1998).

In Typ II-Zellen führt eine geringe DISC-Bildung zu einer geringen Menge aktiver Caspase-8. Diese spaltet das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid, wodurch ein 15 kDa großes Spaltprodukt entsteht, welches myristoyliert wird, zu den Mitochondrien transloziert und

die Freisetzung von Cytochrom *c* auslöst (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999b; Han *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; Zha *et al.*, 2000). Dies führt zur Aktivierung eines mitochondrienabhängigen Signalweges, der durch Bcl-2 oder Bcl-x_L inhibiert werden kann. Wie das *C. elegans* Homolog EGL-1 initiiert Bid die evolutionär konservierte Apoptosemaschine.

In Typ I-Zellen führt eine massive DISC-Bildung zu großen Mengen aktiver Caspase-8. Diese löst eine Caspasenkaskade

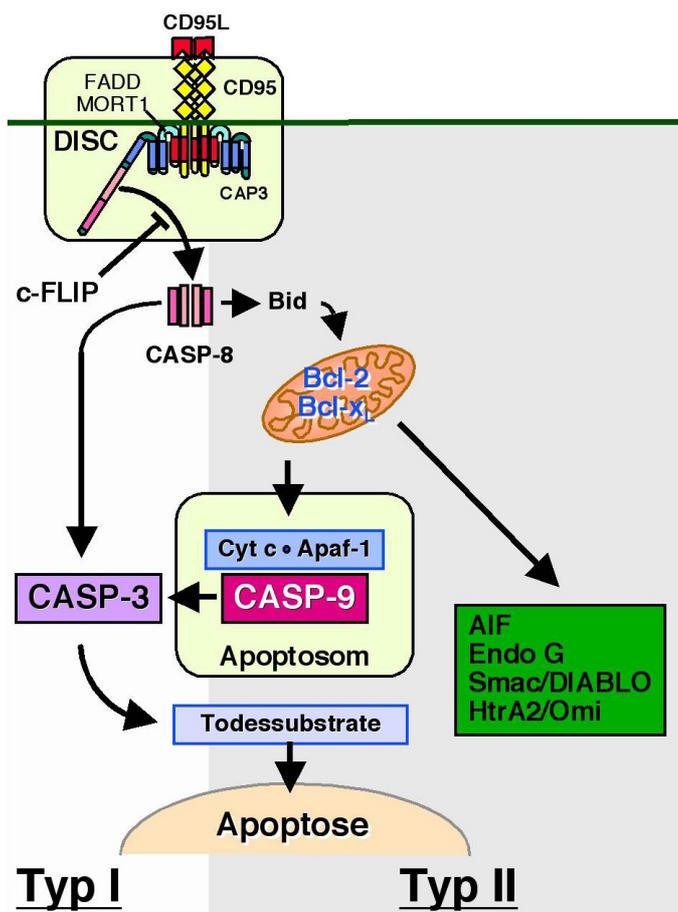


Abb. I.3: Zwei CD95-Signalwege. Erläuterungen siehe Text.

aus, indem Effektorcaspasen wie Caspase-3 proteolytisch gespalten und damit aktiviert werden. Dieser Signalweg umgeht die Mitochondrien und wird folglich nicht durch Bcl-2 inhibiert. Zwar werden auch in Typ I-Zellen Mitochondrien während der Apoptose aktiviert, allerdings sind diese Zellen durch die direkte Caspasekaskade unabhängig vom evolutionär konservierten Apoptosesignalweg (siehe Abb. 1.3). Mausmodelle, in denen der Typ II-Signalweg durch Deletion oder Überexpression von kritischen Proteinen ausgeschaltet ist, unterstreichen die physiologische Bedeutung des Zwei-Signalwege-Modells. Während Thymocyten Bid-defizienter Mäuse genauso sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind wie Thymocyten aus Wildtyp-Mäusen, sind Hepatocyten der Bid-defizienten Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp resistent (Yin *et al.*, 1999). In Bax/Bak doppelt defizienten Mäusen Hepatocyten ebenfalls resistent, während ihre Thymocyten und T-Zellen vergleichbar sensitiv sind wie die Wildtyp-Zellen (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Einen vergleichbaren Phänotyp zeigen Mäuse, die Bcl-2 als Transgen überexprimieren: Hepatocyten sind resistent, T-Zellen und Thymocyten dagegen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Strasser *et al.*, 1995; Lacronique *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1996). Thymocyten und T-Zellen scheinen also Typ I-Zellen zu sein, während Hepatocyten Typ II-Zellen darstellen.

3.6 Die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren

Die biologische Funktion des TNF/TNF-Rezeptor-Systems ist komplexer und weniger gut definiert als die des CD95/CD95L-Systems, da zwei verschiedene Liganden (TNF α und LT α) an zwei Rezeptoren (TNF-R1 (CD120a) und TNF-R2 (CD120b)) binden können (Peter *et al.*, 1998). Ferner haben lösliches (sTNF) und membranständiges (m)TNF unterschiedliche Affinitäten gegenüber beiden Rezeptoren (Wallach *et al.*, 1999). TNF ruft ein weites Spektrum zellulärer Reaktionen wie die Induktion von Cytokinen, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose hervor. Demgemäß werden, verglichen mit dem CD95/CD95L-System, von diesem System auch Signaltransduktionswege größerer Diversität aktiviert (Tracey und Cerami, 1993; Vandenabeele *et al.*, 1995). Diese umfassen unter anderem die drei bekannten MAP-Kinase-Signalwege, die Induktion von NF- κ B, sowie die Aktivierung von Caspasen (Wallach *et al.*, 1999). Die Diversität der Signalwege spiegelt sich auch auf

der Ebene der Adaptormoleküle wider. So koppelt TRADD den TNF-R1 an FADD und Caspase-8 (Hsu *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996b). Obwohl bisher noch keine direkte Assoziation von FADD mit TNF-R1 beobachtet werden konnte, blockieren sowohl dominant negatives FADD (bestehend nur aus der Todesdomäne, DD) als auch inaktive Caspase-8 neben der Signaltransduktion von CD95 auch die von TNF-R1 (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996b). Darüber hinaus verhalten sich Zellen, die defizient an FADD oder Caspase-8 sind, resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose (Juo *et al.*, 1998; Varfolomeev *et al.*, 1998; Juo *et al.*, 1999). MADD, ein DD-enhaltendes Adaptormolekül mit Homologie zu Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, koppelt TNF-R1 an die MAPK-Kaskade (Schievella *et al.*, 1997; Brown und Howe, 1998). RIP dagegen vermittelt die TNF-R1-abhängige NF- κ B-Aktivierung. Als weiteres DD-enhaltendes Adaptormolekül wurde RAIDD/CRADD beschrieben (Ahmad *et al.*, 1997; Duan und Dixit, 1997). RAIDD/CRADD soll Caspase-2 an TNF-R1 koppeln und so eine Caspasekaskade parallel zu Caspase-8 initiieren. Da diese Studien jedoch nur mittels transienter Überexpression durchgeführt wurden und Caspase-8-defiziente Zellen resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose sind, bedarf es weiterer Experimente zur Klärung dieses Signalweges. Ein anderes Molekül, das mit TNF-R1 interagiert, ist SODD (Jiang *et al.*, 1999). Es enthält selbst keine DD, bindet aber an die DD von TNF-R1 und verhindert so die Aggregation nicht-stimulierter Rezeptoren. Nach Stimulation dissoziiert SODD vom TNF-R1, sodass sich ein DISC bilden kann. Später assoziiert SODD wieder mit dem Rezeptor, um das Todessignal abzuschalten (Jiang *et al.*, 1999).

Einige Zelllinien zeigen Resistenz gegenüber TNF-R1-vermittelter Apoptose, die jedoch durch Cycloheximid oder Actinomycin D überwunden werden kann (Holtmann *et al.*, 1988). Dies lässt darauf schließen, dass die Resistenz von der aktiven Transkription/Translation bestimmter Faktoren abhängt. Dabei wird vor allem NF- κ B diskutiert, dem neben einer inflammatorischen auch eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben wird (Wallach *et al.*, 1999; Karin und Lin, 2002). So sensitiviert die Inhibition von NF- κ B gegenüber TNF-induzierter Apoptose (Beg und Baltimore, 1996; Wang *et al.*, 1996; Levkau *et al.*, 1999), wohingegen die Aktivierung von NF- κ B Apoptose supprimiert (Van Antwerp *et al.*, 1996; Levkau *et al.*, 1999).

Über die biologische Funktion von DR3 und DR6 ist noch relativ wenig bekannt. DR3 scheint auf solche Gewebe beschränkt zu sein, die reich an Lymphozyten sind, und spielt möglicherweise eine Rolle in ihrer Homöostase (Chinnaiyan *et al.*, 1996a;

Bodmer *et al.*, 1997). Da DR3 strukturell und bezüglich der bindenden Adaptormoleküle dem TNF-R1 vergleichbar (D'Souza *et al.*, 1996) und ferner in der Lage ist, Apoptose auszulösen sowie NF- κ B zu aktivieren (Chinnaiyan *et al.*, 1996a; Kitson *et al.*, 1996; Marsters *et al.*, 1996b; Bodmer *et al.*, 1997; Screatton *et al.*, 1997), wird postuliert, dass DR3 ähnliche Signalwege stimuliert wie TNF-R1 (Peter *et al.*, 1998). Auch für TRAIL kommt eine immunregulatorische Rolle in Betracht (Marsters *et al.*, 1996a). Zudem hat TRAIL eine anti-tumorale Wirkung. So werden Tumorzelllinien im Gegensatz zu untransformierten Zellen effizient getötet (Walczak *et al.*, 1999). Sowohl FADD als auch Caspase-8 werden an den DISC von TRAIL-R1 und -R2 rekrutiert und sind für TRAIL-induzierte Apoptose essentiell (Bodmer *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000).

3.7 FLICE-inhibitorische Proteine (FLIP)

Todesrezeptor-vermittelte Apoptose kann sowohl auf der Rezeptorebene, z. B. durch Glykosoylierung (Peter *et al.*, 1995; Keppler *et al.*, 1999), als auch durch Modulation der apoptotischen Signalkaskade reguliert werden. So können sogenannte IAPs (engl.: inhibitor of apoptosis proteins) direkt Caspasen inhibieren (Deveraux und Reed, 1999), und, wie oben beschrieben, antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder mit dem mitochondrialen Apoptoseweg in Typ II-Zellen interferieren (Scaffidi *et al.*, 1998). Am DISC wird Todesrezeptor-vermittelte Apoptose durch FLIPs reguliert.

3.7.1 Virale FLIPs (v-FLIP)

Datenbanksuchen führten zur Identifikation viraler Apoptoseinhibitoren mit zwei aufeinanderfolgenden Todeseffektordomänen. Aufgrund dieser Struktureigenschaft wurden die Mitglieder dieser Familie v-FLIPs (viral FLICE inhibitory proteins) genannt (Thome *et al.*, 1997). V-FLIPs werden von γ -Herpesviren wie dem equinen Herpesvirus-2 (EHV-2), dem bovinen Herpesvirus-4 (BHV-4), dem Herpesvirus Saimiri (HVS), dem Kaposi-Sarkom-assoziierten humanen Herpesvirus-8 (HHV-8), sowie dem humanen Molluscum Contagiosum Virus (MCV) codiert (Bertin *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997a; Thome *et al.*, 1997). Sie werden an den CD95-DISC rekrutiert und inhibieren auf diese Weise die Aktivierung von Caspase-8. Auch andere Todesrezeptorsysteme

(TNF-R1, DR3 und TRAIL-R) werden durch v-FLIPs blockiert (Meinl *et al.*, 1998). Eine Deletion des v-FLIP-Gens aus HVS bestätigte dessen antiapoptotische Aktivität und zeigte ferner, dass v-FLIP nicht für die Replikation, Transformationskapazität oder Pathogenität von HVS benötigt wird (Glykofrydes *et al.*, 2000).

3.7.2 Zelluläre FLIPs (c-FLIP)

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

Multiple Splicevarianten von c-FLIP wurden beschrieben (Abb. I.4), von denen allerdings nur zwei, bezeichnet als c-FLIP_L und c-FLIP_S, auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten (Irmler *et al.*, 1997b; Scaffidi *et al.*, 1999a). Während c-FLIP_S mit einem Molekulargewicht von 27 kDa aus zwei Todeseffektordomänen und einem kurzen C-terminalen Rest aus 19 Aminosäuren besteht und damit den viralen FLIPs ähnelt, ist c-FLIP_L mit einem Molekulargewicht von 55 kDa homolog zu Caspase-8. Neben den beiden DEDs verfügt es über zwei Domänen, die der p18- sowie der p10-Domäne von Caspase-8 ähnlich sind und als p20 bzw. p12 bezeichnet werden. Wie Caspase-8 enthält c-FLIP_L zwischen diesen beiden Domänen hinter D376 eine Spaltstelle für Caspasen mit der Sequenz LEVD (Irmler *et al.*, 1997b; Shu *et al.*, 1997). Die konservierten Motive HG und QACQG, die in Caspase-8 an der Katalyse beteiligt sind, finden sich allerdings nicht in c-FLIP_L. Hier sind die entsprechenden Sequenzen RG, respektive QNYVV.

Zusammen mit Caspase-8 und -10 ist das menschliche Gen für c-FLIP, das aus 14 Exons besteht, auf Chromosom 2q33-34 in einem 200 kb großen Cluster lokalisiert (Abb. I.4; (Irmler *et al.*, 1997b; Rasper *et al.*, 1998; Djerbi *et al.*, 2001).

Über die Funktion von c-FLIP gibt es gegensätzliche Aussagen. So wurde c-FLIP zunächst (Shu *et al.*, 1997) und in weiteren Studien als proapoptotisches Molekül beschrieben (Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997), während andere Untersuchungen eine apoptoseinhibierende Funktion von c-FLIP beschreiben (Hu *et al.*, 1997b; Irmeler *et al.*, 1997b; Srinivasula *et al.*, 1997; Kataoka *et al.*, 1998; Rasper *et al.*, 1998). Auch eine gegensätzliche Funktion in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie sowie dem Expressionsniveau von c-FLIP wurde diskutiert (Goltsev *et al.*, 1997; Wallach, 1997). Eine Studie zum Verhalten stabil c-FLIP_L-überexprimierender Zellen gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli zeigte, dass c-FLIP_L effizient Todesrezeptor-vermittelte Apoptose blockiert, nicht jedoch solche, die durch Perforin/Granzym B, verschiedene Chemotherapeutika oder γ -Strahlung ausgelöst wird (Kataoka *et al.*, 1998). Da jedoch allen diesen Studien Untersuchungen mit stabiler oder transients Überexpression des Proteins zugrunde liegen, ist die physiologische

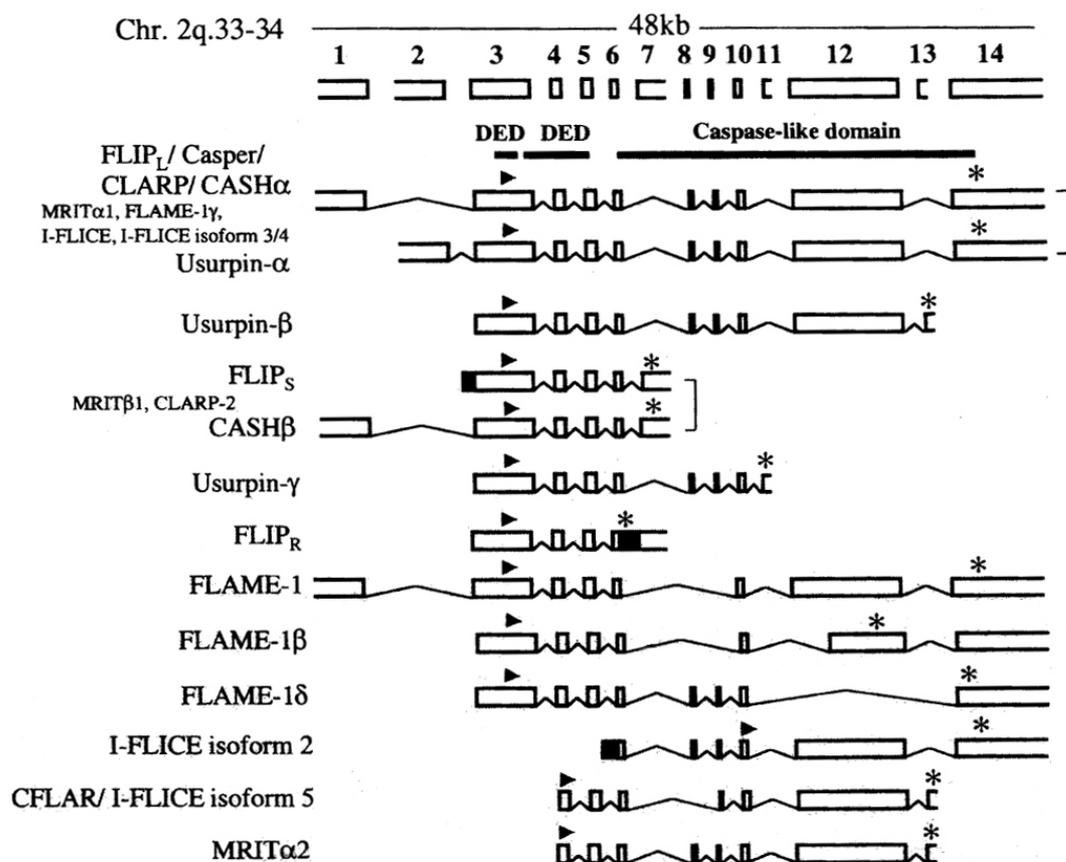


Abb. I.4: Die Exon-Intron-Struktur des c-FLIP (CFLAR)-Gens und die Exon-Nutzung der beschriebenen Transkripte. Ein Startcodon ist durch einen Pfeil, ein Stoppcodon durch einen Stern gekennzeichnet (nach Djerbi *et al.*, 2001).

Situation damit noch nicht erfasst. Da die Überexpression von DED-enhaltenden Proteinen generell Apoptose auslöst, muss eine in Überexpressionssystemen beobachtete proapoptische Funktion von c-FLIP mit Vorsicht diskutiert werden (Irmiler *et al.*, 1997b; Siegel *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999a).

3.7.3 Regulation der Expression von c-FLIP

Die Signalwege, die zu einer Modulation der Expression von c-FLIP führen, sind weitgehend unbekannt. Es wurde berichtet, dass MAP-Kinase-Kinase 1 (MKK1) Concanavalin-stimulierte Jurkat-Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose schützen konnte, was mit einer Steigerung der c-FLIP-mRNA Expression korrelierte (Yeh *et al.*, 1998a). Zudem führte die Inhibition der MAP-Kinase Aktivität zu einer Reduktion von c-FLIP-mRNA. Die Induktion von c-FLIP durch TGF β (engl.: transforming growth factor β) in Microglia konnte ebenfalls durch Inhibition von MAP Kinasen verhindert werden (Schlapbach *et al.*, 2000). Allerdings wurde keine Modulation des Expressionsniveaus von c-FLIP nach CD3-Stimulation von Jurkat-Zellen beobachtet, obwohl auch hier Apoptose durch die Inhibition von MAP-Kinasen verstärkt werden konnte (Holmström *et al.*, 2000). In dieser Studie schienen MAP-Kinasen eher die Expression des proapoptischen Familienmitglieds Bad zu regulieren anstatt den DISC zu beeinflussen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass in einer Reihe von Tumorzelllinien die c-FLIP-Expression nur zum Teil von MAP-Kinase-Aktivität abhängig war, während in allen getesteten Zelllinien der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signalweg Einfluss auf die c-FLIP-Expression hatte (Panka *et al.*, 2001). Die Rolle von Kinase-Signalwegen in der Regulation von c-FLIP ist somit noch weitgehend unklar und vermutlich Zelltyp-abhängig.

3.7.4 Transkriptionelle Aktivierung durch c-FLIP

Im Gegensatz zu TNF-R1, dem eine duale Rolle zukommt, indem er sowohl Todes- als auch Überlebenssignale vermittelt (s. Kap. 3.6), wird CD95 im Wesentlichen als ausschließlicher Todesrezeptor angesehen. Einige Studien beschreiben allerdings auch für CD95 eine proliferative Funktion (Alderson *et al.*, 1993; Rathmell *et al.*, 1996; Aggarwal *et al.*, 1997). Vor kurzem wurde beschrieben, dass c-FLIP in der

Lage ist, das proliferative Signal von CD95 durch erhöhte Rekrutierung von RIP, TRAF-1 und -2 an den CD95-DISC und damit einhergehender Aktivierung von NF- κ B und ERK zu verstärken (Kataoka *et al.*, 2000). Die Modulation des NF- κ B-Signalweges wurde auch für andere DED-enhaltende Proteine wie FADD, v-FLIP, Caspase-8 und -10 nach Überexpression beschrieben (Chaudhary *et al.*, 1999b; Chaudhary *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2000). In c-FLIP-defizienten Mäusen wurden allerdings keine Veränderungen in der Aktivierung von NF- κ B festgestellt (Yeh *et al.*, 2000). Daher bedarf die Rolle von c-FLIP und seinen Homologen noch weiterer Untersuchungen, vor allem in Systemen, die nicht auf Überexpression basieren.

4. Die Rolle der Apoptose im Immunsystem

Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Organismus. Sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und die Beseitigung von alten, geschädigten oder mutierten Zellen. Im Immunsystem ist sie der Hauptmechanismus, über den potentiell autoreaktive oder nutzlose Immunzellen beseitigt werden (Baumann *et al.*, 2002). T-Zellen durchlaufen im Thymus die Prozesse der positiven und negativen Selektion. Durch die positive Selektion werden T-Zellen mit T-Zell-Rezeptoren (TCR), die nicht mit MHC-Peptidkomplexen wechselwirken können, durch Apoptose eliminiert. Durch negative Selektion findet die Eliminierung von T-Zellen statt, deren TCR mit Komplexen aus körpereigenen Peptiden und MHC reagiert und damit potentiell autoreaktiv sind (Fowlkes *et al.*, 1988; Kisielow *et al.*, 1988; Jenkinson *et al.*, 1989; Nossal, 1994; von Boehmer, 1994). Auf ähnliche Weise werden im Knochenmark B-Zellen mit einem nicht-funktionellen B-Zell-Rezeptor durch Apoptose beseitigt (Osmond, 1993). Auch während einer Immunantwort ist Apoptose für den Erhalt der Zellhomöostase essentiell. Nach Erkennung eines Antigens durch T-Zellen proliferieren diese und führen ihre Effektorfunktionen aus. Ist das Antigen beseitigt, werden die nun überflüssigen, aktivierten T-Zellen durch Apoptose eliminiert. Dies wird als Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) bezeichnet (Dhein *et al.*, 1995b; Peter *et al.*, 1997; Combadiere *et al.*, 1998). Dieser Deletionsphase der Immunantwort schließt sich die Gedächtnisphase an. Abbildung I.5 stellt den Verlauf einer Immunantwort schematisch dar. Beim AICD spielt das CD95/CD95L-System eine entscheidende Rolle. Die Stimulation des TCR auf bereits aktivierten T-Zellen führt zu einer verstärkten Pro-

duktion von CD95L, und durch eine Interaktion des CD95/CD95L-Systems werden die Zellen durch Apoptose beseitigt (Alderson *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995a; Ju *et al.*, 1995). Zellen, die diesen Prozess überleben, können potentiell zu Gedächtniszellen werden. Der AICD hat damit eine wesentliche Rolle in der Homöostase des Immunsystems. Wird diese Homöostase dadurch gestört, dass der AICD vermindert ist, kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen (Krammer, 1999).

Des Weiteren benutzen auch cytotoxische T-Zellen das CD95-System, um virusinfizierte oder entartete Zielzellen zu eliminieren (Rouvier *et al.*, 1993). Ferner ist das CD95-System auch an der Homöostase der Leber (Adachi *et al.*, 1995) und dem Phänomen der immunprivilegierten Organe (Barker und Billingham, 1977; Griffith *et al.*, 1995; Griffith und Ferguson, 1997; Stuart *et al.*, 1997) beteiligt.

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

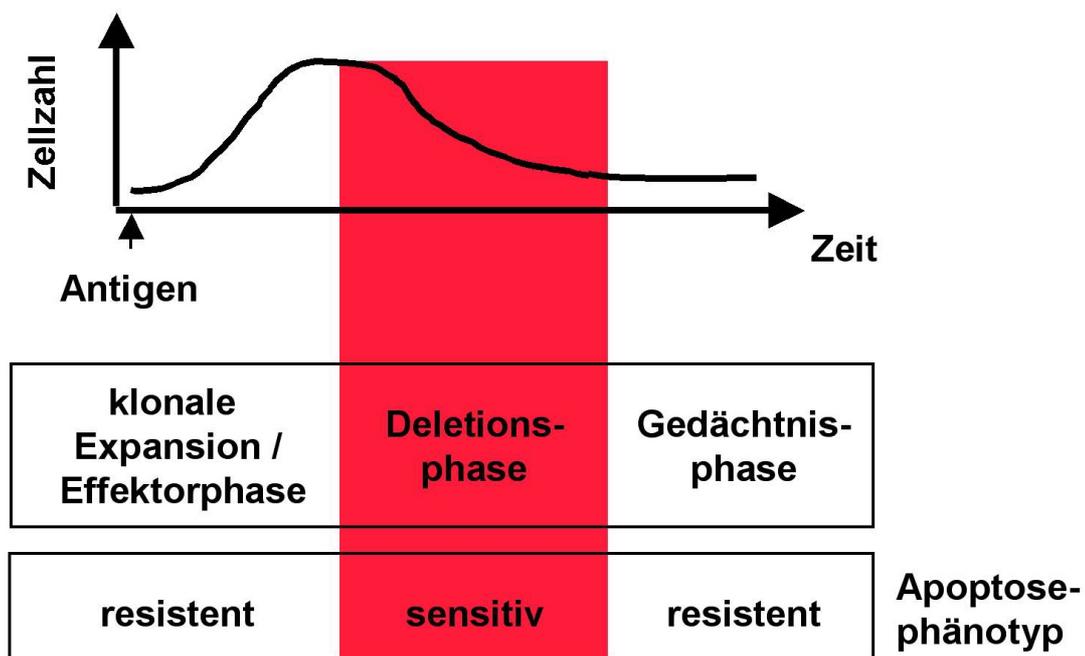


Abb. I.5: Schematische Darstellung einer T-Zell-Immunantwort. Nach Erkennung des Antigens proliferieren antigenspezifische T-Zellen und erfüllen ihre Effektorfunktion. Nach Beseitigung des Antigens sterben T-Zellen über einen Mechanismus, der Aktivierungs-induzierter Zelltod (engl.: activation-induced cell death, AICD) genannt wird. Nur in dieser Phase sind T-Zellen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Die Deletionsphase überleben nur wenige Zellen, die dann als langlebige Gedächtniszellen fungieren.

betreffen und dessen Bedeutung unterstreichen. Der Phänotyp dieser Mäuse beinhaltet die unkontrollierte Akkumulation von CD4⁺CD8⁻-T-Zellen, was zu einer Vergrößerung von Lymphknoten und Milz und Autoimmunerscheinungen führt. Die *lpr*-Mutation (für Lymphoproliferation) betrifft CD95, dessen Expression durch die Insertion eines Transposons in das zweite Intron des Gens stark verringert wird (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992a; Adachi *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1993; Mariani *et al.*, 1994). Bei der *lpr^{gq}*-Mutation wird die Signaltransduktion von CD95 durch einen Aminosäureaustausch in der Todesdomäne verhindert (Matsuzawa *et al.*, 1990), was wiederum die Bedeutung dieser Domäne für die Signaltransduktion des Rezeptors verdeutlicht. In *gld*-Mäusen (für generalized lymphoproliferative disease) ist CD95L betroffen. Ein Aminosäureaustausch im extrazellulären Bereich des Proteins verhindert die Bindung des Liganden an den Rezeptor (Takahashi *et al.*, 1994a). Auch beim Menschen wurden ähnliche Mutationen des CD95-Systems beschrieben (Fisher *et al.*, 1995; Rieux-Laucat *et al.*, 1995). Sie führen zur Ausbildung eines Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS), welches eine massive Lymphadenopathie, die Akkumulation von nicht-malignen T-Zellen und Anzeichen von Autoimmunität beinhaltet (Jackson und Puck, 1999).

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

4.1 Die physiologische Rolle von c-FLIP im Immunsystem

Das Immunsystem steht im Zentrum des Studiums der physiologischen Bedeutung von c-FLIP. Bereits in einer der ersten Beschreibungen von c-FLIP wird die Verminderung des Expressionsniveaus von c-FLIP_L in aktivierten primären T-Zellen berich-

tet. Dies lässt vermuten, dass c-FLIP zur Sensitivierung von aktivierten T-Zellen gegenüber AICD beiträgt (Irmeler *et al.*, 1997b). Interleukin (IL)-2 verstärkt AICD in CD4⁺-Zellen durch Erhöhung der Expression von CD95L und gleichzeitiger Verminderung des c-FLIP-mRNA-Levels (Refaeli *et al.*, 1998). Diese Verminderung von c-FLIP durch IL-2 wurde später mit dem Übergang aktivierter T-Zellen von der G1- zur S-Phase in Verbindung gebracht, da Zellzyklus-Inhibitoren die Modulation des c-FLIP-Expressionsniveaus verhinderten (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999). Retrovirale Rekonstitution aktivierter T- und B-Zellen mit c-FLIP verhinderte CD95-vermittelten AICD in diesen Zellen (Van Parijs *et al.*, 1999a). *In vivo* führt eine erhöhte Expression von c-FLIP zur Produktion von Autoantikörpern und zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung, was den Schluss zulässt, dass c-FLIP zum Erhalt der Selbst-Toleranz notwendig ist (Van Parijs *et al.*, 1999a). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Studien konnte eine Modulation von c-FLIP_L nach Stimulation von primären humanen T-Zellen von Scaffidi *et al.* nicht detektiert werden (Scaffidi *et al.*, 1999a). Bis jetzt liegt keine schlüssige Erklärung für diese Kontroverse vor. Es mag sich hierbei um Spezies-spezifische Unterschiede zwischen Maus und Mensch oder Unterschiede in den experimentellen Bedingungen handeln. Bislang lag der Schwerpunkt der meisten Studien zu c-FLIP auf der langen Splicevariante c-FLIP_L, vermutlich weil diese in der Regel höher exprimiert wird als c-FLIP_S. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, dass c-FLIP_S ein Effektor CD28-vermittelter Kostimulation von T-Zellen ist (Kirchhoff *et al.*, 2000b) und zudem zur Resistenz T-Zell-Rezeptor (TCR)-restimulierter T-Zellen gegenüber AICD beiträgt (Kirchhoff *et al.*, 2000a). Kostimulatorische Signale via CD28 führen zur Resistenz gegenüber CD3-vermittelter Apoptose, indem sie dreifach in die apoptotische Signalkaskade eingreifen: Erstens ist die Induktion des CD95L inhibiert, zweitens sind die Mitochondrien durch Induktion von Bcl-x_L geschützt und drittens ist die DISC-Aktivität durch Hochregulation von c-FLIP_S blockiert. Dieser letzte Effekt ist möglicherweise der wichtigste, weil hierdurch Zellen nicht nur vor Suizid geschützt werden, sondern auch vor dem Tod, der durch benachbarte Zellen induziert wird. Zudem inhibiert c-FLIP im Gegensatz zu Bcl-x_L sowohl den Typ I- als auch den Typ II-CD95-Signalweg (Scaffidi *et al.*, 1999b). Restimulation aktivierter T-Zellen über den TCR führt ebenfalls zu einer massiven Steigerung des Expressionsniveaus von c-FLIP_S, was die DISC-Aktivierung nach Stimulation von CD95 inhibiert und folglich vor Apoptose schützt. Die Induktion von murinem c-FLIP nach wiederholter Antigengabe konnte ebenfalls in einem TCR-

transgenen Mausmodell beobachtet werden (Inaba *et al.*, 1999). Wiederholte Stimulation von T-Zellen führt zur Bildung von Gedächtnis-T-Zellen (Kundig *et al.*, 1996; Ludewig *et al.*, 1999). Daher könnte die Induktion von c-FLIP_S einen der Mechanismen darstellen, der zur Bildung von Gedächtnis-T-Zellen beiträgt. Nicht nur die Homöostase von T-, sondern auch die von B-Zellen scheint durch die Modulation von c-FLIP_L beeinflusst zu werden. Nach Stimulation von humanen tonsillaren B-Zellen über CD40 oder den B-Zell-Rezeptor (BCR) wird c-FLIP_L induziert und an den CD95-DISC rekrutiert (Hennino *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Zudem scheint c-FLIP_L an der Regulation des Überlebens von B-Zellen aus den Keimzentren nach erfolgreicher Affinitätsreifung beteiligt zu sein (Hennino *et al.*, 2001). Über das Überlebenssignal von CD40 verbleibt c-FLIP_L am DISC und schützt so die B-Zellen in Keimzentren vor Apoptose. Dendritische Zellen (DC) und Macrophagen stellen neben den lymphoiden Zellen einen weiteren wichtigen Teil des Immunsystems dar. Sie präsentieren z.B. T- und B-Zellen Antigene, sind aber auch an Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Atherosklerose beteiligt. Macrophagen differenzieren aus zirkulierenden Monocyten und gehen dabei von einem CD95-sensitiven in einen -resistenten Zustand über. Dieser Wechsel korreliert mit einem Anstieg der Expression von c-FLIP (Perlman *et al.*, 1999). Unreife DCs nehmen im peripheren Gewebe Antigene auf und transportieren sie zu den lymphoiden Organen. Während der Wanderung reifen die DCs, d.h. die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen verringert sich, und die Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle nimmt zu. Nach zwei Tagen verschwinden die DCs aus lymphoiden Organen, vermutlich durch Apoptose. Vor kurzem wurde berichtet, dass unreife im Gegensatz zu reifen DCs sensitiv gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sind, wobei letztere ein erhöhtes c-FLIP_L-Expressionsniveau aufweisen (Leverkus *et al.*, 2000). Todesrezeptorsysteme scheinen somit wichtiger für die Homöostase unreifer DCs zu sein als das Verschwinden reifer DCs zu induzieren.

Die Überexpression von c-FLIP induziert nicht nur das Auftreten von Autoimmunerkrankungen (Van Parijs *et al.*, 1999a), sondern kann auch dazu beitragen, dass sich Tumoren einer Immunantwort durch cytotoxische T-Zellen *in vivo* entziehen (Djerbi *et al.*, 1999; Medema *et al.*, 1999). Mäuse mit einem T-Zell-spezifischen Transgen für das virale FLIP-E8 haben stark reduzierte Thymocytenzahlen, obwohl diese Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (OhYama *et al.*, 2000). Die Reduktion der Thymocytenzahlen wurde ebenfalls vor einem CD95^{-/-}-Hintergrund

beobachtet, was darauf schließen lässt, dass dieses Phänomen unabhängig von CD95 ist. Interessanterweise ist der Phänotyp dieser Mäuse dem von Mäusen vergleichbar, die ein Transgen für eine dominant-negative Mutante von FADD tragen, was darauf hindeutet, dass ein anderes Todesrezeptorsystem für die Selektion von Thymocyten von entscheidender Bedeutung ist (Walsh *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 2000).

C-FLIP-defiziente Mäuse sterben embryonal an Tag E10,5 und lassen folglich keine auf das Immunsystem bezogene Analyse zu (Yeh *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise ähnelt ihr Phänotyp dem von FADD- und Caspase-8-defizienten Mäusen (Varfolomeev *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998b). Alle drei sterben vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Herzentwicklung.

5. Das Humane T-Zell-Leukämie Virus-1 (HTLV-1)

Das humane T-Zell-Leukämie Virus-1 (HTLV-1) ist das erste humane Retrovirus, das mit einer malignen Erkrankung assoziiert wurde. 1980 wurde es aus Zellen von Patienten mit Adulter-T-Zell-Leukämie/Lymphom (engl.: adult T cell leukemia/lymphoma, ATL) isoliert (Poiesz *et al.*, 1980; Poiesz *et al.*, 1981). HTLV-1 ist ein umhülltes Doppelstrang-RNA Typ C-Retrovirus (Modrow und Falke, 1997). Es ist infiziert vornehmlich CD4⁺, aber auch CD8⁺ T-Zellen, verursacht T-Zell-Proliferation und kann eine persistierende Infektion verursachen. Die Transmission von HTLV-1 ist weitgehend zellgebunden, was zu in einer großen zellulären Provirusmenge führt, während freies HTLV-1 kaum oder gar nicht im Plasma auftritt (Bangham, 2000). Die Rezeptoren für die Vermittlung des Viruseintritts in die Zelle sind bislang unbekannt. Nach Eintritt in die Zelle synthetisiert das Virus DNA durch reverse Transkription und integriert sie in das Genom des Wirts. Das Genom von HTLV-1 (Abb. I.6) enthält drei strukturelle Gene (*gag*, *pol* und *env*), zwei regulatorische Gene (*tax* und *rex*) und die LTRs (engl.: long terminal repeats). HTLV-1 ist in der Lage, Zellen *in vitro* zu transformieren und zu immortalisieren. Allerdings besitzt es keine viralen Onkogene wie andere Typ C-Retroviren. Das *gag*-Gen codiert für zwei Proteine, p19 und p24, *pol* codiert für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), und *env* codiert für die zwei Hüllproteine gp21 und gp46. Die HTLV-1-Protease prozessiert in erster Linie die *gag*-Genprodukte. Tax und Rex transaktivieren die virale Replikation

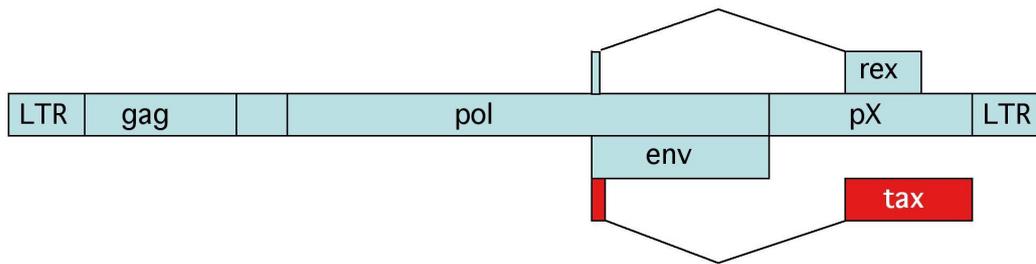


Abb. I.6: Das Genom von HTLV-1. Erläuterungen siehe Text.

und regulieren die Expression viraler Proteine. Das Tax-Protein ist ferner verantwortlich für die Aktivierung der LTRs (Modrow und Falke, 1997).

Die Infektion durch HTLV-1 ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. ATL ist ein Non-Hodgkin-Lymphom, das durch zirkulierende, aktivierte CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen charakterisiert ist (Manns *et al.*, 1999). Das Provirus ist zufällig in das Wirtsgenom maligner Zellen integriert und häufig partiell deletiert, was zu defekten Viren führen kann. Dies stellt möglicherweise einen Mechanismus dar, mit Hilfe dessen das Virus der Immunantwort entkommen kann. Eine Infektion im frühen Lebensalter ist wesentlich für die Entwicklung von ATL, wobei die Krankheit erst nach langer Inkubationsphase auftritt (Manns *et al.*, 1999). Etwa 2% aller HTLV-1-infizierten Individuen entwickeln ATL. Das regulatorische Tax-Protein ist vermutlich verantwortlich für die maligne Transformation der T-Zellen. Weitere HTLV-1-assoziierte Krankheiten sind die HTLV-1-assoziierte Myelopathie/Tropische Spastische Paraparese (HAM/TSP), sowie Dermatitiden und Uveitiden (Manns *et al.*, 1999).

Im Rahmen der Immunantwort gegen HTLV-1 treten zunächst anti-Gag Antikörper auf. Später kommen anti-Env und anti-Tax Antikörper hinzu. Die Infektion mit HTLV-1 induziert in der Regel eine starke cytotoxische T-Zell-Antwort. Dabei erkennen die meisten HTLV-1-spezifischen CD8⁺-Zellen aller Patienten das gleiche Epitop aus dem Tax-Protein (Bangham, 2000).

5.1 HTLV-1 Tax

Das 40 kD große Transaktivatorprotein Tax vermittelt die durch HTLV-1-Infektion induzierte maligne Transformation von CD4⁺ T-Zellen (Grassmann *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1990; Grossman *et al.*, 1995). Obwohl Tax selbst weder DNA-bindende noch enzymatische Aktivität aufweist, reguliert es eine Vielzahl von zellulären Prozessen durch Protein-Protein-Interaktionen mit verschiedenen zellulären Faktoren. Es interagiert mit Transkriptionsfaktoren, wodurch es die Expression sowohl viraler als auch zellulärer Gene reguliert. So wird zum Beispiel die Provirus-Transkription durch Mitglieder der ATF/CREB-Transkriptionsfaktorfamilie und ihrer Koaktivatoren CBP/p300 induziert, deren Bindung an die LTRs des Provirus durch die Interaktion mit Tax verstärkt wird (Suzuki *et al.*, 1993; Brauweiler *et al.*, 1995; Yin und Gaynor, 1996). Neben ATF/CREB werden auch SRF (engl.: serum response factor), AP-1 und NF- κ B durch Tax reguliert. Eine konstitutiv erhöhte NF- κ B-Aktivität wurde sowohl in ATL- als auch in Tax-exprimierenden Zellen gefunden (Jeang, 2001). Tax enthält ein Kernlokalisierungssignal (engl.: nuclear localization signal, NLS) und agiert vornehmlich im Zellkern (Smith und Greene, 1992). Hier kann es die Homodimerisierung von CREB verstärken oder auch Koaktivatoren wie CBP/p300 und P/CAF rekrutieren. Die Regulation von NF- κ B durch Tax findet auf mehreren Ebenen sowohl im Kern als auch im Cytoplasma statt (Li und Gaynor, 2000; Jeang, 2001). Im Kern kann Tax an die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p52 binden und so die Transaktivierung verstärken. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Tax im Cytoplasma mit I κ B (engl.: inhibitor of κ B) interagiert und so den NF- κ B-Komplex vom Inhibitor freisetzt. Zudem beeinflusst Tax die Phosphorylierung von I κ B, die das initiale Signal für Ubiquitinierung und proteolytischen Abbau darstellt, indem es den IKK-Komplex (I κ B-Kinase-Komplex) durch direkte Interaktion oder durch Aktivierung von MAP3K (MAP-Kinase-Kinase-Kinasen) aktiviert. Die Relevanz der Interaktionen von Tax mit den verschiedenen Stufen der NF- κ B -Aktivierungskaskade ist noch weitgehend unklar. Die Interaktion von Tax mit den beschriebenen Transkriptionsfaktoren führt zur verstärkten Expression von einer Reihe von Genen, die für die Transformation infizierter Zellen maßgeblich sein können. Hierzu gehören IL-2, CD25 (IL-2R α), c-fos, GM-CSF,

c-myb, Lck und p53 (Arima *et al.*, 1986; Inoue *et al.*, 1986; Fujii *et al.*, 1988; Miyatake *et al.*, 1988; Wano *et al.*, 1988; Yin und Gaynor, 1996; Hollsberg, 1999).

Apoptose spielt sowohl durch Immortalisierung bei der Transformation von Zellen als auch bei der Ausbreitung von Viren im Wirt eine wichtige Rolle. Viele der durch Tax beeinflussten Transkriptionsfaktoren, vor allem NF- κ B, sind auch an der Regulation von Apoptose beteiligt. NF- κ B induziert antiapoptotische Proteine, darunter Bcl-x_L, c-IAPs und c-FLIP, trägt aber z.B. durch Induktion des CD95L auch zu apoptotischen Vorgängen bei (Kreuz *et al.*, 2001; Micheau *et al.*, 2001; Karin und Lin, 2002; Li-Weber und Kramer, 2002). Die Rolle von Tax als Apoptoseregulator wird kontrovers diskutiert. Es wurde gezeigt, dass Leukämie-Zellen aus ATL-Patienten sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Debatin *et al.*, 1990; Debatin *et al.*, 1993). Tax-exprimierende Jurkat-Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber anti-CD3 induzierter Apoptose (Chlichlia *et al.*, 1995; Chlichlia *et al.*, 1997). Ferner wurde berichtet, dass Tax Caspase-abhängige Apoptose über Bindung an CBP/p300 auslösen kann (Nicot und Harrod, 2000). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Tax NF- κ B-abhängig gegen verschiedene Apoptose-Stimuli schützt (Kawakami *et al.*, 1999; Portis *et al.*, 2001; Torgeman *et al.*, 2001). Zelllinien, die Tax exprimieren, sind resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Copeland *et al.*, 1994; Zehender *et al.*, 2001). Die wichtigsten bisher beschriebenen antiapoptotischen Zielgene von Tax sind Bcl-x_L und Bcl-2, also Regulatoren des mitochondrialen Apoptosesignalweges (Nicot *et al.*, 1997; Tsukahara *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001; Saggiaro *et al.*, 2001). Sowohl die Bedeutung von Tax-induzierten Überlebens- und Todessignalen für die Transformation infizierter Zellen und die Persistenz des Virus als auch die Regulation dieser Signale sind bislang unklar.

6. Aufgabenstellung

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

Das CD95-vermittelte Todessignal wird nach Aktivierung des Rezeptors durch Anlagerung von cytosolischen Signalmolekülen übertragen. Durch Bindung des CD95-Liganden wird CD95 oligomerisiert, und es bildet sich ein Tod-induzierender Signalkomplex (engl.: DISC). Die Fähigkeit, einen DISC zu bilden, ist in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich. Typ I-Zellen bilden den DISC effizient, Typ II-Zellen dagegen zeigen nur eine geringe DISC-Bildung. Aufgrund dieser geringen DISC-Bildung sind Typ II-Zellen von Mitochondrien als Verstärker des Apoptosesignals abhängig. Deshalb lässt sich CD95-vermittelte Apoptose in Typ II-Zellen durch antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren. Ein anderer Regulator CD95-vermittelter Apoptose ist c-FLIP, ein Protein, das an den CD95-DISC rekrutiert wird und dort die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert. C-FLIP existiert in zwei Splicevarianten, c-FLIP_S und c-FLIP_L.

In dieser Arbeit sollten Mechanismen der Regulation Todesrezeptor-vermittelter Apoptose durch c-FLIP untersucht werden. In einem Modell der Restimulation primärer humaner T-Zellen wurde eine differentielle Regulation der beiden Splicevarianten c-FLIP_S und c-FLIP_L beobachtet. Daher stellte sich die Frage nach den mechanistischen Unterschieden zwischen c-FLIP_S und c-FLIP_L. Ferner sollte in einem *in vitro*-Modell der T-Zell-Aktivierung die Rolle von IL-2 als kritischer Faktor für die Sensitivierung Langzeit-aktivierter T-Zellen untersucht werden. Verschiedene Viren besitzen v-FLIPs zum Schutz vor CD95-vermittelter Apoptose. HTLV-1 dagegen vermag über das Transaktivatorprotein Tax NF- κ B zu aktivieren. Es sollte daher untersucht werden, ob HTLV-1 über diesen Mechanismus c-FLIP zum Schutz der Wirtszellen vor Todesrezeptor-vermittelter Apoptose induzieren kann.

II. Material und Methoden

1. *Material*

1.1 Chemikalien

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

1.2 Häufig verwendete Puffer

DNA-Probenpuffer (10 x):	50 % (v/v)	Glycerol
	0,42 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,42 % (w/v)	Xylencyanol
Nicolettipuffer:	0,1 % (w/v)	Natriumcitrat
	0,1 % (w/v)	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid
Lysepuffer (Eukaryonten):	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1 mM	PMSF
	10 % (w/v)	Glycerol
	1 % (w/v)	Triton X-100
	0,5 µg/ml	Antipain
	0,5 µg/ml	Chymostatin A
	0,5 µg/ml	Leupeptin
	0,5 µg/ml	Pepstatin

PBS:	137 mM	NaCl	
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄	pH = 7,4
TBE (10 x):	0,45 M	Tris	
	0,45 M	Borsäure	
	10 mM	EDTA	pH = 8,3
TE:	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	pH = 7,5
Probenpuffer reduz. (5 x):	50 % (v/v)	Glycerol	
	10 % (w/v)	SDS	
	50 mM	Tris, pH = 6,8	
	25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau	
Sammelgel (5 %):	24 mM	Tris-HCl, pH = 6,8	
	5 % (w/v)	Acrylamid	
	0,1 % (w/v)	SDS	
	0,1 % (w/v)	APS	
	0,1 % (w/v)	TEMED	
Trenngel:	37,5 mM	Tris-HCl, pH = 8,8	
	7,5-15 % (w/v)	Acrylamid	
	0,1 % (w/v)	SDS	
	0,03 % (w/v)	APS	
	0,1 % (w/v)	TEMED	
Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM	Tris-Base	
	0,19 M	Glycin	
	1 % (w/v)	SDS	

Transferpuffer:	25 mM	Tris
(Western Blot)	0,19 M	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,037 % (w/v)	SDS

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Verwendung	Referenz, Bezugsquelle
XL1 blue	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
XL10 gold	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
SuRE	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
DH5 α	Vermehrung von Plasmiden	Clontech
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen

1.3.2 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Herkunft
BJAB	EBV-negative Burkitt-ähnliche lymphoblastoide Zelllinie (human)
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie-Linie
H9	humane T-Zell-Leukämie-Linie
CEM	humane T-Zell-Leukämie-Linie
CV-1/EBNA	Nierenepithelzelllinie (Afrikanische Grüne Meerkatze)
BJAB BFL11	BJAB, FLAG-c-FLIP _L überexprimierend
Jurkat ER _{tax}	Jurkat mit ER _{tax} Fusionsprotein transfiziert (Chlichlia <i>et al.</i> , 1995)
Jurkat ER Δ _{tax}	Jurkat mit ER Δ _{tax} Fusionsprotein transfiziert (Chlichlia <i>et al.</i> , 1995)

1.4 Nährmedien

1.4.1 Medien für die Zellkultur

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

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

Folgende Antibiotika oder Zusätze wurden zur Selektion von eukaryontischen Zellen eingesetzt: Geneticin, Na-Salz (G418, Gibco BRL, Eggenstein); Puromycin (Sigma, Deisenhofen).

Jurkat ER Δ tax und Jurkat ER Δ tax wurden in RPMI 1640 Komplettmedium ohne Phenolrot kultiviert (Gibco BRL, Eggenstein).

1.4.2 Medien für Bakterien

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

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

1.5 Antikörper

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

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-APO-1 (IgG3)	CD95	(Trauth <i>et al.</i> , 1989)
C-20 (Kaninchen, polyklonal)	CD95 (AS 316-335: KDITSDSENSNFRNEIQSLV)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
FII23c (IgG3)	unbekannt	(Trauth <i>et al.</i> , 1989)
IgG1 Kontrollantikörper	unbekannt	Pharmingen, San Diego, USA
C15 (IgG2b)	Caspase-8, p18 Untereinheit	(Scaffidi <i>et al.</i> , 1997)
C5 (IgG2a)	Caspase-8, p10 Untereinheit	(Scaffidi <i>et al.</i> , 1997)
anti-FADD (IgG1)	FADD	Transduction Laborato-

anti-FADD (IgG1)	FADD	Pharmingen, San Diego, USA
NF6 (IgG1)	c-FLIP	(Scaffidi <i>et al.</i> , 1999a)
anti-Bid (44-433) (Kaninchen, polyklonal)	Bid, p15	Biosource, Camarillo, USA
anti-Cytochrom c (IgG2b)	Cytochrom c (AS 93-104)	Pharmingen, San Diego, USA
anti-Bcl-x _L (Kaninchen, polyklonal)	Bcl-x _L	Transduction Laboratories, Lexington, USA
anti-CD3 (OKT3)	CD3	(Kung <i>et al.</i> , 1979)
anti-CD3, FITC	CD3	Becton Dickinson, USA
anti-CD25, PE	CD25, IL-2R α	Becton Dickinson, USA
anti-CD69, FITC	CD69	Becton Dickinson, USA
anti-LZ (M15, IgG1)	leucine zipper	Immunex, Seattle, USA
anti-IgG, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG	Jackson, USA
anti-IgG1, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2a, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2a	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2b, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-Kaninchen, HRPO (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

1.6 Apoptosestimuli und -inhibitoren

Substanz	Hersteller/Referenz
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg
TNF α	Biomol, Hamburg
Staurosporin	Roche Pharmaceuticals, Mannheim
LZ-CD95L	(Walczak <i>et al.</i> , 1999)
LZ-TRAIL	(Walczak <i>et al.</i> , 1999)

1.7 Molekularbiologische Materialien

1.7.1 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pcDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
pEFrsFLAG	eukaryontischer Expressionsvektor mit FLAG-Epitop Tag	Dr. A. Strasser, WEHI, Australien
pcDNA3-FLAG	eukaryontischer Expressionsvektor mit FLAG-Epitop Tag	(Krueger, 1999)
pcDNA3-Myc	eukaryontischer Expressionsvektor mit Myc-Epitop Tag	(Krueger, 1999)
pEF-FLAG-c-FLIP _L	eukaryontischer Expressionsvektor für FLAG-c-FLIP _L	(Scaffidi <i>et al.</i> , 1999a)
pcDNA3-FLAG-FLIP _S	eukaryontischer Expressionsvektor für FLAG-c-FLIP _S	(Krueger, 1999)
pcDNA3-Myc-FLIP _S	eukaryontischer Expressionsvektor für Myc-c-FLIP _S	(Krueger, 1999)

1.7.2 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech und ARK Scientific bezogen.

Name	Sequenz (5'-3')
5'-c-FLIP EcoRI/SmaI	ggcgaattcATGcccgggTCTGCTGAAGTCATCCATCAGG
3'-p43 XbaI	gatctagaTCAATCCACCTCCAAGAGGCTGCTGTCC
D376N Sense	CTTGGAGGTGAATGGGCCAGCGATG
D376N Antisense	CATCGCTGGCCATTACCTCCAAG

Kleinbuchstaben bezeichnen Restriktionsschnittstellen und sonstige Nukleotid-überhänge.

1.7.3 Enzyme und Kits

Es wurden folgende Enzyme bzw. Kits verwendet:

Enzym/Kit	Bezugsquelle
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	New England Biolabs, Schwalbach
RNase (DNase frei)	Roche Pharmaceuticals, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
High Fidelity PCR Kit	Roche Pharmaceuticals, Mannheim

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

1.8 Geräte

Gerät		Hersteller
Autoradiographiehüllen		Rego
Blotapparatur Semi-Dry	20 x 25 cm	CTI
Brutschrank Stericult Inkubator		Forma Scientific
Durchflusscytometer FACScan		Becton Dickinson
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	Biorad
ELISA-Reader		SLT Labinstruments
Gefrierschränke:	-20°C	Liebherr
	-80°C	Forma Scientific
Geiger-Müller-Zählrohr 900		Series
Gelelektrophoresekammer	Horizon 11.14	Gibco BRL
Gelelektrophoresekammer	SDS-PAGE	CTI
Heizbad		Köttermann
Heizblock Thermostat 5320		Eppendorf
Mikroskope:	Lichtmikroskop ID 02	Zeiss
	Phasenkontrastmikroskop	Leitz
	Labovert FS	
Mikrowellengerät HMG730B		Bosch
Minigelelektrophoresekammer		Biorad
Netzgerät Electrophoresis Power Supply Consort 865		Renner
pH-Meter Calimatic		LHD Labor-technik
Photoeinheit:	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
	Kamera RA1	Kaiser
	Video Graphic Printer UP-860	Sony
	CE	

Photometer U-1100		Hitachi
Quarzküvetten Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsgerät Curix 160		Agfa-Gevaert
Schüttelinkubator Certomat HK		Braun
Szintillationszähler		LHD Labor- technik
Thermocycler:	GeneAmp 9700	Perkin Elmer
	DNA Engine DYAD	MJ
Vakuumrotationsverdampfer 100H		Bachofer
Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Com- pany
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Mettler
	Präzisionswaage PE 3600	Mettler
Zählkammer Neubauer		HBG
Zentrifugen:	Biofuge A	Heraeus
	Biofuge Fresco	Heraeus
	Megafuge 1.OR	Heraeus
	Omnifuge 2.ORS	Heraeus
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS, 5C PLUS	DuPont

1.9 Software

Folgende Computersoftware wurde verwendet: Microsoft Office, VectorNTI, Laser-gene, CricketGraph III, Canvas 7, CellQuest, Adobe Photoshop 4, Adobe Acrobat 4.

2. Methoden

2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung höherer Zellen erfordern sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden, und wurden daher in Zellkulturlabors an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen der Firmen Renner, Falcon (Becton Dickinson), Greiner und Nunc verwendet. Die verwendeten Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert (siehe II.1.4.1)

RPMI 1640 Medium: BJAB; Jurkat

RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot: Jurkat ER Δ tax; Jurkat ER Δ tax

RPMI 1640 Medium mit 25 U/ml IL-2: primäre humane T-Zellen

DMEM-F12 Medium: CV-1/EBNA

Transfizierte Zellen wurden mit folgenden Zusätzen kultiviert:

BJAB-Kontrolle, BJAB-FLAG-c-FLIP_L: 1 μ g/ml Puromycin

BJAB-Kontrolle, BJAB-FLAG-c-FLIP_S, BJAB-Myc-c-FLIP_S, BJAB-FLAG-p43_{mu}, BJAB-FLAG-D376N: 4 mg/ml Geneticin

BJAB-Kontrolle, BJAB-F_L/M_S: 4 mg/ml Geneticin, 1 μ g/ml Puromycin

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab

1,5 ml einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurden abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm, 20°C) und das Pellet in 500 μ l STET-Puffer (8 % Sucrose, 0,5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert. Durch Zugabe von 50 μ l Lysozym-Lösung (50 mg/ml) wurden die Bakterien 3 min bei RT ly-

siert. Danach wurde für 90 s bei 95°C inkubiert, um Proteine zu denaturieren, und der Debris abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 0,5 ml Isopropanol und 50 µl Ammoniumacetat (8 M) präzipitiert und sofort abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und danach in 30 µl TE oder sterilem Wasser gelöst. Um RNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurde 1 µl (500 µg/ml) DNase-freie RNase zugegeben.

Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab

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

2.2.2 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lässt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen schaffen 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, sodass sich bei jedem Zyklus die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen verdoppelt. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

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

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

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

2.2.3 Restriktionsspaltung von DNA

Es wurden etwa 1 - 2 µg Plasmid-DNA aus Mini- bzw. Maxipräparation mit 2 U einer Restriktionsendonuklease im vom Hersteller angegebenen enzyspezifischen Puffer

für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Fragmente konnten anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt werden.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

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

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

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

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

2.2.6 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

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

Für die Ligation wurde geschnittene Vektor-DNA mit der zu inserierenden DNA gemischt, sodass eine etwa dreifach höhere Konzentration der Insertions-DNA vorlag. Dieses Gemisch wurde in Ligationspuffer mit 2 U T4-DNA-Ligase für 1 h bei Raum-

temperatur oder für 16 h bei 14°C inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten Bakterien verwendet.

2.2.7 Transformation von Bakterien

Chemokompetente Bakterien

Durch Transformation wurde Plasmid-DNA zwecks Amplifikation in Bakterien eingebracht. Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren dienten kompetente Bakterien der *E.coli*-Stämme XL1 blue, XL10 gold oder TOP10. Für die Transformation wurden jeweils 100 µl kompetente Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und 1 - 5 µl DNA-Lösung (ca. 100 - 200 ng DNA) zugefügt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Kurzes Erhitzen auf 42°C (für 90-120 s) und zweiminütiges Abkühlen auf Eis führen zur Permeabilisierung der Bakterienzellwand für DNA. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit je 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versehen und 30 min bei 37°C zur Induktion der Antibiotikaresistenzen inkubiert. Die Selektion auf plasmidtragende Bakterien erfolgte in Petrischalen mit antibiotikahaltigem LB-Agar Ü.N. bei 37°C. Die DNA mehrerer makroskopisch sichtbarer Kolonien wurde am darauffolgenden Tag mittels Minipräparation gewonnen und zur Kontrolle des enthaltenen Plasmids einer Restriktionsanalyse unterworfen. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde schließlich in größerem Maßstab mittels Maxipräparation gewonnen und für weitere Experimente eingesetzt.

Elektrokompetente Bakterien

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden Bakterien des *E.coli*-Stammes SuRE oder DH5α verwendet. Jeweils 100 µl kompetente Bakterien wurden mit 100-200 ng Plasmid DNA gemischt. Die Transformation erfolgte im Gene Pulser (Biorad) bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF. Dann wurden die Bakterien 1 h bei 37°C in LB-Medium inkubiert und anschließend auf LB-Agar, der mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war, über Nacht kultiviert. Die Analyse positiver Klone erfolgte wie bei der chemischen Transformation.

2.2.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Ortsgerichtete Mutagenese bedeutet das spezifische Einbringen einer Mutation in eine Nukleinsäuresequenz, in diesem Falle in ein Plasmid. Hierzu wurde das QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses System basiert auf einer PCR des gesamten Plasmids mit Primern, die die einzuführende Mutation etwa in der Mitte beinhalten. Um das parentale Plasmid aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wird anschließend ein Restriktionsverdau mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease Dpn I durchgeführt, die nur das methylierte parentale Plasmid angreift. Nach Transformation und anschließender Präparation der Plasmide im Maxi-Maßstab werden die Sequenzen auf das Vorhandensein der Mutation überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab, Göttingen, durchgeführt.

Ansatz für die PCR:

5 µl	10x PCR-Puffer
1 µl	Desoxynukleotide (je 10 mM)
1 µl	Primer 1 (125 ng)
1 µl	Primer 2 (125 ng)
50 ng	Template PlasmidDNA
1 µl	<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Start		30'' bei 95°C
16 Zyklen	Denaturierung	30'' bei 95°C
	Annealing	1' bei 55°C
	Elongation	14' bei 68°C
Termination		5' bei 68°C

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Präparation primärer humaner T-Zellen

Alle Waschschrirte wurden mit sterilem PBS oder RPMI ohne FCS durchgeföhrt. 500 ml Vollblut wurden mit 1 ml Heparin (Braun, Melsungen) versetzt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Je 15 ml Ficoll (Biochrom, Berlin) wurden mit 30 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal gewaschen (1000 rpm/10 min/ 20°C/ Bremse auf Stufe 6 und 900 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 2) und in 200 ml RPMI/FCS aufgenommen. Anschließend wurden Monocyten und Macrophagen, d.h. adhärenle Zellen, depleliert, indem die Zellen auf 2 große Kulturflaschen verteilt und mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Nicht-adhärenle Zellen, d.h. die Lymphocyten, wurden abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm/10 min/20°C). Die Lymphocyten wurden mit RPMI/FCS auf 8×10^6 Zellen/ml eingestellt und 1:1 mit 2% AET-Erythrocyten (s.u.) gemischt (Rosettierung). Das Gemisch wurde zentrifugiert (1000 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 2), der Überstand bis auf 20 ml abgenommen und das Pellet (Rosetten) vorsichtig wieder resuspendiert. Die Rosetten wurden auf 15 ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Das Pellet aus T-Zellen und Erythrocyten wurde gewaschen (1200 rpm/10 min/20°C), und dann die Erythrocyten mit dem vierfachen Volumen (bezogen auf das Pellet) an ACK-Puffer (frisch verdünnt aus 10 x Puffer: 41,45g NH_4Cl , 5g KHCO_3 , 0,186g EDTA, pH 7,27 ad 500 ml Wasser) lysiert. Dazu wurden Pellet und ACK-Puffer durch Pipettieren bis zur Lyse vermischt. Die Lyse der Erythrocyten zeigt sich durch einen Farbumschlag von trüb-hellrot nach klar-dunkelrot. Dann wurde mit RPMI/FCS auf 50 ml aufgefüllt und die T-Zellen mit RPMI/FCS auf 2×10^6 /ml eingestellt. Anschließend wurde mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA-P über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit 25-30 U/ml Interleukin-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

AET-Erythrozyten

Alle Zentrifugationen wurden bei 1200 rpm für 10 min bei 20 °C durchgeführt. 0.5 g 2-Aminoethylisothiuroniumbromid (AET, Sigma) wurden in 12,5 ml pyrogenfreiem Wasser bei pH 9,0 (mit 2N NaOH einstellen) gelöst und sterilfiltriert.

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

2.3.2 Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen

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

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

2.3.3 Messung proliferierender Zellen (CFSE)

Die Messung der Zellproliferation mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-(und 6)-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester (CFSE, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, Molecular Probes) beruht auf der Verdünnung des Farbstoffs und damit der Abnahme der Fluoreszenzintensität durch die Teilung der Zellen. Zunächst nicht fluoreszierendes CFSE diffundiert passiv in die zu markierenden Zellen, wo es durch Esterase-Spaltung in einen stark fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird. In der Zelle reagiert es mit freien Aminen von Proteinen, was den Zellaustritt verhindert. 10^7 Zellen werden zwecks Entfernung von FCS einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CFSE werden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Markierung wird durch Zugabe von 1 ml FCS und anschließend 50 ml PBS gestoppt. Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und wieder in Kultur genommen. Die Analyse erfolgt im FACScan (Becton Dickinson) durch Detektion der Fluoreszenz im grünen Bereich (FL-1).

2.3.4 Messung apoptotischer Zellen (Nicoletti *et al.*, 1991)

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

2.3.5 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials beruht auf membrangängigen kationischen Fluoreszenzfarbstoffen, die sich spezifisch in Mitochondrien anreichern, wenn deren Transmembranpotential intakt ist. Eine hohe Fluoreszenzintensität zeigt also eine intakte, lebende Zelle an. Während der Apoptose bricht das mitochondrielle Transmembranpotential zusammen, sodass sich die Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr in den Mitochondrien anreichern. JC-1 besitzt zusätzlich die Eigenschaft, bei hohen Konzentrationen Aggregate zu bilden, sogenannte J-Aggregate. Diese fluoreszieren bei 590 nm, wohingegen das monomere JC-1 bei 527 nm fluoresziert. Apoptotische Zellen zeigen daher gegenüber lebenden Zellen eine Abnahme in Fluoreszenz-2 (FL-2) und eine Zunahme in Fluoreszenz-1 (FL-1) des FACScans. Der spezifische Verlust $\Delta\Psi_M$ wurde analog der in 2.3.5 beschriebenen Formel berechnet.

Färbung mit JC-1

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

2.3.6 Transfektion von Zellen

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

misch zugegeben. Nach Inkubation für 4,5 h im Brutschrank wurde das Chloroquin-Medium entfernt und die Zellen mit DMEM/FCS/10% DMSO für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DMSO-Medium abgenommen und die Zellen in DMEM-F12 kultiviert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und damit auch abgestorbene Zellen entfernt.

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

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

2.3.7 Präparation von cytosolischen Extrakten

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

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

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 ELISA

Der ELISA (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay) dient der Immunodetektion von Proteinen in Lösung, in diesem Falle der Bestimmung der Interleukin-2- bzw. der LZ-CD95L-Konzentration im Zellkulturüberstand.

Zur Bestimmung der Konzentration von LZ-CD95L wurde der Zellkulturüberstand direkt für 24 h bei 4°C in 96-Lochplatten (Falcon) inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit TPBS (0,05% Tween-20 in PBS) gewaschen und für 1 h mit RPMI 1640/10% FCS geblockt. LZ-CD95L wurde mit Hilfe des anti-LZ mAk M15 (Immunex, Seattle, USA) detektiert (Inkubation von 1 µg/ml M15 für 1 h bei RT). Als Zweitantikörper diente nach dreimaligen Waschen der Platte anti-Maus IgG-HRPO 1:5000 (1 h, RT). Nach weiterem dreimaligen Waschen wurde der ELISA mittels einer Farb-reaktion (0,4 mg/ml o-Phenylendiamin (OPD, Sigma) in Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0 mit 0,012 % H₂O₂, 10 - 30 Minuten RT, Abstoppen mit 0,5 Vol. 2 N H₂SO₄) im ELISA-Reader (λ = 490 nm) analysiert. Zur Kalibrierung diente aufgereinigtes LZ-CD95L definierter Konzentration.

Interleukin-2 wurde mit dem OptEIA™ Human IL-2 Set (Pharmingen) bestimmt, das auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip basiert. 96-Lochplatten wurden mit dem Capture-Antikörper (1:250 in Coating-Puffer (0,1 M Carbonat, pH 9,5)) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Platten dreimal mit TPBS gewaschen und für 1 h mit PBS/10 % FCS geblockt. Nach wiederholtem Waschen wurden die Platten mit den Proben und einem Standard (rekombinantes humanes IL-2 von 7,8 bis 500 pg/ml) für 2 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgt die Inkubation der Platten mit einer Kombination aus Detection-Antikörper (anti-IL-2-Biotin, 1:250) und Avidin-HRPO (1:250) in PBS/10 % FCS. Nach 1 h bei RT wurde siebenmal gewaschen und die Platte für 30 Minuten bei RT mit Tetramethylbenzidine-Substrat-Reagenz (Pharmingen) inkubiert. Die Substratreaktion wurde mit 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Analyse erfolgte im ELISA-Reader (λ = 450 nm). Internationale Einheiten (international units, IU) berechnen sich wie folgt: 0,0096 IU/ml = 1 pg/ml.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

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

2.4.3 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen wurde ein "Semidry"-Verfahren eingesetzt. Dazu wurden die Graphitelektroden der Blotkammer (Pharmacia, Freiburg) mit Transferpuffer befeuchtet. Darauf wurden drei Lagen mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und fünf Lagen befeuchtete Filterpapiere gebracht. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² 90 min lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1 h mit 5 % (w/v) Milchpulver oder 2 % (w/v) BSA in TPBS (0,05 % Tween-20 in PBS) bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Blot wurde dreimal mit TPBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in TPBS verdünnt (Hybridomüberstand: 1:5 - 1:20

Verdünnung und aufgereinigte Antikörper: 0,1-1,0 µg/ml) und der Blot unter Schütteln für 16 h bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Danach wurde dreimal je 10 min mit TPBS gewaschen. Anschließend wurde ein Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20 000 in TPBS oder 1:5 000 in 1 % Milchpulver, je nach Anwendung) für 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend der Blot dreimal je 10 min mit TPBS gewaschen. Gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (Renaissance-Kit, NEN, Bad Homburg v.d.H.) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

2.4.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

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

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

2.4.5 Kopplung von Antikörpern an Sepharose

Um Antikörper für die Immunpräzipitation kovalent an Sepharose zu immobilisieren, wurden diese zunächst über Nacht gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8,9) dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Cyanbromid (CNBr)-aktivierte Sepharose zur

Aktivierung mit 20 ml 1 mM HCl für 15 min über Kopf bei RT gerührt, zentrifugiert (600 x g, 1 min) und dann der Überstand abgesaugt. Die aktivierte Sepharose wurde mit dem Antikörper für 2 h bei RT über Kopf gerührt, der ungebundene Antikörper gewaschen und nicht abgesättigte CNBr-Gruppen durch erneutes Rühren für 2 h mit 0,1 M Tris/HCl (pH 8) inaktiviert. Anschließend wurde die Sepharosematrix je dreimal abwechselnd mit 0,1 M Natriumazetat/0,5 M NaCl (pH 4) und 0,1 M Tris/HCl/0,5 M NaCl (pH 8) gewaschen. Schließlich wurde die Sepharose in PBS mit 0,1 % Natriumazid und 1 mM PMSF aufgenommen, so daß eine 50 %ige Suspension entstand.

2.4.6 Immunpräzipitation

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

2.4.7 DISC-Analyse

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

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

2.4.8 In vitro-Caspase-8-Spaltung

Caspase-8/a cDNA wurde *in vitro* mit dem T7-Polymerase-Retikulozytenlysatsystem (TNT, Promega) translatiert. Für das *in vitro*-Spaltungsexperiment wurde der CD95-DISC von 5×10^7 unmarkierten Zellen immunpräzipitiert. Dann wurde das Immunpräzipitat in 50 µl Reaktionspuffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 0,1 % CHAPS; 100 mM NaCl; 100 mM DTT und 20 % Saccharose) 24 h bei 4°C mit *in vitro* translaterter Caspase-8/a inkubiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrocellulosemembranen (Hybond ECL, Amersham) geblottet. Die Membranen wurden getrocknet und autoradiographiert.

III. Ergebnisse

1. *Splicevarianten von c-FLIP inhibieren verschiedene Schritte der Caspase-8-Aktivierung am CD95-DISC*

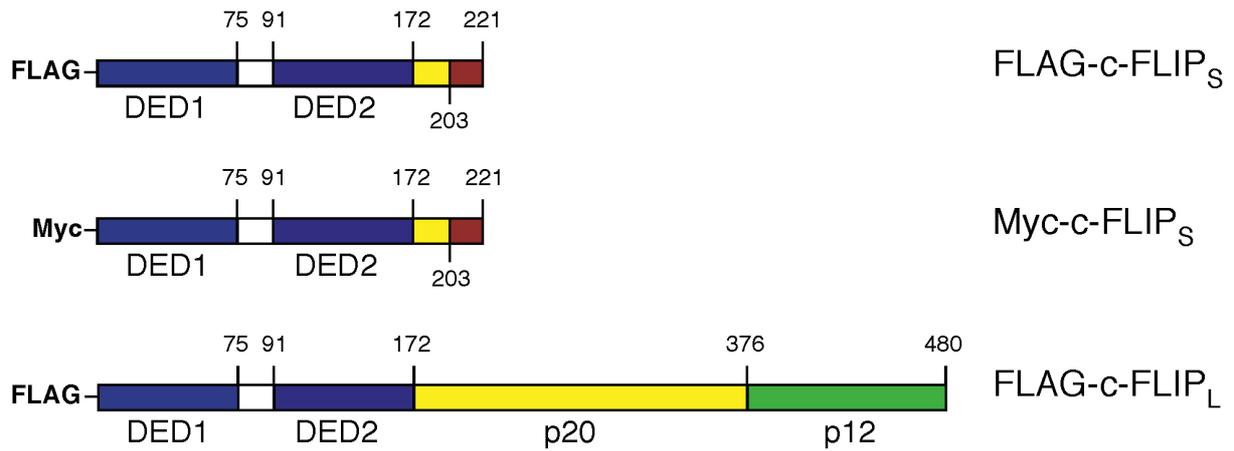
Der Mechanismus der Inhibition der Caspase-8-Aktivierung durch c-FLIP_L ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Sowohl Procaspase-8 als auch c-FLIP_L werden an den CD95-DISC rekrutiert und initial gespalten. Die die Prodomänen enthaltenden Spaltprodukte von Caspase-8 und c-FLIP_L (p43/41-Caspase-8 bzw. p43-c-FLIP) verbleiben am DISC und verhindern die Rekrutierung weiterer Zymogene. Der cytoplasmatische Pool von Procaspase-8 bleibt somit inaktiv, und die Zelle wird resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Scaffidi *et al.*, 1999a). Der inhibitorische Mechanismus von c-FLIP_S ist bisher unbekannt. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass c-FLIP_S, aber nicht c-FLIP_L, T-Zellen vor Aktivierungs-induziertem Zelltod nach Restimulation oder Kostimulation schützt (Kirchhoff *et al.*, 2000a; Kirchhoff *et al.*, 2000b). Aus diesem Grunde sollte der Mechanismus der Funktion von c-FLIP_S, insbesondere im Vergleich zu dem von c-FLIP_L, untersucht werden.

1.1 **c-FLIP_S inhibiert Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in BJAB-Zellen**

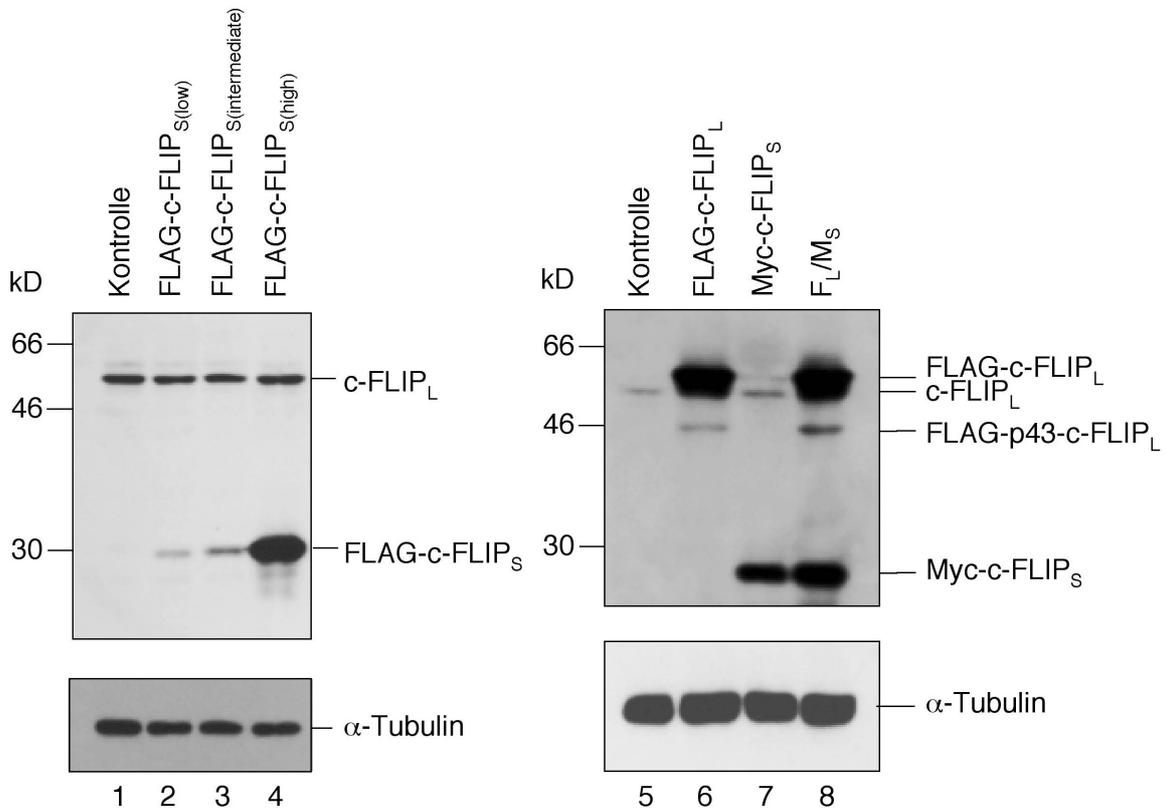
Um die Mechanismen der Apoptose-Inhibition durch c-FLIP_S und c-FLIP_L zu untersuchen, wurden BJAB-Zellen stabil mit Expressionsvektoren für N-terminal getaggtetes FLAG-c-FLIP_S, N-terminal getaggtetes Myc-c-FLIP_S, N-terminal getaggtetes FLAG-c-FLIP_L allein oder in Kombination mit Myc-c-FLIP_S (F_L/M_S) (Abb. III.1.1A) transfiziert. Klone mit verschiedenen Expressionsniveaus von FLAG-c-FLIP_S (Abb. III.1.1B, links) und solche mit hohem Expressionsniveau von Myc-c-FLIP_S, FLAG-c-

FLIP_L bzw. beidem (F_L/M_S) (Abb. III.1.1B, rechts) wurden mittels Western Blot identifiziert.

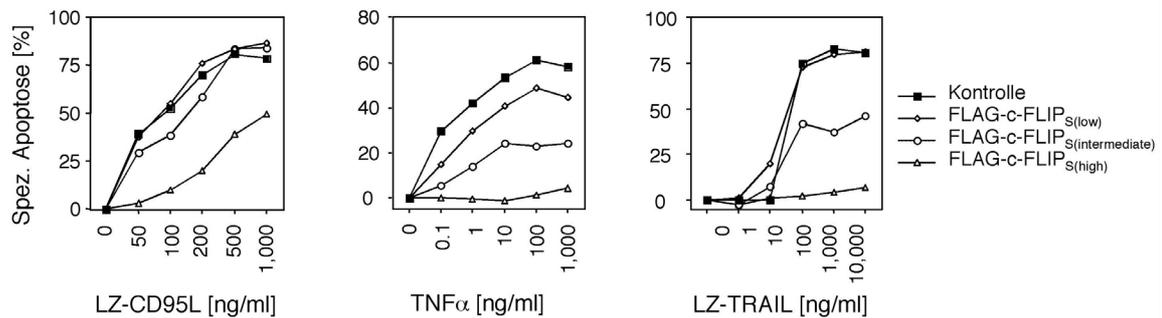
A



B



C



D

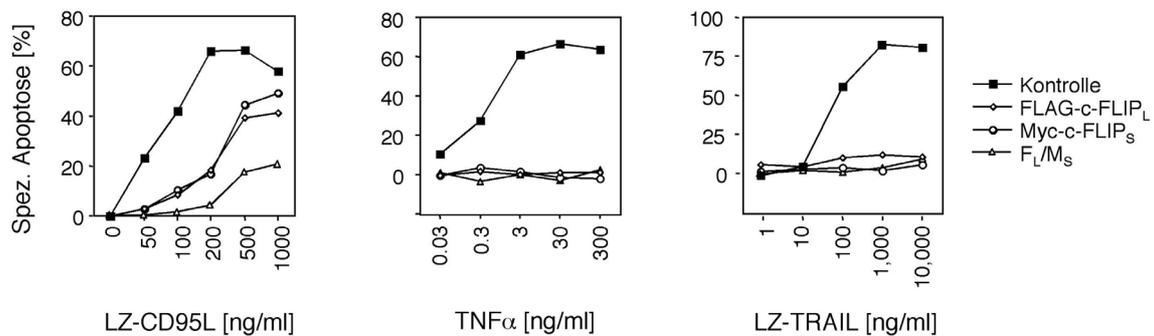


Abb. III.1.1: c-FLIPs inhibieren CD95-vermittelte Apoptose in BJAB-Zellen. A, Überblick über die zur stabilen Überexpression genutzten Expressionskonstrukte mit Nummerierung der Aminosäuren. B, Western Blot-Analyse von Lysaten stabil transfizierter BJAB-Zellen. Bahn 1 und 5: Vektor-transfizierte Zellen (Kontrolle); Bahn 2-4: FLAG-c-FLIP_S; Bahn 6: FLAG-c-FLIP_L; Bahn 7: Myc-c-FLIP_S, Bahn 8: FLAG-c-FLIP_L und Myc-c-FLIP_S (F_L/M_S). Die getaggten Proteine laufen im Vergleich zu den endogenen mit reduzierter Geschwindigkeit. C, Die in B beschriebenen BJAB-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von LZ-CD95L, TNF α oder LZ-TRAIL für 16 h inkubiert. Apoptose wurde durch die Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt. D, Die in B beschriebenen BJAB-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von LZ-CD95L, TNF α oder LZ-TRAIL für 16 h inkubiert. Apoptose wurde wie in C bestimmt.

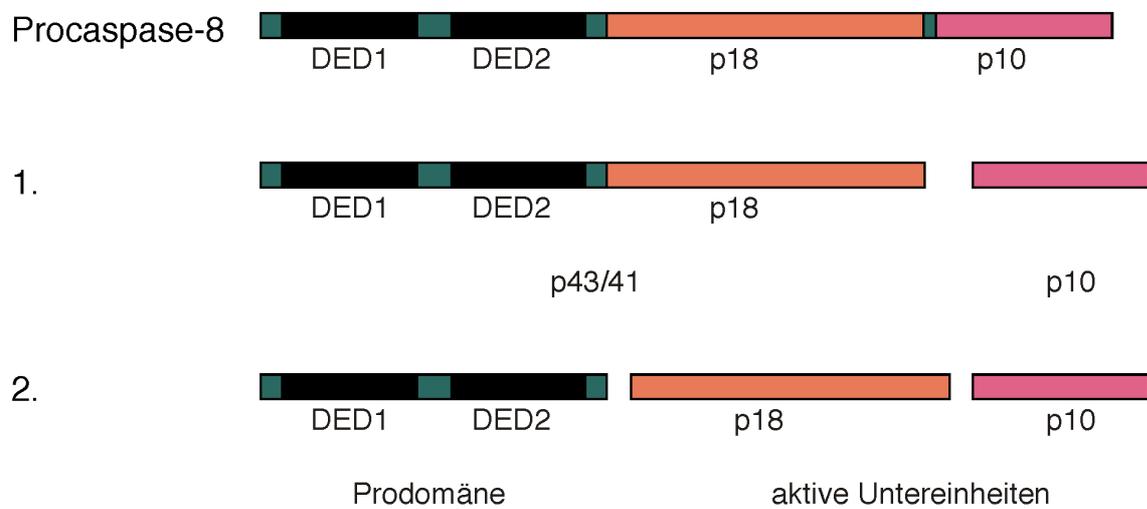
Um klonale Effekte auszuschließen, die aus unterschiedlicher Expression der untersuchten Todesrezeptoren resultieren könnten, wurde die Oberflächenexpression von TRAIL-R1, -R2, -R3, -R4, TNF-R1 und CD95 untersucht. Ferner wurde die Expression von Procaspase-8 und FADD in den analysierten Klonen bestimmt. Die Expressionsmuster der untersuchten Proteine erwiesen sich in allen Fällen als vergleichbar (nicht gezeigt). Die Funktionalität der transfizierten c-FLIP Proteine wurde durch Analyse der Sensitivität der verschiedenen BJAB-Klone gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose getestet. Überexpression von c-FLIP_S führte zur Resistenz von Zellen gegenüber Leuzin-Zipper (LZ)-CD95L-, TNF α - und TRAIL-induzierter

Apoptose. Die Resistenz korrelierte direkt mit dem Expressionsniveau von c-FLIP_S (Abb. III.1.1C). Zur Kontrolle der Apoptose-Sensitivität gegenüber einem Todesrezeptor-unabhängigen Stimulus, wurden die Zellen mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin behandelt. Alle c-FLIP überexprimierenden Klone zeigten eine mit den Kontrollklonen vergleichbare Sensitivität (nicht gezeigt, vgl. auch (Kataoka *et al.*, 1998)). Überexpression von sowohl c-FLIP_S als auch c-FLIP_L erhöhte die Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose additiv (Abb. III.1.1D). In diesen Doppelttransfektanten waren TRAIL- und TNF α -vermittelte Apoptose vollständig inhibiert. Möglicherweise war der CD95-DISC in den entweder c-FLIP_S oder c-FLIP_L allein überexprimierenden Klonen noch nicht gesättigt, während dieses für die TRAIL-R- und TNF-R1-Systeme aufgrund geringerer Rezeptorexpression bereits in den Einzeltransfektanten der Fall war (Kataoka *et al.*, 2002).

1.2 Vollständige Inhibition der Spaltung von Caspase-8 durch c-FLIP_S

Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus von c-FLIP_S wurde die Aktivierung von Caspase-8 als einem der frühen Ereignis nach Stimulation von CD95 analysiert. Abbildung III.1.2A zeigt vereinfacht schematisch die proteolytische Prozessierung von Procaspase-8 am DISC. In Vektor-transfizierten Kontrollzellen wurde eine vollständige Prozessierung von Caspase-8 beobachtet, und die beiden das aktive Heterotetramer bildenden Untereinheiten p10 und p18 wurden 10 bis 30 min nach Stimulation mit LZ-CD95L detektiert (Abb. III.1.2B, Bahn 3). Im Gegensatz dazu war die Bildung der aktiven Untereinheiten in c-FLIP_S-überexprimierenden Zellen vollständig blockiert. Weder die p18- noch die p10-Untereinheit konnten detektiert werden. Ungespaltene Procaspase-8 blieb über den Zeitraum von 3 Stunden konstant nachweisbar (Abb. III.1.2B, Bahn 18). C-FLIP_L-überexprimierende Zellen zeigten keine Bildung der p18-Untereinheit und nur geringe Mengen der p10-Untereinheit von Caspase-8 (Abb. III.1.2B, Bahnen 7-12). Das heißt, Überexpression von c-FLIP_L erlaubt lediglich die Bildung von p43/41-Caspase-8, die am DISC verbleibt und die weitere Rekrutierung von Procaspase-8 aus dem Cytosol

A



B

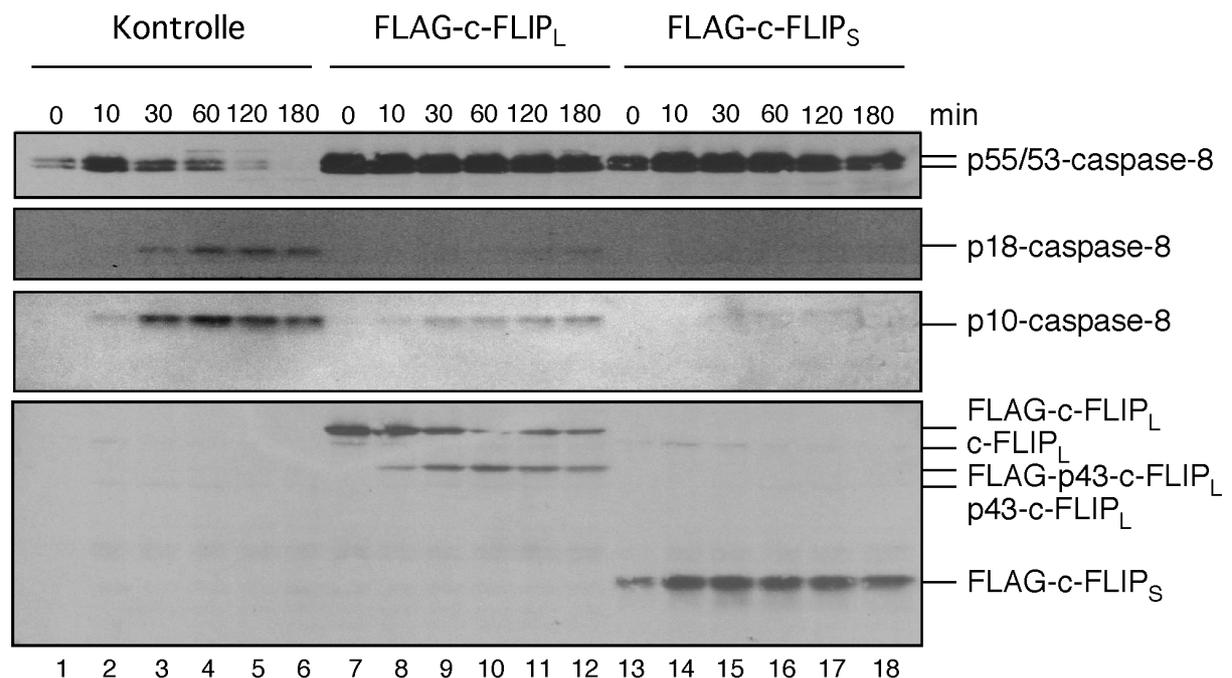


Abb. III.1.2: Unterschiede in der Caspase-8-Spaltung nach CD95-Stimulation in Anwesenheit von c-FLIP_S oder c-FLIP_L. A, Vereinfachtes Modell der Prozessierung von Procaspase-8. Die Spaltung von Procaspase-8 vollzieht sich in zwei aufeinanderfolgenden Schritten: Zunächst bilden sich die p10- und die p43/41-Untereinheiten (1.); Anschließend werden p43/41 weiter in die Prodomänen und die p18-Untereinheit umgesetzt (2.). B, Kinetik der Prozessierung von Procaspase-8 und c-FLIP_L in BJAB-Zellen, die entweder FLAG-c-FLIP_L (Bahn 7-12) oder FLAG-c-FLIP_S (Bahn 13-18) stabil überexprimieren (vgl. Abb. III.1.1B). Als Kontrolle dienen mit leerem Vektor transfizierte BJAB-Zellen (Bahn 1-6).

verhindert. In ähnlicher Weise wie Procaspase-8 wird auch c-FLIP_L am DISC entweder von Procaspase-8 oder p43/41-Caspase-8 gespalten (Abb. III.1.2B, Bahnen 8-12). Beide c-FLIP Splicevarianten verhindern die Bildung aktiver Caspase-8. Allerdings zeigt sich ein Unterschied dahingehend, dass c-FLIP_S die Prozessierung von Procaspase-8 vollständig blockiert, während c-FLIP_L die initiale Spaltung von Procaspase-8 in die p43/41- und p10-Untereinheiten zulässt.

1.3 Vollständige Inhibition der DISC-Aktivität durch c-FLIP_S

Da sowohl Procaspase-8 als auch c-FLIP_S an den CD95-DISC rekrutiert werden,

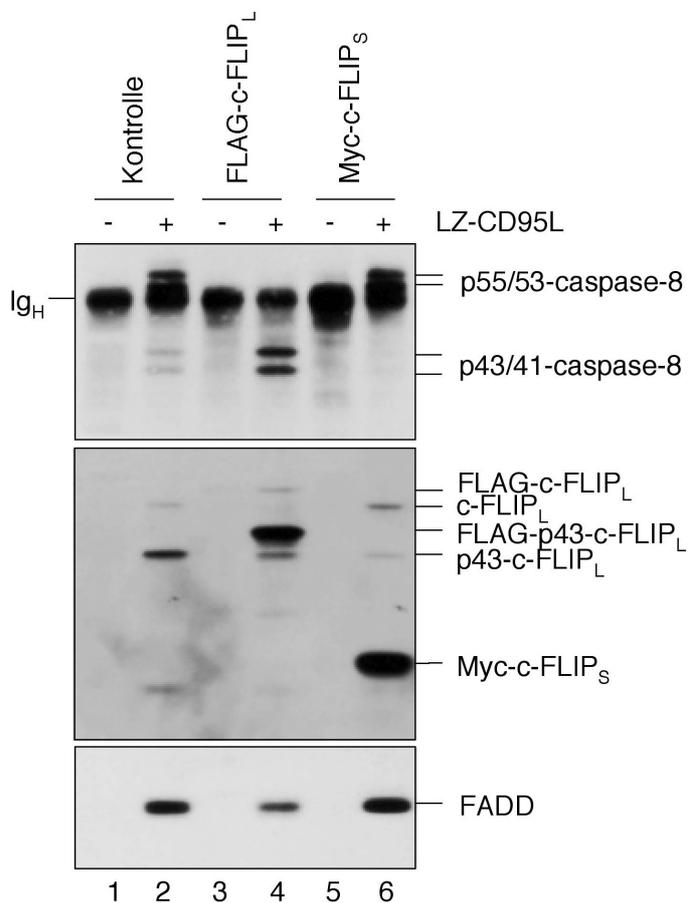


Abb. III.1.3: Unterschiede in der Procaspase-8-Prozessierung in Anwesenheit von c-FLIP_S oder c-FLIP_L am DISC. DISC-Analyse von BJAB-Zellen mit leerem Vektor (Kontrolle, Bahn 1 und 2), FLAG-c-FLIP_L (Bahn 3 und 4) oder Myc-c-FLIP_S (Bahn 5 und 6) transfiziert. Die Stimulation erfolgte mit 10 µg LZ-CD95L (+); (-): unstimulierte Zellen.

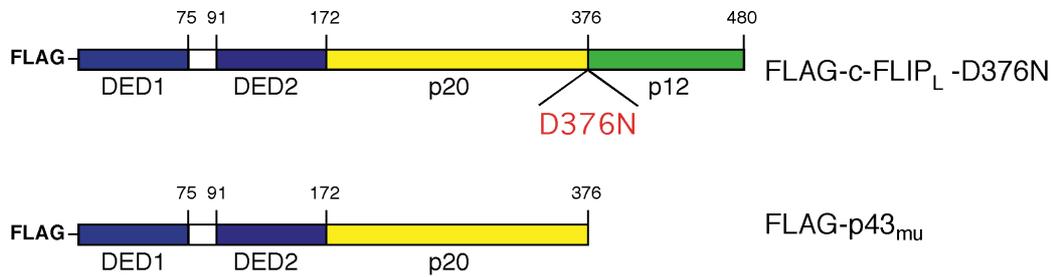
wurde vermutet, dass Procaspase-8 in Anwesenheit von c-FLIP_S entweder nicht an den DISC rekrutiert wird oder zwar rekrutiert, aber nicht prozessiert werden kann. Um beide Hypothesen zu testen, wurde der DISC mittels Immunpräzipitation aus CD95-stimulierten und -unstimulierten c-FLIP_S- oder c-FLIP_L-überexprimierenden und Kontroll-BJAB Zellen analysiert. Die an den DISC rekrutierten Spaltprodukte von Caspase-8 wurden anschließend im Western Blot detektiert. Der DISC aus c-FLIP_S-überexprimierenden Zellen enthielt ausschließlich unprozessierte Procaspase-8 (Abb. III.1.3, Bahn 6). Wie schon in den Zell-Lysaten beobachtet (Abb. III.1.2B) war auch die

Spaltung von c-FLIP_L am DISC deutlich reduziert. Dagegen verhinderte die Überexpression von c-FLIP_L nicht die Bildung von p43/41-Caspase-8, was die Detektion der p10-Unterheit in den Zell-Lysaten erklärt (Abb. III.1.3, Bahn 4). Die Rekrutierung des Adaptors FADD wurde durch c-FLIP_S oder c-FLIP_L nicht moduliert. Zusammengefasst bedeutet das, dass c-FLIP_S die Spaltung von Procaspase-8 am DISC inhibiert, während c-FLIP_L die weitere Prozessierung des initialen p43/41-Caspase-8-Spaltprodukts verhindert.

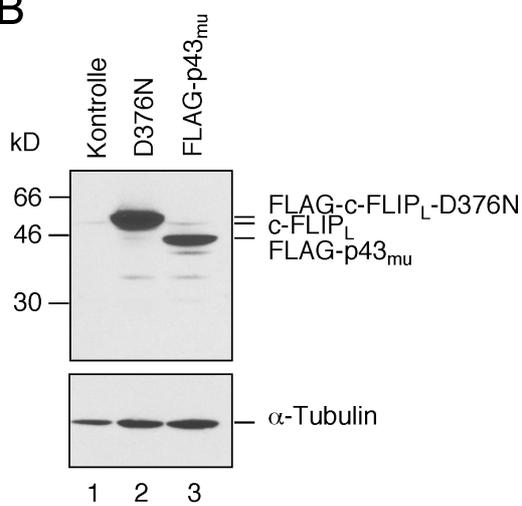
1.4 Der initiale Spaltungsschritt von Caspase-8 am DISC wird durch c-FLIP_L ermöglicht

Die Tatsache, dass das p43-Spaltprodukt von c-FLIP_L den Hauptteil des am DISC detektierbaren c-FLIP_L ausmacht (Abb. III.1.3 und (Scaffidi *et al.*, 1999a)), ließ vermuten, dass die Spaltung im inhibitorischen Mechanismus von c-FLIP_L eine wichtige Rolle spielt. Um den molekularen Mechanismus von c-FLIP_L auf diese Hypothese hin näher zu untersuchen, wurden Expressionsvektoren für mutierte N-terminal FLAG-getaggte c-FLIP_L-Proteine hergestellt, die entweder nach Aspartat 376 enden und also dem p43-Spaltprodukt entsprechen (FLAG-p43_{mu}), bzw. eine defekte Spaltstelle durch Mutation des kritischen Aspartat 376 an P₁ in Asparagin enthalten (FLAG-D376N) (Abb. III.1.4A). Stabil transfizierte, diese Proteine überexprimierende BJAB Klone wurden durch Western Blot-Analyse identifiziert (Abb. III.1.4B). Sowohl stabile Überexpression des FLAG-getaggten p43-c-FLIP_L (FLAG-p43_{mu}) als auch des FLAG-getaggten nicht-spaltbaren c-FLIP_L (FLAG-D376N) führte zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Abb. III.1.4C). Folglich stellen beide Mutanten anti-apoptotische Proteine dar, woraus zu schließen ist, dass die Spaltung von c-FLIP_L für den inhibitorischen Mechanismus nicht essentiell ist.

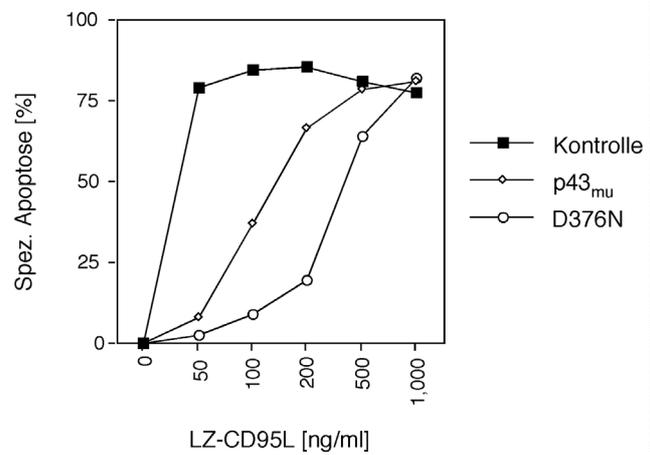
A



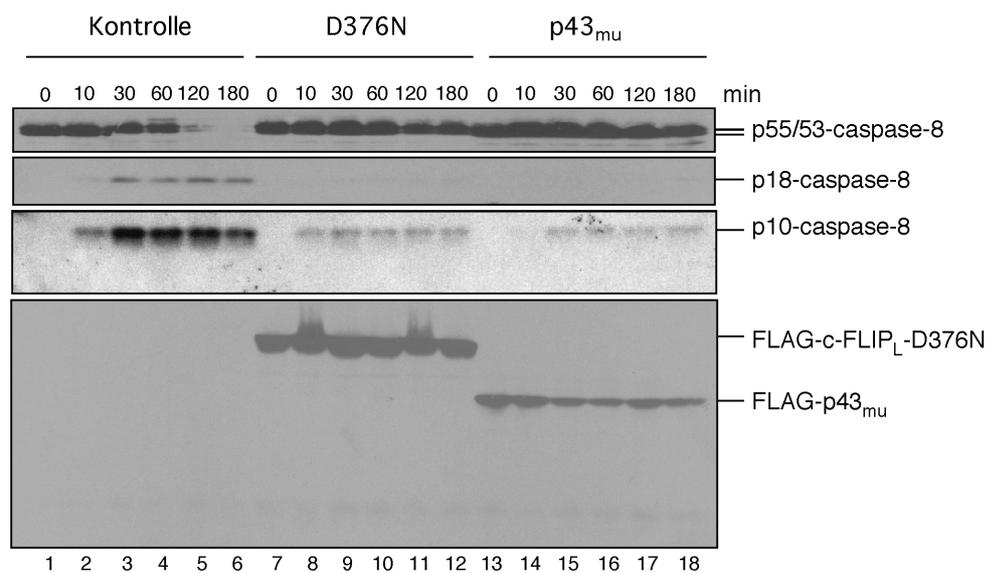
B



C



D



E

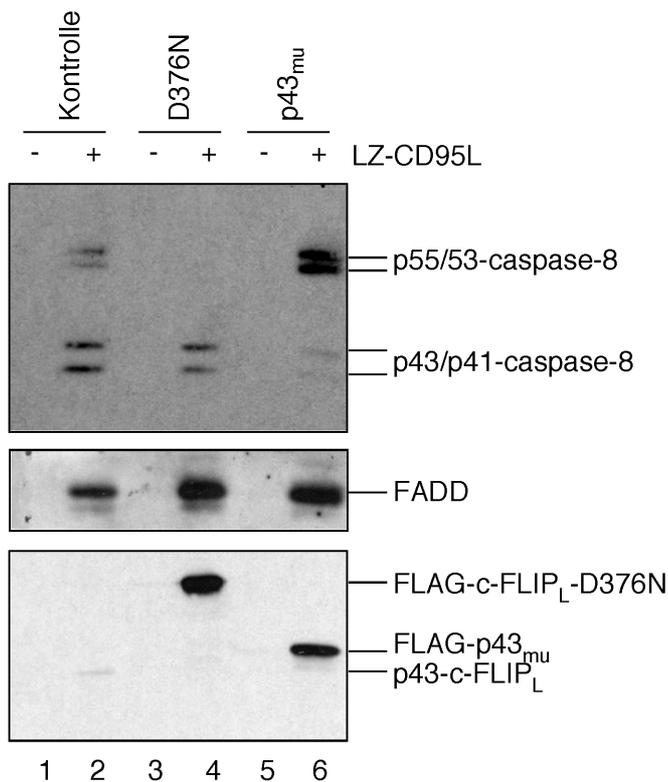


Abb. III.1.4: Die Prozessierung von Procaspase-8 ist abhängig von unprozessiertem c-FLIP_L. *A*, Übersicht über FLAG-c-FLIP-Expressionkonstrukte, die entweder für unprozessierbares c-FLIP_L (D376N) oder gespaltenes c-FLIP_L (p43_{mu}) codieren. *B*, Western Blot-Analyse von Lysaten stabil transfizierter BJAB-Zellen. Bahn 1: Vektor-transfizierte Zellen (Kontrolle); Bahn 2: FLAG-c-FLIP_L-D376N (D376N); Bahn 3: FLAG-p43-c-FLIP_L (p43_{mu}). *C*, Die in *B* beschriebenen BJAB-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von LZ-CD95L für 16 h inkubiert. Apoptose wurde durch Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt. *D*, Kinetik der Prozessierung von Procaspase-8 und c-FLIP_L in BJAB-Zellen, die entweder D376N (Bahn 7-12) oder p43_{mu} (Bahn 13-18) stabil überexprimieren. Kontrolle: BJAB-Zellen, mit leerem Vektor transfiziert (Bahn 1-6). *E*, DISC-Analyse von BJAB-Zellen aus *A-D*: Vektor (Kontrolle, Bahn 1 und 2), D376N (Bahn 3 und 4) oder p43_{mu} (Bahn 5 und 6). Die Stimulation erfolgte mit 10 µg LZ-CD95L (+); (-): unstimulierte Zellen.

Um den Punkt zu bestimmen, an welchem die mutierten c-FLIP_L-Konstrukte die Prozessierung von Procaspase-8 inhibierten, wurde die Procaspase-8-Spaltung nach CD95-Stimulation untersucht. In Vektor-transfizierten Kontrollzellen wurde eine vollständige Prozessierung von Caspase-8 beobachtet, und die beiden das aktive Heterotetramer bildenden Untereinheiten p10 und p18 waren detektierbar (Abb. III.1.4D, Bahnen 1-6). In FLAG-p43_{mu} überexprimierenden Zellen war die Bildung der

p10-Untereinheit von Procaspase-8 verzögert und nach 10 min nicht detektierbar (Abb. III.1.4D, Bahn 14). Dagegen wurde Procaspase-8 in den FLAG-D376N überexprimierenden Zellen innerhalb von 10 min in die p43/41- und p10-Untereinheiten gespalten (Abb. III.1.4D, vergleiche Bahnen 8 und 14). Die p18-Untereinheit wurde weder in Anwesenheit von FLAG-p43_{mu} noch von FLAG-D376N gebildet (Abb. III.1.4D). Die Überexpression der beiden mutierten c-FLIP_L-Proteine resultiert folglich in der Inhibition der Procaspase-8-Spaltung an verschiedenen Punkten. Um diese näher zu untersuchen, wurde der CD95-DISC aus Kontrollzellen und den die mutierten c-FLIP_L-Proteine überexprimierenden Zellen im Hinblick auf mit dem DISC assoziierte Caspase-8-Spaltprodukte analysiert. Während in den Kontrollzellen sowohl Procaspase-8 als auch das initiale p43/41-Spaltprodukt im DISC detektiert werden konnten, wurde am DISC der FLAG-D376N überexprimierenden Zellen nur das p43/41-Spaltprodukt gefunden (Abb. III.1.4E). Damit ähnelt diese Zusammensetzung dem DISC aus c-FLIP_L-Wildtyp überexprimierenden Zellen (Abb. III.1.3). FLAG-p43_{mu}-Expression verhinderte die Bildung von p43/41-Caspase-8 am DISC, der damit dem aus c-FLIP_S hoch exprimierenden Zellen ähnelt (Abb. III.1.4E, vgl. Abb. III.1.3). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den in Zell-Lysaten beobachteten Unterschieden (Abb. III.1.4D) und lässt darauf schließen, dass zwar die Anwesenheit des vollständigen c-FLIP_L, nicht aber dessen Spaltung für den initialen Spaltungsschritt von Procaspase-8 bei einem hohen Expressionsniveau von c-FLIP_L notwendig ist.

1.5 c-FLIP_L und c-FLIP_S koexistieren in derselben DISC-Spezies

Da die hohe Expression von c-FLIP_L und c-FLIP_S die Prozessierung von Procaspase-8 auf verschiedenen Stufen inhibiert, wurde anschließend untersucht, ob eine Splicevariante die jeweils andere von der Rekrutierung an einen individuellen Komplex ausschloss. Daher wurde FLAG-c-FLIP_L aus LZ-CD95L-stimulierten FLAG-c-FLIP_L und Myc-c-FLIP_S exprimierenden BJAB-Zellen (F_L/M_S) immunpräzipitiert, um diejenigen individuellen DISCs zu isolieren, an welche FLAG-c-FLIP_L rekrutiert wurde. Diese DISCs wurden im Western Blot hinsichtlich der Anwesenheit von Myc-c-FLIP_S analysiert. Die Immunpräzipitation des DISC über FLAG-c-FLIP_L resultierte in der Co-Immunpräzipitation von Myc-c-FLIP_S in den Doppeltransfektanten (Abb. III.1.5, Bahn 6). Zusätzlich wurde der DISC aus diesen Zellen durch Immunpräzipita-

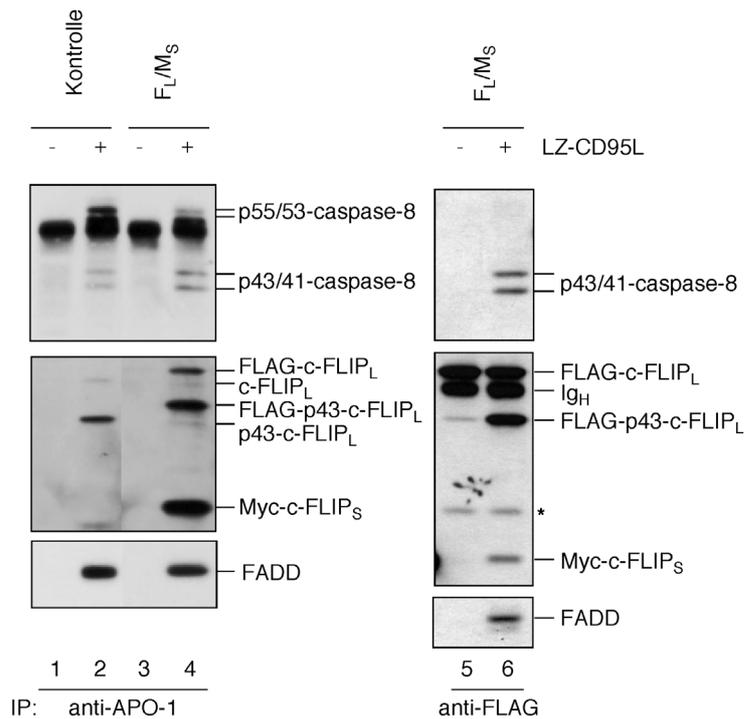


Abb. III.1.5: c-FLIP_L und c-FLIP_S koexistieren in derselben DISC Spezies. DISC-Analyse von stabil transfizierten BJAB-Zellen. Vektor- (Kontrolle, Bahn 1 und 2) oder FLAG-c-FLIP_L und Myc-c-FLIP_S (F_L/M_S, Bahn 3-6) transfizierte Zellen wurden mit 10 µg LZ-CD95L (+) oder nicht (-) stimuliert. Der DISC wurde entweder mittels anti-APO-1 (Bahn 1-4) oder mittels anti-FLAG Antikörpern (Bahn 5 und 6) präzipitiert. Der (*) bezeichnet eine unspezifische Bande.

tion via CD95 wie oben beschrieben isoliert (Abb. III.1.5, Bahnen 3 und 4). Beide Splicevarianten wurden an den DISC rekrutiert, und die Rekrutierung von FADD entsprach der der Kontrolltransfektanten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach CD95-Stimulation c-FLIP_S und c-FLIP_L an einem individuellen DISC koexistieren können, wobei aus technischen Gründen nicht ausgeschlossen werden kann, dass DISCs existieren, die ausschließlich eine Splicevariante enthalten.

2. Ein Interleukin (IL)-2-abhängiger Wechsel der CD95-Signalwege von Typ II nach Typ I sensitiviert primäre humane T-Zellen für den Aktivierungs-induzierten Zelltod

2.1 Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind resistente CD95-Typ II-Zellen

Verschiedene Studien zeigen, dass Langzeit-aktivierte T-Zellen die Expression von c-FLIP im Vergleich zu Kurzzeit-aktivierten reduzieren (Irmmler *et al.*, 1997b; Refaeli *et al.*, 1998; Algeciras-Schimmich *et al.*, 1999). Dieses wurde mit der Sensitivierung für den AICD korreliert. Im Gegensatz dazu fanden Scaffidi *et al.* (1999) keine Modulation des c-FLIP_L-Expressionsniveaus, dagegen aber Unterschiede in der DISC-Bildung. Während Langzeit-aktivierte T-Zellen große Mengen an CD95-DISC bilden, ist in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen ein DISC trotz vergleichbarer CD95-Oberflächenexpression kaum detektierbar. Dieser Befund lässt die Vermutung zu, dass primäre humane T-Zellen einen Wechsel vom CD95-Typ II- zum CD95-Typ I-Signalweg durchlaufen. Typ II-Zellen sind sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, aber abhängig vom mitochondrialen Apoptosesignalweg. Eine Induktion des antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedes Bcl-x_L in frisch aktivierten T-Zellen, die nach längerer Kultivierung wieder abnimmt, korreliert mit der Beobachtung, dass in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen das mitochondriale Transmembranpotential stabiler ist (Schmitz, 2000). Diese Protektion kann jedoch auch in mangelnder DISC-Aktivität begründet sein, zumal Kurzzeit-aktivierte T-Zellen eine erhöhte Expression von c-FLIP_S aufweisen (Schmitz, 2000). Um zu testen, ob die Inhibition des Signalweges oberhalb oder an den Mitochondrien stattfindet, wurde ein etabliertes Modell der T-Zellaktivierung primärer humaner T-Zellen verwendet (Klas *et al.*, 1993): Frisch isolierte periphere T-Zellen (Tag 0) wurden für 16 Stunden mit Lectin (Phytohämagglutinin, PHA) stimuliert (Tag 1) und anschließend für weitere fünf Tage mit 25 U/ml IL-2 kultiviert (Tag 6). Dabei entsprechen frisch isolierte T-Zellen (Tag 0) ruhenden, während Kurzzeit-aktivierte T-Zellen (Tag 1) Zellen der Effektorphase entsprechen. Langzeit-aktivierte T-Zellen (Tag 6) repräsentieren Zellen in der Deletionsphase. Die DISC-Aktivität in Tag 1-Zellen wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsassays untersucht.

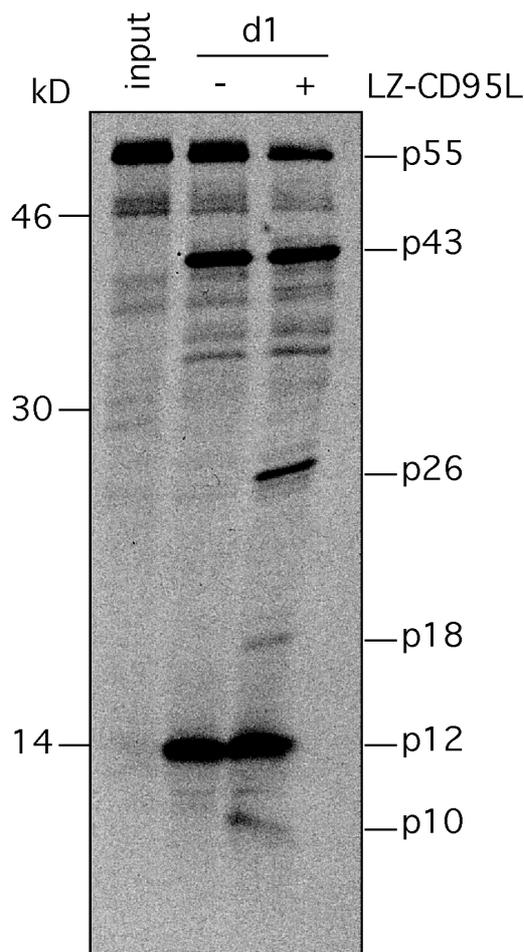


Abb. III.2.1: DISC-Aktivität in Tag 1-T-Zellen. *In vitro*-Caspase-8-Spaltungsassay. [³⁵S]-markierte, *in vitro*-translatierte Procaspase-8/a wurde mit unstimulierten (-) oder stimulierten (+) CD95-Präzipitaten aus Tag 1 (d1)-T-Zellen oder ohne Präzipitat (input) inkubiert und mittels 15% SDS-PAGE analysiert.

DISCs aus Tag 1-T-Zellen waren in der Lage rekombinante Caspase-8 zu spalten, was durch das Auftreten der Spaltprodukte p26, p18, p12 und p10 deutlich wurde (Abb. III.2.1). Daraus kann geschlossen werden, dass selbst die geringen Mengen an DISC aus Tag 1-Zellen aktiv sind, wie es bereits für CD95-Typ II-Zelllinien beobachtet wurde (Scaffidi *et al.*, 1999b). Damit ist wahrscheinlich, dass die Blockade des CD95-Signalweges in diesen Zellen auf der Ebene der Mitochondrien erfolgt, was die entscheidende Rolle von Bcl-x_L unterstreicht. Da c-FLIP die DISC-Aktivität inhibiert, ist zu vermuten, dass c-FLIP nicht oder nur untergeordnet zur Resistenz von Kurzzeit-aktivierten T-Zellen beiträgt.

2.2 IL-2 sensitiviert primäre humane T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose

IL-2 sensitiviert primäre T-Zellen gegenüber Apoptose (Lenardo, 1991). Ferner wurde berichtet, dass IL-2 in einem Mausmodell die Expression von c-FLIP_L reduziert und die von CD95L erhöht (Refaeli *et al.*, 1998). Die Rolle von IL-2 bezüglich Sensitivität und Resistenz von primären humanen T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose war mechanistisch bislang unklar und sollte mit Hilfe des oben beschriebenen *in vitro*-Systems untersucht werden. Kurzzeit-aktivierte T-Zellen (Tag 1) wurden wie oben beschrieben hergestellt und für weitere sechs Tage entweder in IL-2-haltigem Medium (25 U/ml) oder in Medium ohne IL-2 kultiviert. Im Laufe der Kultivierungszeit ohne exogenes IL-2 sezernierten T-Zellen kein detektierbares endogenes IL-2 (nicht

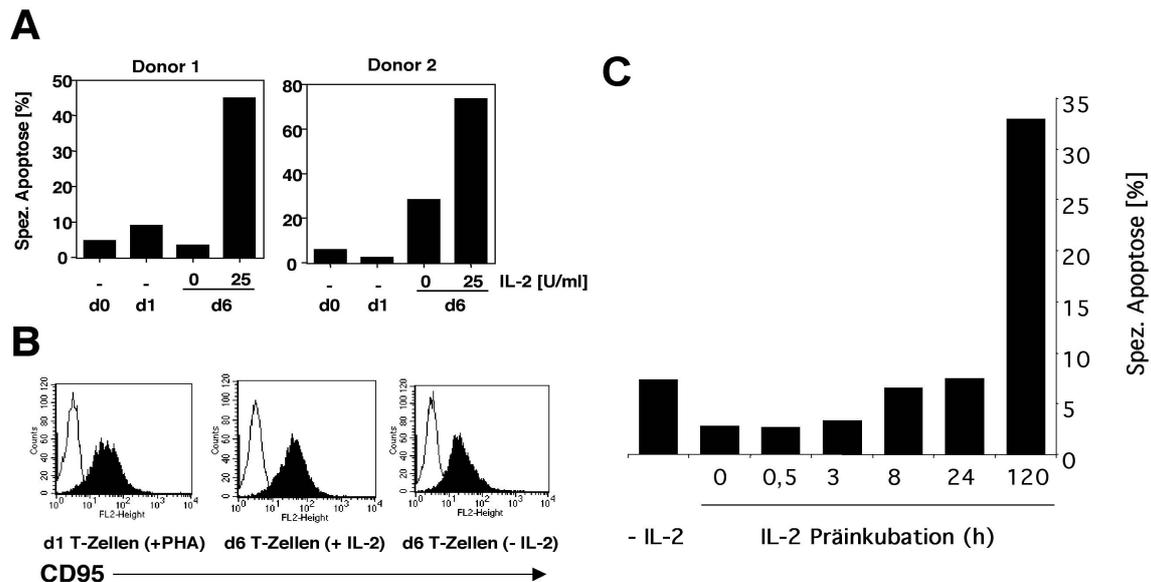


Abb. III.2.2: IL-2 sensitiviert primäre T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. A, Tag 0 (d0), Tag 1 (d1) und Tag 6 (d6)-T-Zellen mit und ohne IL-2 wurden für 16 h mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-APO-1 und 10 ng/ml Protein A inkubiert. Die Apoptose wurde durch Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt. Gezeigt sind zwei unabhängige Spender. B, T-Zellen wurden bis Tag 6 (d6) mit oder ohne IL-2 kultiviert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD95 durch eine FACS-Analyse mit anti-APO-1 bestimmt. Zum Vergleich ist die CD95-Expression auf Tag 1 (d1)-T-Zellen gezeigt. C, Kurzzeitige Präinkubation mit IL-2 ist für die Sensitivierung von Tag 6-T-Zellen nicht ausreichend. Tag 6-T-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit IL-2 präinkubiert (120 h entspricht der IL-2-Gabe an Tag 1) und anschließend für 16 h mit 200 ng/ml LZ-CD95L stimuliert. Die Apoptoserate wurde durch FSC/SSC-Analyse im FACS bestimmt.

gezeigt). Zunächst wurde die Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose bestimmt. Wie bereits früher gezeigt wurde (Abb. III.2.2A; (Klas *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999a)) waren Tag 0- und Tag 1-T-Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose nach Stimulation mit agonistischen anti-CD95 Antikörpern, während Tag 6-T-Zellen nach Kultivierung mit IL-2 sensitiv waren (Abb. III.2.2A). Dagegen waren Tag 6-T-Zellen nach Kultur ohne exogenes IL-2 fast vollständig (vgl. Donor 1) oder zumindest partiell (vgl. Donor 2) resistent. Die Analyse der Oberflächenexpression von CD95 auf Tag 6-T-Zellen in Abhängigkeit von IL-2 zeigte vergleichbare Expressionsniveaus, wobei die Expression in Abwesenheit von IL-2 etwas geringer war und dem Niveau der CD95-Oberflächenexpression auf Tag 1-T-Zellen glich (Abb. III.2.2B). Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Sensitivität von Tag 6-T-Zellen nach Kultur ohne IL-2 durch kurzzeitige Zugabe von IL-2 rekonstituierbar war. Hierzu wurde IL-2 zu verschiedenen Zeitpunkten (24; 8; 3; 0,5 und 0 h) vor der Stimulation von Tag 6-T-Zellen mit LZ-CD95L zur Kultur gegeben und die Apoptoserate bestimmt. Keine der kürzeren IL-2-Gaben erzeugte Sensitivität

in diesen Tag 6-T-Zellen, während im selben Experiment Tag 6-T-Zellen, die über den vollen Zeitraum von 5 Tagen mit exogenem IL-2 kultiviert worden waren, wie erwartet sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose waren (Abb. III.2.2C). Hieraus lässt sich schließen, dass die Sensitivierung primärer humaner T-Zellen nicht durch ein einfaches, direktes IL-2-Signal ausgelöst wird, sondern eher aus einem IL-2-abhängigen Differenzierungsprozess resultiert.

2.3 Charakterisierung des Aktivierungsstatus primärer T-Zellen in Abhängigkeit von IL-2

IL-2 ist nicht nur ein wichtiger Faktor für die Sensitivierung von T-Zellen gegenüber dem AICD, sondern auch für das Überleben und die Proliferation von T-Zellen. Daher sollte untersucht werden, ob möglicherweise ein Defekt in der T-Zell-Aktivierung die Sensitivierung gegenüber dem AICD verhindert. Primäre humane T-Zellen wurden kultiviert wie beschrieben, entweder mit exogenem oder ohne exogenes IL-2. Der Aktivierungsstatus wurde durch tägliche Analyse der Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD69 (Abb. III.2.3A) und CD25 (IL-2-Rezeptor α -Kette) (Abb. III.2.3B) bestimmt. CD69 wurde bis Tag 2 unabhängig von IL-2 stark exprimiert, nahm dann aber auf T-Zellen, die ohne IL-2 kultiviert wurden, bis Tag 6 langsamer ab. CD25 wurde auf T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 über den gesamten Zeitraum der Kultur stärker exprimiert als in Abwesenheit von IL-2. Allerdings war auch hier bis Tag 6 die Expression von CD25 deutlich detektierbar. Zusammengenommen lässt sich, gemessen an der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25, eine ähnliche Aktivierung von T-Zellen mit und ohne IL-2 feststellen. Als nächstes wurde die Proliferation der T-Zellen durch Markierung der Zellen mit CFSE (5-(und 6)-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester) analysiert. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der von Zellen aufgenommen wird. Mit jeder Teilung halbiert sich die Fluoreszenzintensität pro Zelle, da der Farbstoff auf beide Tochterzellen aufgeteilt wird. T-Zellen, die über 6 Tage in Abwesenheit von IL-2 kultiviert wurden, teilten sich von Tag 2 bis Tag 6 nicht oder einmal (Abb. III.2.4, oberes Histogramm), während zumindest eine Fraktion von T-Zellen mit IL-2 etwa dreimal den Zellzyklus durchliefen (Abb. III.2.4, unteres Histogramm).

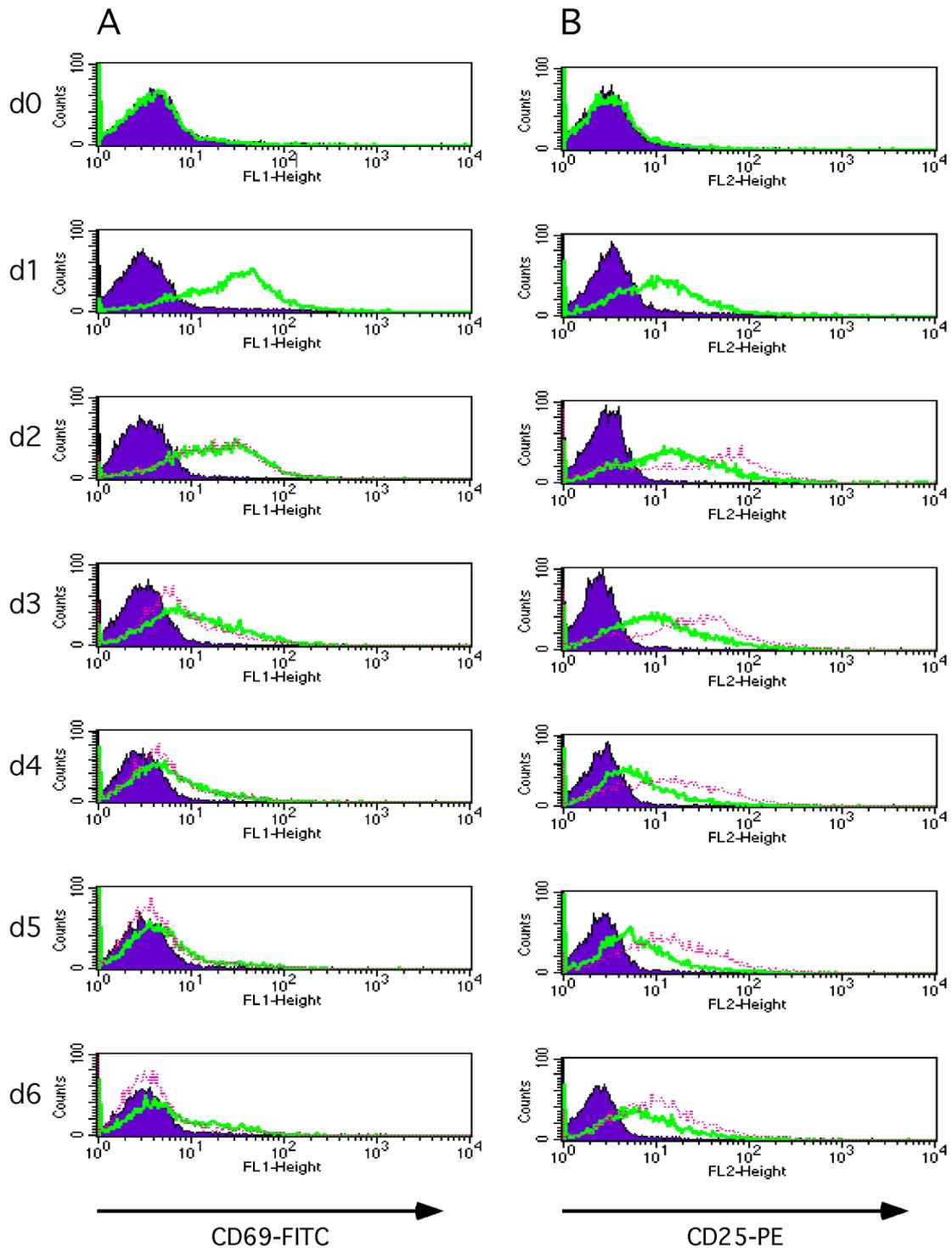


Abb. III.2.3: Charakterisierung des Aktivierungsstatus von T-Zellen durch Analyse von Oberflächenmarkern. Primäre humane T-Zellen wurden wie beschrieben isoliert, aktiviert und für weitere 6 Tage (d0 bis d6) mit (rote Histogramme) oder ohne (grüne Histogramme) IL-2 kultiviert. Täglich wurde durch FACS-Analyse die Oberflächenexpression von A, CD69 und B, CD25 bestimmt. Ausgefüllte Histogramme stellen die Autofluoreszenz dar.

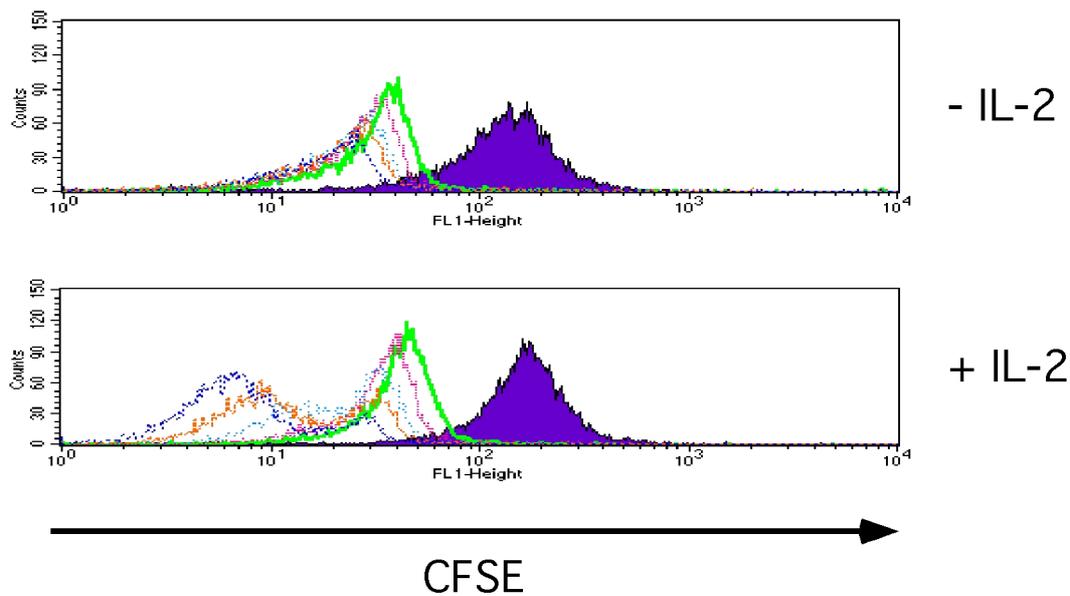


Abb. III.2.4: Charakterisierung der Proliferation primärer humaner T-Zellen in Abhängigkeit von IL-2. Tag 1-T-Zellen wurden mit CFSE markiert (ausgefülltes Histogramm) und anschließend für weitere fünf Tage (d2 bis d6) mit oder ohne IL-2 kultiviert. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität wurde durch FACS-Analyse bestimmt. d2: grün; d3: rot; d4: hellblau; d5: orange; d6: dunkelblau.

Während also der Aktivierungsstatus der T-Zellen im wesentlichen unabhängig von IL-2 zu sein scheint, bestätigt die CFSE-Analyse die Bedeutung von IL-2 für die Proliferation der T-Zellen.

2.4 IL-2 beeinflusst nicht die Expression von bekannten Komponenten des CD95-DISC

Die Modulation der Expression von Komponenten des CD95-DISC ist möglicherweise relevant für die Regulation der Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber dem AICD. Es wurden Zell-Lysate aus Tag 0-, Tag 1- und Tag 6-T-Zellen in An- oder Abwesenheit von IL-2 hergestellt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. C-FLIP_L war in allen Zellen vergleichbar exprimiert, während das Expressionsniveau von c-FLIP_S in Tag 1-T-Zellen, aber nicht in Tag 6-T-Zellen ohne IL-2 erhöht war (Abb. III.2.5A). Dieses Ergebnis ist konsistent mit einer früheren Beobachtung der Induktion von c-FLIP_S nach Kostimulation von T-Zellen über CD28 (Kirchhoff *et al.*, 2000b). Procaspase-8 und FADD zeigten vergleichbare Expressionsniveaus in allen Zell-Lysaten (Abb. III.2.5B und C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-2 keine

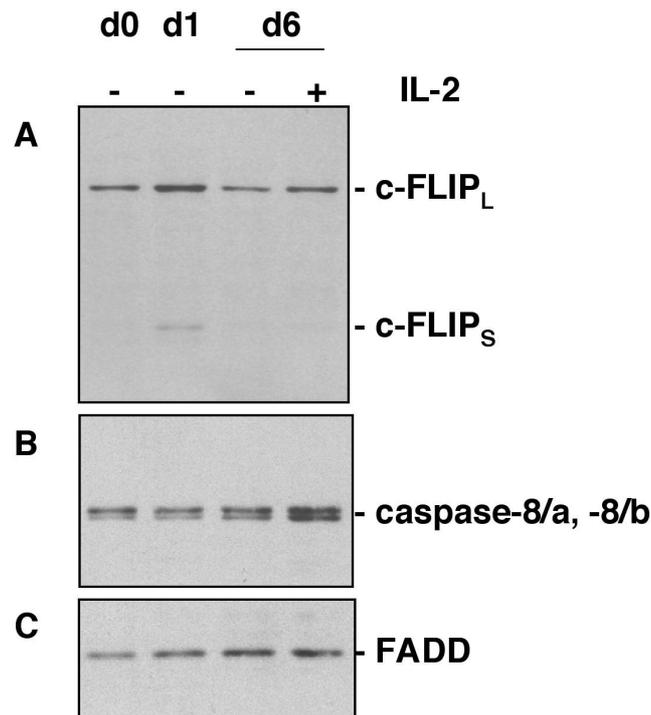


Abb. III.2.5: Expression von DISC-Komponenten in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-2. Lysate aus Tag 0- (d0), Tag 1- (d1) und Tag 6 (d6)-T-Zellen nach Kultivierung mit oder ohne IL-2 wurden mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen A, c-FLIP, B, Caspase-8 und C, FADD im Western Blot analysiert.

Modulation der Expression der DISC-Komponenten c-FLIP, FADD und Procaspase-8 in Tag 6-T-Zellen induziert.

2.5 IL-2 beeinflusst die DISC-Bildung und die Protektion der Mitochondrien

Wie oben beschrieben zeigen Tag 1-T-Zellen im Vergleich zu Tag 6-T-Zellen eine deutlich reduzierte DISC-Bildung (Scaffidi *et al.*, 1999a), was darauf schließen lässt, dass sich im Laufe der Aktivierungsphase ein Wechsel der CD95-Signalwege von Typ II nach Typ I vollzieht. Als nächstes sollte daher die Fähigkeit von Tag 6-T-Zellen zur DISC-Bildung in Abhängigkeit von IL-2 untersucht werden. Da T-Zell-Kulturen

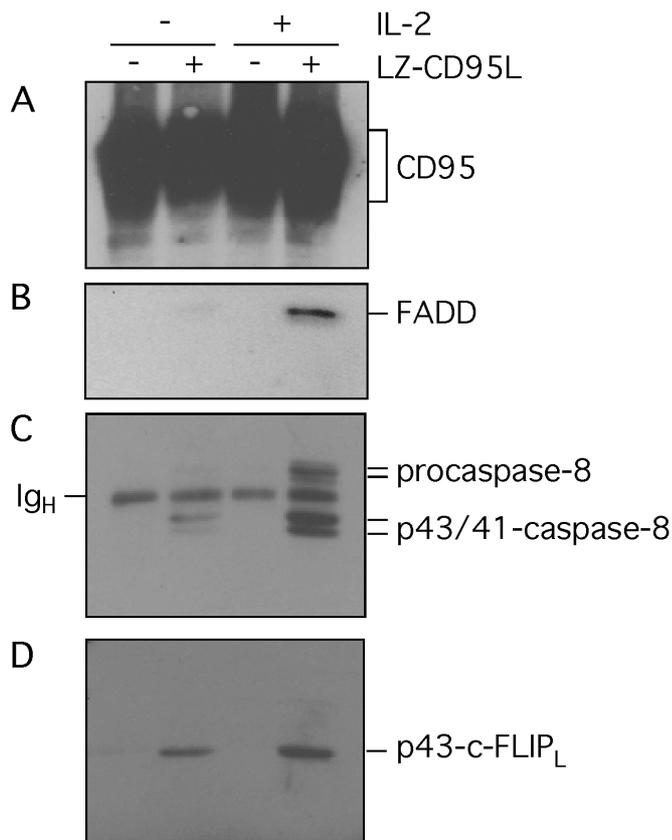


Abb. III.2.6: IL-2 beeinflusst die DISC-Bildung in Tag 6-T-Zellen. T-Zellen wurden bis Tag 6 mit oder ohne IL-2 kultiviert. Nach der Entfernung toter Zellen wurden die T-Zellen mit 2 µg/ml LZ-CD95L für 5 min bei 37°C stimuliert oder unbehandelt gelassen. Der DISC wurde mit anti-APO-1 präzipitiert und im Western Blot mit Antikörpern gegen *A*, CD95, *B*, FADD, *C*, Caspase-8 und *D*, c-FLIP analysiert.

ohne IL-2 viele tote Zellen enthalten, wurden diese mittels Dichtegradientenzentrifugation entfernt, die T-Zellen für mindestens 2 h weiterkultiviert und anschließend wie beschrieben mit LZ-CD95L stimuliert oder unbehandelt gelassen, lysiert und einer Immunpräzipitation gegen CD95 unterworfen. Der präzipitierte DISC wurde mittels Western Blot analysiert. Die Analyse von FADD (Abb. III.2.6B), Caspase-8 (Abb. III.2.6C) und c-FLIP (Abb. III.2.6D) zeigte eine stimulationsabhängige DISC-Bildung in T-Zellen nach Kultivierung in Anwesenheit von IL-2 (Abb. III.2.6, Bahn 4). Dagegen zeigten Tag 6-T-Zellen in Abwesenheit von IL-2 eine stark reduzierte DISC-Bildung (Abb. III.2.6, Bahn 2). FADD und Caspase-8 waren kaum detektierbar. Interessanterweise ließ sich p43-c-FLIP_L dagegen vergleichsweise deutlich erkennen. Somit scheint sich das Verhältnis von Caspase-8 und c-FLIP_L am DISC zu

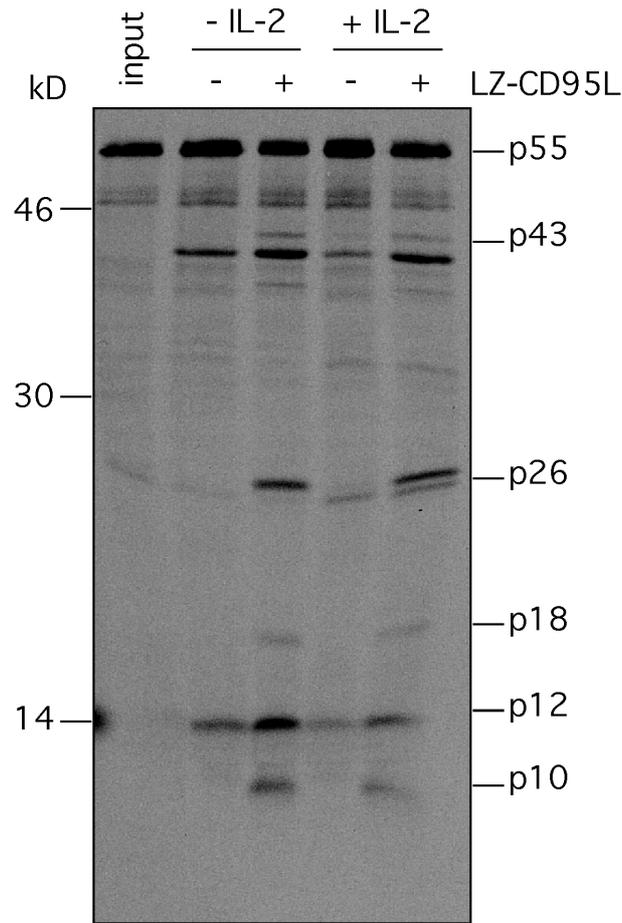


Abb. III.2.7: DISC-Aktivität in Tag 6-T-Zellen nach Kultivierung mit oder ohne IL-2. Entweder mit oder ohne IL-2 kultivierte Tag 6-T-Zellen wurden für 5 min mit LZ-CD95L stimuliert oder unbehandelt gelassen. Der DISC wurde wie oben beschrieben präzipitiert. [³⁵S]-markierte *in vitro*-translatierte Procaspase-8/a wurde mit unstimulierten (-) oder stimulierten (+) CD95-Präzipitaten oder ohne Präzipitat (input) inkubiert und mittels 15 % SDS-PAGE analysiert.

ändern, was auf einen möglichen Einfluss von c-FLIP_L auf die CD95-Resistenz hindeutet. Alternativ kann dieser Unterschied auch auf die sehr hohe Sensitivität des anti-c-FLIP Antikörpers NF6 zurückzuführen sein (Scaffidi *et al.*, 1999a). Zur Kontrolle der Effizienz der Immunpräzipitation wurde die Menge von präzipitiertem CD95 mit einem polyklonalen Antikörper analysiert (Abb. III.2.6A). Zusammengefasst verhalten sich folglich Tag 6-T-Zellen nach Kultur ohne IL-2 im Hinblick auf die DISC-Bildung wie Tag 1-T-Zellen (Scaffidi *et al.*, 1999a). Daher sollte untersucht werden,

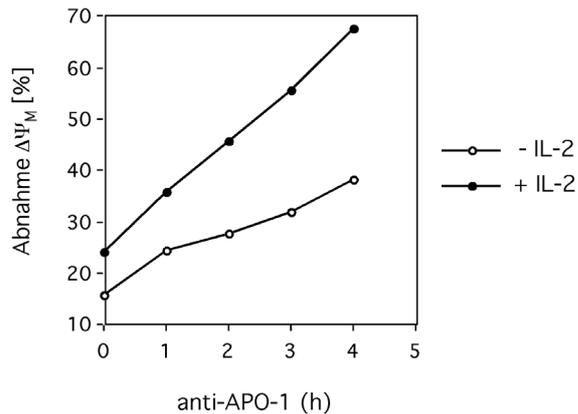


Abb. III.2.8: Einfluss von IL-2 auf Mitochondrien in Tag 6-T-Zellen. Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials in Tag 6-T-Zellen nach Kultivierung mit oder ohne IL-2. T-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-APO-1 und 10 ng/ml Protein A stimuliert, mit JC-1 gefärbt und anschließend im FACS analysiert.

ob trotz reduzierter DISC-Bildung DISC-Aktivität messbar war wie in Typ II- oder Tag 1 Zellen. Ein *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsassay zeigte DISC-Aktivität auch in Tag 6-T-Zellen in Abwesenheit von IL-2 (Abb. III.2.7). In Typ II-Zellen, wie z. B. Tag 1-T-Zellen (siehe oben), kann Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose durch antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie auf der Ebene der Mitochondrien induziert werden. Daher wurden zur Untersuchung des mitochondrialen Transmembranpotentials Tag 6-T-Zellen nach Kultivierung mit oder ohne IL-2 für unterschiedliche Dauer mit agonistischen anti-CD95

Antikörpern behandelt und die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 angefärbt. Nach vier Stunden Behandlung mit anti-APO-1 zeigten Tag 6-T-Zellen ohne IL-2 lediglich einen leichten Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_M$), während $\Delta\Psi_M$ in Tag 6-T-Zellen mit IL-2 deutlich abfällt (Abb. III.2.8). Daraus lässt sich schließen, dass IL-2 nicht nur den Wechsel vom CD95-Typ II- zum -Typ I-Signalweg induziert, sondern zudem zum Verlust der Protektion der Mitochondrien in Langzeit-aktivierten T-Zellen beiträgt.

3. Modulation CD95-vermittelter Apoptose durch das HTLV-1 Transaktivator Protein Tax in T-Zellen

3.1 HTLV-1 Tax inhibiert CD95-vermittelte Apoptose in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von HTLV-1 Tax auf CD95-vermittelte Apoptose wurde ein induzierbares Expressionssystem verwendet, das auf der Fusion der Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (engl. estrogen receptor, ER) mit HTLV-1 Tax basiert (Abb. III.1A) (Chlichlia *et al.*, 1995). In Abwesenheit von Östrogen oder dessen Derivat 4-Hydroxy-Tamoxifen (HT) bindet HSP90 an das ER-Fusionsprotein und verhindert so dessen Translokation in den Zellkern und damit dessen Transaktivierungskapazität. Bindung des Hormons führt zur Freisetzung des Fusionsproteins von HSP90 und damit zu dessen Aktivierung (Abb. III.1B) (Picard *et al.*, 1988; Eilers *et al.*, 1989). Jurkat T-Zellen, die ein Fusionsprotein aus der Hormonbindungsdomäne des ER und C-terminal folgendem Tax stabil exprimieren (Jurkat ERtax), wurden auf ihre Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose untersucht. Als Kontrollzellen wurden Zellen mit einem ähnlichen Fusionsprotein verwendet, bei dem jedoch die ersten 12 Aminosäuren von Tax deletiert sind, was zu einem inaktiven Protein führt (Jurkat ER Δ tax, vgl. Abb. III.3.1A). Jurkat-Zellen exprimieren keinen endogenen Östrogenrezeptor (Chlichlia *et al.*, 1995). ERtax- und ER Δ tax-Zellen wurden für 24 h mit HT oder anti-CD3 oder beidem stimuliert. Anschließend wurde CD95-vermittelte Apoptose induziert. Weder ERtax- noch ER Δ tax-Zellen zeigten nach Stimulation mit HT allein eine veränderte Apoptosesensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (nicht gezeigt). Mit anti-CD3 prästimulierte ERtax-Zellen waren jedoch in Anwesenheit von HT deutlich resistenter gegenüber CD95-vermittelter Apoptose als in Abwesenheit von HT oder ER Δ tax-Zellen in An- und Abwesenheit von HT (Abb. III.3.2).

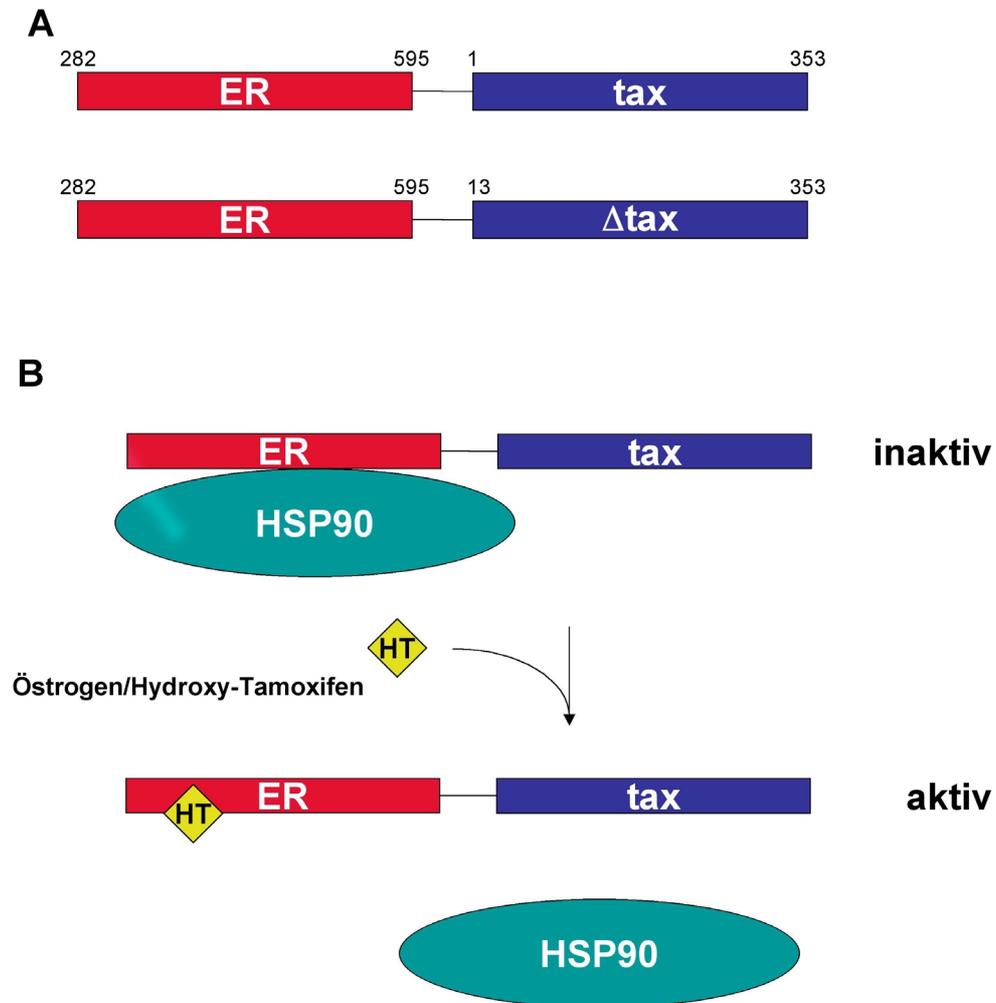


Abb. III.3.1: Das ERtax-System. *A*, Schematische Darstellung der beiden Fusionsproteine ERtax und ERΔtax. Die Zahlen geben die Aminosäuren von Tax bzw. des Östrogenrezeptors wieder. *B*, Schema für die hormoninduzierte Aktivierung des ERtax-Fusionsproteins. Erläuterungen siehe Text.

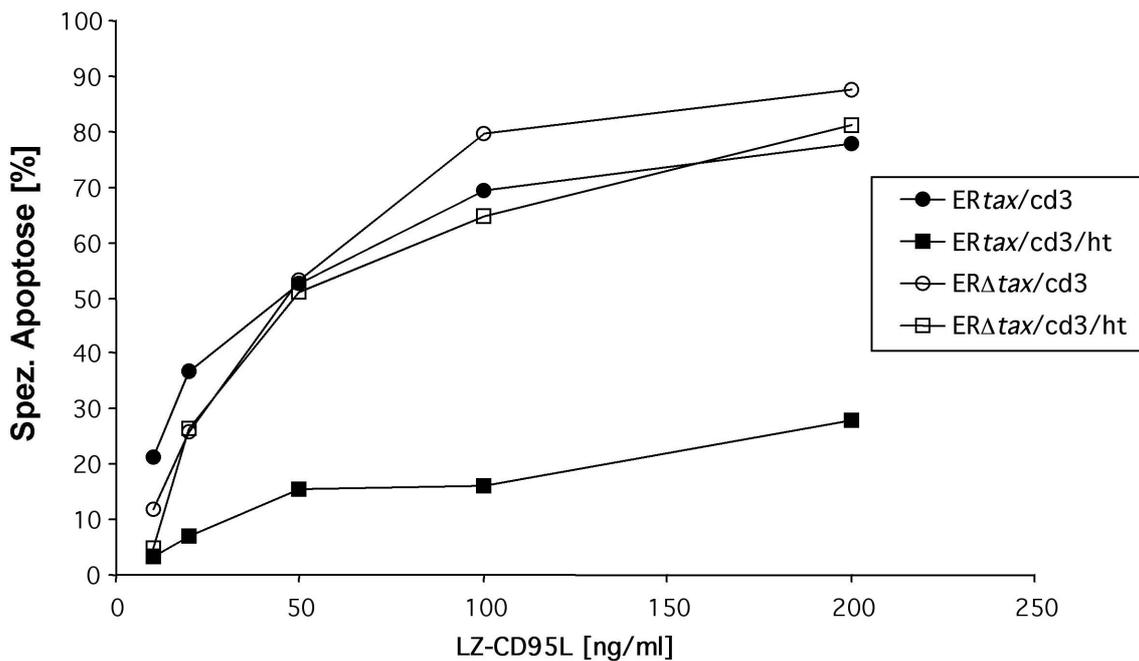


Abb. III.3.2: Tax induziert Resistenz gegenüber CD95 in CD3-stimulierten Jurkat-Zellen. Jurkat *ERtax* und Jurkat *ERΔtax* wurden für 24 h mit 30 µg/ml anti-CD3 mit oder ohne 2 µM HT inkubiert. Anschließend wurde für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen an LZ-CD95L stimuliert. Die Apoptose wurde durch FSC/SSC-Analyse im FACS bestimmt.

3.2 HTLV-1 Tax induziert die Expression von c-FLIP_S, c-FLIP_L und Bcl-x_L in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen

Die Regulation CD95-vermittelter Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. CD95-Typ II-Zellen, zu denen auch Jurkat-Zellen gehören, sind abhängig von einem mitochondrialen Verstärkungssignal (Scaffidi *et al.*, 1998). Daher ist bei ihnen CD95-vermittelte Apoptose durch Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder inhibierbar. Eine andere, vom CD95-Signaltyp unabhängige Ebene der Regulation CD95-vermittelter Apoptose stellt der DISC dar (Scaffidi *et al.*, 1999b). Hier kann die Inhibition durch c-FLIP erfolgen. Es wurde berichtet, dass die antiapoptotische Wirkung von Tax abhängig von der Aktivierung von NF-κB ist (Kawakami *et al.*, 1999; Portis *et al.*, 2001; Torgeman *et al.*, 2001) und mit der Expression von Bcl-x_L und Bcl-2 korreliert (Nicot *et al.*, 1997; Tsukahara *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001; Saggiaro *et al.*, 2001). Auch c-FLIP kann durch NF-κB induziert werden (Kreuz *et al.*, 2001; Micheau *et al.*, 2001). Daher sollte untersucht werden, ob in *ERtax*-Zellen eine Tax-abhängige Induktion von c-FLIP stattfindet. Während weder

in $ER\Delta tax$ -Zellen, noch in $ERtax$ -Zellen, die nicht oder mit HT oder anti-CD3 allein behandelt worden waren, die Expression von c-FLIP erhöht war, konnte in $ERtax$ -Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 und HT eine deutliche Induktion von c-FLIP, vor allem von c-FLIP_S, beobachtet werden (Abb. III.3.3A, Bahn 4). Auch die Expression von Bcl-x_L war nur unter diesen Stimulationsbedingungen erhöht (Abb. III.3.3B, Bahn 4). Als nächstes wurde untersucht, ob bei Stimulation mit anti-CD3/HT weitere für den CD95-Signalweg relevante Proteine reguliert werden. Weder FADD, Procaspase-8, noch Bcl-2 zeigten eine Modulation auf Proteinebene (Abb. III.3.3D). Der Anstieg der Expression der antiapoptotischen Proteine korrelierte mit der initial beobachteten Apoptoseresistenz in anti-CD3/HT-stimulierten $ERtax$ -Zellen. Da Jurkat-T-Zellen vom CD95-Typ II sind, können sowohl Bcl-x_L als auch c-FLIP zu dieser Resistenz beitragen. Um die relative Bedeutung der beiden Proteine zu klären, sollte untersucht werden, ob die apoptotische Signalkaskade nach anti-CD3/HT-Stimulation oberhalb oder an den Mitochondrien inhibiert ist.

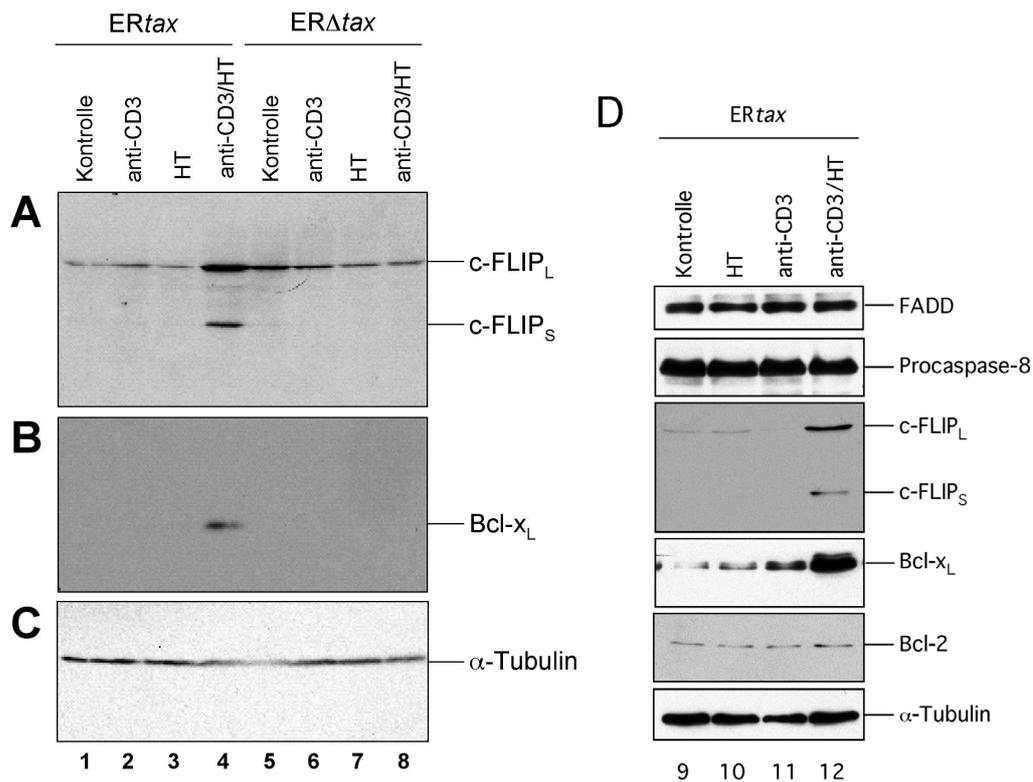


Abb. III.3.3: HTLV-1 Tax induziert die Expression von c-FLIP_S, c-FLIP_L und Bcl-x_L in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen. Jurkat ERtax und Jurkat ERΔtax wurden für 24 h mit und ohne anti-CD3, mit und ohne HT oder in Kombination inkubiert. Lysate wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen A, c-FLIP und B, Bcl-x_L analysiert. C, α-Tubulin-Expression wurde als Kontrolle für gleiche Proteinladung analysiert. D, Keine Modulation der DISC-Komponenten FADD und Procaspase-8 sowie von Bcl-2. Jurkat ERtax wurden für 24 h mit anti-CD3, mit HT oder beidem inkubiert. Lysate wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen FADD, Procaspase-8 und Bcl-2 analysiert. α-Tubulin-Expression wurde als Kontrolle für die Proteinladung verwendet; c-FLIP und Bcl-x_L dienten als Positivkontrolle.

3.3 Tax-induziertes c-FLIP_S wird verstärkt an den CD95-DISC rekrutiert

Zunächst sollte durch Analyse des CD95-DISC untersucht werden, ob die verstärkte Expression von c-FLIP auch zu einer verstärkten Rekrutierung an den DISC führt, was eine Voraussetzung zur Apoptoseinhibition darstellt. Hierzu wurden ERtax-Zellen nach 24-stündiger Prästimulation mit anti-CD3 mit oder ohne HT einer DISC-Präzipitation unterworfen. In der Tat war wie im Lysat nach Stimulation mit anti-CD3/HT eine erhöhte Menge von c-FLIP_S im DISC detektierbar (Abb. III.3.4B, Bahn 4). Ob auch die Menge von c-FLIP_L erhöht war, konnte nicht eindeutig festgestellt

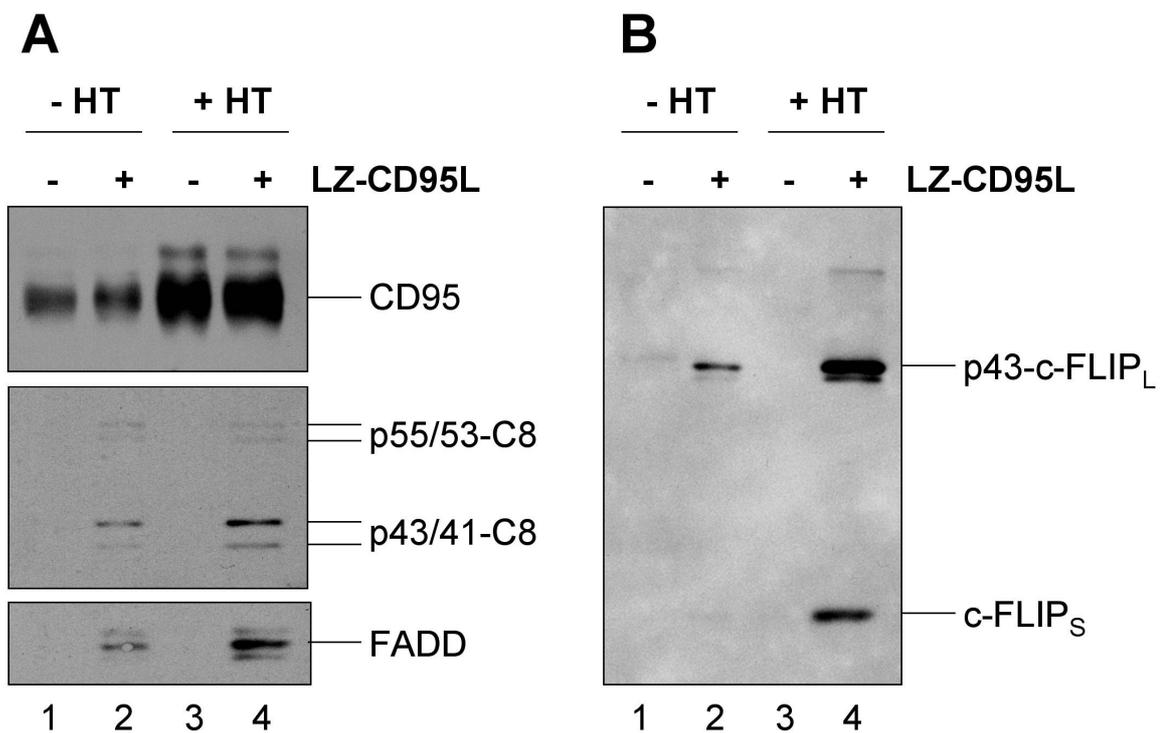


Abb. III.3.4: Tax induziert die verstärkte Rekrutierung von c-FLIP_S und c-FLIP_L an den DISC in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen. Jurkat ER_{tax}-Zellen wurden für 24 h mit 30 µg/ml anti-CD3 mit oder ohne 2 µM HT inkubiert. Nach Aufreinigung der lebenden Zellen durch Ficoll-Gradientenzentrifugation wurden die Zellen mit 10 µg LZ-CD95L stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden CD95 über anti-APO-1, gekoppelt an Streptavidin-Sepharose via anti-mIgG3-Biotin, präzipitiert und der DISC mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. *A*, Western Blot für CD95, Caspase-8 (C8) und FADD. *B*, Western Blot für c-FLIP.

werden, da insgesamt die Effizienz der Präzipitation in den anti-CD3/HT-stimulierten Zellen erhöht erschien (Abb. III.3.4A).

3.4 Die Tax-induzierte Expression von c-FLIP führt zu einer Verringerung der Bid-Spaltung

CD95-Typ II Zellen sind vom mitochondrialen Apoptosesignalweg abhängig. Dieser wird durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung des „BH3-only“-Proteins Bid initiiert, das an die Mitochondrien transloziert und vermutlich durch Oligomerisierung von Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c induziert (Kap. I.3.4). Die Spaltung von Bid ist also ein Ereignis, das nicht durch Bcl-x_L, wohl aber durch c-FLIP moduliert werden

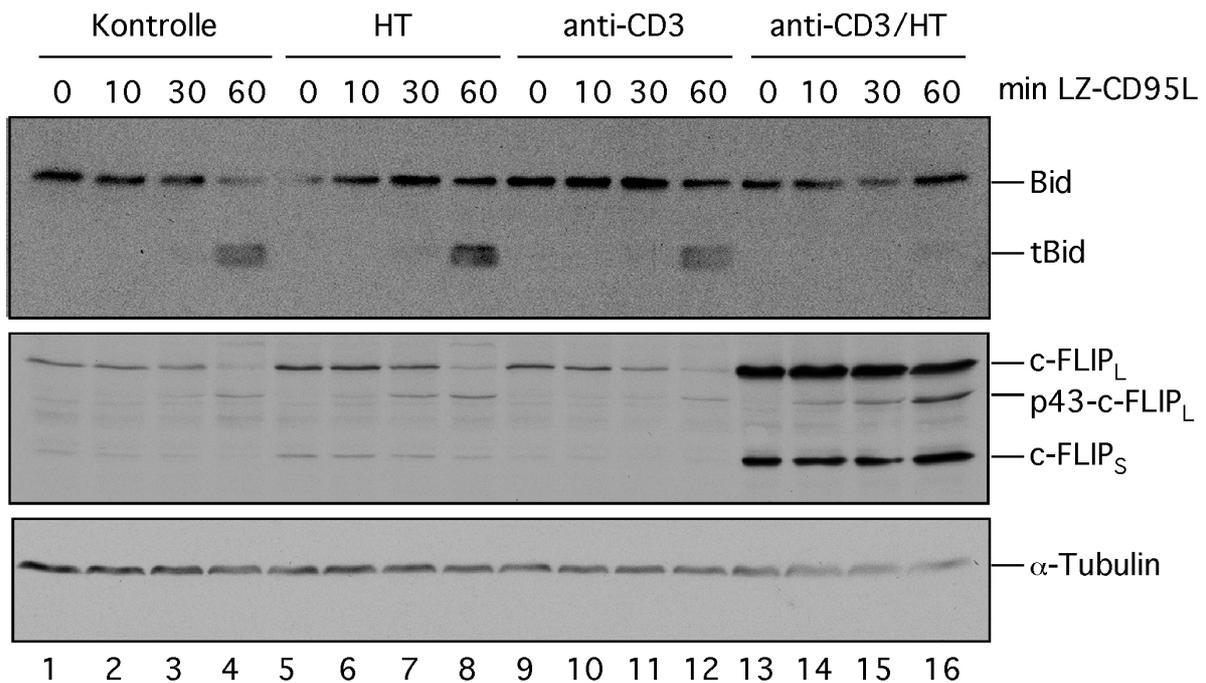


Abb. III.3.5: Tax verringert die CD95-induzierte Bid-Spaltung in CD3-stimulierten Jurkat T-Zellen. Jurkat *ERTax*-Zellen wurden für 24 h mit 30 µg/ml anti-CD3, 2 µM HT oder beidem stimuliert. Überlebende Zellen wurden durch eine Ficoll-Gradientenzentrifugation isoliert und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit 200 ng/ml LZ-CD95L inkubiert. Lysate der Zellen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Bid analysiert. α-Tubulin diente als Kontrolle für die Proteinladung und c-FLIP als Kontrolle für die Stimulation. tBid: gespaltenes Bid (engl.: truncated Bid).

kann. Um den Einfluss beider antiapoptotischer Proteine zu untersuchen, wurde die Spaltung von Bid in mit anti-CD3, HT oder beidem stimulierten Jurkat *ERTax*-Zellen nach Inkubation mit LZ-CD95L analysiert (Abb. III.3.5). Während sich Kontrollzellen sowie mit HT- oder anti-CD3 allein stimulierte Zellen hinsichtlich der Bid-Spaltung nicht deutlich unterschieden (Abb. III.3.5, Bahn 1 – 12), zeigte sich in den anti-CD3/HT-stimulierten Zellen nach 60 min eine Reduktion der Bid-Spaltung (Abb. III.3.5, Bahn 16). Da keine vollständige Inhibition der Spaltung von Bid zu beobachten war, kann aus diesem Ergebnis keine Aussage darüber getroffen werden, wie die Reduktion der Bid-Spaltung im Vergleich zu möglichen Effekten der hohen Expression von Bcl-x_L zu gewichten ist. Allerdings lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Tax-induziertes c-FLIP in der Tat einen Effekt auf die DISC-Aktivität ausübt und damit zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beiträgt.

IV. Diskussion

Apoptose ist für mehrzellige Organismen in der embryonalen Entwicklung und der Erhaltung der Zellhomöostase von fundamentaler Bedeutung (Vaux und Korsmeyer, 1999; Krammer, 2000). Dabei spielen Todesrezeptoren, eine Unterfamilie der TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie, eine wesentliche Rolle (Peter *et al.*, 1998). Der Todesrezeptor CD95 ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, die Apoptose involvieren. Speziell im Immunsystem kommt CD95 eine entscheidende Rolle zu, wie durch den Phänotyp von Menschen oder Mäusen mit einem Defekt im CD95-System deutlich wird (Matsuzawa *et al.*, 1990; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992a; Takahashi *et al.*, 1994a; Fisher *et al.*, 1995; Rieux-Laucat *et al.*, 1995). Eine Fehlregulation im CD95-System kann zur Entstehung von Krankheiten wie dem Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS), beitragen (Vaux und Flavell, 2000). Um therapeutisch solche Fehlregulationen korrigieren zu können, ist es unerlässlich, die Signalwege von CD95, ihre Regulation und die Verknüpfung mit anderen Signalwegen zu kennen.

1. *Splicevarianten von c-FLIP inhibieren verschiedene Schritte der Caspase-8-Aktivierung am CD95-DISC*

Während die Apoptose-induzierenden Wege der CD95-Signaltransduktion vergleichsweise gut charakterisiert sind (siehe Einleitung), sind die Mechanismen der Inhibition CD95-vermittelter Apoptose noch weitgehend unklar. C-FLIP_L ist ein Protein, das inhibitorisch auf den DISC wirkt und dort die proteolytische Prozessierung von Procaspase-8 zum aktiven Heterotetramer verhindert. Der Mechanismus dieser Inhibition ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch die zweite Splicevariante von c-FLIP, c-FLIP_S, hat eine antiapoptotische Funktion. Beide Splicevarianten besitzen Tandem-DEDs, werden an den DISC rekrutiert und blockieren so Todesrezeptor-vermittelte Apoptose. In dieser Arbeit wurden die inhibitorischen Mechanismen der beiden Splicevarianten von c-FLIP näher untersucht. BJAB-Zellen, die entweder c-FLIP_L oder c-FLIP_S stark exprimieren, sind gegenüber

Todesrezeptor-vermittelter Apoptose geschützt. C-FLIP_S verhindert den ersten Spaltungsschritt von Procaspase-8, sodass ausschließlich die unprozessierte Procaspase-8 am DISC detektiert werden kann. Dagegen kann in Gegenwart von c-FLIP_L die initiale Spaltung von Procaspase-8 stattfinden, doch ist die weitere proteolytische Prozessierung blockiert, sodass sich keine Bildung der p18-Untereinheit von Caspase-8 und damit auch keine Bildung des aktiven Caspase-8 (p10/p18)₂-Heterotetramers vollzieht. Der Unterschied in der Caspase-8-Prozessierung auf der Ebene des DISC in Anwesenheit der beiden Splicevarianten von c-FLIP zeigt sich auch in Zell-Lysaten und verleiht neue Einblicke in den Mechanismus der Aktivierung von Procaspase-8 am DISC. Folgendes Modell der Inhibition Todesrezeptor-vermittelter Apoptose durch c-FLIP kann basierend auf den hier erhaltenen Ergebnissen aufgestellt werden: Bei einer geringen Konzentration an c-FLIP Proteinen besteht der Großteil der Tandem-DED-enhaltenden Proteine am DISC aus Procaspase-8. Aufgrund der so entstehenden hohen lokalen Konzentration und möglichen Dimerbildung wird Procaspase-8 durch auto- und transkatalytische Spaltungsschritte am DISC aktiviert (Abb. IV.1B) (Muzio *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). An den DISC rekrutiertes c-FLIP_L wird durch Caspase-8 gespalten. Eine hohe Konzentration an c-FLIP_L verhindert die Annäherung bzw. Dimerisierung von Procaspase-8, indem es selbst den Platz von Procaspase-8 einnimmt, was zur initialen, aber nicht zur vollständigen Spaltung von Caspase-8 führt. In dieser Konstellation werden lediglich die p10-Untereinheit von Caspase-8 und die p12-Untereinheit von c-FLIP_L ins Cytoplasma freigesetzt (Abb. IV.1C). Da c-FLIP_L keine intrinsische katalytische Aktivität besitzt, muss bei einer angenommenen induzierten Dimerisierung die Spaltung zwischen den beiden Caspase-ähnlichen Domänen p18 und p10 autokatalytisch erfolgen, während die Spaltung zwischen der p18-Untereinheit und der Prodomäne transkatalytisch erfolgen sollte und somit in einem c-FLIP_L/Procaspase-8-Dimer blockiert ist. Große Mengen von c-FLIP_S verhindern jegliche Prozessierung von Procaspase-8 (Abb. IV.1D). Dies lässt den Schluss zu, dass c-FLIP_L im Gegensatz zu c-FLIP_S eine Konformation des DISC induzieren kann, die eine autokatalytisch, aber nicht transkatalytisch aktive Procaspase-8 beinhaltet, sodass sich die initiale Prozessierung zur Freisetzung von p10-Caspase-8 und p12-c-FLIP_L vollziehen kann. Das vorgeschlagene Modell wird durch die Analyse der c-FLIP_L-Mutanten gestützt. Die unspaltbare c-FLIP_L-Mutante ermöglicht, wie Wildtyp-c-FLIP_L, den ersten Spaltungsschritt von Procaspase-8 und damit die Bildung der p10-Untereinheit.

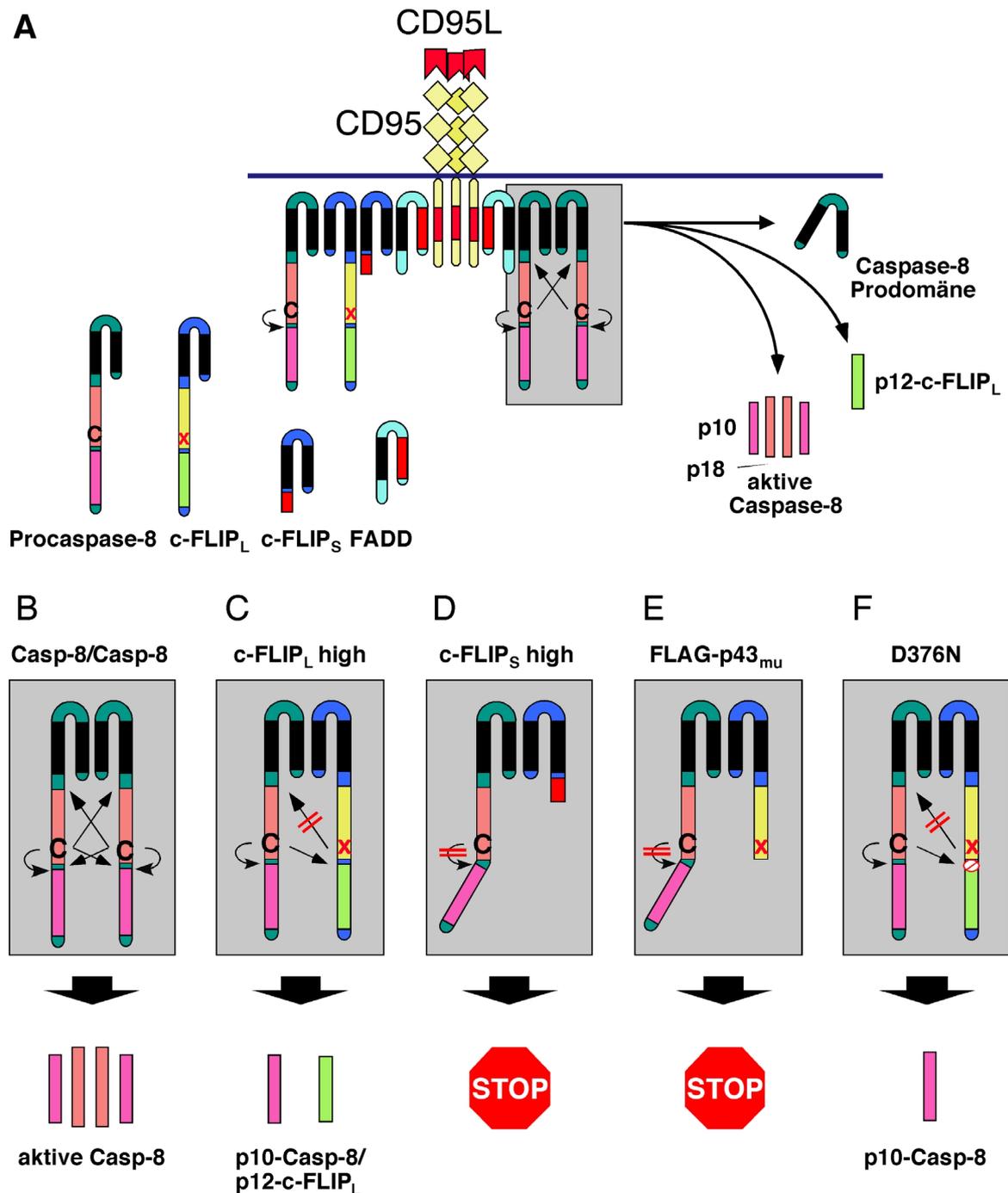


Abb. IV.1: Modell für die c-FLIP-vermittelte Inhibition der Prozessierung von Procaspase-8 am DISC. A, Stimulation von CD95 führt zur Rekrutierung von FADD, Procaspase-8 und den c-FLIP Proteinen an den DISC. Bindung von Procaspase-8 löst deren Aktivierung durch auto- und transkatalytische Spaltung aus. Die verbleibende Prodomäne wird durch weitere Procaspase-8-Moleküle ersetzt, die wiederum proteolytisch aktiviert werden. B-F, In Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen Procaspase-8 und c-FLIP am DISC (grauer Kasten) werden verschiedene Spaltprodukte vom DISC ins Cytoplasma freigesetzt. B, Geringe Mengen von c-FLIP lassen die vollständige Prozessierung von Procaspase-8 zu, was zur Bildung des aktiven Heterotetramers führt. C, Hohe Expression von c-FLIP_L führt nach Rekrutierung von Procaspase-8 zur Inhibition der Prozessierung nach dem ersten Spaltungsschritt. D, Hohe Expression von c-FLIP_S führt zur vollständigen Blockade der Procaspase-8-Prozessierung am DISC. In beiden Fällen führt die Modulation der Procaspase-8-Prozessierung zur Apoptose-Resistenz. E, Gespaltenes c-FLIP_L-p43_{mu} verhindert die Procaspase-8-Spaltung vollständig. F, Unspaltbares c-FLIP_L-D376N erlaubt den initialen Spaltungsschritt von Procaspase-8, verhindert aber die weitere Prozessierung, sodass p43/41-caspase-8 im DISC akkumuliert.

Demzufolge scheint das Vorhandensein der Caspasen-Homologiedomäne und nicht die Spaltung von c-FLIP_L die initiale Prozessierung von Procaspase-8 zu induzieren (Abb. IV.1F). Die c-FLIP_L-Deletionsmutante, der die p12-Untereinheit fehlt (p43_{mu}), verhindert vergleichbar mit c-FLIP_S jegliche Prozessierung von Procaspase-8 am DISC (Abb. IV.1E), was die Bedeutung der Caspasen-Homologiedomäne von c-FLIP_L für die Induktion der initialen Spaltung unterstreicht. Beide c-FLIP_L-Mutanten blockieren die Aktivierung von Caspase-8 und inhibieren auf diese Weise Todesrezeptor-vermittelte Apoptose. Ausgehend von der Annahme, dass Procaspase-8 mit c-FLIP am DISC Dimere bildet, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Bildung von p10-Caspase-8 autokatalytisch erfolgt, während die zweite Spaltung, die zur Bildung der p18-Untereinheit führt, eine transkatalytische Aktivität zwischen den beiden Monomeren erfordert. Die hier präsentierten Ergebnisse schließen allerdings keine Komplexe höherer Ordnung wie Dimere aus Dimeren oder Multimere, die durch extensives Clustering von Todesrezeptoren entstehen können, aus (Siegel *et al.*, 2000a; Siegel *et al.*, 2000b). Eine hohe Expression von c-FLIP_S verhindert außer der Prozessierung von Procaspase-8 auch die Spaltung von c-FLIP_L am DISC. Dieses Phänomen wurde auch in restimulierten primären T-Zellen beobachtet (Kirchhoff *et al.*, 2000a). Die Blockade der c-FLIP_L-Spaltung kann auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt werden: Zum einen könnte c-FLIP_S räumlich mit der c-FLIP_L/Procaspase-8-Dimerbildung interferieren; zum anderen könnte die initiale Prozessierung von Procaspase-8 notwendig sein, um eine transkatalytische Aktivität zur Spaltung von c-FLIP_L hervorzurufen.

Zellen, die sowohl c-FLIP_L als auch c-FLIP_S überexprimierten waren in additiver Weise stärker protektiert gegenüber CD95-vermittelter Apoptose als die entsprechenden Einzeltransfektanten, was darauf hindeutet, dass in diesen Zellen die c-FLIP-Expression nicht ausreichte, um die DISCs mit c-FLIP zu sättigen. DISCs aus Doppeltransfektanten enthielten p43/p41-Caspase-8 trotz hoher Expression von c-FLIP_S. Das bedeutet, dass entweder c-FLIP_L gegenüber c-FLIP_S eine dominante Funktion ausübt oder aber DISC-Spezies existieren, die ausschließlich c-FLIP_L, aber kein c-FLIP_S enthalten.

Da beide c-FLIP Splicevarianten antiapoptotische Funktionen erfüllen, stellt sich die Frage, warum einige physiologische Stimuli entweder wie der B-Zellrezeptor, kostimuliert über CD40 (Hennino *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000), ausschließlich c-FLIP_L induzieren oder wie der TCR, kostimuliert über CD28 (Kirchhoff *et al.*, 2000a;

Kirchhoff *et al.*, 2000b) c-FLIP_S induzieren. Die biologische Funktion der unterschiedlichen Spaltungsmuster von Procaspase-8 bei hoher Expression von c-FLIP_S oder c-FLIP_L sind noch ungeklärt. Da c-FLIP_S die Prozessierung von Procaspase-8 vollständig blockiert, könnten so neue Bindungsstellen für weitere DISC-Komponenten entstehen, die für eine veränderte Signaltransduktion verantwortlich sein könnten. Alternativ könnte den nur bei hoher Expression von c-FLIP_L freigesetzten p12-c-FLIP_L- und p10-Caspase-8-Untereinheiten eine bislang unbekannte Funktion in der Signaltransduktion zukommen. Vor kurzem wurde berichtet, dass einige, aber nicht alle viralen und zellulären FLIP Proteine - vermutlich durch die Rekrutierung von RIP, TRAF-1 und TRAF-2 an den DISC - die Aktivierung von NF- κ B und AP-1 nach Stimulation von Todesrezeptoren verstärken können (Kap. I.3.7.4 und (Chaudhary *et al.*, 1999a; Chaudhary *et al.*, 1999b; Chaudhary *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000)). Eine Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch DED-enthaltende Proteine wie c-FLIP wurde allerdings auch berichtet (Wajant *et al.*, 2000). Die Rolle von c-FLIP in der Todesrezeptor-vermittelten Aktivierung von NF- κ B bedarf folglich noch der genaueren Untersuchung.

2. Ein Interleukin (IL)-2-abhängiger Wechsel der CD95-Signalwege von Typ II nach Typ I sensitiviert primäre humane T-Zellen für den Aktivierungs-induzierten Zelltod

Primäre humane T-Zellen sind in einem *in vitro*-Aktivierungsmodell nach kurzzeitiger Aktivierung resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, während Langzeit-aktivierte T-Zellen in diesem Modell sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Klas *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999a; Kirchhoff *et al.*, 2000a). Somit gibt dieses *in vitro*-Modell die apoptotischen Eigenschaften peripherer T-Lymphocyten im Laufe einer Immunantwort wieder und erlaubt das Studium der molekularen Mechanismen des AICD in primären humanen T-Zellen. Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen zumindest teilweise auf reduzierter DISC-Bildung beruht (Peter *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999a). Dieser Phänotyp ähnelt stark dem von CD95-Typ II Zellen (Scaffidi *et al.*, 1998), was darauf schließen lässt, dass primäre humane T-Zellen im Laufe ihrer Aktivierung von Typ II- zum Typ I-Signalweg (d.h. zur starken DISC-Bildung) wechseln.

Um diese Hypothese weitergehend zu testen, wurden in dieser Studie zusätzliche Schritte in der CD95-Signaltransduktion wie die DISC-Aktivität in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen untersucht (Abb. III.2.1). Es konnte gezeigt werden, dass der Wechsel von Typ II nach Typ I im Laufe der Aktivierung von der Anwesenheit von IL-2 abhängt. Daraus ergibt sich folgendes Modell (Abb. IV.2): Durch reduzierte DISC-Bildung sind Kurzzeit-aktivierte (Tag 1) T-Zellen abhängig vom mitochondrialen Weg der CD95-Signaltransduktion. Dieser ist jedoch durch die hohe Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedes Bcl-x_L, das an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, blockiert (Peter *et al.*, 1997; Schmitz, 2000), wie bereits für Bcl-x_L überexprimierende CD95-Typ II-Zelllinien gezeigt wurde (Scaffidi *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999). Somit führt die reduzierte CD95 DISC-Bildung in Kombination mit der hohen Expression von Bcl-x_L zur Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Dagegen bilden Langzeit-aktivierte (Tag 6) T-Zellen große Mengen DISC, aktivieren große Mengen an Caspase-8 und verhalten sich damit wie CD95-Typ I Zellen (Scaffidi *et al.*, 1999a). Desweiteren ist die Expression von Bcl-x_L in diesen Zellen vermindert, sodass es zu einem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi_M$ und der Freisetzung von Cytochrom *c* kommt (Peter *et al.*, 1997; Schmitz, 2000). Somit sind in Langzeit-aktivierten T-Zellen beide CD95-Signalwege aktiv: die direkte Caspasen-Kaskade, sowie der mitochondriale Weg, der zur Aktivierung des Apoptosoms führt. Die Beobachtung, dass Langzeit-aktivierte T-Zellen sich wie CD95-Typ I Zellen verhalten, wird durch ein transgenes Mausmodell gestützt, in dem Bcl-2 überexprimiert ist (Strasser *et al.*, 1995). In diesem Modell sind Langzeit-aktivierte T-Zellen nach Stimulation mit Concanavalin A und IL-2 gegenüber AICD nicht protektiert. Allerdings wurden in dieser Studie ruhende oder Kurzzeit-aktivierte T-Zellen nicht untersucht.

Der Wechsel von Typ II (Kurzzeit-aktiviert) zu Typ I (Langzeit-aktiviert) T-Zellen ist abhängig von IL-2, denn nur in Anwesenheit von IL-2 war eine starke DISC-Bildung und Sensitivierung Langzeit-aktivierter T-Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose festzustellen (Abb. III.2.6). Ohne IL-2 im Kulturmedium blieben die T-Zellen resistent und zeigten geringe DISC-Bildung. Somit ähneln Langzeit-aktivierte T-Zellen nach Kultur in Abwesenheit von IL-2 den Kurzzeit-aktivierten Zellen und scheinen ebenfalls von CD95-Typ II zu sein. Interessanterweise beeinflusst IL-2 den Aktivierungsstatus Langzeit-aktivierter T-Zellen nur unwesentlich (Abb. III.2.3), während es für ihre Proliferation in diesem *in vitro*-Modell ausschlaggebend ist (Abb.

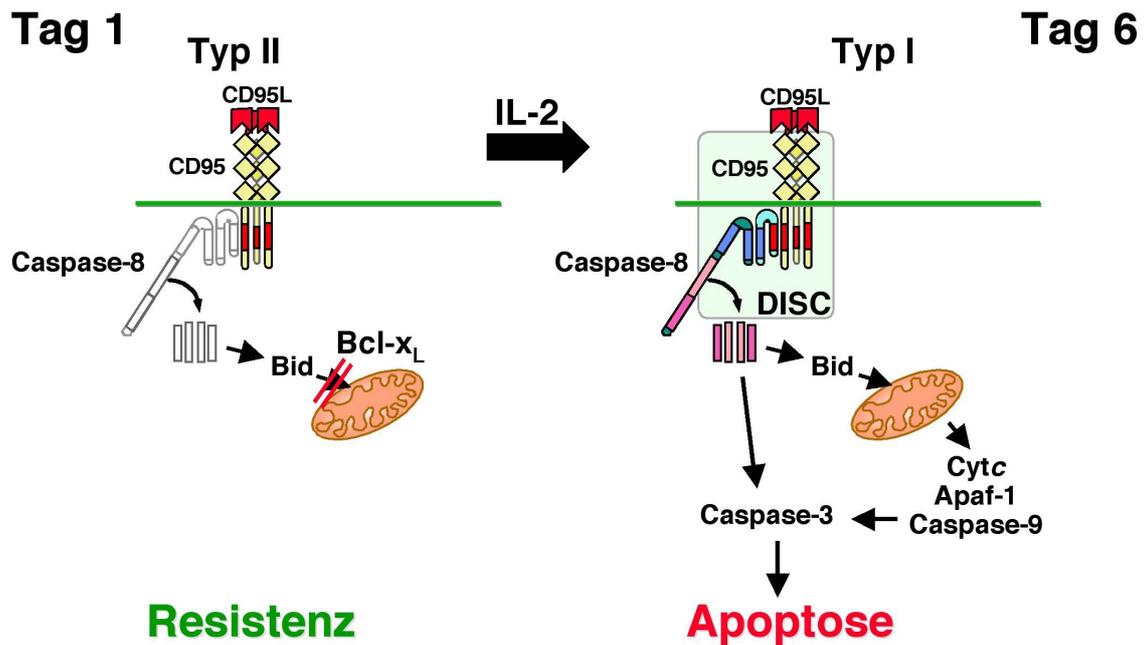


Abb. IV.2: Modell der Sensitivität und Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose in primären humanen T-Zellen. T-Zellen durchlaufen einen IL-2-abhängigen Wechsel von CD95-Typ II - als Kurzzeit-aktivierte Tag 1-Zellen - zu CD95-Typ I - als Langzeit-aktivierte Tag 6-Zellen. Grau schattiertes FADD und Caspase-8 deuten reduzierte DISC-Bildung in Tag 1-Zellen an. Die CD95-Signaltransduktion wird in diesen Zellen an den Mitochondrien durch hohe Expressionslevel von Bcl-x_L inhibiert. Tag 6-Zellen zeigen starke DISC-Bildung (grüner Kasten) und durch geringe Expression von Bcl-x_L Aktivität beider CD95-Signalwege.

III.2.4). IL-2 induziert den Eintritt von T-Zellen in den Zellzyklus, wie durch Studien an IL-2-Rezeptor-defizienten Mäusen belegt werden konnte (Suzuki *et al.*, 1995; Willerford *et al.*, 1995; Van Parijs *et al.*, 1997). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Proliferation für die Sensitivierung von T-Zellen gegenüber dem AICD notwendig ist (Algeciras-Schimmich *et al.*, 1999). Eine kurzzeitige Exposition Langzeit-aktiverter T-Zellen mit IL-2 war nicht ausreichend, um diese Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose zu sensitivieren (Abb. III.2.2C). Es wäre interessant, den Einfluss des Eintritts aktivierter T-Zellen in den Zellzyklus auf den Wechsel vom CD95-Typ II- zum CD95-Typ I-Phänotyp zu untersuchen, was weitere Aufschlüsse über die molekularen Unterschiede zwischen den beiden CD95-Signalwegen geben könnte. Allerdings scheint eine solche mögliche Abhängigkeit vom Zellzyklus kein generelles Phänomen zu sein, da es unter proliferierenden Tumor-Zelllinien sowohl Typ I- als auch Typ II-Zellen gibt (Scaffidi *et al.*, 1998). Allerdings bestimmt nicht IL-2 allein die Charakteristik von Zellen als Typ II oder Typ I, da auch IL-2 unresponsive Zellen wie

B-Zellen (Scaffidi *et al.*, 1998), embryonale Fibroblasten (Cecconi *et al.*, 1998) oder Leberzellen (Yin *et al.*, 1999) als Typ I oder II charakterisiert werden können. Außerdem war es nicht möglich, den CD95-Typ II-Phänotyp von Jurkat-T-Zellen mittels IL-2 in den Typ I umzuwandeln (Daten nicht gezeigt). Allerdings könnten Teile der IL-2-abhängigen Signalwege in Jurkat-Zellen dereguliert sein, da diese im Gegensatz zu primären T-Zellen generell unabhängig von IL-2 wachsen. In anderen Studien wurde im Gegensatz zu dieser gezeigt, dass die Expression von c-FLIP_L nach T-Zell-Aktivierung vermindert wird (Refaeli *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998a; Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999). Zwei Studien zeigten diesen Effekt allerdings in überzeugender Weise lediglich auf der mRNA-Ebene (Refaeli *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998a). Protein- und mRNA-Expression von c-FLIP müssen nicht notwendigerweise miteinander korrelieren (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999). Algeciras-Schimnich *et al.* zeigten, dass die Expression des c-FLIP_L Proteins mit dem Eintritt in den Zellzyklus korreliert (Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999). Ob die c-FLIP Expression über die Zellzyklus-induktion mit IL-2 korreliert oder direkt von IL-2-vermittelter Signaltransduktion abhängt, ist gegenwärtig nicht bekannt. Anhand des in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Modells der T-Zellaktivierung lässt sich keine Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Status des Zellzyklus und einer Modulation von c-FLIP_L treffen. Allerdings konnte keine Verringerung der Expression von c-FLIP_L in diesem Modell beobachtet werden, obwohl Langzeit-aktivierte T-Zellen mehrere Teilungen durchlaufen haben (Abb. III.2.5A). Zudem wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von IL-2 im Kulturmedium getestet, jedoch bis zu 200 U/ml kein Einfluss von IL-2 auf die Expression von c-FLIP_L detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Rekrutierung von c-FLIP_L an den CD95-DISC schien in Abwesenheit von IL-2 im Vergleich zu Caspase-8 verstärkt zu sein (Abb. III.2.6). Zudem konnte eine starke Verringerung der DISC-Bildung insgesamt festgestellt werden, also ein Effekt, der sich in der CD95-Signalkaskade oberhalb von c-FLIP befindet. Demgemäß könnte dieses eine weit wichtigere Rolle in der Regulation spielen, zumal die Expression von c-FLIP etwa 100fach niedriger liegt als die von Caspase-8 (Scaffidi *et al.*, 1999a). Zudem konnte im *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsassay DISC-Aktivität in T-Zellen nach Kultur in Abwesenheit von IL-2 festgestellt werden, was dafür spricht, dass c-FLIP_L für die Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Im Gegensatz dazu wird die Expression von c-FLIP_S nach Stimulation des TCR hochreguliert (Abb. III.2.5A und (Kirchhoff *et al.*, 2000a; Kirchhoff *et al.*, 2000b)), sodass

diese Splicevariante mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Rolle im Zusammenhang mit dem AICD spielt. Durch die Reduktion der DISC-Bildung könnten auch geringere Konzentrationen an c-FLIP zur Inhibition beitragen, denn es konnte gezeigt werden, dass c-FLIP TRAIL- und TNF-vermittelte Apoptose - vermutlich aufgrund geringerer Rezeptorexpression für die Liganden - effizienter hemmen kann als CD95-vermittelte Apoptose (Abb. III.1.1C).

Die Ursache für die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bezüglich der Regulation von c-FLIP im Rahmen der T-Zellaktivierung und den von anderen berichteten Beobachtungen (Irmeler *et al.*, 1997b; Refaeli *et al.*, 1998; Algeciras-Schimnich *et al.*, 1999) ist bislang unklar. Eine mögliche Ursache liegt in Unterschieden hinsichtlich der Stimulation der T-Zellen. Mittels cDNA-Array-Technologie konnte gezeigt werden, dass das Expressionsprofil aktivierter T-Zellen vom aktivierenden Stimulus abhängt (Alizadeh *et al.*, 1998). In den Studien von Refaeli *et al.* und Algeciras-Schimnich *et al.* wurde eine Kombination aus monoklonalen Antikörpern gegen CD3 und CD28 in An- oder Abwesenheit von IL-4 verwendet. In dieser Arbeit wurde das Lectin PHA als T-Zell-Mitogen verwendet, weil es im Vergleich zu anti-CD3/anti-CD28 eine stärkere Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose auslöste (Kirchhoff *et al.*, 2000b). PHA könnte allerdings neben dem TCR auch weitere Oberflächenrezeptoren kreuzvernetzen, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass unter diesen Bedingungen weitere Signalwege aktiviert werden, die auf die Expression von c-FLIP einwirken. Ein potentieller Kandidat ist Toso, ein Oberflächenrezeptor, der als Regulator CD95-vermittelter Apoptose via c-FLIP beschrieben wurde (Hitoshi *et al.*, 1998).

IL-2 vermittelt sowohl Überlebenssignale als auch solche, die zur Sensitivierung gegenüber Apoptose führen (Lenardo, 1991). Die Signaltransduktion von IL-2 läuft zum einen über die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges (Miyazaki *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1995) und zum anderen vermittelt der Bindung von SHC über die Aktivierung der ras/MAPK und PI3K/Akt Signalwege (Johnston *et al.*, 1995; Friedmann *et al.*, 1996; Lord *et al.*, 1998). All diese Signalwege tragen zur Proliferation von aktivierten T-Zellen bei (Moriggl *et al.*, 1999; Van Parijs *et al.*, 1999b). In einem eleganten Modell der retroviralen Rekonstitution von IL-2R β -defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die SHC-Bindungsdomäne in IL-2R β für die Induktion von Bcl-2 über den PI3K/Akt-Signalweg notwendig ist. Zudem können sowohl Akt als auch MAPK proapoptotische „BH3-only“-Mitglieder der Bcl-2-Familie phosphorylieren und

damit inaktivieren (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997; Scheid und Duronio, 1998; Bonni *et al.*, 1999; Scheid *et al.*, 1999; Holmström *et al.*, 2000). Sowohl die Induktion von Bcl-2 als auch die Inaktivierung von „BH3-only“-Proteinen können zum IL-2-induzierten Überleben von T-Zellen beitragen. Im Gegensatz zu diesen anti-apoptotischen Vorgängen induziert IL-2 auch den CD95L über die Aktivierung von STAT5 (Van Parijs *et al.*, 1999b). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-2 für eine effiziente DISC-Bildung in Langzeit-aktivierten T-Zellen benötigt wird (Abb. III.2.6). Es ist allerdings noch unklar, welche IL-2-vermittelten Signalwege die DISC-Bildung beeinflussen. Ein direkter Effekt der IL-2-Signaltransduktion auf die DISC-Bildung erscheint unwahrscheinlich, da eine kurzzeitige Prästimulation mit IL-2 nicht ausreichte, um eine Sensitivierung Langzeit-aktivierter T-Zellen hervorzurufen (Abb. III.2.2C). Daher ist der Einfluss von IL-2 auf die DISC-Bildung vermutlich ein transkriptionsabhängiger Prozess oder, wie oben diskutiert, ein indirekter Prozess, der über den Eintritt in den Zellzyklus gesteuert wird. Zusätzlich zur DISC-Bildung beeinflusst IL-2 auch den mitochondrialen Apoptoseweg in proapoptotischer Weise. Auch hier sind die Mechanismen und direkte Effektormoleküle noch unbekannt. Weitere Untersuchungen – wie zum Beispiel eine Analyse des Transkriptoms in Abhängigkeit von IL-2 durch cDNA-Arrays – sind zur Aufklärung der genauen Mechanismen vonnöten.

3. Modulation CD95-vermittelter Apoptose durch das HTLV-1 Transaktivator Protein Tax in T-Zellen

Das HTLV-1 Transaktivatorprotein Tax ist essentiell für die maligne Transformation von CD4⁺ T-Zellen, die zur Erwachsenen-T-Zell-Leukämie/Lymphom (ATL)-Erkrankung führt (Grassmann *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1990; Grossman *et al.*, 1995). Tax wirkt vor allem durch Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie sowie mit NF-κB (Jeang, 2001). Die Aktivierung von NF-κB stellt häufig ein wichtiges Überlebenssignal für Zellen dar, obwohl für diesen Transkriptionsfaktor auch proapoptotische Funktionen beschrieben wurden (Karin und Lin, 2002). Kürzlich wurde berichtet, dass auch die Expression von c-FLIP durch NF-κB induziert werden kann (Kreuz *et al.*, 2001; Micheau *et al.*, 2001). In dieser Arbeit sollte der Effekt des HTLV-1 Tax Proteins auf die Modulation der Expression von c-FLIP unter-

sucht werden. Hierzu wurde ein induzierbares Expressionssystem für Tax in Jurkat T-Zellen verwendet, in welchem Tax durch die Gabe von Östrogen oder seinem Derivat 4-Hydroxytamoxifen aktiviert werden konnte (Chlichlia *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Tax Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose induziert, jedoch nur nach Stimulation der Zellen über CD3 (Abb. III.3.2 und Daten nicht gezeigt). Diese Resistenz korrelierte mit der verstärkten Expression von Bcl-x_L, c-FLIP_L und c-FLIP_S unter denselben Stimulationsbedingungen (Abb. III.3.3A und B). Die Expression weiterer im CD95-Signalweg relevanter Proteine wie FADD, Procaspase-8 und Bcl-2 wurde nicht moduliert (Abb. III.3.3D). Bcl-x_L wurde bereits früher als antiapoptisches Zielprotein von Tax in T-Zellen beschrieben (Tsukahara *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001; Zehender *et al.*, 2001). Ferner wurde berichtet, dass in murinen Fibroblasten der mitochondriale Apoptosesignalweg blockiert ist (Saggioro *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu existiert allerdings auch ein Bericht, demzufolge Bcl-x_L durch Tax nicht moduliert wird (Kawakami *et al.*, 1999). Da Jurkat T-Zellen als CD95-Typ II Zellen charakterisiert wurden und dementsprechend CD95-vermittelte Apoptose vom mitochondrialen Signalweg abhängig ist (Scaffidi *et al.*, 1998), ist es notwendig, die relativen Beiträge von c-FLIP und Bcl-x_L zur Apoptoseresistenz in diesen Zellen zu klären. Einen Hinweis auf die mögliche Relevanz von c-FLIP_S ergibt sich aus dessen verstärkter Rekrutierung an den CD95-DISC (Abb. III.3.4). Allerdings wurde hier keine Anreicherung der Proform von Caspase-8 relativ zum initialen Spaltprodukt detektiert, wie es bei stabiler Überexpression von c-FLIP_S zu beobachten war (Abb. III.1.3). Dieses ist möglicherweise auf das Verhältnis von c-FLIP_S zu c-FLIP_L zurückzuführen, das in den Transfektanten deutlich weiter zugunsten von c-FLIP_S verschoben war (vgl. Abb. III.1.1B und Abb. III.3.3A). Dass die Induktion von c-FLIP einen Effekt hat, kann aus der Reduktion der Spaltung des proapoptotischen „BH3-only“ Proteins Bid geschlossen werden, welches das Bindeglied zwischen dem DISC bzw. Caspase-8 und dem mitochondrialen Apoptosesignalweg darstellt (Abb. III.3.5). Somit kann zwar c-FLIP, nicht aber Bcl-x_L für diese Reduktion verantwortlich sein. Da die beobachtete Inhibition der Bid-Spaltung nicht vollständig war, kann jedoch aus diesem Ergebnis nicht geschlossen werden, dass c-FLIP für die Apoptose-Inhibition eine bedeutendere Rolle als Bcl-x_L in diesem System zukommt. Interessanterweise führt auch die Kostimulation von T-Zellen über CD3 und CD28 zur Induktion von c-FLIP_S und Bcl-x_L (Kirchhoff *et al.*, 2000b), was vermuten lässt, dass Tax in Kombination mit Stimulation des TCR ähnliche Signalwege indu-

zieren könnte wie die TCR/CD28-Kostimulation. Langzeit-aktivierte T-Zellen sind vom CD95-Typ I, sodass in diesen Zellen der mitochondriale Signalweg keine essentielle Rolle spielt. Damit könnte man in einem System der Transfektion primärer humaner T-Zellen zusätzlich Aussagen über die relative Bedeutung der Induktion von c-FLIP gegenüber der Induktion von Bcl-x_L treffen.

Neben antiapoptotischen sind allerdings auch proapoptotische Funktionen von Tax beschrieben worden (Chlichlia *et al.*, 1995; Chlichlia *et al.*, 1997; Nicot und Harrod, 2000). Für das in dieser Arbeit verwendete Modell von Jurkat T-Zellen, die induzierbares Tax exprimieren, wurde gezeigt, dass Tax den AICD dieser Zellen nach zwei bis drei Tagen verstärkt (Chlichlia *et al.*, 1995; Chlichlia *et al.*, 1997). Im Rahmen einer 24-stündigen Stimulation, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede im anti-CD3-vermittelten AICD festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ferner wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Tax allein ohne zusätzliche Stimulation über CD3 über einen Zeitraum von sieben Tagen zu verstärkter Apoptose führt (Chlichlia *et al.*, 1995). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Tax-induzierte Apoptose von der Fähigkeit des Proteins zur Interaktion mit CBP/p300 abhängt (Nicot und Harrod, 2000). Auch über die Fähigkeit von Tax, CD95-vermittelte Apoptose zu inhibieren, gibt es verschiedene, zum Teil konträre Berichte.

Einerseits wurde gezeigt, dass sowohl HTLV-1 transformierte T-Zelllinien als auch Leukämie-Zellen aus ATL-Patienten sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Debatin *et al.*, 1990; Debatin *et al.*, 1993). Andererseits konnten Copeland *et al.* zeigen, dass HTLV-1 Tax exprimierende T-Zellen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Copeland *et al.*, 1994). Auch konnte exogenes Tax aus Zellkulturüberständen Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose induzieren (Copeland *et al.*, 1994). Möglicherweise lassen sich die beobachteten Unterschiede auf unterschiedliche Stadien der Infektion bzw. der Krankheit zurückführen. So könnte die Infektion mit HTLV-1 zu einer frühen Tax-vermittelten Resistenz gegenüber Apoptose führen, während nach der malignen Transformation und Ausbildung von ATL Leukämie-Zellen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Debatin *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass diese ATL-Zellen keine signifikanten Mengen des Virus oder von viralen Produkten produzieren (Hoshino *et al.*, 1983; Franchini *et al.*, 1984; Sugamura *et al.*, 1984), sodass möglicherweise hierin die Ursache für die beobachtete Apoptosesensitivität liegt. Auch der wahrscheinliche

Ablauf einer Immunantwort gegen HTLV-1 lässt eine Tax- induzierte Apoptose-resistenz in der Frühphase der Infektion sinnvoll erscheinen. Ein großer Teil (10 – 80%) Provirus-positiver Zellen exprimiert Tax innerhalb von 12 h (Hanon *et al.*, 2000). Dieses hat eine starke CTL-Antwort Tax-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zur Folge, sodass gleichzeitig in Tax-exprimierenden Zellen eine starke Proliferation angeregt und die Zelle anfällig für eine CTL-Antwort wird. Die zwei Hauptwege der cytotoxischen T-Zellantwort sind das CD95- und das Perforin/Granzym-System (Shresta *et al.*, 1998). Die Induktion von c-FLIP durch Tax könnte spezifisch das CD95-System blockieren und so dafür sorgen, dass ein Teil der infizierten Zellen die CTL-Antwort überlebt. Es bleibt allerdings zu klären, ob und unter welchen Bedingungen Tax in primären humanen T-Zellen in der Lage ist, c-FLIP zu induzieren.

V. Anhang

1. Literatur

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. und Akey, C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, **9**, 423-32.

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

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

Aggarwal, S., Gupta, A., Nagata, S. und Gupta, S. (1997) Programmed cell death (apoptosis) in cord blood lymphocytes. *J Clin Immunol*, **17**, 63-73.

Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E. S. (1997) CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res*, **57**, 615-9.

Alderson, M. R., Armitage, R. J., Maraskovsky, E., Tough, T. W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F. und Lynch, D. H. (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med*, **178**, 2231-5.

Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F. und Lynch, D. H. (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*, **181**, 71-7.

Algeciras-Schimnich, A., Griffith, T. S., Lynch, D. H. und Paya, C. V. (1999) Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, **162**, 5205-11.

Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K. und Peter, M. E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, **22**, 207-20.

Alizadeh, A., Eisen, M., Botstein, D., Brown, P. O. und Staudt, L. M. (1998) Probing lymphocyte biology by genomic-scale gene expression analysis. *J Clin Immunol*, **18**, 373-9.

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

Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. und Martinou, J. C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, **276**, 11615-23.

Aravind, L., Dixit, V. M. und Koonin, E. V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*, **24**, 47-53.

Arima, N., Daitoku, Y., Ohgaki, S., Fukumori, J., Tanaka, H., Yamamoto, Y., Fujimoto, K. und Onoue, K. (1986) Autocrine growth of interleukin 2-producing leukemic cells in a patient with adult T cell leukemia. *Blood*, **68**, 779-82.

Armstrong, R. C., Aja, T., Xiang, J., Gaur, S., Krebs, J. F., Hoang, K., Bai, X., Korsmeyer, S. J., Karanewsky, D. S., Fritz, L. C. und Tomaselli, K. J. (1996) Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem*, **271**, 16850-5.

Bangham, C. R. (2000) The immune response to HTLV-I. *Curr Opin Immunol*, **12**, 397-402.

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

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

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

Baumann, S., Krueger, A., Kirchhoff, S. und Krammer, P. H. (2002) Regulation of T cell Apoptosis during the Immune Response. *Curr Mol Med*, **2**, 257-272.

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

Bernardi, P., Broekemeier, K. M. und Pfeiffer, D. R. (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, **26**, 509-517.

Berndt, C., Mopps, B., Angermüller, S., Gierschik, P. und Krammer, P. H. (1998) CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 12556-61.

Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G. H., Senkevich, T. G., Alnemri, E. S., Moss, B., Lenardo, M. J., Tomaselli, K. J. und Cohen, J. I. (1997) Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 1172-6.

Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P. R., Marco, S. D., Krebs, J. F., Wu, J. C., Tomaselli, K. J. und Grutter, M. G. (1999) The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des.*, **7**, 1125-1133.

Bodmer, J. L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L. E., Browning, J. L., MacDonald, H. R. und Tschopp, J. (1997) TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity*, **6**, 79-88.

Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J. und Tschopp, J. (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol*, **2**, 241-3.

Bodmer, J. L., Schneider, P. und Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, **27**, 19-26.

Boise, L. H. und Thompson, C. B. (1997) Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 3759-3764.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. und Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, **85**, 803-15.

Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H. und Wallach, D. (1995) Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem*, **270**, 387-91.

Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A. und Greenberg, M. E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, **286**, 1358-1362.

Brauweiler, A., Garl, P., Franklin, A. A., Giebler, H. A. und Nyborg, J. K. (1995) A molecular mechanism for human T-cell leukemia virus latency and Tax transactivation. *J Biol Chem*, **270**, 12814-22.

Brown, T. L. und Howe, P. H. (1998) MADD is highly homologous to a Rab3 guanine-nucleotide exchange protein (Rab3-GEP). *Curr Biol*, **8**, R191.

Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., Ware, C. F. und et al. (1995) Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, **373**, 441-4.

Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M. und Cohen, G. M. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*, **275**, 6067-70.

Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. und Cohen, G. M. (1999) Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*, **274**, 22686-22692.

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

Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. und Shi, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**, 855-62.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. und Lenardo, M. J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-4.

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

Chaudhary, P. M., Eby, M. T., Jasmin, A. und Hood, L. (1999a) Activation of the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway by overexpression of caspase-8 and its homologs. *J Biol Chem*, **274**, 19211-9.

Chaudhary, P. M., Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L. und Hood, L. (2000) Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene*, **19**, 4451-60.

Chaudhary, P. M., Jasmin, A., Eby, M. T. und Hood, L. (1999b) Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene*, **18**, 5738-46.

Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. und Korsmeyer, S. J. (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-11.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R. und Dixit, V. M. (1997) Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, **275**, 1122-6.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. und Dixit, V. M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-12.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. und Dixit, V. M. (1996a) Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, **274**, 990-2.

Chinnaiyan, A. M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G. G. und Dixit, V. M. (1996b) Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem*, **271**, 4573-6.

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

Chlichlia, K., Busslinger, M., Peter, M. E., Walczak, H., Krammer, P. H., Schirmacher, V. und Khazaie, K. (1997) ICE-proteases mediate HTLV-I Tax-induced apoptotic T-cell death. *Oncogene*, **14**, 2265-72.

Chlichlia, K., Moldenhauer, G., Daniel, P. T., Busslinger, M., Gazzolo, L., Schirmacher, V. und Khazaie, K. (1995) Immediate effects of reversible HTLV-1 tax function: T-cell activation and apoptosis. *Oncogene*, **10**, 269-77.

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

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

Chu, K., Niu, X. und Williams, L. T. (1995) A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 11894-11898.

Clarke, P. G. H. und Clarke, S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol*, **193**, 81.

Combadiere, B., Reis e Sousa, C., Trageser, C., Zheng, L. X., Kim, C. R. und Lenardo, M. J. (1998) Differential TCR signaling regulates apoptosis and immunopathology during antigen responses *in vivo*. *Immunity*, **9**, 305-313.

Copeland, K. F., Haaksma, A. G., Goudsmit, J., Krammer, P. H. und Heeney, J. L. (1994) Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **10**, 1259-68.

D'Souza, S. D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N. R., Barker, P. A., Troutt, A. B., Raine, C. S. und Antel, J. P. (1996) Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med*, **184**, 2361-2370.

Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D. R. und Simon, H. U. (2002) Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat Med*, **8**, 61-7.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.

Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. und Kroemer, G. (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J*, **14**, 729-39.

Day, C. L., Dupont, C., Lackmann, M., Vaux, D. L. und Hinds, M. G. (1999) Solution structure and mutagenesis of the caspase recruitment domain (CARD) from Apaf-1. *Cell Death Differ*, **6**, 1125-32.

Debatin, K. M., Fahrig-Faissner, A., Enenkel-Stoodt, S., Kreuz, W., Benner, A. und Krammer, P. H. (1994) High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*, **83**, 3101-3.

Debatin, K. M., Goldman, C. K., Waldmann, T. A. und Krammer, P. H. (1993) APO-1-induced apoptosis of leukemia cells from patients with adult T- cell leukemia. *Blood*, **81**, 2972-7.

Debatin, K. M., Goldmann, C. K., Bamford, R., Waldmann, T. A. und Krammer, P. H. (1990) Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia. *Lancet*, **335**, 497-500.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. und Nunez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, **278**, 687-689.

Deveraux, Q. L. und Reed, J. C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-52.

Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. und Liu, Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, **12**, 419-429.

Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P. und Krammer, P. H. (1992) Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol*, **149**, 3166-73.

Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M. und Krammer, P. H. (1995a) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, **373**, 438-41.

Dhein, J., Walczak, H., Westendorp, M. O., Baumler, C., Stricker, K., Frank, R., Debatin, K. M. und Krammer, P. H. (1995b) Molecular mechanisms of APO-1/Fas(CD95)-mediated apoptosis in tolerance and AIDS. *Behring Inst Mitt*, 13-20.

Djerbi, M., Darreh-Shori, T., Zhivotovsky, B. und Grandien, A. (2001) Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol*, **54**, 180-9.

Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A. I., Bogen, B., Biberfeld, P. und Grandien, A. (1999) The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med*, **190**, 1025-32.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. und Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.

Duan, H. und Dixit, V. M. (1997) RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*, **385**, 86-9.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M. und Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions during Apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R. und Bishop, J. M. (1989) Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone- dependent transformation of cells. *Nature*, **340**, 66-8.

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. und Alnemri, E. S. (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 7464-9.

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

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

Franchini, G., Wong-Staal, F. und Gallo, R. C. (1984) Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 6207-11.

Friedmann, M. C., Migone, T. S., Russell, S. M. und Leonard, W. J. (1996) Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 2077-82.

Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner, B., Ihle, J. N., Minami, Y., Miyazaki, T. und Taniguchi, T. (1995) Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5482-6.

Fujii, M., Sassone-Corsi, P. und Verma, I. M. (1988) c-fos promoter trans-activation by the tax1 protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 8526-30.

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

Glucksmann, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev*, **26**, 59-81.

Glykofrydes, D., Niphuis, H., Kuhn, E. M., Rosenwirth, B., Heeney, J. L., Bruder, J., Niedobitek, G., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B. und Ensser, A. (2000) Herpesvirus saimiri vFLIP provides an antiapoptotic function but is not essential for viral replication, transformation, or pathogenicity. *J Virol*, **74**, 11919-27.

Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., Brodianskii, V. M. und Wallach, D. (1997) CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem*, **272**, 19641-4.

Grassmann, R., Dengler, C., Müller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B., McGuire, K., Dokhelar, M. C., Sodroski, J. G. und Haseltine, W. A. (1989) Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 3351-5.

Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R. und Ferguson, T. A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, **270**, 1189-92.

Griffith, T. S. und Ferguson, T. A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunology Today*, **18**, 240-244.

Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E. und Gross, A. (2002) tBID Homooligomerizes in the Mitochondrial Membrane to Induce Apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 12237-45.

Gross, A., McDonnell, J. M. und Korsmeyer, S. J. (1999a) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-911.

Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Korsmeyer, S. J. (1999b) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, **274**, 1156-63.

Grossman, W. J., Kimata, J. T., Wong, F. H., Zutter, M., Ley, T. J. und Ratner, L. (1995) Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T- cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 1057-61.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. und Tschopp, J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, **274**, 1363-6.

Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M. und Hood, L. (1997) MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 11333-8.

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

Hanon, E., Hall, S., Taylor, G. P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., Usuku, K., Osame, M., Weber, J. N. und Bangham, C. R. (2000) Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T- cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, **95**, 1386-92.

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E. S. (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*, **277**, 432-8.

Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Palleja, M., Krammer, P. H. und Defrance, T. (2000) Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol*, **165**, 3023-30.

Hennino, A., Berard, M., Krammer, P. H. und Defrance, T. (2001) FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med*, **193**, 447-58.

Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., Francke, U., Reed, J. C., Kinoshita, S. und Nolan, G. P. (1998) Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*, **8**, 461-71.

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

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B. und Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, **1**, 489-95.

Hollsberg, P. (1999) Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 308-33.

Holmström, T. H., Schmitz, I., Soderstrom, T. S., Poukkula, M., Johnson, V. L., Chow, S. C., Krammer, P. H. und Eriksson, J. E. (2000) MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J*, **19**, 5418-28.

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

Hoshino, H., Shimoyama, M., Miwa, M. und Sugimura, T. (1983) Detection of lymphocytes producing a human retrovirus associated with adult T-cell leukemia by syncytia induction assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 7337-41.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V. und Goeddel, D. V. (1996a) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor- 1 signaling complex. *Immunity*, **4**, 387-96.

Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G. und Goeddel, D. V. (1996b) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.

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

Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. und Dixit, V. M. (1997a) A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 9621-4.

Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. und Dixit, V. M. (1997b) I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD- 95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 17255-7.

Hu, W. H., Johnson, H. und Shu, H. B. (2000) Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem*, **275**, 10838-44.

Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. und Nunez, G. (1998) Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 4386-4391.

Huang, D. C., O'Reilly, L. A., Strasser, A. und Cory, S. (1997) The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J*, **16**, 4628-38.

Huang, D. C. und Strasser, A. (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, **103**, 839-42.

Huang, D. C., Tschopp, J. und Strasser, A. (2000) Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ*, **7**, 754-5.

Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K. und Yonehara, S. (1999) The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, **398**, 777-85.

Inaba, M., Kurasawa, K., Mamura, M., Kumano, K., Saito, Y. und Iwamoto, I. (1999) Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol*, **163**, 1315-1320.

Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. und Nunez, G. (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 10717-10722.

Inoue, J., Seiki, M., Taniguchi, T., Tsuru, S. und Yoshida, M. (1986) Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J*, **5**, 2883-8.

Irmeler, M., Hofmann, K., Vaux, D. und Tschopp, J. (1997a) Direct physical interaction between the *Caenorhabditis elegans* 'death proteins' CED-3 and CED-4. *FEBS Lett*, **406**, 189-90.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. und Tschopp, J. (1997b) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**, 190-5.

Itoh, N. und Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-7.

Itoh, N., Tsujimoto, Y. und Nagata, S. (1993) Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol*, **151**, 621-7.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. und Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**, 233-43.

Jäättelä, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J. A. und Dixit, V. M. (1995) Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene*, **10**, 2297-305.

Jackson, C. E. und Puck, J. M. (1999) Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr*, **11**, 521-527.

Jacobson, M. D., Burne, J. F., King, M. P., Miyashita, T., Reed, J. C. und Raff, M. C. (1993) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, **361**, 365-369.

Jeang, K. T. (2001) Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. *Cytokine Growth Factor Rev*, **12**, 207-17.

Jenkinson, E. J., Kingston, R., Smith, K. A., William, G. T. und Owen, J. J. (1989) Antigen induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell repertoire. *Eur J Immunol*, **19**, 2175.

Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W. und Goeddel, D. V. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, **283**, 543-6.

Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., Gupta, S., Chen, Y. Q., Giri, J. D. und et al. (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8705-9.

Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z. und Marshak-Rothstein, A. (1995) Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature*, **373**, 444-8.

Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J. und Blenis, J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol*, **8**, 1001-1008.

Juo, P., Woo, M. S., Kuo, C. J., Signorelli, P., Biemann, H. P., Hannun, Y. A. und Blenis, J. (1999) FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ*, **10**, 797-804.

Karin, M. und Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-7.

Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M. und Tschopp, J. (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*, **10**, 640-8.

Kataoka, T., Ito, M., Budd, R. C., Tschopp, J. und Nagai, K. (2002) Expression level of c-FLIP versus Fas determines susceptibility to Fas ligand-induced cell death in murine thymoma EL-4 cells. *Exp Cell Res*, **273**, 256-64.

Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J. und Tschopp, J. (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*, **161**, 3936-42.

Katsikis, P. D., Wunderlich, E. S., Smith, C. A. und Herzenberg, L. A. (1995) Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med*, **181**, 2029-2036.

Kawakami, A., Nakashima, T., Sakai, H., Urayama, S., Yamasaki, S., Hida, A., Tsuboi, M., Nakamura, H., Ida, H., Migita, K., Kawabe, Y. und Eguchi, K. (1999) Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF- kappaB nuclear translocation. *Blood*, **94**, 3847-54.

Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. und Yagita, H. (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*, **182**, 1777-1783.

Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z. und Leder, P. (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, **8**, 297-303.

Keppler, O. T., Peter, M. E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W. und Pawlita, M. (1999) Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology*, **9**, 557-569.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer*, **26**, 239-257.

Kirchhoff, S., Müller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I. und Krammer, P. H. (2000a) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol*, **165**, 6293-300.

Kirchhoff, S., Müller, W. W., Li-Weber, M. und Krammer, P. H. (2000b) Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol*, **30**, 2765-74.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, **14**, 5579-88.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J. und Ashkenazi, A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, **12**, 611-20.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D. und Ashkenazi, A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*, **276**, 46639-46.

Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M. und von Boehmer, H. (1988) Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*, **333**, 742-746.

Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y. P., Goeddel, D. V., Giles, K. M., Pun, K. T., Grinham, C. J., Brown, R. und Farrow, S. N. (1996) A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*, **384**, 372-5.

Klas, C., Debatin, K. M., Jonker, R. R. und Krammer, P. H. (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol*, **5**, 625-30.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. und Newmeyer, D. D. (1997) The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.

Koonin, E. V., Aravind, L., Hofmann, K., Tschopp, J. und Dixit, V. M. (1999) Apoptosis. Searching for FLASH domains. *Nature*, **401**, 662; discussion 662-3.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. und Reed, J. C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, **53**, 4701-4714.

Krammer, P. H. (1999) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, **71**, 163-210.

Krammer, P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789-95.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. und Wajant, H. (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol*, **21**, 3964-73.

Kroemer, G., Zamzami, N. und Susin, S. A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, **18**, 44-51.

Krueger, A. (1999) Klonierung und funktionelle Analyse von Splicevarianten des zellulären FLICE-inhibitorischen Proteins (c-FLIP) (*Diplomarbeit*). Fachbereich Chemie, Universität Hannover.

Kundig, T. M., Bachmann, M. F., Oehen, S., Hoffmann, U. W., Simard, J. J., Kalberer, C. P., Pircher, H., Ohashi, P. S., Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (1996) On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 9716-23.

Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E. L. und Schlossman, S. F. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, **206**, 347-9.

Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V. und Kahn, A. (1996) Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med*, **2**, 80-86.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lee, R. K., Spielman, J. und Podack, E. R. (1996) Bcl-2 protects against Fas-based but not perforin-based T cell-mediated cytotoxicity. *Int Immunol*, **8**, 991-1000.

Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H. und Moller, P. (1993) Constitutive and induced expression of APO-1, a

new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest*, **69**, 415-29.

Lenardo, M. J. (1991) Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*, **353**, 858-61.

Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H. W., Terbeck, G., Brocker, E. B. und Kampgen, E. (2000) Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE- inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand- mediated apoptosis. *Blood*, **96**, 2628-31.

Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C. M., Ross, R. und Raines, E. W. (1999) Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol*, **1**, 227-233.

Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V. und Pardee, A. B. (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*, **268**, 429-431.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. und Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.

Li, L. Y., Luo, X. und Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-9.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. und Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-89.

Li, R., Pei, H., Watson, D. K. und Papas, T. S. (2000) EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene*, **19**, 745-753.

Li, X. H. und Gaynor, R. B. (2000) Mechanisms of NF-kappaB activation by the HTLV type 1 tax protein. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **16**, 1583-90.

Li-Weber, M. und Krammer, P. H. (2002) The death of a T-cell: expression of the CD95 ligand. *Cell Death Differ*, **9**, 101-3.

Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R. und Thompson, C. B. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, **6**, 1389-99.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. und Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, **86**, 147-157.

Locksley, R. M., Killeen, N. und Lenardo, M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.

Lord, J. D., McIntosh, B. C., Greenberg, P. D. und Nelson, B. H. (1998) The IL-2 receptor promotes proliferation, bcl-2 and bcl-x induction, but not cell viability through the adapter molecule Shc. *J Immunol*, **161**, 4627-33.

Los, M., Wesselborg, S. und Schulze-Osthoff, K. (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, **10**, 629-639.

Ludewig, B., Oehen, S., Barchiesi, F., Schwendener, R. A., Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (1999) Protective antiviral cytotoxic T cell memory is most efficiently maintained by restimulation via dendritic cells. *J Immunol*, **163**, 1839-44.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-90.

Mandal, M., Maggirwar, S. B., Sharma, N., Kaufmann, S. H., Sun, S. C. und Kumar, R. (1996) Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem*, **271**, 30354-30359.

Manns, A., Hisada, M. und La Grenade, L. (1999) Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*, **353**, 1951-8.

Mariani, S. M., Matiba, B., Armandola, E. A. und Krammer, P. H. (1994) The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol*, **24**, 3119-23.

Mariani, S. M., Matiba, B., Baumler, C. und Krammer, P. H. (1995) Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol*, **25**, 2303-7.

Marsters, S. A., Pitti, R. M., Donahue, C. J., Ruppert, S., Bauer, K. D. und Ashkenazi, A. (1996a) Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr Biol*, **6**, 750-2.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Donahue, C. J., Pitti, R. M., Gray, C. L., Goddard, A. D., Bauer, K. D. und Ashkenazi, A. (1996b) Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol*, **6**, 1669-76.

Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N. F., Lemoine, N. R., Savopoulos, J., Gray, C. W., Creasy, C. L., Dingwall, C. und Downward, J. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*, **277**, 439-44.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C. und Kroemer, G. (1998a) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, **281**, 2027-31.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C. und Kroemer, G. (1998b) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*, **187**, 1261-71.

Matsuzawa, A., Moriyama, T., Kaneko, T., Tanaka, M., Kimura, M., Ikeda, H. und Katagiri, T. (1990) A new allele of the *lpr* locus, *lprcg*, that complements the *gld* gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. *J Exp Med*, **171**, 519-531.

McCloskey, T. W., Oyaizu, N., Kaplan, M. und Pahwa, S. (1995) Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Cytometry*, **22**, 111-114.

McDonnell, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. und Cowburn, D. (1999) Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, **96**, 625-34.

Medema, J. P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C. J. und Offringa, R. (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE- inhibitory protein. *J Exp Med*, **190**, 1033-8.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, **16**, 2794-804.

Meinl, E., Fickenscher, H., Thome, M., Tschopp, J. und Fleckenstein, B. (1998) Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today*, **19**, 474-9.

Memon, S. A., Moreno, M. B., Petrak, D. und Zacharchuk, C. M. (1995) Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol*, **155**, 4644-4652.

Michaelson, J. S. (2000) The Daxx enigma. *Apoptosis*, **5**, 217-20.

Michaelson, J. S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C. und Leder, P. (1999) Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev*, **13**, 1918-1923.

Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. und Tschopp, J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*, **21**, 5299-305.

Minn, A. J., Kettlun, C. S., Liang, H., Kelekar, A., Vander Heiden, M. G., Chang, B. S., Fesik, S. W., Fill, M. und Thompson, C. B. (1999) Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J*, **18**, 632-643.

Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. und Thompson, C. B. (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385**, 353-357.

Mittl, P. R., Di Marco, S., Krebs, J. F., Bai, X., Karanewsky, D. S., Priestle, J. P., Tomaselli, K. J. und Grutter, M. G. (1997) Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem*, **272**, 6539-6547.

Miyatake, S., Seiki, M., Yoshida, M. und Arai, K. (1988) T-cell activation signals and human T-cell leukemia virus type I- encoded p40x protein activate the mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene through a common DNA element. *Mol Cell Biol*, **8**, 5581-7.

Miyazaki, T., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z. J., Oishi, I., Silvennoinen, O., Witthuhn, B. A., Ihle, J. N. und Taniguchi, T. (1994) Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*, **266**, 1045-7.

Modrow, S. und Falke, D. (1997) Molekulare Virologie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.

Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T. A., Dyer, M. J., Mason, D. Y. und Greaves, M. F. (1992) Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem*, **40**, 1819-1825.

Moreno, M. B., Memon, S. A. und Zacharchuk, C. M. (1996) Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and IL-1beta-converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, **157**, 3845-3849.

Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M. und Yamamoto, N. (2001) Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor- kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes*, **22**, 279-87.

Moriggl, R., Topham, D. J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Bunting, K. D., Grosveld, G. C. und Ihle, J. N. (1999) Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*, **10**, 249-59.

Moriishi, K., Huang, D. C., Cory, S. und Adams, J. M. (1999) Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 9683-9688.

Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. und Fesik, S. W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **381**, 335-341.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. und Dixit, V. M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**, 817-27.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. und Dixit, V. M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**, 2926-30.

Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H. und Youle, R. J. (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*, **153**, 1265-76.

Newmeyer, D. D., Bossy-Wetzel, E., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Beere, H. M. und Green, D. R. (2000) Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ*, **7**, 402-7.

Newton, K., Harris, A. W. und Strasser, A. (2000) FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *EMBO J*, **19**, 931-41.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. und Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-279.

Nicot, C., Astier-Gin, T. und Guillemain, B. (1997) Activation of Bcl-2 expression in human endothelial cells chronically expressing the human T-cell lymphotropic virus type I. *Virology*, **236**, 47-53.

Nicot, C. und Harrod, R. (2000) Distinct p300-responsive mechanisms promote caspase-dependent apoptosis by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *Mol Cell Biol*, **20**, 8580-9.

Nossal, G. J. (1994) Negative selection of lymphocytes. *Cell*, **76**, 229-239.

O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K. und Shanahan, F. (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med*, **184**, 1075-1082.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J. und Trauth, B. C. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem*, **267**, 10709-10715.

OhYama, T., Tsukumo, S., Yajima, N., Sakamaki, K. und Yonehara, S. (2000) Reduction of thymocyte numbers in transgenic mice expressing viral FLICE-inhibitory protein in a Fas-independent manner. *Microbiol Immunol*, **44**, 289-97.

Okada, H., Suh, W. K., Jin, J., Woo, M., Du, C., Elia, A., Duncan, G. S., Wakeham, A., Itie, A., Lowe, S. W., Wang, X. und Mak, T. W. (2002) Generation and Characterization of Smac/DIABLO-Deficient Mice. *Mol Cell Biol*, **22**, 3509-3517.

Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C. F., Chang, H. M. und Yeh, E. T. (1996) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol*, **157**, 4277-4281.

- Osmond, D. G. (1993) The turnover of B-cell populations. *Immunol Today*, **14**, 34-37.
- Pan, G., O'Rourke, K. und Dixit, V. M. (1998) Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*, **273**, 5841-5.
- Panka, D. J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K. und Mier, J. W. (2001) Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activity Regulates c-FLIP Expression in Tumor Cells. *J Biol Chem*, **276**, 6893-6.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A. und Ruberti, G. (1999) Identification and Characterization of a Ligand-independent Oligomerization Domain in the Extracellular Region of the CD95 Death Receptor. *J Biol Chem*, **274**, 38241-38250.
- Parker, M. W. und Pattus, F. (1993) Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem Sci*, **18**, 391-395.
- Parlato, S., Giammarioli, A. M., Logozzi, M., Lozupone, F., Matarrese, P., Luciani, F., Falchi, M., Malorni, W. und Fais, S. (2000) CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J*, **19**, 5123-34.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X. und Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*, **412**, 90-4.
- Peitsch, M. C. und Tschopp, J. (1995) Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol Immunol*, **32**, 761-72.
- Perlman, H., Pagliari, L. J., Georganas, C., Mano, T., Walsh, K. und Pope, R. M. (1999) FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*, **190**, 1679-88.
- Peter, M., Hellbardt, S., Schwartz-Albiez, A., Westendorp, M., Walczak, H., Moldenhauer, G., Grell, M. und Krammer, P. (1995) Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, **2**, 163-171.
- Peter, M. E., Kischkel, F. C., Scheuerpflug, C. G., Medema, J. P., Debatin, K. M. und Krammer, P. H. (1997) Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur J Immunol*, **27**, 1207-12.
- Peter, M. E., Scaffidi, C., Medema, J. P., Kischkel, F. C. und Krammer, P. H. (1998) The Death Receptors. In S. Kumar (ed.) *Apoptosis, problems and diseases*. Springer, Heidelberg, pp. 25-63.
- Petit, P. X., Lecoœur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. und Gougeon, M. L. (1995) Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol*, **130**, 157-167.

Petit, P. X., Susin, S. A., Zamzami, N., Mignotte, B. und Kroemer, G. (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett*, **396**, 7-13.

Picard, D., Salsler, S. J. und Yamamoto, K. R. (1988) A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell*, **54**, 1073-80.

Pluta, A. F., Earnshaw, W. C. und Goldberg, I. G. (1998) Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J Cell Sci*, **111**, 2029-2041.

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. und Gallo, R. C. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**, 7415-9.

Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Reitz, M. S., Kalyanaraman, V. S. und Gallo, R. C. (1981) Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature*, **294**, 268-71.

Portis, T., Harding, J. C. und Ratner, L. (2001) The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors. *Blood*, **98**, 1200-8.

Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S. und Shi, Y. (1999) Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature*, **399**, 549-57.

Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B. F., Peterson, E. P., Thornberry, N. A., Huang, J., MacPherson, D. P., Black, S. C., Hornung, F., Lenardo, M. J., Hayden, M. R., Roy, S. und Nicholson, D. W. (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, **5**, 271-88.

Rathmell, J. C., Townsend, S. E., Xu, J. C., Flavell, R. A. und Goodnow, C. C. (1996) Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, **87**, 319-29.

Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J. und Abbas, A. K. (1998) Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, **8**, 615-23.

Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A. und de Villartay, J. P. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, **268**, 1347-1349.

Rodriguez, I., Matsuura, K., Khatib, K., Reed, J. C., Nagata, S. und Vassalli, P. (1996) A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J Exp Med*, **183**, 1031-1036.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A. und Becker, J. W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*, **3**, 619-625.

Rouvier, E., Luciani, M. F. und Golstein, P. (1993) Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*, **177**, 195-200.

Saggiaro, D., Barp, S. und Chieco-Bianchi, L. (2001) Block of a mitochondrial-mediated apoptotic pathway in Tax-expressing murine fibroblasts. *Exp Cell Res*, **269**, 245-55.

Saito, M., Korsmeyer, S. J. und Schlesinger, P. H. (2000) BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol*, **2**, 553-5.

Salvesen, G. S. und Dixit, V. M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 10964-7.

Sato, T., Irie, S., Kitada, S. und Reed, J. C. (1995) FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science*, **268**, 411-415.

Savill, J. S., Fadok, V., Henson, P. und Haslett, J. E. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, **14**, 131.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, **17**, 1675-87.

Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1997) FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem*, **272**, 26953-8.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1999a) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 1541-8.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1999b) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem*, **274**, 22532-8.

Scheid, M. P. und Duronio, V. (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 7439-7444.

Scheid, M. P., Schubert, K. M. und Duronio, V. (1999) Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem*, **274**, 31108-31113.

Schendel, S. L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B. L. und Reed, J. C. (1999) Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem*, **274**, 21932-21936.

Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. und Reed, J. C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 5113-8.

Schievella, A. R., Chen, J. H., Graham, J. R. und Lin, L. L. (1997) MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 12069-12075.

Schlapbach, R., Spanaus, K. S., Malipiero, U., Lens, S., Tasinato, A., Tschopp, J. und Fontana, A. (2000) TGF-beta induces the expression of the FLICE-inhibitory protein and inhibits Fas-mediated apoptosis of microglia. *Eur J Immunol*, **30**, 3680-8.

Schmitz, I. (2000) Das Zwei-Signalwege-Modell des Todesrezeptors CD95: Implikationen für das Verständnis der T-Zell-Immunantwort (*Dissertation*). Fachbereich Chemie, Universität Hannover.

Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1999) Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ*, **6**, 821-2.

Screaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J. und Bell, J. I. (1997) LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 4615-4619.

Shimizu, S., Narita, M. und Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.

Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A. und Ley, T. J. (1998) How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*, **10**, 581-7.

Shu, H. B., Halpin, D. R. und Goeddel, D. V. (1997) Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, **6**, 751-63.

Siegel, R. M., Chan, F. K., Chun, H. J. und Lenardo, M. J. (2000a) The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*, **1**, 469-74.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y. und Lenardo, M. J. (2000b) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, **288**, 2354-7.

Siegel, R. M., Martin, D. A., Zheng, L., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J. und Lenardo, M. J. (1998) Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, **141**, 1243-53.

Slee, E. A., Adrain, C. und Martin, S. J. (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**, 1067-1074.

Smith, M. R. und Greene, W. C. (1992) Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology*, **187**, 316-20.

Spector, M. S., Desnoyers, S., Hoepfner, D. J. und Hengartner, M. O. (1997) Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature*, **385**, 653-656.

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H. und Walczak, H. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, **12**, 599-609.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E. S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, **1**, 949-57.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J., Armstrong, R. C. und Alnemri, E. S. (1997) FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 18542-5.

Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E. und Seed, B. (1995) RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, **81**, 513-523.

Stegh, A. H., Barnhart, B. C., Volkland, J., Algeciras-Schimmich, A., Ke, N., Reed, J. C. und Peter, M. E. (2002) Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. *J Biol Chem*, **277**, 4351-60.

Stegh, A. H., Herrmann, H., Lampel, S., Weisenberger, D., Andra, K., Seper, M., Wiche, G., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (2000) Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor- mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 5665-79.

Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M. und Salvesen, G. S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*, **274**, 8359-62.

Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Müller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H. und Galle, P. R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med*, **2**, 1361-6.

Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H. und Cory, S. (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J*, **14**, 6136-47.

Stuart, P. M., Griffith, T. S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X. und Ferguson, T. A. (1997) CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest.*, **99**, 396-402.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. und Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-78.

Sugamura, K., Fujii, M., Kannagi, M., Sakitani, M., Takeuchi, M. und Hinuma, Y. (1984) Cell surface phenotypes and expression of viral antigens of various human cell lines carrying human T-cell leukemia virus. *Int J Cancer*, **34**, 221-8.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. und Kroemer, G. (1999a) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*, **189**, 381-94.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. R., Penninger, J. M. und Kroemer, G. (1999b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441[^]-446.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H. G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J. C. und Kroemer, G. (1997) The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide- induced apoptosis. *J Exp Med*, **186**, 25-37.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. und Kroemer, G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*, **184**, 1331-41.

Suzuki, H., Kundig, T. M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J. J., Ohashi, P. S., Griesser, H. und et al. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*, **268**, 1472-6.

Suzuki, T., Fujisawa, J. I., Toita, M. und Yoshida, M. (1993) The trans-activator tax of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) interacts with cAMP-responsive element (CRE) binding and CRE modulator proteins that bind to the 21-base-pair enhancer of HTLV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 610-4.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. und Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, **8**, 613-21.

Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. und Nagata, S. (1994a) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, **76**, 969-76.

Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. und Nagata, S. (1994b) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol*, **6**, 1567-74.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A. und Reed, J. C. (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, **80**, 279-284.

Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M. und Hatanaka, M. (1990) Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 1071-5.

Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. und Nagata, S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*, **4**, 31-6.

Tanaka, S., Saito, K. und Reed, J. C. (1993) Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem*, **268**, 10920-10926.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. und Goeddel, D. V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-853.

Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E. und Tschopp, J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, **386**, 517-21.

Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Ting, A. T., Pimentel-Muinós, F. X. und Seed, B. (1996) RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J*, **15**, 6189-6196.

Torgeman, A., Ben-Aroya, Z., Grunspan, A., Zelin, E., Butovsky, E., Hallak, M., Lochelt, M., Flugel, R. M., Livneh, E., Wolfson, M., Kedar, I. und Aboud, M. (2001) Activation of HTLV-I long terminal repeat by stress-inducing agents and protection of HTLV-I-infected T-cells from apoptosis by the viral tax protein. *Exp Cell Res*, **271**, 169-79.

Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A. und Reed, J. C. (1999) Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J*, **18**, 6037-49.

Tracey, K. J. und Cerami, A. (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 317-343.

Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. und Krammer, P. H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-5.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. und Croce, C. M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**, 1440-1443.

Tsukahara, T., Kannagi, M., Ohashi, T., Kato, H., Arai, M., Nunez, G., Iwanaga, Y., Yamamoto, N., Ohtani, K., Nakamura, M. und Fujii, M. (1999) Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol*, **73**, 7981-7.

Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. und Verma, I. M. (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*, **274**, 787-789.

Van Loo, G., Demol, H., van Gorp, M., Hoorelbeke, B., Schotte, P., Beyaert, R., Zhivotovsky, B., Gevaert, K., Declercq, W., Vandekerckhove, J. und Vandenabeele, P. (2002) A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. *Cell Death Differ*, **9**, 301-8.

van Loo, G., van Gorp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. und Vandenabeele, P. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, **9**, 20-6.

Van Parijs, L., Biuckians, A., Ibragimov, A., Alt, F. W., Willerford, D. M. und Abbas, A. K. (1997) Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol*, **158**, 3738-45.

Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A. K. und Baltimore, D. (1999a) Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity*, **11**, 763-70.

Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J. D., Nelson, B. H., Abbas, A. K. und Baltimore, D. (1999b) Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity*, **11**, 281-8.

Vandenabeele, P., Declercq, W., Vanhaesebroeck, B., Grooten, J. und Fiers, W. (1995) Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol*, **154**, 2904-2913.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T. und Thompson, C. B. (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, **91**, 627-637.

Vander Heiden, M. G. und Thompson, C. B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*, **1**, E209-E216.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. und Wallach, D. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, **9**, 267-76.

Vaux, D. L., Cory, S. und Adams, J. M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-442.

Vaux, D. L. und Flavell, R. A. (2000) Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, **12**, 719-24.

Vaux, D. L. und Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell*, **96**, 245-54.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W. und Vandenabeele, P. (1998) Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J Exp Med*, **187**, 1477-1485.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Conolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. und Vaux, D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.

Vincenz, C. und Dixit, V. M. (1997) Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem*, **272**, 6578-83.

Vogt, C. (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans). Solothurn.

von Boehmer, H. (1994) Positive selection of lymphocytes. *Cell*, **76**, 219-228.

Wajant, H., Haas, E., Schwenzer, R., Muhlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., Smith, C. und Scheurich, P. (2000) Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem*, **275**, 24357-66.

Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C. und Lynch, J. (2000) Fas-mediated apoptosis of hematopoietic cells in mice lacking FADD. *Cell*, **101**, 21-32.

D. H. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, **5**, 157-163.

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C. und Hammill, L. D. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta- converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, **78**, 343-352.

Wallach, D. (1997) Apoptosis. Placing death under control. *Nature*, **388**, 123, 125-6.

Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. und Boldin, M. P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, **17**, 331-67.

Walsh, C. M., Wen, B. G., Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Dixit, V. M. und Hedrick, S. M. (1998) A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity*, **8**, 439-49.

Wang, C. Y., Mayo, M. W. und Baldwin, A. S., Jr. (1996) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, **274**, 784-787.

Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M. und Lenardo, M. J. (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 13884-8.

Wang, J., Lobito, A. A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A. und Lenardo, M. J. (2000) Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol*, **30**, 155-63.

Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E. und Lenardo, M. J. (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, **98**, 47-58.

Wano, Y., Feinberg, M., Hosking, J. B., Bogerd, H. und Greene, W. C. (1988) Stable expression of the tax gene of type I human T-cell leukemia virus in human T cells activates specific cellular genes involved in growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 9733-7.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Nagata, S. (1992a) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**, 314-7.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Nagata, S. (1992b) The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol*, **148**, 1274-9.

Watt, W., Koeplinger, K. A., Mildner, A. M., Heinrikson, R. L., Tomasselli, A. G. und Watenpaugh, K. D. (1999) The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des.*, **7**, 1135-1143.

Weber, C. H. und Vincenz, C. (2001) The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci*, **26**, 475-81.

Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B. und Korsmeyer, S. J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, **14**, 2060-71.

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. und Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-30.

Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M. und Kramer, P. H. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*, **375**, 497-500.

Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A. und Alt, F. W. (1995) Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*, **3**, 521-30.

Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A. und Raybuck, S. A. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, **370**, 270-275.

Wright, D. A., Futcher, B., Ghosh, P. und Geha, R. S. (1996) Association of human Fas (CD95) with a ubiquitin-conjugating enzyme (UBC-FAP). *J Biol Chem*, **271**, 31037-31043.

Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X. und Shi, Y. (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, **408**, 1008-12.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. und Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.*, **68**, 251-306.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. und Wang, X. (1997a) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.

Yang, X., Chang, H. Y. und Baltimore, D. (1998) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*, **1**, 319-325.

Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y. und Baltimore, D. (1997b) Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, **89**, 1067-1076.

Yeh, J. H., Hsu, S. C., Han, S. H. und Lai, M. Z. (1998a) Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med*, **188**, 1795-802.

Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V. und Mak, T. W. (2000) Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, **12**, 633-42.

Yeh, W. C., Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V. und Mak, T. W. (1998b) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, **279**, 1954-8.

Yin, M. J. und Gaynor, R. B. (1996) HTLV-1 21 bp repeat sequences facilitate stable association between Tax and CREB to increase CREB binding affinity. *J Mol Biol*, **264**, 20-31.

Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A. und Korsmeyer, S. J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, **400**, 886-91.

Yonehara, S., Ishii, A. und Yonehara, M. (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, **169**, 1747-1756.

Yu, K. Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y. und Kwon, B. S. (1999) A Newly Identified Member of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TR6) Suppresses LIGHT-mediated Apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 13733-13736.

Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A. und Kroemer, G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, **16**, 2265-82.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Masse, B. und Kroemer, G. (1996) Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett*, **384**, 53-7.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X. und Kroemer, G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*, **181**, 1661-1672.

Zehender, G., Varchetta, S., De Maddalena, C., Colasante, C., Riva, A., Meroni, L., Moroni, M. und Galli, M. (2001) Resistance to Fas-mediated apoptosis of human T-cell lines expressing human T-lymphotropic virus type-2 (HTLV-2) Tax protein. *Virology*, **281**, 43-50.

Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C. und Korsmeyer, S. J. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, **290**, 1761-5.

Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. und Wallach, D. (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*, **12**, 301-311.

Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. und Pandolfi, P. P. (2000) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med*, **191**, 631-40.

Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R. und Thompson, C. B. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, **15**, 1481-6.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-13.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. und Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**, 11549-56.

2. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom
AIF	Apoptose induzierender Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
c-FLIP	„Cellular FLICE-inhibitory protein“
CAP	Zytotoxizitäts-abhängiges APO-1 assoziiertes Protein
CD	„Cluster of differentiation“
CED	„C.elegans death gene“
CHX	Cycloheximid
CIAP	„Calf intestinal alkaline phosphatase“
CrmA	„Cytokine response modifier A“
Da	Dalton
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
$\Delta\Psi_M$	Mitochondriales Transmembranpotential
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
ELISA	„Enzyme-linked immunoabsorbant assay“
FADD	„Fas-associated death domain protein“
FADD-DN	FADD-dominant negativ
FCS	Fötale Kälberserum
FLICE	"FADD-like ICE"
h	Stunde
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus-1
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus-1
ICE	Interleukin-1 β -konvertierendes Enzym
IgG	Immunglobulin der Klasse G

IgG _H	schwere Kette eines Immunglobulins der Klasse G
kDa	Kilodalton
LZ	„Leucin-Zipper“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MW	Molekulargewicht
min.	Minute
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
pI	isoelektrischer Punkt
PT	Permeabilitäts-Transition
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRAIL	„TNF-related Apoptosis-inducing ligand“
v-FLIP	„viral FLICE-inhibitory protein“

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

3. Publikationsverzeichnis

Originalveröffentlichungen

Kirchhoff, S., Müller, W.W., **Krueger, A.**, Schmitz, I. und Krammer, P.H. (2000) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol*, **165**, 6293-300.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, **276**, 20633-40.

Chatterjee, D., Schmitz, I., **Krueger, A.**, Yeung, K., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., Wyche, J.H. und Pantazis, P. (2001) Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short). *Cancer Res*, **61**, 7148-54.

Eckhart, L., Henry, M., Santos-Beneit, A.M., Schmitz, I., **Krueger, A.**, Fischer, H., Bach, J., Ban, J., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Mollinedo, F. und Tschachler, E. (2001) Alternative Splicing of Caspase-8 mRNA during Differentiation of Human Leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 777-781.

Hentze, H., Schmitz, I., Latta, M., **Krueger, A.**, Krammer, P.H. und Wendel, A. (2002) Glutathione dependence of caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, **277**, 5588-95.

Kirchhoff, S., Sebens, T., Baumann, S., **Krueger, A.**, Zawatzky, R., Li-Weber, M., Meinel, E., Neipel, F., Fleckenstein, B. und Krammer, P.H. (2002) Viral IFN-regulatory factors inhibit activation-induced cell death via two positive regulatory IFN-regulatory factor 1-dependent domains in the CD95 ligand promoter. *J Immunol*, **168**, 1226-34.

Baumann, S., Hess, J., Eichhorst S.T., **Krueger, A.**, Angel, P., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) An unexpected Role for FosB in Activation-induced T cell Death. Zur Publikation eingereicht.

Lavrik, I., **Krueger, A.**, Schmitz, I., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) The Active Caspase-8 Heterotetramer is formed at the CD95 DISC. Zur Publikation eingereicht.

Schmitz, I.*, **Krueger, A.***, Baumann, S., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) An IL-2 Initiated Switch between CD95 Signaling Pathways Regulates Apoptosis Sensitivity of Primary Human T Cells. Zur Publikation eingereicht.

Die mit * gekennzeichneten Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Studie beigetragen.

Schmitz, I., **Krueger, A.**, Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2002) Comparison of anti-human CD95 antibodies in Western Blot analysis. Zur Publikation eingereicht.

Übersichtsartikel

Krammer, P.H. und **Krueger, A.** (2001) CD95/CD95 Ligand (Fas/FasL, APO-1/APO-1L). In John Wiley and Sons, I. (ed.) *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*.

Kirchhoff, S., **Krueger, A.**, Baumann, S. and Krammer, P.H. (2001) TCR/CD3 Restimulation und CD28 Kostimulation induzieren die Expression von c-FLIPshort und verhindern CD95 vermittelte Apoptose in T-Zellen. *Immunologie Aktuell*, **1**, 117-8.

Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. (2001) FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 8247-54.

Baumann, S., **Krueger, A.**, Kirchhoff, S. und Krammer, P.H. (2002) Regulation of T cell Apoptosis during the Immune Response. *Current Molecular Medicine*, **2**, 257-272.

Krammer, P.H. und **Krueger, A.** (2002) CD95 Molecule Page, Association for Cellular Signaling, www.cellularsignaling.org

4. Lebenslauf

Name: Andreas Krueger
Geburtstag, -ort: 20.11.1973, Alfeld (Leine)

Eltern: Inge Krueger, geb. Heise, techn. Angestellte
Dietrich Krueger, kfm. Angestellter

Geschwister: Ilka Krueger

Schullaufbahn:

1980-1984 Grundschule Delligsen
1984-1986 Orientierungsstufe Duingen
1986-1993 Gymnasium Alfeld,
abgeschlossen mit dem Abitur am 15.05.1993

Zivildienst:

01.06.1993-31.08.1994 in der Gudrun-Pausewang-Schule,
Schule für Geistigbehinderte, Alfeld

Studium:

10.1994 - 08.1999 Biochemie (Diplom) an der Universität Hannover
02.1995 - 08.1999 Stipendiat des Ev. Studienwerkes e.V., Villigst
seit WS 95/96 Philosophie und Neuere Deutsche Literaturwissenschaft
(M.A.) an der Fern-Universität Hagen

13.06.1996 Diplomvorprüfung im Studiengang Biochemie
25.01. - 29.01.1999 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie,
Biophysikalische Chemie und Immunologie
08.02. - 02.08.1999 Diplomarbeit zum Thema „Klonierung und funktionelle
Analyse von Splicevarianten des zellulären FLICE-
inhibitorischen Proteins (c-FLIP)“ in der Abteilung
Immungenetik des DKFZ Heidelberg (Prof. Dr. Peter H.
Krammer)

26.06.2001 Magisterzwischenprüfung im Fach Philosophie an der
Fern-Universität Hagen

seit dem 01.09.1999 Anfertigung der Doktorarbeit in der Abteilung Immun-
genetik des DKFZ Heidelberg (Prof. Dr. Peter H.
Krammer)

5. Erklärung

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

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

Heidelberg, im Mai 2002