Biochemie

Der Tod-induzierende Signalkomplex des Apoptose-auslösenden CD95 (APO-1/Fas)-Rezeptors

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

> vorgelegt von Frank Christian Kischkel aus Kiel

> > - 1997 -

Dekan:	Herr Prof. Dr. FK. Holtmeier
Erster Gutachter:	Herr Prof. Dr. F. Spener
Zweiter Gutachter:	Herr Prof. Dr. P. H. Krammer
Tag der mündlichen Prüfung(en):	
Tag der Promotion:	

Meinen Eltern und Freunden

Es gibt drei Wege klug zu handeln: durch Nachahmen, das ist der leichteste; durch Nachdenken, das ist der edelste; durch Erfahrungen, das ist der härteste. (Konfuzius)

Inhaltsverzeichnis

1 ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN 1		
2 ZUSAMMENFASSUNG	4	
3 EINLEITUNG	6	
3.1 Mechanismen des Zelltods	6	
3.2 Die Todesrezeptoren	8	
3.2.1 Der CD95 (APO-1/Fas)-Rezeptor	9	
3.3 Die Todesliganden	11	
3.4 Die biologische Funktion des CD95/CD95L-Systems	12	
3.4.1 Natürliche Aberrationen im CD95/CD95L-System	13	
3.4.2 Die Funktion des CD95/CD95L-Systems im Immunsystem	14	
3.4.3 Das CD95/CD95L-System in nicht-lymphoiden Geweben	15	
3.5 Signaltransduktion der CD95-vermittelten Apoptose	16	
3.5.1 Oligomerisierung von CD95 ist Voraussetzung für die Übermittlung des zytotoxischer	ı	
Signals	16	
3.5.2 Die Todesdomäne - "Death Domain"	16	
3.5.3 CD95-assoziierte Signalmoleküle	17	
3.5.4 Weitere publizierte Signalmoleküle des CD95-Signalweges	18	
3.5.5 Die Bcl-2-Familie, die Familien der Caspasen und der Mitogen-aktivierten Protein-		
Kinasen	19	
3.5.5.1 Die Proteine der Bcl-2-Familie	20	
3.5.5.2 Caspasen (ICE-ähnliche Proteasen)	21	
3.5.5.3 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs)	23	
4 WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG	25	
5 ERGEBNISSE	26	
5.1 CD95-assoziierte Moleküle	26	
5.1.1 Untersuchung des unstimulierten Rezeptors	26	
5.1.1.1 Charakterisierung von Zellinien	26	
5.1.1.2 Methode zur Identifizierung CD95-assoziierter Signalmoleküle	28	
5.1.1.3 Keine spezifischen konstitutiven Assoziationen mit CD95	29	
5.1.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex ("Death-Inducing Signaling Complex", DISC)	30	
5.1.2.1 Oligomerisierung von CD95 führt zur sofortigen Rezeptor-Aggregation	30	
5.1.2.2 Assoziation von CAP1-4 an den oligomerisierten Rezeptor	31	

5.1.2.3 CAP-Assoziation benötigt eine funktionsfähige CD95-Todesdomäne	33
5.1.2.4 CAP-Proteine assoziieren selektiv nur mit aktiviertem CD95	35
5.1.2.5 DISC-Bildung findet sich in allen untersuchten CD95-sensitiven Zellen	38
5.1.2.6 Untersuchung der Zellinie Boe ^R	39
5.1.3 Identifizierung von CAP1 und 2 als FADD/Mort1	40
5.1.3.1 Charakterisierung von CAP1 und 2	40
5.1.3.2 Erste Hinweise auf eine Kinase, die FADD phosphoryliert	42
5.1.4 FADD ermöglicht CAP3 und 4 die Assoziation an den Rezeptor	43
5.1.5 Identifizierung von CAP4 als Caspase-8 (FLICE/MACH/Mch5)	46
5.1.5.1 Identifizierung von CAP4	46
5.1.5.2 Die verschiedenen CAP4-Spots repräsentieren Caspase-8/a	49
5.1.5.3 Caspase-8 hat Homologie zur DED von FADD	51
5.1.5.4 Caspase-8 ist ein neues Mitglied der Caspasenfamilie	51
5.1.5.5 Chromosomale Lokalisierung von Caspase-8 in Mensch und Maus durch	
Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	53
5.1.6 Partielle Charakterisierung von CAP3	55
5.1.7 Aktivierungsmodell der Caspase-8	57
5.1.7.1 Identifizierung von CAP5 und 6 als Prodomäne von Caspase-8	57
5.1.7.2 Caspase-8 wird am DISC gespalten und aktiviert	59
5.1.7.3 Caspase-8 kann sich nicht selber spalten	63
5.1.7.4 Die Wirkung von Inhibitoren auf die Caspase-8-Spaltung	63
5.2 Aktivierung von SAP-Kinasen durch Caspasen bei CD95-induzierter Apoptose	66
5.2.1 Die CD95-induzierte Aktivierung von mehreren Proteinkinasen geht der DNA-	
Fragmentierung voraus	66
5.2.2 Die CD95-induzierten Kinasen sind für die CD95-vermittelte Apoptose spezifisch	68
5.2.3 CD95 induziert Jun-Kinasen der JNK/SAPK-Familie	69
5.2.4 CD95-induzierte Kinasen benötigen Caspasen	72
5.3 Modell für die Begulation des CD95-Systems: die T-I vmphozyten	73
6 DISKUSSION	78
6.1 Der Tod-induzierende Signalkomplex (DISC) des CD95-Rezeptors	78
6.2 Caspase-8 als Schlüsselmolekül im Todesrezeptor-Signalweg?	80
6.3 Die DD und DED repräsentieren Bindungsmotive	89
6.4 Die Modulation des CD95-Signalweges	92
6.5 Distale Ereignisse im CD95-Signalweg?	96
7 EXPERIMENTELLER TEIL	103
	100
/. Materianen	103

7.1.1 Chemikalien	103
7.1.2 Häufig verwendete Puffer	104
7.1.3 Biologisches Material	105
7.1.3.1 Eukaryontische Zellen	105
7.1.3.2 Bakterienstämme	106
7.1.4 Nährmedien	106
7.1.4.1 Medium für die Zellkultur	106
7.1.4.2 Bakterienanzuchtmedien	107
7.1.5 Seren und Antikörper	107
7.1.6 Molekularbiologische Materialien	109
7.1.6.1 Synthetische Oligonukleotide	109
7.1.6.2 Vektoren	110
7.1.6.3 Enzyme und Kits	110
7.1.7 Caspaseninhibitoren	111
7.1.8 Computer und Software	111
7.1.9 Geräte	112
7.2 Methoden	113
7.2.1 Zellkultur	113
7.2.1.1 Kultivierung von Bakterien	113
7.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter ("kompetenter") Bakterien	113
7.2.1.3 Kultivierung eukaryontischer Zellen	113
7.2.1.4 Präparation von peripheren T-Zellen	114
7.2.2 Arbeiten mit DNA/RNA	114
7.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	114
7.2.2.2 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösunge	en 116
7.2.2.3 Synthese des ersten cDNA-Stranges (Reverse Transkription, RT)	117
7.2.2.4 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	117
7.2.2.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	117
7.2.2.6 Gentechnologische Methoden	118
7.2.2.7 Herstellung von gentechnologisch veränderten Organismen	119
7.2.2.8 cDNA-Klonierung von Caspase-8	119
7.2.3 Zellbiologische Methoden	119
7.2.3.1 Immunfluoreszenz	119
7.2.3.2 Biotinylierung von Oberflächenmolekülen auf Zellen	120
7.2.3.3 Isolation von DNA-Fragmenten und Darstellung einer DNA-Leiter	120
7.2.3.4 Zytotoxizitätstest	120
7.2.3.5 Messung apoptotischer Zellen nach der Methode von Nicoletti	121
7.2.4 Proteinchemische Methoden	121
7.2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	121
7.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	122

7.2.4.3 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	124
7.2.4.4 Western-Blot	124
7.2.4.5 Kopplung von Antikörpern an Bromcyan-aktivierte Sepharose (kovalent ge	koppelter
Antikörper)	125
7.2.4.6 Produktion und Präparation von Fusionsproteinen	125
7.2.4.7 Metabolische Markierung, Immunpräzipitation und DISC-Analyse	126
7.2.4.8 Präparation von CAP3 und 4 zum Sequenzieren	127
7.2.4.9 In vitro -Translation und in vitro-Spaltungsexperiment	128
7.2.4.10 In-Gel-Kinase-Test	128
7.2.5 Sequenzierung von CAP3 und 4 mittels Nano-ES-MS/MS	129
7.2.6 Analyse der CAP4-Isoformen mittels Massenspektrometrie	129
7.2.7 Chromosomale Lokalisierung durch Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	130
8 LITERATURVERZEICHNIS	131
9 PUBLIKATIONEN	155
10 LEBENSLAUF	156

1 Abkürzungen und Definitionen

Abb	Abbildung
Ac-DEVD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd
Ac-YVAD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd
Act D	Actinomycin D
AIDS	erworbene Immunschwäche als Folge der HIV-1-Infektion ("aquired
	immuno d eficiency s yndrome")
AIZT	aktivierungsinduzierter Zelltod
Ak	Antikörper
ALPS	menschliche Erkrankung analog dem Ipr-Syndrom bei der Maus ("autoimmune
	lympho p roliferative s yndrome")
anti-APO-1	monoklonaler Antikörper gegen APO-1 (IgG3-Subtyp)
APZ	Antigen präsentierende Zellen
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphpat
BH-1,2	"Bcl-2-homology domain 1,2"
bp	Basenpaare
C. elegans	Caenorhabditits elegans
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	"Cytotoxicity-dependent APO-1-associated Protein"
Caspasen	Cysteinproteasen; ehemals ICE-ähnliche Proteasen
CD95zT	CD95 zytoplasmatischer Teil
CD	"Cluster of Differentiation"-Nomenklatur für Antigene
CD-95∆	mit einer deletierten Version des CD95 Rezeptors transfiziert. Dem Konstrukt
	fehlten die letzten 57 C-terminalen Aminosäuren
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
DD	Todesdomäne ("Death Domain")
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex ("Death-Inducing Signaling Complex")
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli

1

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F _{ab}	Antigen bindendes Fragment des Antikörpers
FADD	mit APO-1 assoziiertes Molekül; identisch mit MORT1/CAP 1,2 ("Fas-associated
	d eath d omain protein")
FAF1	"Fas-associated protein factor"
FAP-1	"Fas-associated phosphatase"
FKS	fötales Kälberserum
FLICE	"FADD-like ICE"
g	Erdbeschleunigung
g/v	Gewicht zu Volumen
Gu•HCl	Guanidinhydrochlorid
HCP	"hemapoetic cell protein tyrosine phosphatase"
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2'-ethansulfonsäure
HIV	"human immunodeficiency virus"
ICE	IL-1β konvertierendes Enzym
lgG, lgM	Immunglobuline vom Subtyp G bzw. M
IGK	<i>in-Gel</i> -Kinase
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
lpr	"lympho pr oliferation"
lpr ^{cg}	lympho pr oliferation complementing <i>gld</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	"matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry"
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MORT1	mit APO-1 assoziiertes Molekül; identisch mit FADD/CAP 1,2 ("mediator of
	receptor-induced toxicity")
mRNA	Boten ("messenger")-Ribonukleinsäure
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid
Nano-ES-MS/MS	Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie
NF-κB	Kernfaktor κB (nuclear factor)
NP-40	Nonidet P-40 (Nonylphenylpolyethylenglykol)
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohemagglutinin

PMA	Phorbolester (Phorbol 12-Myristyl 13-Acetat)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTPase	Proteintyrosinphosphatase
PZT	programmierter Zelltod
ReIP	Reimmunpräzipitation
RIP	"receptor interacting protein"
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Serpin	Serin-Protease-Inhibitor
snRP U1-70kDA	small ribonuclear protein U1-70 kDa
Т	Threonin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF (-R)	Tumor Nekrose Faktor (-Rezeptor)
TRADD	"TNF-receptor associated death domain protein"
TRAF	"TNF-receptor associated factor"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
U	Einheit der Enzymaktivität (unit)
v/v	Volumen zu Volumen
Y	Tyrosin
zDEVD-fmk	Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon
zIETD-fmk	Benzoxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon
zVAD-fmk	Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethlyketon
Δ	Deletion

Für die Bezeichnung von Aminosäuren werden die üblichen Ein- oder Drei-Buchstabensymbole verwendet.

Der Probenpuffer für die SDS-PAGE von Proteinen ist ein reduzierender Probenpuffer, sofern nicht anders angegeben.

2 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ist die Bedeutung der Apoptose (programmierter Zelltod) für den multizellulären Organismus erkannt worden. Bereits in der Embryonalentwicklung und später im ausgewachsenen Körper - dort, in der Homöostase der Gewebe und im Immunsystem - ist die Apoptose essentiell. Ein Apoptosesignal kann über Rezeptoren in die Zielzelle übermittelt werden. Einer dieser Rezeptoren ist CD95 (APO-1/Fas).

Zu Beginn dieser Arbeit war der Signalweg des CD95-Rezeptors noch wenig erforscht. Der damalige Kenntnisstand beschränkte sich auf die Notwendigkeit der Rezeptoroligomerisierung für die Signaltransduktion und die Entdeckung der entscheidenden signalübermittelnden Domäne im intrazellulären Teil von CD95, die Todesdomäne ("Death Domain", DD). Welche Moleküle an CD95 binden und das Apoptosesignal weiterleiten würden, war unbekannt. In dieser Arbeit wurden mit einem biochemischen Ansatz drei Moleküle (FADD, Caspase-8 und CAP3) gefunden und charakterisiert, die an den stimulierten CD95-Rezeptor binden und das Apoptosesignal in die Zelle weiterleiten. Sie wurden anfangs als CAPs (für "Cytotoxicity-dependent APO-1-associated Proteins") bezeichnet, und der oligomerisierte Rezeptor mit den assoziierten CAPs erhielt den Namen DISC (für "Death-Inducing Signaling Complex"). Insgesamt wurden sechs CAPs identifiziert. CAP1 und 2 konnten als ein Molekül mit Namen FADD/MORT1, das von zwei Gruppen fast zeitgleich publiziert wurde, charakterisiert werden (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995). Der Einfachheit halber wird hier von FADD gesprochen. CAP1 und 2 entstehen durch unterschiedliche Serinphosphorylierung von FADD. Erste Hinweise auf eine Proteinkinase, die FADD phosphoryliert, konnten in dieser Doktorarbeit etabliert werden. Es handelt sich um ein ca. 70 kD großes Protein, das eine Autophosphorylierungsaktivität besitzt. Die Funktion dieser Phosphorylierung ist noch unbekannt. FADD besitzt eine Domäne am C-Terminus die homolog zur DD des CD95-Rezeptors ist. Über diese DD bindet FADD an die CD95-DD. Der N-Terminus ist alleine in der Lage bei Überexpression Apoptose auszulösen und wurde daher als Todeseffektordomäne ("Death Effector Domains", DEDs) bezeichnet. Diese Arbeit zeigt, daß die Hauptaufgabe von FADD wahrscheinlich eine Adapterfunktion ist, denn FADD ermöglicht den anderen CAPs, an den Rezeptor zu binden.

Die Sequenzierung von CAP3 und 4 ergab, daß CAP4 eine unbekannte Cysteinprotease mit Homologie zur ICE-Protease ("Interleukin-1β-Converting Enzyme") ist und CAP3 zumindestens im Nterminalen Bereich identisch mit CAP4 zu sein scheint. CAP4 wurde kloniert und in unserer Veröffentlichung FLICE (für "FADD-like ICE") genannt. Es stellte sich nämlich heraus, daß der N-Terminus von FLICE homolog zu der DED von FADD ist. FLICE besitzt jedoch zwei DEDs. CAP3 ist noch nicht kloniert, aber die sequenzierten Peptide von CAP3 sind identisch mit den Peptiden der DEDs von FLICE, so daß CAP3 wahrscheinlich ebenfalls zwei DEDs besitzt. Zwei andere Arbeitsgruppen publizierten im gleichen Zeitraum dieselbe Cysteinprotease und bezeichneten sie als MACH bzw. Mch5. Dieses Molekül (CAP4/FLICE/MACH/Mch-5) ist Mitglied einer neuen Familie von Cysteinproteasen, die 1996 eine neue Nomenklatur erhielt. Für CAP4/FLICE/MACH/Mch-5 wurde daraufhin der Name Caspase-8 eingeführt. Die Charakterisierung von CAP5 und 6 führte zur Erkenntnis, daß sie die N-terminalen Prodomänen der Caspase-8 sind und damit ebenfalls zwei DEDs besitzen. In dieser Arbeit wurde zusätzlich der Mechanismus der Caspase-8-Aktivierung untersucht. Caspase-8 bindet über die DEDs an FADD und bildet damit den CD95-DISC. Die CAP3-Assoziation verläuft wahrscheinlich über den gleichen Mechanismus. Nach Assoziation wird Caspase-8 als Zymogen gespalten und damit aktiviert. Es entstehen dabei sowohl die Prodomänen CAP5 und CAP6 als auch das aktive Enzym mit den Untereinheiten p10 und p18. Die aktiven Untereinheiten werden durch Spaltung nach den Aspartatresten an Position 216 (nicht ganz gesichert), 374 und 398 gebildet. Die Aktivierung benötigt den DISC. Während der Prozessierung von Caspase-8 bleiben die Mengen an FADD und CAP3 im DISC konstant.

Die chromosomale Lokalisierung der Mensch- und Maus-Caspase-8-Gene durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ergab, daß das Gen auf Chromosom 2q33-q34 beim Menschen und auf Chromosom 1 in der Region 1B-proximalC bei der Maus lokalisiert ist. Es gibt keinen Hinweis auf Pseudogene. Die Lokalisierung erweitert den bekannten syntenen Bereich zwischen humanem Chromosom 2q33-34 und dem Chromosom 1 im Gebiet 1B-proximalC bei der Maus.

Die Regulation des CD95-Signalweges wurde an aktivierten peripheren T-Lymphozyten untersucht. In T-Zellen, die resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind, fehlt Caspase-8 im DISC, während in den gegenüber CD95-induzierten Zelltod sensitiven T-Zellen Caspase-8 zu finden ist. Der DISC aus den resistenten T-Zellen kann auch im Gegensatz zum DISC aus den sensitiven T-Zellen nicht Caspase-8 aktivieren, obwohl das Molekül exprimiert wird. Damit scheint der CD95-Signalweg in diesen Zellen bereits auf der Ebene des CD95-DISC reguliert zu werden. Der Grund für diese Inhibition der Caspase-8-Assoziation in den resistenten T-Lymphozyten ist noch ungelöst.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich weitere mögliche Signalmoleküle identifiziert (Cahill et al., 1996). Es handelt sich um die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), insbesondere um einige c-Jun N-terminale Kinasen/Streß-aktivierte Proteinkinasen (JNK/SAPKs). Sie werden spezifisch im CD95-Signalweg aktiviert. Ihre Induktion ließ sich durch die Caspaseninhibitoren Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethlyketon (zVAD-fmk) und CrmA, ein Protein aus dem Kuhpockenvirus, inhibieren. Dies deutet darauf hin, daß die MAPKs, deren Funktion noch weithin ungeklärt ist, durch Caspasen aktiviert werden.

Die Bindung von FADD, Caspase-8 und CAP3 an den CD95-Rezeptor stellt den ersten Schritt im CD95-Signalweg dar. Durch die einsetzende Prozessierung von Caspase-8 wird das Apoptosesignal weitergeleitet. Dieser Mechanismus scheint für den Signalweg essentiell zu sein, denn die Inhibition der Caspase-8-Spaltung sowohl in den resistenten T-Lymphozyten als auch durch den Peptidinhibitor Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethlyketon (zVAD-fmk) ermöglicht es den Zellen, das Todesprogramm zu blockieren.

3 Einleitung

3.1 Mechanismen des Zelltods

Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurde der Aufbau eines Organismus aus Zellen entdeckt. Bald danach setzte sich die Erkenntnis durch, daß der Zelltod ein wichtiger Bestandteil der tierischen Entwicklung ist (Clarke und Clarke, 1996 (Review)). Zuerst wurde der Zelltod während der Metamorphose von Amphibien beobachtet (Vogt, 1842). Danach wurde er auch in vielen sich im Wachstum befindlichen Geweben von Vertebraten und Invertebraten entdeckt (Glucksmann, 1951 (Review); Clarke und Clarke, 1996 (Review)). Die Bezeichnung "programmierter Zelltod" (PZT) wurde anfänglich zur Beschreibung des Zelltodes, der zu einer bestimmten Zeit an einem bestimmten Ort eintritt, verwendet und sollte hervorheben, daß der Tod im Entwicklungsplan eines Organismus vorprogrammiert ist (Locksin und Williams, 1964). Doch schon damals waren einige Beispiele für die Verhinderung von Zelltod durch Substanzen, die von anderen Geweben stammten, bekannt und zeigten auf, daß der Tod nicht unausweichlich war und offensichtlich durch Signale von anderen Zellen unterdrückt werden konnte (Saunders, 1966 (Review)).

In einer richtungsweisenden Veröffentlichung verwendeten die Wissenschaftler Kerr, Wyllie und Currie (1972) morphologische Kennzeichen, um den Zelltod genauer zu differenzieren. Sie unterschieden den physiologischen Zelltod vom pathologischen Zelltod, der im Innern von akuten Verletzungen, wie z. B. Trauma oder Ischämie, vorkommt. Bei der pathologischen Form tendieren die Zellen und deren Organelle dazu, anzuschwellen und schließlich zu bersten. Diese Art des Zelltodes wurde Nekrose genannt. In der Regel führt der Verlust des Zellinhalts in die Umgebung zu einer Entzündungsreaktion. Wenn Zellen während der normalen Entwicklung, der Gewebehomöostase oder am Rand einer akuten Verletzung sterben, schrumpfen und verdichten sie sich gewöhnlich. Die Organelle und die Plasmamembran behalten dabei ihre Integrität. Dieser physiologische Zelltod wurde von Kerr et al. Apoptose genannt. Die toten Zellen und ihre Fragmente werden schnell durch Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen (phagozytiert). Dies geschieht, bevor der Zellinhalt nach außen gelangt, so daß es nicht zu einer Entzündungsreaktion kommt. Da der apoptotische Zelltod in verschiedenen Geweben und unterschiedlichen Tieren meist ähnlich aussieht, vertraten Kerr et al. die Auffassung, daß alle Arten der Apoptose ein aktives, intrazelluläres Todesprogramm, das durch eine Reihe von physiologischen und pathologischen Stimuli aktiviert oder inhibiert werden kann, besitzen.

Erst 20 Jahre später wurde allgemein akzeptiert, daß tierische Zellen ein eingebautes Todes- oder Selbstmordprogramm haben. Hierfür ausschlaggebend waren die genetischen Studien im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, die zur Identifizierung von Genen führten, die für das Todesprogramm und dessen Kontrolle wichtig waren (Horvitz et al., 1982; Ellis und Horvitz, 1986), und die spätere Entdeckung von homologen Genen in Säugetieren (Yuan et al., 1993; Hengartner und Horvitz, 1994). Während der Entwicklung von *C. elegans* sterben 131 von 1090 somatischen Zellen (Sulston et al., 1983). Es ließen sich drei Gene (ced-3, ced-4 und ced-9) identifizieren, die eine wichtige Aufgabe in der Ausführung und Regulation der Apoptose im Wurm besaßen (Horvitz et al., 1994). Das

Genprodukt von ced-9 (CED-9) schützt die Zellen vor Zelltod, während die von ced-3 und ced-4 kodierten Proteine (CED-3 und CED-4) essentiell für die Exekution des Apoptoseprogramms sind (Horvitz et al., 1994; Hengartner et al., 1992; Hengartner und Horvitz, 1994). Später wurden für CED-9 homologe Proteine (Bcl-2 und Bcl-x₁) in Säugetieren gefunden (Hengartner et al., 1992; Hengartner und Horvitz, 1994). Bcl-2 konnte sogar teilweise CED-9 im Nematoden funktionell ersetzen (Vaux et al., 1992b; Yuan et al., 1993). Das erste beschriebene homologe Säugetierprotein zu CED-3 war das Interleukin-1β-konvertierende Enzym (ICE) (Yuan et al., 1993; Miura et al., 1993). Die funktionelle Konservierung ging hier so weit, daß das menschliche ICE-Protein den durch Mutation von ced-3 ausgelösten Apoptosedefekt in C. elegans ausgleichen konnte (Yuan et al., 1993). Erst vor kurzem ist ein homologes Protein zu CED-4 in Säugetieren kloniert worden (Zou et al., 1997). Dieses Protein Apaf-1 kann zusammen mit ATP, Cytochrom C und einem noch unbekannten Faktor ein ICEähnliches Protein (Caspase-3) in einem zellfreien System aktivieren. Als die Definition des eingebauten Selbstmordprogramms (Apoptose) allgemein anerkannt wurde, bekam der Begriff "programmierter Zelltod" (PZT) eine etwas andere Bedeutung. Heute wird damit jeder Zelltod bezeichnet, der durch ein intrazelluläres Todesprogramm vermittelt wird. Dabei spielt es keine Rolle, welcher Stimulus den PZT auslöst und ob alle charakteristischen Merkmale der Apoptose zu erkennen sind. Es ist wahrscheinlich, daß der normale Zelltod in sich entwickelnden oder ausgewachsenen Tieren wie auch in vielen pathologischen Fällen dieses in der Evolution konservierte Todesprogramm benutzt.

Als Charakteristika der Apoptose gelten heutzutage die Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung des Zellkerns, die Ausbildung von bläschenförmigen Ausstülpungen an der Zelloberfläche (Zeiose), die die Vorstufe der sogenannten apoptotischen Körperchen bilden, und die Phagozytose der apoptosischen Zelle. Über die Beteiligung des Zytoskeletts an den morphologischen Veränderungen der Zelle im Verlauf der Apoptose ist wenig bekannt. Einige Gruppen berichteten über die proteolytische Spaltung von Kernlamin A und B oder Fodrin (lymphozytäres Spektrin) in verschiedenen Zellinien (Oberhammer et al., 1994; Neamati et al., 1995; Martin et al., 1995b). Diese Vorgänge könnten an den Veränderungen der Zellstruktur und der Chromatinkondensation beteiligt sein. Die Degradation der zellulären DNA scheint in zwei Stufen zu verlaufen. Über die Bildung von DNA-Fragmenten der Größen von 50, 150 und 300 kb zu einem früheren Zeitpunkt haben Watanabe et al. (1995) und Oberhammer et al. (1993) berichtet. Im weiteren Verlauf des PZT kommt es dann zur internukleosomalen Degradation der DNA (Earnshaw, 1995; Wyllie, 1980; Oberhammer et al., 1993). Eine Endonuklease zerschneidet die chromosomale DNA zwischen den Nukleosomen, wodurch DNA-Fragmente mit einer Größe von 180 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen entstehen (Cohen und Duke, 1984; Arends et al., 1990; Giannakis et al., 1991) und im Agarosegel die für den apoptotischen Zelltod charakteristische "DNA-Leiter" bilden. Apoptotische Zellen und Körperchen werden aufgrund von Veränderungen der Zellmembran von Makrophagen spezifisch erkannt, phagozytiert und abgebaut (Duvall et al., 1985; Savill et al., 1989, 1990; Fadok et al., 1992). Dies ist eine Folge der Zerstörung der Membranasymmetrie (Savill et al., 1990) und des Auftauchens von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Dieses Molekül, welches in der Regel an der Innenseite der Plasmamembran zu finden ist, dient als Erkennungssignal für Makrophagen (Fadok et al., 1992; Martin et al., 1995c).

Zu den Agentien, die Apoptose auslösen können, gehören Glukokortikoide, Zytokine (z. B. Tumornekrosefaktor), Pharmaka (z. B. Zytostatika) und Antikörper (Lennon et al., 1991; Krammer et al., 1994; Larrick und Wright, 1990). Auch Hitze und Röntgenstrahlung können Apoptose induzieren (Kerr et al., 1972; Arends und Wyllie, 1991).

3.2 Die Todesrezeptoren

Eine große Anzahl Stimuli kann Apoptose auslösen. Aber erst durch die Entdeckung von Rezeptoren, die Apoptose induzieren können, wurde es offensichtlich, daß bestimmte Substanzen nicht nur durch ihre hohe Toxizität Zellen töten, sondern durch spezielle zelleigene Apoptose-induzierende Mechanismen. Es zeigte sich, daß eine Reihe von Rezeptoren existieren, die neben der Induktion von Apoptose auch noch andere Funktionen haben. Zu diesen Rezeptoren gehören der T-Zell-Rezeptor (TZR)/CD3-Komplex (Smith et al., 1989; Newell et al., 1990; Takahashi et al., 1989), der B-Zell-Rezeptor (Ales-Martinez et al., 1992), CD2 (Merkenschlager und Fisher 1991), CD4 (Wadsworth et al. 1990) und das Mausantigen Thy-1 (Ucker et al. 1989). In der Zwischenzeit zeichnete sich ab, daß die meisten Apoptose-auslösenden Rezeptoren zu einer Familie von Rezeptoren gehören, die strukturell mit den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren verwandt sind (Abb. 3.1). Diese Rezeptor-Superfamilie ist durch cysteinreiche extrazelluläre Domänen mit zwei bis fünf Kopien charakterisiert. Die Familienmitglieder sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Ihre Funktion reicht von der Induktion von Proliferation über Differenzierung bis hin zur Induktion von Apoptose, wobei die Aufgabe eines Rezeptors aber nicht immer klar definiert ist, sondern zum Teil von zusätzlichen (kostimulatorischen) Signalen oder vom Zelltyp abhängt. So spielt z. B. der CD40-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Zusammenarbeit der T- und B-Zellen während einer Immunantwort. Seine Aufgabe reicht von der anfänglichen Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und dem Isotyp-"Switch" von B-Zellen bis zur Herunterregulierung der B-Zellfunktion nach einer Immunantwort. Ebenso scheint der Rezeptor auch die Funktion von T-Helferzellen (Th) zu modulieren (Lipsky et al., 1997). Dabei wirkt der Rezeptor antiapoptotisch. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß der gleiche Rezeptor, auf transformierten Zellen exprimiert, Zelltod auslösen kann (Hess und Engelmann, 1996; Bergamo et al., 1997). Interessanterweise ist von den meisten TNF-R-Familienmitgliedern eine Apoptose-induzierende Aktivität berichtet worden (Tabelle 3.1). Innerhalb dieser Superfamilie scheint aber eine Unterfamilie zu existieren, deren Hauptfunktion in der Vermittlung des Todessignals besteht. Im intrazellulären Bereich dieser "Todesrezeptoren" befindet sich eine Domäne, die "Todesdomäne" genannt wird (s. Kapitel 3.5.2), welche das Apoptosesignal in die Zielzelle übermittelt. Zur Familie der Todesrezeptoren gehören CD95, TNF-RI, DR3, DR4 und DR5 (Abb. 3.1). Ein zusätzlicher Rezeptor (DcR1) sollte ebenfalls zu dieser Familie gezählt werden. Er besitzt keinen intrazellulären Bereich und damit keine Todesdomäne, aber die extrazelluläre Homologie von DcR1 zu DR4 und DR5 ist groß (Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997a). Außerdem wurde gezeigt, daß DcR1 den gleichen Signalbotenstoff binden kann wie DR4 und DR5 (s. Kapitel 3.3). Da dieser Rezeptor (DcR1) keine Apoptose auslösen kann, scheint er das Todessignal kompetitiv zu blockieren. Dies ist ein Beispiel von Signalregulation auf der Rezeptorebene. Für einige andere Mitglieder der TNF-R-Superfamilie sind lösliche Formen der Rezeptoren berichtet worden (z. B. CD95, TNF-RI und TNF-RII), die durch proteolytische Spaltung der membranständigen Rezeptoren entstehen (Cheng et al., 1994; Smith et al., 1994). Diese löslichen Formen können die apoptotischen Signalbotenstoffe abfangen und somit auch inhibierend wirken.

Rezeptor	Referenz	Apoptose- induzierende Aktivität
CD95 (APO-1/Fas)	Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992	+
DR4/TRAIL-RI	Pan et al., 1997b	+
DR5/TRAIL-RII/TRICK2	Walczak et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997a; Screaton et al., 1997a	+
DcR1/TRID	Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997a	n.b.
DR3/wsl-1/APO-3/TRAMP/LARD/AIR	Chinnaiyan et al., 1996a; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996b; Bodmer et al., 1997; Screaton et al., 1997b; Degli- Esposti et al., 1997	+
TNF-Rezeptor I (TNF-RI)/CD120a	Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990; Smith et al., 1990	+
TNF-Rezeptor II (TNF-RII)/CD120b	Dembic et al., 1990	+
Lymphotoxin β -Rezeptor (LT β -R)	Baens et al., 1993; Crowe et al., 1994; Nakamura et al., 1995	+
CD40	Stamenkovic et al., 1989	+
CD30	Durkop et al., 1992	+
CD27	Camerini et al., 1991	+
GITR	Nocentini et al., 1997	n.b.
4-1BB	Kwon und Weissman, 1989	n.b.
HVEM/ATAR/TR2	Montgomery et al., 1995; Hsu et al., 1997a; Kwon et al., 1997	n.b.
OX-40	Mallett et al., 1990	n.b
niedrigaffine NGF ("nerve growth factor")-Rezeptor	Johnson et al., 1986	+

Tabelle 3.1: Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie

(Fortsetzung Tabelle 3.1)

Aufgelistet sind die Familienmitglieder und deren Referenzen. Soweit von einer Apoptose-induzierenden Aktivität der Rezeptoren berichtet wurde, ist dies mit einem (+) gekennzeichnet. Kein Beweis für solch eine Aktivität ist mit (n.b.) = "nicht berichtet" angegeben.

3.2.1 Der CD95 (APO-1/Fas)-Rezeptor

Der Apoptose-auslösende, monoklonale Antikörper (mAk) anti-APO-1 wurde nach Immunisierung einer Maus mit der Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierten B-lymphoblastoiden Zellinie SKW6.4 isoliert und charakterisiert (Trauth et al., 1989). Der anti-APO-1-Antikörper erkennt ein Oberflächenmolekül, welches APO-1 genannt wurde. Es konnte aus Membranen der SKW6.4- Zellinie durch Affinitätschromatographie und RP-HPLC bis zur Homogenität gereinigt werden (Oehm et al., 1992). Das isolierte APO-1-Antigen war durch Kompetition in der Lage, SKW6.4-Zellen vor dem anti-APO-1-induzierten Zelltod zu schützen. Seguenzinformationen des gereinigten APO-1-Proteins wurden zur Klonierung und anschließenden Sequenzierung der APO-1-cDNA verwendet (Oehm et al., 1992). APO-1 besteht aus 335 Aminosäuren (As) und hat unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese ein relatives Molekulargewicht von 48 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen konnte eine singuläre Bande bei 51 kDa gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, daß das APO-1-Antigen aus einer einzigen, durch intramolekulare Disulfidbrücken verknüpften, Polypeptidkette besteht. Der Anteil N-glykosidisch gebundener Polysaccharide beträgt 8 kDa. Gleichzeitig mit anti-APO-1 wurde der Antikörper anti-Fas beschrieben, der Apoptose bei sensitiven Zellen auslöste. Die Sequenz des Fas-Antigens wurde durch Expressionsklonierung bestimmt (Itoh et al., 1991); es zeigte sich, daß APO-1 und Fas identisch waren. Inzwischen wurden die verschiedenen Namen unter der Bezeichnung CD95 zusammengefaßt. Der Einfachheit halber wird der Rezeptor in der Folge mit CD95



Abb. 3.1: Die TNF-/TNF-Rezeptor-Famile und die Unterfamilie der Todesrezeptoren

Die Subfamilie der Todesrezeptoren ist blau unterlegt. Die cysteinreichen extrazellulären Domänen sind als Rauten dargestellt. CD95 (Fas/APO-1), DR4 (TRAIL-RI), DR5 (TRAIL-RII/TRICK2), DR3 (wsl-1, APO-3, TRAMP, LARD, AIR) und TNF-RI verfügen intrazellulär über einen Bereich erhöhter Homologie, der als Todesdomäne bezeichnet wird (rote Box). Die Liganden dieser Rezeptoren sind mit ihrem extrazellulären C-Terminus, mit ihrem Membrandurchgang und mit ihrer intrazellulären N-terminalen Region oberhalb ihrer entsprechenden Rezeptoren dargestellt. bezeichnet.

3.3 Die Todesliganden

Rezeptoren auf der Membranoberfläche einer Zelle erhalten ihre Signale von Botenstoffen. Diese Botenstoffe, die auch als Liganden bezeichnet werden, können in membranständiger oder löslicher Form vorkommen. Für die meisten Mitglieder der TNF-R-Superfamilie ist ein entsprechender Ligand identifiziert worden (Tabelle 3.2). Mit Ausnahme von NGF - er gehört zur Familie der neurotrophen Faktoren - bilden alle Liganden die Familie der TNF-verwandten Moleküle. Außer dem löslichen LTa sind alle Vertreter dieser Ligandenfamilie Membranproteine vom Typ II, welche einen extrazellulären C-Terminus und einen Membrandurchgang besitzen (Takahashi et al., 1994b). Die Homologie innerhalb der TNF-Familie besteht ausschließlich im Bereich der C-terminalen Rezeptorbindungsstelle (Hahne et al., 1995). Die Sequenzen der intrazellulären Teile der Mitglieder der TNF-Familie zeigen untereinander keine Homologien, sind aber speziesübergreifend konserviert (Smith et al., 1994). Die Funktion des intrazellulären Teils ist unbekannt. Eine andere Eigenschaft, die von den Liganden der TNF-Familie mit Ausnahme von LT α geteilt wird, ist, daß sie als Transmembran-Proteine exprimiert werden. Jedoch konnten für die meisten auch eine lösliche Form nachgewiesen werden. Diese freigesetzte Form wird durch die Aktivität einer Metalloprotease generiert. Daten legen dies für den CD95L nahe (Mariani et al. 1995); für TNF α wurde bereits eine Metalloprotease (TACE) kloniert, die spezifisch TNFα spaltet (Black et al. 1997; Moss et al. 1997). Ob TACE in der Lage ist, andere Liganden dieser TNF- Familie zu spalten, oder ob jeder Ligand seine eigene Protease besitzt, ist bis jetzt noch nicht geklärt. LTα ist der einzige Ligand, der nur als lösliches Protein existiert.

In der Regel bindet ein Ligand an einen speziellen Rezeptor (s. Tabelle 3.2). Für den Liganden TRAIL sind jedoch drei Bindungspartner publiziert worden (DR4, DR5 und DcR1) (Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997a; s. Kapitel 3.2), und für die TNF-Rezeptoren sieht es noch etwas verwirrender aus. So binden die löslichen Formen von TNF α und LT α an beide TNF-Rezeptoren. Jedoch hat das lösliche TNF α eine höhere Affinität an den TNF-RI, während das membrangebundene TNF α primär an den TNF-RII bindet (Grell et al., 1995). In Kombination mit dem Transmembran-LT β bindet dagegen das LT α als Heterotrimer an den LT β -R (Crowe et al., 1994).

Die Kristallstruktur von TNFα und LTα allein oder LTα im Komplex mit der extrazellulären Domäne des TNF-RI ergab eine Trimer-Struktur sowohl für die Liganden als auch für den gebundenen TNF-RI (Eck et al., 1989; Jones et al., 1992; Eck et al., 1992; Banner et al., 1993). Zusammen mit einer Reihe von biochemischen Daten, die ebenfalls darauf hindeuten, daß TNF-ähnliche Liganden Trimere bilden können (Karpusas et al. 1995; Pitti et al. 1996), wird allgemein angenommen, daß alle aktiven Liganden dieser Familie in Lösung eine Trimer-Struktur besitzen. Es ist daher wahrscheinlich, daß sie an ihren entsprechenden Rezeptor binden und ihn dann durch Trimerisierung aktivieren. Für das CD95/CD95L-System wurde die Struktur, basierend auf den Struktur- und Sequenzinformationen von TNF-RI und CD40, computerunterstützt modelliert (Bajorath und Aruffo, 1997), wobei sich ebenfalls eine Trimerstruktur des CD95/CD95L-Komplexes vorhersagen ließ. Daß eine Dimerisierung von CD95

nicht ausreichend ist, um Apoptose auszulösen, wurde von Dhein et al. (1992) beschrieben und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (vgl. Kapitel 5.1.2.2; Kischkel et al. 1995). Für die membranständigen Formen von TNF α und CD95L wurde es bis jetzt noch nicht formal bewiesen, daß auch sie Trimere bilden können. Da zwei LT β -Rezeptoren mit einem LT α -Molekül eine Heterotrimer-Struktur auf der Zelloberfläche ausbilden (Androlewicz et al., 1992), ist es jedoch wahrscheinlich, daß dies auch für membranständige TNF α , CD95L und die anderen Familienmitglieder gilt. Die Kristallstruktur von NGF - aus der Familie der neurotrophen Faktoren - ergab dagegen einen dimeren Aufbau (McDonald et al., 1991), und biochemische Daten deuten darauf hin, daß auch der niedrigaffine NGF-R nach Bindung an den NGF lediglich als Dimer vorliegt (Buxser et al., 1985). Damit nimmt der NGF-R eine Sonderstellung in der TNF-R-Superfamilie ein.

Ligand	Referenz	Bindungspartner
CD95L	Suda et al. 1993	CD95
TRAIL (APO-2L)	Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996	DR4, DR5, DcR1
ΤΝFα	Pennica et al., 1984; Shirai et al., 1985; Wang et al., 1985	TNF-RI, TNF-RII
Lymphotoxin α (LT α)	Gray et al., 1984	TNF-RI, TNF-RII
Lymphotoxinβ (LTβ)	Browning, 1993	LTβ-R
CD40L (TRAP/gp39)	Graf et al., 1992	CD40
CD30L	Smith et al., 1993	CD30
CD27L (CD70)	Goodwin et al., 1993a	CD27
4-1BBL	Goodwin et al., 1993b	4-1BB
OX-40L (gp34)	Godfrey et al., 1994	OX-40
[NGF	Gray et al., 1983	NGF-R]

Tabelle 3.2: Die TNF-Familie

Die Mitglieder der TNF-Familie binden als Liganden an ihre entsprechenden Rezeptoren. NGF gehört nicht zu dieser Familie, sondern zur Familie der neurotrophen Faktoren (McDonald et al., 1991). Da der entsprechende Rezeptor jedoch zurTNF-R-Superfamilie gehört, ist NGF ebenfalls (in Klammern) aufgeführt.

3.4 Die biologische Funktion des CD95/CD95L-Systems

TNF-RI und CD95 sind die am besten charakterisierten Mitglieder der Todesrezeptor-Familie. Die Untersuchungen dieser Rezeptoren und deren Liganden unterstreichen die biologische Bedeutung der apoptotischen Systeme innerhalb eines Organismus. In einem ausgereiften Organismus spielt Apoptose, induziert durch Todesrezeptoren, eine Rolle bei der Homöostase von Geweben. Alternde (seneszente), beschädigte und mutierte Zellen werden so eliminiert. Darüber hinaus spielt Apoptose auch im Immunsystem eine entscheidende Rolle. Autoreaktive Zellen müssen beseitigt werden, um Autoimmunität zu verhindern. Am Ende einer Immunantwort werden die aktivierten Lymphozyten deletiert, um die Immunhomöostase zu erhalten. Zusätzlich sind apoptotische Prozesse auch an der Immunüberwachung zur Entfernung von anormalen Zellen involviert. Erst vor kurzem wurde klar, daß die Todesliganden für die außergewöhnliche Rolle im Immunsystem einiger Gewebe wie Gehirn, Ovar, Testis, Uterus während der Schwangerschaft, Plazenta, Auge und die Hamsterbackentasche verantwortlich sind. Diese Gewebe sind von der normalen Immunantwort ausgenommen und werden

daher als immunologisch privilegiert bezeichnet (Barker und Billingham, 1977). Innerhalb dieser Orte werden Immunzellen durch Apoptose beseitigt. Dies hat enorme Auswirkungen auf die Transplantationsmedizin, da das Problem der Spender-gegenüber-Empfänger- und Empfängergegenüber-Spender-Erkrankungen noch nicht geklärt ist. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, wie diese privilegierten Orte ihren Status aufrechterhalten, könnte zu Wegen führen, die Immunreaktionen spezifisch zu unterdrücken. Die apoptotische Maschinerie, die die Todesrezeptoren/liganden benutzt, ist sehr potent und muß daher genau reguliert werden. Störungen dieser Systeme können zu ernsten Erkrankungen führen.

Der CD95-Rezeptor ist fast überall exprimiert, sowohl auf lymphoiden als auch auf nicht-lymphoiden Zellen (Watanabe-Fukunaga et al., 1992a; Leithäuser et al., 1993; Hiramatsu et al., 1994; Galle et al., 1995), wohingegen die Expression vom CD95L eng reguliert wird. Zuerst schien der Ligand lediglich auf T-Zellen exprimiert zu sein (Suda et al., 1993), doch zeigte sich später, daß auch in einigen wichtigen nicht-lymphoiden Bereichen CD95L exprimiert wird (s. Kapitel 3.4.3).

3.4.1 Natürliche Aberrationen im CD95/CD95L-System

Die Identifizierung von CD95 und CD95L half, die Phänotypen von drei Mausmutanten zu erklären. 1978 beschrieben Murphy und Rothes eine Mauslinie mit einem autosomal-rezessiven Gendefekt *lpr* (für "Iympho**pr**oliferation"). Bei Mäusen der Linie MRL/MpJ führte diese Mutation zur starken Vergrößerung von Lymphknoten und Milz, die durch eine Akkumulation von CD4⁻CD8⁻-Zellen hervorgerufen wurde. Die Entwicklung der Merkmale wurde dabei vom genetischen Hintergrund beeinflußt (Izui et al., 1984). So entwickelten einige Mausstämme auch Autoimmunerkrankungen. Sie haben starke Ähnlichkeit mit den Symptomen, die beim humanen systemischen Lupus erythematodes (SLE) auftreten (Andrews et al., 1978; Mysler et al., 1994). Inzwischen ist bekannt, daß die *lpr*-Mutation auf den Einbau eines Retrotransposons im Gen für CD95 beruht, was zu einem veränderten mRNA-Transkript führt. Dies hat eine stark verringerte Expression des Rezeptors zur Folge, so daß es zu einer erheblich verminderten Apoptose in der Immunregulation dieser Mäuse kommt (Watanabe-Fukunaga et al., 1992); Adachi et al., 1993; Chu et al., 1993; Wu et al., 1993; Mariani et al., 1994).

Eine weitere Mutation *lpr^{cg}* (für "lympho**pr**oliferation-**c**omplementing *gld*⁺) ist allelisch mit *lpr* und führt zu sehr ähnlichen Symptomen (Matsuzawa et al., 1990). Die Oberflächenexpression des CD95-Rezeptors von *lpr^{cg}*-Mäusen ist nicht verändert (Watanabe-Fukunaga et al., 1992b), doch ist eine Aminosäure innerhalb der Todesdomäne des CD95 ausgetauscht (Ile₂₆₂ mit Asn₂₆₂), was auf eine Punktmutation (T₇₈₆ nach A₇₈₆) zurückzuführen ist. Diese Veränderung führt zur Unterbrechung der Signaltransduktion und zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Watanabe-Fukunaga et al., 1992b). Der homologe Austausch beim Menschen ist Val₂₃₈ zu Asn₂₃₈. Auch hier ist die Todesdomäne inaktiv und verhindert so die Weiterleitung des zytotoxischen Signals von CD95 in die Zelle (Itoh et al., 1991; Itoh und Nagata, 1993) (vgl. Kapitel 3.5.2). Später zeigte die CD95-"knock-out"-Maus wesentlich stärkere Formen von Lymphadenopathie und Splenomegalie als die *lpr*-Maus (Adachi et al., 1995). Dies ließ sich durch eine geringe Restaktivität des CD95/CD95L-Systems erklären. Zusätzlich konnte die Lymphoadenopathie in der *lpr*-Maus durch Expression des CD95-Rezeptors als

Transgen verhindert werden (Wu et al., 1994). Damit wurde die Wichtigkeit von CD95 im programmierten Zelltod von T-Lymphozyten bestätigt.

Eine inaktivierende Punktmutation ist nicht nur auf der Rezeptorseite, sondern auch auf der Ligandenseite beschrieben worden. Sie wird als *gld* (für "**g**eneralized **I**ymphoproliferative **d**isease) bezeichnet. Doppelt-heterozygote (*lpr^{cg +/-}*, *gld^{+/-}*) Mäuse zeigten ähnliche Symptome, wie sie für die homozygoten *lpr^{-/-}*-Stämme beschrieben wurden (Roths et al., 1984). Nach Klonierung der cDNA für CD95L aus der Ratte (Suda et al., 1993) zeigten vergleichende Untersuchungen mit *gld*-Mäusen, daß die *gld*-Punktmutation zu einer Aminosäureveränderung (Phe₂₇₂ zu Leu₂₇₂) im extrazellulären Bereich des Moleküls führte (Lynch et al., 1994; Ramsdell et al., 1994). Diese Region in der Bindungsstelle des CD95L ist innerhalb der TNF-Familie hochkonserviert (Hahne et al., 1995). Der Aminosäureaustausch führte zum völligen Verlust der zytotoxischen Funktion des CD95L (Ramsdell et al., 1994; Takahashi et al., 1994a; Lynch et al., 1994). Das bestätigte Beobachtungen, die vorher zu der Vermutung geführt hatten, daß *lpr* und *gld* Mutationen eines Liganden-Rezeptor-Paares seien (Allen et al., 1990; Sobel et al., 1993).

Beim Menschen wurde eine ähnliche Krankheit mit einer Dysfunktion im CD95/CD95L-System beschrieben (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). Kinder mit diesem Syndrom ("**a**utoimmune lympho**p**roliferative **s**yndrome", ALPS) haben eine massive, nicht-maligne Lymphadenopathie, eine veränderte und vergrößerte T-Zellpopulation und eine massive Autoimmunfunktionsstörung.

3.4.2 Die Funktion des CD95/CD95L-Systems im Immunsystem

Obwohl einige Berichte existieren, die zeigen, daß die Aktivierung von CD95 zur Sekretion von IL-8 (Abreu-Martin et al., 1995) oder Proliferation (Alderson et al., 1993; Mapara et al., 1993; Aggarwal et al., 1995; Freiberg et al., 1997) führte, deuten die meisten in vitro- und in vivo-Daten klar darauf hin, daß CD95 ein Rezeptor ist, der hauptsächlich Apoptose vermittelt. Die physiologische Rolle des CD95/CD95L-Systems scheint stark mit dem Immunsystem und der Leber verbunden zu sein (Adachi et al., 1995). Injektion von anti-CD95-Antikörper oder von rekombinantem CD95L in Mäuse führte zum schnellen Tod durch Leberversagen (Ogasawara et al., 1993; Tanaka et al., 1997). Die Bedeutung im Immunsystem konnte dadurch gezeigt werden, daß nach T-Zellrezeptor-Stimulation bei voraktivierten oder transformierten T-Zellen (Alderson et al., 1995; Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995) die CD95L-Expression hochreguliert ist und die Zellen durch CD95/CD95L-Wechselwirkung Apoptose begehen. Dieser aktivierungsinduzierte Zelltod (AIZT) ist ebenfalls in der peripheren Deletion in vivo involviert, indem T-Zellen, die auf einen starken Antigen-Stimulus reagieren, im Laufe der Zeit herunterreguliert werden: ein Prozeß, der wahrscheinlich für die Homöostase im Immunsystem eine entscheidende Rolle spielt. Periphere Deletion ist zumindest teilweise defekt in Tieren, bei denen eine Dysfunktion im CD95/CD95L-System existiert (Singer und Abbas, 1994; Mogil et al., 1995). Dies unterstützt die Ansicht, daß die Expression dieses Rezeptor/Liganden-Paares wichtig ist für die Depletion von überflüssigen Lymphozyten nach einer Immunantwort. Da dieses System im AIZT involviert ist, scheint es zumindest teilweise für die Depletion von CD4+-T-Zellen bei AIDS verantwortlich zu sein. Es stellte sich heraus, daß indirekte Mechanismen zur Sensitivierung von nichtinfizierten T-Zellen nach einer HIV-Infektion zu AIDS führen (Westendorp et al., 1995; Li et al., 1995a; Szawlowski et al., 1993; Zagury et al., 1993). Zusätzlich exprimierten T-Lymphozyten von HIV-1infizierten Patienten mehr CD95 auf ihrer Oberfläche (Debatin et al., 1994; McCloskey et al., 1995). Katsikis et al. (1995) zeigten überdies, daß T-Zellen von HIV-1-seropositiven Individuen sensitiver gegenüber CD95-vermittelter Apoptose werden. Es läßt sich ein Szenario zeichnen, in dem AIZTsensitive T-Zellen von HIV-Patienten eine erhöhte Expression von CD95 zeigen. Die Stimulation dieser Zellen mit Antigen oder anti-CD95-Autoantikörpern würde zu Apoptose führen. Dieser Mechanismus könnte zur starken Depletion von T-Zellen im Verlauf der AIDS-Erkrankung beitragen.

3.4.3 Das CD95/CD95L-System in nicht-lymphoiden Geweben

CD95L scheint von einigen Geweben benötigt zu werden, um den immunologisch privilegierten Status aufrechtzuerhalten. Nach Einbringen von Viren in die vordere Augenkammer von Mäusen infiltrierten Lymphozyten und Granulozyten diese Region. Diese begingen Apoptose, wahrscheinlich hervorgerufen durch CD95L-Expression auf den Endothelzellen (Griffith et al., 1995; Griffith et al., 1996). Da das CD95/CD95L-System für immunprivilegierte Orte von Bedeutung ist, entstand die Idee, dieses System bei der Transplantation einzusetzen. Die Transplantate sollten durch künstliche Expression des CD95L vor Abstoßungsreaktionen bewahrt werden. Kürzlich ließ sich zeigen, daß die menschliche Cornea funktionalen CD95L exprimiert (Stuart et al., 1997). Der Ligand könnte das Molekül sein, welches die Cornea-Transplantate in Menschen vor dem Immunsystem des Empfängers schützt. Untersuchungen an Cornea-Transplantaten in der Maus unterstützten diese Hypothese. Andere Studien über die Beteiligung des CD95L bei der Akzeptanz von Spendergewebe sind weniger eindeutig und werden momentan kontrovers diskutiert (Bellgrau et al., 1995; Allison et al., 1997; Lau et al., 1996; Selawry und Cameron, 1993). Ein anderes, neueres Ergebnis hebt die Abhängigkeit der immunprivilegierten Orte von der CD95L-Expression in einem andern Zusammenhang hervor. Eine Reihe verschiedener muriner und humaner Tumoren, einschließlich vieler nicht-lymphoider Tumoren, zeigte eine konstitutive Expression von funktionalem CD95L (O'Connell et al., 1996; Hahne et al., 1996; Niehans et al., 1997; Shiraki et al., 1997). So war zum Beispiel ein CD95L-exprimierendes Melanom in der Lage, eine potente Antitumor-Immunität hervorzurufen, wenn das Wirtstier einen Defekt in der CD95- Expression hatte (Hahne et al., 1996). Dies legt die Möglichkeit nahe, daß der Mechanismus, der für den Schutz des Gewebes vor einer Autoimmunreaktion während einer Entzündung oder während einer Abstoßungsreaktion eines Transplantates wirkt, auch von Tumoren benutzt werden kann, um der Immunüberwachung zu entkommen.

Diese Beobachtungen verdeutlichen, daß nicht-lymphoider CD95L in großem Maße an der Kontrolle von Immunantworten durch Induktion von Apoptose bei infiltrierenden Lymphozyten und Granulozyten beteiligt ist. Doch führte die Expression des CD95L in einigen Tumoren zu deren Abstoßung (Seino et al., 1997). Zusätzlich ist bekannt, daß CD95L auch Gewebe schädigen kann. In Spender-gegenüber-Empfänger-Erkrankungen trägt die Fähigkeit der Spender-Effektorzellen, funktionalen CD95L zu exprimieren, zum destruktiven Angriff bei (Baker et al., 1996; Braun et al., 1996). Anti-CD95-Antikörper induzierten Apoptose in Hepatozyten *in vivo* (Ogasawara et al., 1993), und dies führte zur Idee, daß die CD95L-induzierte Apoptose dieser Zellen zu einigen Formen von Hepatitis beiträgt. Diese Idee

konnte zumindest bei Patienten mit alkoholischen Leberschäden, in denen die Hepatozyten CD95L exprimieren, bestätigt werden (Galle et al., 1995).

CD95L-induzierte Apoptose scheint auch eine Rolle in einigen Autoimmunerkrankungen zu spielen. Normale Thyrozyten exprimieren konstitutiv funktionalen CD95L, aber normalerweise kein CD95. In Hashimoto-Thyroiditis-Patienten exprimieren die Thyrozyten CD95, und diese Zellen begehen auch Apoptose (Giordano et al., 1997). *In vitro* exprimieren normale Thyrozyten CD95 nach Inkubation mit Interleukin-1, und die resultierende Apoptose kann mit Antikörpern blockiert werden, die die CD95/CD95L-Interaktion inhibieren. Folglich führt bei Hashimoto-Thyroitis die normale schützende Funktion des CD95L auf Thyrozyten zur Zerstörung der Schilddrüse. Die Ursache dieser Dysfunktion ist nicht klar, aber es ist wahrscheinlich, daß das CD95/CD95L-System zum Fortschreiten der Krankheit beiträgt.

3.5 Signaltransduktion der CD95-vermittelten Apoptose

Die Signaltransduktion von CD95 war lange Zeit ungeklärt. Inzwischen wurde jedoch eine Reihe von Signalwegen beschrieben, die mit der CD95-vermittelten Apoptose in Zusammenhang gebracht werden. In diesem Kapitel werden die unterschiedlichen Veröffentlichungen zu diesem Signalweg zusammengefaßt.

3.5.1 Oligomerisierung von CD95 ist Voraussetzung für die Übermittlung des zytotoxischen Signals

Versuche mit verschiedenen Subklassen des Antikörpers anti-APO-1 zeigten die Notwendigkeit der Oligomerisierung des Rezeptors, um ein Todessignal auszulösen (Dhein et al., 1992). Der anti-APO-1-Ak ist vom Subtyp IgG3. Dieser IgG-Subtyp besitzt die Eigenschaft, über den Fc-Teil mit sich selbst zu aggregieren. Andere Immunglobulinsubklassen von anti-APO-1 hatten stark unterschiedliche Aktivitäten in der Reihenfolge IgG3>>IgG1>IgG2a>IgG2b. Für den IgG2b-Ak war keine Aktivität mehr nachweisbar (Dhein et al., 1992). Da alle Isotypen von anti-APO-1 dieselbe Spezifität und Affinität für CD95 besaßen, mußte der Grund für die unterschiedliche Aktivität in den unterschiedlichen Fc-Teilen der einzelnen Isotypen liegen. Der IgG2b-Ak war deshalb inaktiv, weil er CD95 zwar quervernetzte, aber maximal zu einer Dimerisierung des Rezeptors führte. Eine zusätzliche Quervernetzung war aber nötig, um dem IgG2b-Ak Aktivität zu verleihen. Der IgG3-Ak benötigte diese zusätzliche Quervernetzung nicht zu seiner vollen Aktivität. Man nimmt deshalb an, daß der IgG3-anti-APO-1 durch seine Tendenz zur Fc-Fc-Wechselwirkung eine Aggregation von CD95 herbeiführt. Die vorliegenden Daten zeigen, daß eine Dimerisierung nicht ausreicht, CD95 anzuregen, sondern daß mindestens eine Trimerisierung notwendig ist, um ein Todessignal in der Zelle zu erzeugen. Diese Annahme stimmt überein mit der durch die Röntgenkristallographie von LTa in Komplex mit TNF-RI vorhergesagten trimeren Struktur der Mitglieder der TNF-R-Familie (Banner et al., 1993).

3.5.2 Die Todesdomäne - "Death Domain"

Der intrazelluläre Teil von CD95 besaß keinerlei Konsensussequenz, die auf die Nutzung eines bekannten Signalweges hingewiesen hätte. 1993 zeigten Itoh und Nagata, daß eine 15 As-lange Deletion am C-Terminus von CD95 eine Verstärkung des CD95-vermittelten Zelltodes ergab. Weitere Deletionen inhibierten das CD95-Signal dagegen vollständig. Ein Sequenzvergleich mit dem intrazellulären Bereich von TNF-RI ergab eine Homologie über einen Bereich von 68 As. Kurze Zeit später konnten Tartaglia et al. (1993) ebenfalls durch Deletionsmutagenese und zusätzlich durch inaktivierende Punktmutationen im TNF-RI eine Region lokalisieren, die für die Zytotoxizität des Rezeptors essentiell ist. Dieser 80 As-lange Bereich wurde "Death Domain" (DD) genannt und beinhaltet die von Itoh und Nagata (1993) beschriebene Domäne. Innerhalb der DD liegt auch der Valinrest (Val₂₃₈), dessen Veränderung bei der Mutation *Ipr^{og}* die Signaltransduktion durch CD95 verhindert (Itoh und Nagata, 1993).

Es dauerte mehrere Jahre, bis die nächsten Rezeptoren mit einer DD isoliert wurden (DR3, DR4 und DR5; vgl. Kapitel 3.2). Neben den DD-Rezeptoren sind noch weitere DD-Proteine gefunden worden, von denen drei an CD95 binden sollen. Zur Klonierung wurde das Two-Hybrid-System in Hefe und der zytoplasmatische Teil von CD95 (CD95zT) verwendet. Die drei DD-Proteine sind FADD (auch MORT1 genannt) (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et a., 1995), RIP (Stanger et al., 1995) und DAXX (Yan et al., 1997).

3.5.3 CD95-assoziierte Signalmoleküle

Alle publizierten Signalmoleküle, die an den CD95-Rezeptor binden, wurden in den letzten drei Jahren mittels des Two-Hybrid-Systems in Hefe mit CD95zT als Bindungspartner gefunden. In Tabelle 3.3 sind die Proteine zusammengefaßt. Die drei DD-Proteine FADD, RIP und DAXX binden direkt an die CD95-DD; FADD und RIP lösen bei Überexpression Apoptose aus, während DAXX den CD95-vermittelten Zelltod verstärkt. Alle andern Moleküle besitzen keine DD. Doch werden sämtliche Bindungen der Proteine zum Rezeptor, bis auf die von FAP-1, durch eine *lpr^{cg}*-Mutation verschlechtert oder ganz unterbunden, was darauf hindeutet, daß die DD direkt oder indirekt benötigt wird. Während DAXX, FAF1 und UBC-FAP die CD95-vermittelte Apoptose bei Überexpression verstärkten, wurde von FAP-1 und Sentrin eine blockierende Wirkung beschrieben (Abb 3.2).

Für FADD wurde außer der DD am C-Terminus keine bekannte Domäne identifiziert. Interessanterweise führte die Expression der DD allein nicht zum Selbstmord der Zelle, dafür aber die des N-Terminus. Aufgrunddessen wurde dieser Teil des Moleküls "Death Effektor **D**omain" (DED) genannt. RIP zeigt im Two-Hybrid-System Affinität zu

Signalmolekül	Referenz
FADD (MORT1)	Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995
RIP	Stanger et al., 1995
DAXX	Yang et al., 1997
FAF1	Chu et al., 1995
UBC-FAP (UBC9)	Wright et al., 1996
FAP-1	Sato et al., 1995
Sentrin	Okura et al., 1996

Tabelle 3.3: CD95-assoziierte Signalmoleküle

CD95 und in geringem Maße zu TNF-RI. Das RIP-Molekül besitzt eine Domäne mit Homologie zu Proteinkinasen, und seine DD allein genügt, um eine Zelle zu töten. DAXX ist vor kurzem kloniert worden. Es verstärkt Apoptose und aktiviert die Jun-N-terminalen Kinasen (JNK). Sein C-terminaler DD-Bereich bindet an die DD von CD95 und TNF-RI. Dieser Bereich allein exprimiert, inhibiert Apoptose und JNK-Aktivierung. UBC-FAP ist das menschliche Homolog zum "ubiquitin conjugating enzyme 9" (UBC9) in *Saccharomyces cerevisiae*, welches den Zellzyklus an der Stelle von G₂ nach M kontrolliert und die Degradation von Zyklinen reguliert. Für CD95 ist eine negative regulatorische Rolle des Cterminalen Bereiches des Rezeptors vorgeschlagen worden, da die Deletion der letzten 15 As von CD95 die Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose verstärkt (Itoh et al., 1993, s. Kapitel 3.5.2). Diese Region des CD95 interagiert mit FAP-1 (für "Fas-assoziierte Phosphatase-1"), einer Proteinphosphatase. FAP-1 konnte den CD95-vermittelten Zelltod inhibieren, ebenso wie Sentrin, das wie RIP und DAXX auch an den TNF-RI im Two-Hybrid-System binden konnte. Zusätzlich zeigt FAP-1 Homologien zu Ubiquitin, NEDD8 und einem *Saccharomyces cerevisiae*-Protein (Smt3).

3.5.4 Weitere publizierte Signalmoleküle des CD95-Signalweges

Obwohl die Ausführung des CD95-Apoptosesignals sehr spezifisch zu sein scheint, wurden einige (zum Teil klassische) Signalwege beschrieben, die an der Erzeugung des APO-1-Todessignals beteiligt zu sein scheinen. Diese sind in Abb.3.2 dargestellt.

- Ceramid wird aus membranständigen Sphingolipiden, die der zentrale Bestandteil der Membran sind, durch die Aktivität von Sphingomyelinasen (SMasen) abgespalten (Hannun und Obeid, 1995) oder *de novo* produziert (Bose et al., 1995). Für die CD95-vermittelte Apoptose wurde sowohl die Aktivität der sauren SMase (Kolesnick et al., 1994; Cifone et al., 1993) als auch die Aktivität der neutralen SMase als essentieller Schritt dargestellt (Tepper et al., 1995).
- Für viele Rezeptoren ist Tyrosinphosphorylierung als regulatorische Modifikation gezeigt worden (van der Geer et al., 1994 (Review)). Auch für die CD95-vermittelte Apoptose wurde die Aktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) als notwendig beschrieben (Eischen et al., 1994).
- Die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) spielt auch eine Rolle bei der Modulation des zytotoxischen Signals. Zum einen sensitivierte die Hemmung der PKC durch die Inhibitoren H7 und HA1004 Zellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Ni et al., 1994), zum anderen führte deren Aktivierung mit dem Phorbolester PMA zur Resistenzbildung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Copeland et al., 1994). In diesem Zusammenhang wurde über den Einstrom von Ca²⁺ nach anti-CD95-Inkubation in der B-Zellinie FMO berichtet (Oshimi und Miyazaki, 1995).



Abb. 3.2: Publizierte Signalmoleküle des CD95-Signalweges

 Phosphatasen als zelluläre Gegenspieler der Proteinkinasen gewinnen in letzter Zeit bei der Signaltransduktion immer mehr an Bedeutung. Für lymphoide Zellen wurde eine Phosphatase (HCP) beschrieben, deren Funktion eng mit der Apoptosesensitivität dieser Zellen korreliert ist. Mutanten dieser Zellen mit verringerter HCP Aktivität zeigten Resistenz gegenüber CD95vermittelter Apoptose. Diese Beobachtung wurde auch bei Untersuchungen mit mev/mev Mäusen gemacht, die einen Defekt eben jener Phosphatase haben (Su et al., 1995). Einen gegenteiligen Effekt hat die an CD95-bindende Tyrosinphosphatase FAP-1 (s. Kapitel 3.5.3).

3.5.5 Die Bcl-2-Familie, die Familien der Caspasen und der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen

Die Notwendigkeit der ced-9- und ced-3-Gene in der Apoptose von *C.elegans* und die Entdeckung ihrer menschlichen Homologen führte zur Annahme, daß diese Gene in Säugetieren eine ähnlich wichtige Aufgabe wie in der Nematode übernehmen würden. In den nachfolgenden Kapiteln ist deshalb der Wissensstand zu Beginn dieser Doktorarbeit einführend wiedergegeben. Anschließend wird die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen vorgestellt, da auch sie in den letzten Jahren in der Apoptoseforschung an Bedeutung gewonnen haben.

3.5.5.1 Die Proteine der Bcl-2-Familie

Bcl-2 wurde erstmals bei der Entwicklung des humanen follikulären Lymphoms beschrieben (Tsujimoto et al., 1984). Eine t(14:18)-Translokation des Gens führte zur Deregulation seiner Expression, da es unter die Kontrolle des Enhancers des Gens für die schwere Kette der Immunglobuline geriet (Graninger et al., 1987). Bald wurde klar, daß Überexpression von Bcl-2 allein nicht zur Transformation von Zellen ausreichte. Vielmehr waren weitere genetische Veränderungen notwendig (Vaux et al., 1988; Reed et al., 1988; Cook et al., 1985; Metcalf et al., 1987). Dies konnte in eleganten Experimenten gezeigt werden, in denen Nachkommen von Mäusen, die transgen für *c-myc* und *bcl-2* waren, erhöhtes Tumoraufkommen aufwiesen (Strasser et al., 1990).

Bcl-2 vermag in physiologischen Systemen mit mehreren Proteinen zu heterodimerisieren. Diese Moleküle interagieren durch Domänen (BH1 und BH2), die einen hohen Grad an Homologie zueinander aufweisen (Yin et al., 1994). Zusammen bilden sie die Bcl-2-Familie (Sedlak et al., 1995). Für die Funktion von Bcl-2 ist vor allem seine Interaktion mit Bax wichtig (Oltvai et al., 1993; Yin et al., 1994; Hanada et al., 1995). Bax kommt in mehreren Splicevarianten vor (Bax- α , Bax- β und zwei Bax- γ -Formen), von denen nur die Funktion der einen, Bax- α , bekannt ist. Überexpression von Bax- α in Zellen führt zur Apoptose, und der Schutz durch gleichzeitige Expression von Bcl-2 in diesen Zellen wird aufgehoben (Oltvai et al., 1993). So findet man Bax-α-Expression auch in Geweben, die verstärkt Apoptose zeigen (Krajewski et al., 1994). Ein weiteres Mitglied der Bcl-2-Familie ist Bcl-x (Boise et al., 1993). Bcl-x kommt in zwei Splicevarianten vor, die eine gegensätzliche Wirkung auf die Apoptose von Zellen haben. Während die lange Form, Bcl-x_L, ebenso wie Bcl-2, die Zellen vor der Apoptose durch den Entzug von Wachstumsfaktoren schützt, antagonisiert die kurze Variante, Bcl-x_s, die Wirkung von Bcl-2. Die Expression der beiden Varianten korrelierte in verschiedenen Geweben mit der Lebensdauer der dortigen Zellen (Boise et al., 1993). Bcl-x_L und Bcl-2 üben ihre negativ regulierende Wirkung auf unterschiedliche apoptotische Wege aus. So blockiert Bcl-x_L in B-lymphoiden Zellinien durch immunsupprimierende Agentien ausgelöste Apoptose, während Bcl-2 hier keinen Schutz verleiht (Gottschalk et al., 1994; Choi et al., 1995; Cuende et al., 1993). Aus Untersuchungen an T-Zell-Lymphomen sind auch in vivo Resistenzmechanismen bekannt, die nicht durch Bcl-2 vermittelt werden (Debatin und Krammer, 1995; Boise et al., 1995a).

Weitere Moleküle der Bcl-2-Familie sind Bad, ein Modulator der Bax-Funktion (Yang et al., 1995), Bik, das mit dem Adenovirusprotein E1B 19K, Bcl-2 und Bcl- x_L assoziiert (Boyd et al., 1995) und Bak-1, das wie Bad als Verstärker von Apoptose wirkt (Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995; Kiefer et al., 1995). Bei Säugern zeigen die Gene *A1* (Lin et al., 1993) und *Mcl-1* (Kozopas et al., 1993) Homologie zu *bcl-2*. Aus dem Epstein-Barr-Virus wurde das Protein BHRF (Pearson et al., 1987) und aus dem afrikanischen Schweinefieber-Virus LMW5-H1 (Neilan et al., 1993) isoliert. Beide weisen ebenfalls eine Ähnlichkeit mit Bcl-2 auf. BHFR hemmt Apoptose von befallenen Zellen, während von dem zweiten Virusprotein keine weitere Funktion bekannt ist.

Ein weiteres Protein, BAG-1, das keine Sequenzhomologie zur Bcl-2-Familie aufweist, interagiert jedoch mit Bcl-2 und verstärkt bei Kotransfektion mit diesem die antiapoptotische Wirkung (Takayama et al., 1995).

Die Expression von Bcl-2 in Zellen führt zum Schutz vor verschiedenen apoptoseauslösenden Stimuli, wie Strahlung, DNA-schädigenden Substanzen, Glukokortikoiden, Natriumazid, Ca²⁺-Influx, Hitzeschock und Sauerstoffradikalen (Vaux et al., 1988; McDonell et al., 1989; Strasser et al., 1991b, 1991b; Sentman et al., 1991; Miyashita und Reed, 1992; Reed, 1994). Zu den Apoptosearten, die nicht durch Bcl-2 blockierbar sind, gehören die negative Selektion von Thymozyten (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991a), der durch TNF ausgelöste Zelltod (Vanhaesebroeck et al., 1993) oder die Lyse durch zytotoxische T-Zellen (Vaux et al., 1992a). Der Einfluß von Bcl-2 auf die CD95-vermittelte Apoptose ist unklar. Die Hinweise nach Transfektion von bcl-2 reichten von vollständiger Resistenz (Jäättelä et al., 1995) oder teilweiser Inhibition (Itoh et al., 1993; Martin et al., 1995c; Enari et al., 1995a) bis hin zur Beobachtung, daß bcl-2 nicht in der Lage war, Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose zu schützen (Strasser et al., 1995; Memon et al., 1995).

3.5.5.2 Caspasen (ICE-ähnliche Proteasen)

Caspasen (ehemals ICE-ähnliche Proteasen genannt) bilden eine Familie von Cysteinproteasen. Sie sind in Säugetieren das Gegenstück zu dem *C. elegans*-Zelltodmolekül CED-3. Der erste bei Säugern gefundene Vertreter war die Caspase-1 (das "Interleukin-1β konvertierende Enzym", (ICE)) (Yuan et al., 1993). Überexpression von Caspase-1 löste Apoptose aus (Miura et al., 1993; Schwartz und Osborne, 1994). Die Caspase-1 besitzt eine enge Substratspezifität. Sie katalysiert ihre eigene proteolytische Reifung und die von Interleukin-1β. Später wurde klar, daß Caspase-1-ähnliche Proteasen auch bei der CD95-vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Los et al., 1995; Enari et al., 1995b). Inzwischen sind zehn humane Mitglieder der Caspasen-Familie bekannt (Abb. 3.3). Eine phylogenetische Analyse der Familienmitglieder ergab, daß diese Enzyme in zwei, möglicherweise in drei Unterfamilien unterteilt werden können. Eine Reihe von Hinweisen deutet darauf hin, daß dabei die Mitglieder der ICE-Unterfamilie hauptsächlich eine Rolle in Entzündungsreaktionen spielen, wogegen die Mitglieder der CED-3-Unterfamilie meist (wenn nicht ausschließlich) in Apoptose involviert sind. Die Caspase-8 wurde im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert.



Abb. 3.3: Die Caspasenfamilie von ICE/CED-3-ähnlichen Cysteinproteasen.

Synonyme sind in Klammern angegeben. (Phylogenetische Verwandtschaften wurden über den PILEUP-Algorithmus des "Wisconsin GCG sequence analysis package" ermittelt. Bekannte Familienmitglieder der Caspasen umfassen *Caenorhabditis elegans* CED-3 und zehn Enzyme menschlichen Ursprungs. Entsprechende Moleküle in andern Spezies wurden ebenfalls identifiziert (z. B. Maus, Meerschweinchen und *Drosophila melanogaster*) (nicht gezeigt). Die Proteine können basierend auf den Sequenzen von ICE und CED-3 grob in zwei Untergruppen unterteilt warden. *C. elegans* CED-3 ist eng mit der menschlichen Caspase-3 verwandt. Referenzen für Caspase-1: Thornberry et al., 1992; Ceretti et al., 1992; Caspase-2: Wang et al., 1994; Kumar et al., 1994; Caspase-3: Fernandes-Alnemri et al., 1994; Tewari et al., 1995c; Nicholson et al., 1995; Caspase-4: Faucheu et al., 1995; Munday et al., 1995; Kamens et al., 1995; Caspase-5: Munday et al., 1995; Faucheu et al., 1996; Caspase-6: Fernandes-Alnemri et al., 1995a; Caspase-7: Fernandes-Alnemri et al., 1995; Lippke et al., 1996; Duan et al., 1996a; Caspase-8: Muzio et al., 1996; Boldin et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Caspase-9: Duan et al., 1996b; Srinivasula et al., 1996b; Caspase-10: Fernandez-Alnemri et al., 1996; Vincenz und Dixit, 1997.

Caspasen werden als Zymogene synthetisiert und müssen zur Aktivierung proteolytisch gespalten werden. Das aktive Enzym setzt sich aus einem heterotetrameren Komplex zusammen mit zwei großen Untereinheiten, die das aktive Zentrum enthalten, und zwei kleinen Untereinheiten. Diese Struktur kann aus den Kristallstrukturen von Caspase-1 und -3 abgeleitet werden (Wilson et al., 1994; Walker et al., 1994; Mittl et al., 1997). Apoptose konnte in Zellen durch Caspasen-spezifische Inhibitoren gehemmt werden. Es handelte sich dabei um die natürlich vorkommenden Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) CrmA aus dem Kuhpockenvirus (Gagliardini et al., 1994; Komiyama et al., 1994; Ray et al., 1992; Tewari und Dixit, 1995) und p35 aus Baculovirus (Kamita et al., 1993; Beidler et al., 1995) sowie um die Tetrapeptide unterschiedlicher Spezifität (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) für Caspase-3; Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp (YVAD) für Caspase-1) (Enari et al., 1995; Los et al., 1995; Chow et al., 1995; Schlegel et al., 1995).

Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich Caspase-1 bis -3 bekannt. Das erste beschriebene Substrat der Caspasen, das während der Apoptose gespalten wird, war das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995c). Mittlerweile sind weitere Substrate bekannt und werden in Kapitel 6.5 zusammengefaßt. Eine weitere Protease, von der schon lange bekannt war, daß sie einen apoptotischen Prozeß auslöst, ist Granzym B. Dieses Enzym spaltet sein Substrat an dem für Caspasen typischen Aspartatrest (Shi et al., 1992).

Die Position der Caspasen im Signalweg bei der Apoptose war nicht geklärt. Im allgemeinen wurde eine distale Aktivität bezüglich der Proteine der Bcl-2-Familie angenommen (Chinnaiyan et al., 1996b). Dagegen sprach die Tatsache, daß Apoptose durch Überexpression von Caspase-1, -2 oder CED-3 durch Bcl-2 inhibiert werden konnte (Miura et al., 1993; Kumar et al., 1994).

3.5.5.3 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs)

Eukaryontische Zellen haben spezifische Signalwege entwickelt, um auf externe Stimuli zu reagieren. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) bilden dabei eine Familie von Serin-/Threonin-Kinasen, die auf diverse Stimuli antworten können und aus Kinasekaskaden aufgebaut sind. MAPKs werden durch spezifische Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosin-Resten von MAPK-Kinasen aktiviert, die als MKKs (MAPK-Kinasen) oder MEKs (MAPK/ERK-Kinase-Kinasen) bezeichnet werden. Die MKKs werden wiederum durch Phosphorylierung von MKK/MEK-Kinasen (MKKK/MEKKs) aktiviert. In Hefe- und Säugetierzellen wurden einige homologe Kinasekaskaden gefunden, die darauf hindeuten, daß konservierte MAPK-Signalwege in Eukaryonten existieren. Drei Signalkaskaden sind hierbei relativ gut verstanden. Dazu gehören die MAPKs ERK1/ERK2 (auch als p42/p44 MAPKs bezeichnet), die p38/HOG1-Kinasen und die c-Jun-N-terminalen Kinasen/Streß-aktivierten Protein-Kinasen (JNK/SAPKs). Bei den menschlichen JNKs sind drei Hauptformen bekannt, die homolog zu Proteinkinasen sind, welche in der Ratte SAPKs genannt wurden (Kyriakis et al., 1994). JNK1 (p46) ist das menschliche Homolog zur Ratten-SAPKy, JNK2 (p54) das menschliche Homolog zur Ratten-SAPKα, und JNK3 (p49) das Homolog zu SAPKβ. JNK3 wird spezifisch im Gehirn exprimiert (Mohit et al., 1995). Jede MAPK-Gruppe wird durch spezifische MKKs phosphoryliert und aktiviert. MEK1 und MEK2 aktivieren die ERKs, MKK3 und MKK6 die p38-Kinasen und MKK4 (SEK-1/JNKK1) aktiviert die JNK/SAPKs. Die MKKs werden wiederum von den MKKKs an Serin/Threonin phosphoryliert und damit stimuliert. Mittlerweile sind eine ganze Reihe MKKKs - insbesondere für den JNK/SAPK-Signalweg gefunden worden, die von unterschiedlichen externen Stimuli induziert werden können und damit die MAPK-Signalwege modulieren (Fanger et al., 1997 (Review); Su und Karin, 1996 (Review); Gerwins et al., 1997). Dies deutet auf die große Bedeutung der MAPK-Signalwege hin. Ihre Funktion ist die positive Regulation von einigen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. SRF, NF-kB, ATF-2 und c-Jun (Hill und Treisman, 1995), und sie sind in die post-transkriptionale Kontrolle der Genexpression involviert (Su und Karin, 1996). Dabei agieren sie nicht nur als Informationsträger zwischen Plasmamembran Genexpression-kontrollierenden und Kernproteinen, sondern bilden einen komplexen Kontrollmechanismus, der die verschiedenen externen und internen Signale verstärken und integrieren kann.

Die MAPK-Signalwege können als Antwort auf Strahlung, DNA-schädigende Chemikalien, Proteinsynthese-Inhibitoren, Hitzeschock, osmotische Veränderungen und andere Streßfaktoren, die Zelle einwirken, aktiviert werden. Zusätzlich reagieren sie auf die auf spezifische Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosinkinasen und an heteromere G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembranrezeptoren wie auch auf Zytokinrezeptoren (Johnson und Vaillancourt, 1994; Seger und Krebs, 1995). Damit können die Mitglieder der MAPK-Familie selektiv zur Regulation von verschiedenen zellulären Antworten beitragen. So regulieren z. B. spezifische MAPK-Signalwege die Gene, die mit der Zytokin-Biosynthese von TNF α , IL-2 und IL-4 assoziiert sind (Lee et al., 1994). Zusätzlich scheinen auch der Wachstumsstopp, die Differenzierung und selbst die Apoptose einer Zelle mit der Aktivität von MAPK-Familienmitgliedern assoziiert zu sein. Darüber hinaus wird diskutiert, ob die unterschiedlichen MAPK-Signalwege und das Gleichgewicht ihrer Aktivität nicht für das Schicksal einer Zelle bestimmend sind. Insbesondere in den letzten Jahren zeigten einige Studien, daß JNK/SAPKs notwendig und zum Teil ausreichend für die Vermittlung von Apoptose sind (Verheij et al., 1996; Xia et al., 1995), obwohl andere Berichte die Wichtigkeit der JNK/SAPKs in Frage stellen (Johnson et al., 1996; Liu et al., 1996). Andererseits wurde berichtet, daß die Aktivierung des ERK-Signalweges eine schützende Funktion gegenüber dem Zelltod darstellt und damit dem Effekt von Faktoren, die Apoptose vermitteln, entgegenwirkt (Xia et al., 1995; Gardner und Johnson, 1996). In dieser Arbeit konnte die Aktivierung von JNK/SAPKs während des CD95-vermittelten Zelltodes gezeigt werden. Ihre Bedeutung für den CD95-Signalweg wird in Kapitel 6.5 besprochen.

4 Wissenschaftliche Fragestellung

Neuere Forschungen zeigen, daß die CD95-induzierte Apoptose von zentraler Bedeutung bei der Homöostase des Immunsystems, der Leber, des Gastrointestinaltrakts und vieler anderer Gewebe ist. Auch scheint sie bei der Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Status einiger Gewebe eine wichtige Rolle zu spielen. Zusätzlich ist sie an der Beseitigung geschädigter Gewebe beteiligt. Das CD95-Rezeptor/Liganden-System ist auch von zentraler Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Krankheiten, bei denen es zur Störung des Apoptosegleichgewichts kommt, wie z. B. bei Autoimmunkrankheiten, Krebs oder AIDS (s. Kapitel 3.4).

Um ein Eingreifen in Apoptosevorgänge auf molekularer Ebene zu ermöglichen, ist es wichtig, die intrazellulären Prozesse zu entschlüsseln, die zum Zelltod führen. Es ergaben sich folgende Fragen:

- Wie wird die Stimulation des CD95-Rezeptors in der Zelle in ein Todessignal umgesetzt?
- Welche Signalmoleküle sind daran beteiligt?
- Welche Funktionen haben diese Signalmoleküle, und wie wird ihre Aktivität reguliert?
- Sind die zu erwartenden Signalwege allgemeingültig für den CD95-Signalweg oder sind sie zellspezifisch?
- Welche Möglichkeiten der Modulation des CD95-Signalweges existieren?
- Wie sieht das distale Apoptosesignal aus?
- Gibt es in Hinsicht auf die Signalwege Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen Apoptoseinduzierenden Rezeptoren oder vielleicht sogar ein konserviertes Todesprogramm?

5 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind überwiegend publiziert und wurden durch weitere Daten vervollständigt und aktualisiert. Die Resultate des Kapitels 5.1 sind überwiegend in Kischkel et al. (1995), Chinnaiyan et al. (1995b), Muzio et al. (1996), Medema et al. (1997) und in Kischkel et al. (1997), die Daten des Kapitels 5.2 in Cahill et al. (1996) und des Kapitels 5.3 in Peter et al. (1997a) veröffentlicht. Es werden lediglich die eigenen Versuche wiedergegeben. Sollten Experimente nicht von mir durchgeführt worden sein, welches jedoch wichtig für das Verständnis sind, wird nachfolgend extra darauf hingewiesen.

5.1 CD95-assoziierte Moleküle

Zur Identifizierung von Molekülen, die mit dem CD95-Rezeptor assoziieren, wurde folgende Strategie gewählt:

- Auswahl und Charakterisierung geeigneter Zellinien, die den Rezeptor exprimieren und sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind
- Wahl einer geeigneten Methode zur Identifizierung der assoziierten Signalmoleküle mit unstimuliertem und stimuliertem Rezeptor

5.1.1 Untersuchung des unstimulierten Rezeptors

5.1.1.1 Charakterisierung von Zellinien

Die am besten charakterisierte Zellinie in Bezug auf CD95-Expression und Sensitivität ist die menschliche B-lymphoblastoide Zellinie SKW6.4. Mit Hilfe dieser Zellinie wurde in unserem Labor der Antikörper anti-APO-1 entwickelt (Trauth et al., 1989) und später der Rezeptor aufgereinigt (Oehm et al., 1992). Die Rezeptordichte bei dieser Zellinie liegt bei etwa 4x10⁴ Rezeptoren pro Zelle (Trauth et al., 1989). Ausgehend von dieser Zellinie wurden weitere Zellinien gefunden, die den Rezeptor exprimieren und sensitiv gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose sind. Die Expression der verschiedenen Zellinien konnte durch Markierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit anti-APO-1, anschließender Fluoreszenzanalyse und im Vergleich mit der Referenzzellinie SKW6.4 bestimmt werden. Die CD95-Expression der in dieser Arbeit verwendeten Zellinien ist in Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Die Burkitt-Lymphoma-Zellinie BL-60 exprimiert sehr wenig CD95 auf der Zelloberfläche. Nach Transfektion mit der cDNA für humanes CD95 findet man eine Expression, die der von SKW6.4 im Klon K50 entspricht (Oehm et al., 1992). K2.2 ist eine BL-60-Transfektante, die ein intrazellulär deletiertes CD95 trägt (Kischkel et al., 1995). Die andern Zellinien haben eine hohe Expression von CD95 auf der Zelloberfläche, wie der Vergleich mit SKW6.4 zeigt. Zusätzlich ließ sich die Menge der CD95-Expression durch Western-Blot oder durch Oberflächenbiotinylierung bestimmen (Abb. 5.1A, Abb. 5.3 und Abb. 5.7).

Zellinie	Kontrolle (DFI)	anti-APO-1 (DFI)
BL-60	1,2 (4,0)	10,0 (22,5)
K50	2,5 (2,6)	99,2 (57,8)
K2.2	0,8 (3,6)	96,2 (36,7)
HUT78	0,3 (3,2)	99,9 (56,7)
SKW6.4	0,2 (3,3)	99,9 (57,8)
Boe ^R	2,4 (3,9)	95,0 (71,0)
Jurkat	0,6 (2,9)	99,9 (41,8)
Raji	1,0 (3,6)	93,4 (57,7)
H9	2,79 (2,9)	97,9 (58,2)



Die angegebenen Zellinien wurden mit anti-APO-1 als detektierendem Antikörper gefärbt und die Expression im Durchflußzytometer gemessen. Angegeben ist der Anteil an APO-1-positiven Zellen in Prozent und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (DFI).





A: Western-Blot-Analyse von CD95-Expression in verschiedenen Zellen

B: Sensitivität verschiedener Zellinien gegenüber anti-APO-1-vemittelter Apoptose (BL-60: weißer Kreis; K50: schwarzer Kreis; SKW6.4: schwarzes Dreieck; HUT78: weißes Dreieck; Boe^R: schwarzes Viereck).

(Fortsetzung Abb. 5.1)

C: SKW6.4 wurde mit 20 (Kreis), 100 (Raute) oder 500 ng/ml (Quadrat) anti-APO-1 bei 37 ℃ für die angegebene Zeit inkubiert. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen wurde nach der Methode von Nicoletti (s. Material und Methoden) bestimmt.

Alle Zellinien wurden auf ihre Sensitivität gegenüber anti-APO-1-vermittelter Apoptose getestet. Die apoptotischen Zellen wurden nach der Methode von Nicoletti gemessen (Nicoletti et al., 1991). Der Prozentsatz der apoptotsichen Zellen stieg mit der Konzentration des Antikörpers an (Abb. 5.1B). Lediglich BL-60- und Boe^R-Zellen starben selbst mit hohen Konzentrationen an anti-APO-1 nur zu einem geringen Prozentsatz. Für BL-60 läßt sich das mit der geringen CD95-Expression erklären, während die Boe^R -Zellinie trotz hoher Rezeptordichte resistent ist. Diese Zellinie wurde in dieser Arbeit eingehender untersucht (Kap. 5.1.2.6).

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen an anti-APO-1 auf die Kinetik der Apoptose ist exemplarisch in Abb. 5.1C für die Zellinie SKW6.4 gezeigt. Höhere Konzentrationen des Antikörpers beschleunigten den Ablauf der Apoptose, erhöhten aber nicht den absoluten Prozentsatz an apoptotischen Zellen nach 24 Stunden Inkubationsdauer.

5.1.1.2 Methode zur Identifizierung CD95-assoziierter Signalmoleküle

Zur Identifizierung von CD95-assoziierten Signalmolekülen mußte eine geeignete Methode gefunden werden. In unserem Labor wurde der agonistische, monoklonale Antikörper anti-APO-1 entwickelt (Trauth et al., 1989). Dieser konnte den Rezeptor immunpräzipitieren, so daß sich der Rezeptor damit aufreinigen ließ (Oehm et al., 1992). Mit seiner Hilfe sollten die assoziierten Moleküle koimmunpräzipitiert werden.

Um ein membranständiges Molekül wie den CD95-Rezeptor zu reinigen, müssen die Zellen lysiert werden. Hierzu dienen in der Regel Detergenzien. Je stärker das Detergens nicht-kovalente, hydrophobe Wechselwirkungen aufhebt, desto leichter werden schwache Assoziationen von Molekül zu Molekül unterbunden und so nicht mehr erkennbar. Deshalb ist die Wahl des Detergens ein wichtiges Kriterium. In dieser Arbeit wird hauptsächlich mit Brij-58, Nonidet P-40 (NP-40) und Triton X-100 gearbeitet. Dabei stellte sich Triton X-100 als das am besten geeignete Detergens heraus (vgl. Kapitel 5.1.2.1).

Ein Markierungsverfahren, das fast alle zellulären Proteine markiert, ist die ³⁵S-metabolische Markierung mit ³⁵S-Cystein/Methionin. Die Markierung ist von der Expressionsrate und dem Methioninund Cysteingehalt des Proteins abhängig. Dieses Verfahren schien eine geeignete Methode zur Identifizierung assoziierter Moleküle zu sein. Die Zellen wurden dabei 20 bis 24 Stunden mit ³⁵S inkubiert, was ungefähr einer Zellteilung entsprach, um auch gering exprimierte Proteine zu detektieren.

Die Reinigung des Rezeptors und assoziierter Proteine mittels SDS-PAGE wurde als Analyseverfahren gewählt. Die verwendete Auftrennung lag zwischen 14 und 200 kDa (12% iges Gel). Um auch gering markierte Proteine aufzuspüren, wurde die Auflösung durch zusätzliche Trennung nach Ladung erhöht, was der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-IEF/SDS-PAGE) entspricht. Die Proteine
werden hierzu in der ersten Dimension auf einem vorgelegten pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt (pl) aufgetrennt, bevor sie in der zweiten Dimension einer konventionellen SDS-PAGE unterzogen werden. Man kann über verschiedene pH-Bereiche auftrennen. Da die zu suchenden Proteine einen unbekannten pl hatten, wurde ein möglichst großer Trennbereich angestrebt. Hierzu wurde die Trennung verwendet, die im Labor etabliert war und einen pH-Bereich von etwa 4,3-9,0 mit einem linearen Trennbereich von pH 5,5 bis 7,5 versprach. Es stellte sich jedoch heraus, daß der basische Bereich nur bis etwa pH 7,5 abgedeckt wurde. Da die meisten publizierten Signalmoleküle einen leicht sauren pl besitzen, wurde die isoelektrische Fokussierung nicht weiter modifiziert.

5.1.1.3 Keine spezifischen konstitutiven Assoziationen mit CD95

Mit Hilfe des Antikörpers anti-APO-1 wurde der Rezeptor in verschiedenen Zellinien immunpräzipitiert und dann zweidimensional analysiert. K50 stellte sich als besonders geeignete Zellinie heraus, da der überexprimierte Rezeptor ein deutliches Signal ergab. Dabei konnten im zweidimensionalen Gel keine reproduzierbaren Assoziationen festgestellt werden (Abb. 5.2B). Triton X-100 diente als Detergens, und um unspezifische Assoziationen, die durch Bindung an die Trägersubstanz oder den Antikörper entstehen, zu erkennen, wurde ein unspezifischer, isotypgleicher Antikörper (FII23c) zur Kontrollimmunpräzipitation verwendet (Abb. 5.2A).

Schon bei diesen Immunpräzipitationen (IPs) stellte sich Brij-58 als nicht geeignetes Detergens heraus. Es wurden nämlich unter diesen Bedingungen Assoziationen mit dem Transferrin-Rezeptor, IgM-Rezeptor, CD-20, MHC Klasse I und Klasse II in K50 gefunden (Daten nicht gezeigt). Da eine Assoziation von CD95 mit dem Transferrin-Rezeptor unwahrscheinlich erschien, wurde dieses



Abb. 5.2: Keine konstitutiv assoziierten Moleküle mit dem unstimulierten Rezeptor

Metabolisch markierte K50-Zellen wurden zuerst in einem Puffer mit Triton X-100 lysiert. Im Anschluß wurde hintereinander mit FII23c- (**A**) und dann mit anti-APO-1-Antikörper (**B**) jeweils gekoppelt an Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde dann auf einem 2D-Gel aufgelöst.

Detergens nicht weiter verwendet.

5.1.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex ("Death-Inducing Signaling Complex", DISC)

5.1.2.1 Oligomerisierung von CD95 führt zur sofortigen Rezeptor-Aggregation

Die Induktion von Apoptose durch den CD95-Rezeptor benötigt die Kreuzvernetzung des Rezeptors (Dhein et al., 1992). Kreuzvernetzung von CD95 in HUT78 -Zellen durch den agonistischen IgG3 anti-APO-1 monoklonalen Antikörper (mAk) und IP mit Protein A-Sepharose resultierte in der Detektion von SDS-stabilen CD95-Aggregaten mit hohem Molekulargewicht (Abb. 5.3A, Bahn 2). Anschließend wurde das verbliebene, nicht kreuzvernetzte CD95 mit immobilisiertem anti-APO-1 immunpräzipitiert. Der CD95-Rezeptor lag dabei lediglich in der monomeren Form vor (Abb. 5.3A, Bahn 4). Die Aggregatbildung dagegen benötigt die Bindung von anti-APO-1, da unbehandelte Zellen nur monomeres CD95 besitzen (Abb. 5.3A, Bahn 3). Besonders signifikante Mengen am oligomeren CD95 wurden mit dem Detergens Brij-58 detektiert, doch wurde unter diesen Bedingungen CD95 nicht effizient solubilisiert (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in allen folgenden Experimenten der Triton X-100 als Detergens verwendet. Die Bildung von CD95-Oligomeren mit hohem Molekulargewicht war sehr schnell und geschah bereits 1 s nach Rezeptorkreuzvernetzung (Abb. 5.3B). In den K50-Zellen ließ sich eine CD95-Spezies von hohem Molekulargewicht von etwa 110 kDa erkennen, nachdem der Rezeptor kreuzvernetzt und mit Protein A-Sepharose immunpräzipitiert worden war (Abb. 5.3B, Bahnen 2 bis 5). In diesem Immunkomplex war kaum noch ein monomerer Rezeptor zu erkennen (Abb. 5.3).



Abb. 5.3: Kreuzvernetzen von CD95 resultiert in Rezeptor-Aggregation

A: CD95-Western-Blot mit einem biotinylierten anti-APO-1. HUT78-Zellen wurden ohne (-) und mit (+) anti-APO-1 für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden in einem Puffer mit 1% Brij-58 lysiert. CD95 wurde mit Protein A-Sepharose (Bahnen 1 und 2) immunpräzipitiert, gefolgt von kovalent-gekoppelten anti-APO-1 (Bahnen 3 und 4). Unter nicht denaturierenden Bedingungen erscheint der monomere CD95 in HUT78 manchmal als eine Doppelbande, wahrscheinlich wegen einer Inhomogenität in der N-Glykolisierung.

B: Anti-APO-1-IPs von ³⁵S-markierten K50-Zellen, die mit anti-APO-1 für unterschiedliche Zeiten stimuliert und dann in Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 lysiert wurden. Der stimulierte Rezeptor (kreuzvernetzte Rezeptor) wurde mit Protein A-Sepharose CL-4B immunpräzipitiert und duch SDS-PAGE analysiert.

Die Position des monomeren (CD95^m) und des aggregierten (CP95^a) CD95 auf den Gelen sind angegeben.

5.1.2.2 Assoziation von CAP1-4 an den oligomerisierten Rezeptor

Um Signalmoleküle zu identifizieren, die direkt mit dem oligomerisierten Rezeptor interagieren, wurden metabolisch markierte K50-Zellen vor der Lyse mit anti-APO-1 (Isotyp IgG3) inkubiert. Nach der Lyse ließ sich der kreuzvernetzte (stimulierte) Rezeptor mit Protein A-Sepharose immunpräzipitieren (Abb. 5.4B). Der monomere (nicht-stimulierte) Rezeptor wurde immunpräzipitiert, indem der Antikörper nach der Lyse dazugegeben wurde (Abb. 5.4A). Nur im stimulierten Fall traten die assoziierten Proteine auf. Sie wurden CAPs genannt (für "Cytotoxicity-dependent APO-1-associated Proteins"). Insgesamt vier CAPs ließen sich detektieren (CAP1, 27 kDa, pl 5.2; CAP2, 28 kDa, pl 5.15; CAP3, 27 kDa, pl 5.05 und CAP4, 55 kDa, pl 5.02; Abb. 5.4C). Diese Proteine wurden nicht in Immunpräzipitaten von nicht-stimulierten Zellen gefunden (Abb. 5.4A). Die Assoziation der CAPs erfolgte bereits 1 s nach anti-APO-1-Stimulation (Abb. 5.4D). Diese Kinetik korrelierte mit der Bildung der SDS-stabilen CD95-Spezies (Abb. 5.3B). Die Schnelligkeit dieser Reaktion deutet darauf hin, daß die Assoziation der



Abb. 5.4: Identifizierung der CAPs durch IP mit ani-APO-1-Ak

A: Metabolisch markierte K50-Zellen wurden in Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 lysiert und erst dann wurde anti-APO-1-Ak dazugegeben und immunpräzipitiert.

B: Metabolisch markierte K50-Zellen wurden 5 min bei 37 °C mit anti-APO-1-Ak stimuliert und dann lysiert.

CD95 wurde in beiden Fällen mit Protein A-Sepharose CL-4B immunpräzipitiert und auf einem 2D-Gel analysiert. CAP1-4 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

C: Schematische Darstellung der Migrationspositionen von CD95 und den CAPs.

D: Kinetik der Assoziation der kleinen CAPs. Anti-APO-1-IPs von ³⁵S-markierten K50-Zellen, die mit anti-APO-1 für eine angegebene Zeit stimuliert wurden. Protein A-Sepharose CL-4B wurde zur IP benutzt und das Immunpräzipitat wurde mit SDS-PAGE analysiert. Die Region mit den kleinen Molekulargewichten ist abgebildet, und die Migrationsposition der kleinen CAPs ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Bande bei 30 kDa repräsentiert eine Hintergrundbande.

CAPs den Anfang des CD95-Todessignals markiert. Daher wurden der aggregierte Rezeptor und die assoziierten CAPs als der "Tod-induzierende Signalkomplex" ("Death-Inducing Signaling Complex", DISC) bezeichnet.



Abb. 5.5: Die Assoziation der CAPs mit dem CD95 benötigt die Stimulation mit dem zytotoxischen anti-APO-Ak

A: Messung der Apoptosesensitivität nach der Nicoletti-Methode. K50-Zellen wurden in Medium (Bahn 1), mit 2 μg/ml anti-APO-1 (IgG2b) (Bahn 2), mit 2 μg/ml anti-APO-1 (IgG2b) + 10 μg/ml anti-Maus-IgG Fc-spezifisch (Bahn 3) oder mit 2 μg/ml anti-APO-1 (IgG3) (Bahn 4) für 20 h inkubiert. Die Experimente wurden in Tripletts durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung sind angegeben.

B-D: CD95-IP von 35-markierten Zellen. Metabolisch markierte K50-Zellen wurden in Trition X-100-Lysepuffer lysiert. Ein nicht-bindender IgG3-Kontroll-mAk FII23c wurde zugegeben (**B**) oder Zellen wurden zuerst mit IgG3 anti-APO-1 (**C**) oder IgG2b anti-APO-1 (**D**) inkubiert und dann lysiert. In allen Fällen wurde der Antikörper mit Protein A-Sepharose CL-4B immunpräzipitiert und das Immunpräzipitat wurde auf 2D-Gelen analysiert. Der Teil des Gels mit CD95 und den CAPs ist gezeigt. Die Migrationspositionen der CAPs sind gekennzeichnet.

Ob das Erscheinen der CAPs nur von der Kreuzvernetzung des Rezeptors durch den zytotoxischen anti-APO-1-mAk abhängt, wurde in einem Experiment untersucht, in dem nicht-zytotoxischer IgG2banti-APO-1-lsotyp verwendet wurde (Abb. 5.5). Konsistent mit früheren Ergebnissen (Dhein et al., 1992) tötete nur der IgG3-anti-APO-1-mAk K50-Zellen (Abb. 5.5A, Säule 4). Beide Isotypen IgG2b und IgG3 des anti-APO-1-mAk immunpräzipitierten gleiche Mengen an CD95 (Abb. 5.5C und D) im Gegensatz zum Kontrollantikörper FII23c mit dem Isotyp IgG3 (Abb. 5.5B). Jedoch koimmunpräzipitierte nur der IgG3-Isotyp von anti-APO-1 die CAPs (Abb. 5.5C). Dies deutet darauf hin, daß die Detektion dieser Proteine mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist. Die Wechselwirkung der CAPs ist spezifisch für CD95, denn es konnten keine Assoziationen mit anderen Rezeptoren, wie z. B. dem Transferrin-Rezeptor (Abb. 5.6B) oder dem MHC Klasse II in SKW6.4 oder K50, die mit anti-APO-1 stimuliert wurden, gefunden werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 5.6: Die CAP-CD95-Assoziation ist spezifisch

Metabolisch markierte SKW6.4-Zellen wurden mit anti-APO-1 (IgG3) für 5 min inkubiert, lysiert und nacheinander mit anti-IgG1-Agarose (**A**), mit anti-TfR-mAk (IgG1) an anti-IgG1-Agarose gekoppelt (**B**) und mit Protein A-Sepharose CL-4B (**C**) immunpräzipitiert. TfR ist mit einer gestrichelten Box, CD95 mit einer normalen Box und die CAPs mit offenen Pfeilen gekennzeichnet.

5.1.2.3 CAP-Assoziation benötigt eine funktionsfähige CD95-Todesdomäne

Die Notwendigkeit einer funktionsfähigen Todesdomäne von CD95 für die CAP-Assoziation wurde mit BL-60-Zellen, die mit einer deletierten Version des CD95-Rezeptors transfiziert wurden, überprüft. Dem Konstrukt fehlten die letzten 57 C-terminalen Aminosäuren (CD95∆). Diesem deletierten CD95 fehlte etwa ein Drittel der Todesdomäne. Solch ein Rezeptor war unfähig, ein Todessignal zu transduzieren (Itoh und Nagata, 1993). Trotz hoher CD95A-Expression (Abb. 5.7A) wurden die Transfektanten resistenter gegenüber Apoptose als die BL-60-Zellen, die nur geringe Mengen an endogenem CD95 exprimierten (vgl. Kap. 5.1.1.1). Dies deutet darauf hin, daß der deletierte Rezeptor als dominant-negative Mutante agiert (Abb. 5.7B). Transfektanten, die nur in etwa gleiche Mengen CD95∆ wie der endogene Rezeptor exprimierten, waren immer noch resistent (Daten nicht gezeigt). CAP1-4 assoziierten nicht mit CD95∆, wenn die Zellen mit IgG3 anti-APO-1 stimuliert wurden (Abb. 5.7D). Zusätzlich hatte Stefan Hellbardt (aus unserer Arbeitsgruppe) zytoplasmatische Teile von CD95 (CD95zT) rekombinant hergestellt, mit der Absicht herauszufinden, welche der Signalproteine an solche Konstrukte in vitro binden würden. Als Kontrollen erzeugte er auch zwei mutierte CD95zTs: Ein CD95zT mit einer 39 Aminosäure-langen C-terminalen Deletion und ein CD95zT mit einer Punktmutation, die der Mutation im CD95 der lpr^{9c} -Mäuse (Wanabe-Fukunaga et al., 1992) entsprach. Beide Mutanten sollten kein Todessignal mehr erzeugen können (Itoh und Nagata, 1993). Alle CD95zTs wurden mit einem 6-Histidin-Schwanz versehen und konnten somit direkt zur Präzipitation mit einer Ni²⁺-NTA-Agarosematrix eingesetzt werden. Die Präzipitationen zeigten, daß nur CAP1 und 2 an das Wildtyp-CD95zT binden konnten (Abb. 5.8C), sie aber nicht mit den mutierten CD95zTs assoziierten (Abb. 5.8C und D). Das Wildtyp-CD95zT mußte damit eine "quasi" aktive Struktur besitzen, denn unsere Daten zeigten, daß CAP1 und 2 in vivo nicht mit dem unstimulierten Rezeptor wechselwirken. Allerdings konnten CAP3 und 4 nicht mit dem CD95zT interagieren, da die Struktur der His-CD95zTs offensichtlich nicht für ihre Bindung ausreicht. Aus den Daten geht hervor, daß für die Assoziation von CAP1-4 eine funktionsfähige Todesdomäne notwendig ist.



Abb. 5.7: CAP1-4 assoziieren nicht mit dem verkürzten CD95, daß als dominant-negative Mutante wirkt.

C und D: CD95-IP von metabolisch markierten CD95 Δ -Zellen mit anti-APO-1 nach (unstimuliert, **C**) oder vor (stimuliert, **D**) der Lyse. Proteine wurden wie in Abb. 5.4 beschrieben analysiert. Schwarzer Pfeil: endogener Wildtyp-CD95; Box: CD95 Δ ; offener Pfeil: Migrationspositionen der CAPs. Mit dem F01-Ak (s. Abb. 5.13) konnte gezeigt werden, daß die CD95D-Zellen genausoviel CAP1 und 2 exprimieren wie die K50-Zellen (Daten nicht gezeigt).



Abb. 5.8: CAP1 und 2 binden an Wildtyp-CD95zT, aber nicht an mutiertes CD95zT

A: Gereinigte und mit Coomassie-gefärbte CD95zTs wurden mit 15 % SDS-PAGE analysiert (wt: Wildtyp-CD95zT; cg: CD95zT mit der lpr^{cg}-Mutation; ∆: CD95zT, dem die 39 C-terminalen As fehlen).

B: CAP1 und 2 assoziieren mit dem aggregierten CD95 in metabolischen markieren SKW6.4-Zellen.

C-E: Präzipitation von metabolisch markierten SKW6.4-Zellen nach Lyse mit 1 % NP-40 Lysepuffer mit rekombinatem CD95zT^{wt} (C) , CD95zT^{cg} (D) oder CD95zT^Δ (E) an Agarose gekoppelt. Die Bereiche mit den CAPs, die ein geringes Molekulargewicht haben, sind wiedergegeben. Die Positionen von CAP1 und 2 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

5.1.2.4 CAP-Proteine assoziieren selektiv nur mit aktiviertem CD95

Ob eine Stimulation für die Bindung der CAPs notwendig ist, konnte ermittelt werden, indem HUT78-Zellen mit anti-APO-1 stimuliert wurden und dann im Lysat hintereinander mit kovalent an Sepharosegekoppeltem anti-APO-1 und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert wurden (Abb. 5.9). Nur der kreuzvernetzte CD95 assoziierte mit den CAPs (Abb. 5.9B, rechte Seite). CAP4 verhielt sich genau wie die gezeigten CAP1-3. Der CD95-Rezeptor ist aufgrund geringer metabolischer Markierung in HUT78-Zellen nur schwach zu erkennen. Die Menge an immunpräzipierten CD95 war aber unter allen Bedingungen vergleichbar (Abb. 5.9, linke Seite, Pfeile). Da das metabolische Markieren von CD95 in HUT78-Zellen ineffizient war, wurde das Experiment mit den CD95-überexprimierenden K50-Zellen wiederholt (Abb. 5.9C und D). Das Ergebnis war identisch. Zusätzlich erhielt man in beiden Zellinien die Assoziation der CAPs (inklusive CAP4) auch nur mit dem stimulierten CD95-Rezeptor, wenn umgekehrt zuerst mit Protein A-Sepharose und dann mit kovalent an Sepharose-gekoppeltem anti-APO-1 in den Lysaten immunpräzipiert wurde (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Experimenten läßt sich schließen, daß kreuzvernetzte (oligomere) und monomere CD95-Rezeptoren gleichzeitig auf der Zelloberfläche zu finden sind.

Die frühen Ereignisse im CD95-Signalweg lassen sich wie folgt zusammenfassen: Der CD95-Rezeptor liegt auf der Zelloberfläche in einer inaktiven "monomeren" Form vor. Die Signalmoleküle befinden sich im Zytoplasma (Abb. 5.10A). Nach Stimulation, die mindestens zu einer Trimerisierung führen muß, werden nach sehr kurzer Zeit die CAP-Proteine an den Rezeptor rekrutiert und bilden den DISC. Momomere Rezeptoren auf den aktivierten Zellen liegen in ungebundener Form vor. Wenn der Rezeptor durch den IgG2b-anti-APO-1-Ak nur dimerisiert wird, so reicht das nicht aus, um ein



Abb. 5.9: Die CAPs assoziieren nur mit dem kreuzvernetzten CD95

Anti-APO-1-Immunpräzipitate von HUT78 (**A** und **B**) oder K50-Zellen (**C** und **D**) wurden 5 min mit anti-APO-1 inkubiert, lysiert, und mit kovalent gekoppeltem anti-APO-1 (**A** und **C**) gefolgt von Protein A-Sepharose CL-4B (**B** und **D**) immunpräzipitiert. Die Bereiche der Gele sind gezeigt, auf denen CD95 (linkes Bild) und CAP1-3 (rechtes Bild) zu sehen sind. Offene Pfeile: CAP1-3. Die Migrationspositionn von CD95 sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Position von der metabolisch markierten leichten Kette des IgG aus K50-Zellen ist mit einem kleinen, schwarzen Pfeil markiert. Das IgG bindet unspezifisch an die Sepharose und wird sehr nah an CAP1 im 2D-Gel aufgelöst.

Todessignal zu erzeugen. Entsprechend kommt es auch nicht zur DISC-Bildung (Abb. 5.10B). Ebenfalls gibt es keine DISC-Bildung, wenn der Rezeptor in der Todesdomäne (DD, " **D**eath **D**omain") deletiert ist und kein Signal mehr erzeugen kann (Abb. 5.10C).



Abb. 5.10: Die Rolle von CAP1-4 bei der CD95-vermittelten Apoptose.

A: CAP1-4 binden nur an den oligomerisierten CD95, aber nicht an den monomeren CD95.

B: Die durch den anti-APO-1-IgG2b-Ak induzierte Dimerisierung von CD95 führt nicht zur Assoziation von CAP1-4 oder zur Zytotoxizität.

C: CAP1-4 assoziieren nicht mit anti-APO-1-IgG3-stimuliertem CD95 in Zellen, die mit dem CD95 transfiziert wurden. Dem transfizierten CD95 fehlten die 35 C-terminalen Aminosäuren.

5.1.2.5 DISC-Bildung findet sich in allen untersuchten CD95-sensitiven Zellen

Daß die DISC-Bildung ein ubiguitärer Schritt im CD95-Signalweg ist, konnte durch das Testen von unterschiedlichen CD95-sensitiven Zellinien gezeigt werden. Der DISC wurde in T-Zell-Lymphomen wie HUT78 und H9, in B-Zell-Lymphomen wie SKW6.4, BJAB, Raji und K50 sowie im Interferon-γaktivierten Colonkarzinom HT29 und im Interferon-y-aktivierten Hepatom Hep G2 gefunden (Abb. 5.11). Interferon-γ wird für die Hochregulierung des CD95 in den beiden letzten Zellen benötigt (von Reyher, 1997). In allen Zellinien bestand der DISC aus CAP1-4, wohingegen die CAPs am unstimulierten Rezeptor fehlten (Daten nicht gezeigt). Der Maus-DISC in Fibroblasten ließ sich in einer murinen Fibroblastenzellinie L929 nachweisen. Es wurden mit humanem Rezeptor transfizierte L929-Zellen (430-Zellen) verwendet, da kein entsprechender muriner anti-APO-1-Ak verfügbar war. Diese Zellinie war sensitiv gegenüber anti-APO-1-vermittelter Apoptose, und es zeigte sich ein DISCähnliches Bild. CAP1-4-analoge Moleküle ließen sich nachweisen. Die assoziierten Moleküle CAP1 und 2 hatten einen basischeren pl als die humanen CAPs. CAP1 und 2 sind unterschiedlich phosphorylierte Formen desselben Moleküls (vgl. Kap. 5.1.3), und die Maus-CAP1 und 2 ließen sich durch spezifische IP identifizieren (Abb. 5.11, letztes Bild, eingerahmter Kasten und Abb. 5.13E und F). Murines CAP3 und 4 war ebenfalls zu erkennen Abb. 5.11, letztes Bild, Pfeil), jedoch wurden keine weiteren Kontrollen zur Charakterisierung durchgeführt. Ihre Größe und deren stimulationsabhängiges Auftreten waren die einzigen Kriterien zur Identifizierung.



Abb. 5.11: Die DISC-Bildung wurde in allen CD95-sensitven Zellen gefunden

Die Analyse des CD95-DISC von verschiedenen metabolisch markierten Zellen. Im oberen linken Bild sind die Migrationspositionen von CD95 und den CAPs angegeben. Im unteren rechten Bild ist der DISC einer mit humanem CD95-transfizierten Mauszellinie L929 gezeigt. Die CAPs haben deshalb ein etwas anderes Laufverhalten.

5.1.2.6 Untersuchung der Zellinie Boe^R

Die lymphoide prä-B-Zellinie Boe exprimierte vergleichbare Mengen an CD95 wie die untersuchten CD95-sensitiven Zellen. Jedoch war sie fast resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Daten nicht gezeigt). Wurde diese Zellinie für zwei Wochen in anti-APO-1 (1 µg/ml) kultiviert, so erhielt man eine vollständig resistente Zellinie (Abb. 5.12A). Diese Resistenz blieb bis zu 6 Wochen Zellkultur ohne anti-Apo-1-Zusatz bestehen (maximal getestete Zeitdauer). Die Expression von CD95 im vollständig



Abb. 5.12: Die resistente Zellinie Boe^R läßt sich mit Cycloheximid sensitivieren

A: Messung der Apoptosesensitivität nach der Nicoletti-Methode von Boe^R (o___o), Boe^R + 10 μg/ml Cycloheximid (CHX) (•___•) und der Vergleichszellinie SKW6.4 (◊___◊). Zellen wurden mit 2 μg/ml anti-APO-1 für 20 h inkubiert.

B: CD95-IP von ³⁵S-markierten Zellen. 28 h metabolisch markierte K50-Zellen wurden in Triton X-100-Lysepuffer lysiert. Acht Stunden vor der Lyse wurden kein (-) oder 10 μ g/ml CHX (+) ins Medium dazugegeben. Der unstimulierte (-) und stimulierte (+) CD95 wurde, wie in Abb. 5.4 beschrieben, immunpräzipitiert. CD95 ist als Box markiert. resistenten Phänotyp blieb unverändert hoch (Tabelle 5.1). Da die Resistenz nicht durch die Expression von CD95 geregelt wurde, mußte der Grund dafür intrazellulär zu finden sein. Schon im ersten Schritt des Signalweges der DISC-Bildung ließ sich ein Unterschied erkennen; CAP1-4 assoziierten nicht mit dem stimulierten Rezeptor (Abb. 5.12B). Interessanterweise konnten die Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) (Abb. 5.12A) oder dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D (Act D) (Daten nicht gezeigt) sensitiviert werden. Doch auch in den sensitivierten Zellen assoziierten die CAPs nicht mit CD95 (Abb. 5.12B). Die fehlende Assoziation von CAP1 und 2 ließ sich später auch mit einem mAk gegen CAP1 und 2 bestätigen (Daten nicht gezeigt). Auch konnte gezeigt werden, daß die Expression von CAP1, 2 und 4 in den Zellen mit der Expression in den CD95-sensitiven Zellen vergleichbar war. Dies wurde durch IP von CAP1 und 2 und Western-Blot von CAP1, 2 und 4 im Lysat von Boe^R-Zellen gezeigt. Zusätzlich ließen sich auch keine neuen assoziierten stimulationsunabhängigen oder stimulationsabhängigen Moleküle identifizieren. Der Grund für die Resistenz und der Signalweg in der sensitivierten Zellinie ist nicht geklärt und wird in der Diskussion (Kapitel 6.3) besprochen.

5.1.3 Identifizierung von CAP1 und 2 als FADD/Mort1

5.1.3.1 Charakterisierung von CAP1 und 2

FADD, bzw. Mort1 ist ein Molekül, das von zwei unterschiedlichen Gruppen fast zeitgleich kloniert wurde (Chinnaiyan et al., 1995; bzw. Boldin et al., 1995). Dieses Molekül bindet an den CD95-Rezeptor und wurde über das Two-Hybrid-System gefunden, mit CD95zT als Assoziationspartner (s. Kapitel 3.5.2). Im folgenden wird das Molekül der Einfachheit halber nur noch als FADD bezeichnet. Um zu testen, ob dieses Molekül im DISC enthalten war, wurde ein affinitätsgereinigter Kaninchenantikörper (F01) generiert. Hierzu wurde ein Peptid synthetisiert, das den Aminosäuren 130-148 von FADD einem Bereich in der Todesdomäne - entspricht und damit Kaninchen immunisiert. Der affinitätsgereinigte Antikörper erkannte spezifisch im Lysat von metabolisch markierten Zellen zwei Formen von FADD, die mit CAP1 und 2 komigrierten (Abb. 5.13A). Die Spezifität der IP konnte gezeigt werden, indem in Gegenwart des synthetisierten Peptids kompetitiv immunpräzipitiert wurde. Dabei wurden die beiden FADD-Formen nicht mehr erkannt (Abb. 5.13B). Zusätzlich ließen sich CAP1 und 2 mit dem anti-FADD Ak (F01) auch aus dem DISC reimmunpräzipitieren (Abb. 5.13C). Der generierte Antikörper war jedoch nicht sensitiv genug für einen Western-Blot. Mit Hilfe des mittlerweile kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-FADD-Antikörpers (Dianova, Hamburg) ließ sich die FADD-Assoziation an den Rezeptor nach Stimulation zeigen (Abb. 5.13D). Sowohl aus den IPs als auch aus dem Western-Blot ist ersichtich, daß FADD bereits im Zytoplasma in zwei Formen existiert. Da die beiden Formen sich jedoch nicht nach Stimulation ändern, bleibt die Funktion unklar (Daten nicht gezeigt).



Abb. 5.13: Charakterisierung von CAP1 und 2

A und B: IP von CAP1 und 2 mit dem F01-Ak in metabolisch markierten K50-Zellen ohne (**A**) und mit (**B**) dem Peptidantigen als kompetitiver Inhibitor (1:4 molares Verhältnis von Ak:Peptid). Immunpräzipitat wurde auf 2D-Gelen analysiert.

C: Reimmunpräzipitation des DISC aus K50-Zellen mit dem F01-Ak.

D: Western-Blot mit dem käuflichen anti-FADD-Ak (Dianova, Hamburg). Lysat von 10⁶ K50-Zellen (Bahn 1), CD95-IP (unstimuliert) von 10⁷ K50-Zellen (Bahn 2), DISC-IP (stimuliert) von 10⁷ K50-Zellen (Bahn 3).

E: DISC-IP aus der mit humanen CD95-transfizierten Maus-Zellinie L929. Zellen waren metabolisch markiert und Immunpräzipitat wurde auf 2D-Gelen analysiert.

F: IP von Maus-CAP1 und 2 aus der in E. erwähnten Zellinie.

CAP1 und 2 sind mit offenen Pfeilen markiert.

Stefan Hellbardt aus unserer Arbeitsgruppe konnte in *in vivo*-Phosphorylierungs- und *in vitro*-Kinaseexperimenten zeigen, daß CAP2 eine phosphorylierte Form von FADD darstellt (Kischkel et al., 1995; Carsten Scaffidi, persönliche Mitteilung). Die Phosphoaminosäureanalyse von CAP2 ergab eine ausschließliche Serinphosphorylierung (Kischkel et al., 1995). Ob es sich bei CAP1 um eine niedriger phosphorylierte Form von FADD oder um eine vollständig unphosphorylierte Form handelt, ist momentan noch unklar und wird von C. Scaffidi in seiner Doktorarbeit untersucht. In der Maus scheint CAP1 zumindest nicht phosphoryliert zu sein (Zhang und Winoto, 1996).

Das FADD in der Maus konnte durch IP ebenfalls gefunden werden. Hierfür wurden der anti-FADD Ak (F01) und die mit dem humanen CD95-transfizierte Zellinie L929 verwendet. Auch in dieser IP traten zwei zusätzliche Spots auf (Abb. 5.13F), die in der IP mit Kontrollantikörpern (Kaninchen-IgG) nicht auftraten (Daten nicht gezeigt). Diese zwei zusätzlichen Spots liefen in der gleichen Höhe wie das humane FADD, hatten aber einen basischeren pl. Sie komigrierten mit den Spots im Maus-DISC (Abb. 5.13E und Abb. 5.11, letztes Bild, eingerahmter Kasten) und wurden deshalb als die CAP1 und 2 in der Maus gedeutet. Auf eine Reimmunpräziptation (ReIP) von FADD im Maus-DISC wurde verzichtet. Daß der anti-FADD Ak (F01) das Maus-FADD überhaupt erkennen kann, liegt an der Sequenzähnlichkeit vom FADD in Mensch und Maus. Die Ähnlichkeit beträgt 67,0% über das gesamte Molekül und 68,4% über die Peptidsequenz (13 Aminosäuren von 19 sind identisch), gegen die F01 erzeugt wurde. Dies ließ sich später mit der publizierten FADD-Sequenz der Maus ermitteln (Zhang und Winoto, 1996 und Hsu et al., 1996). Auch zeigte sich, daß Maus-FADD einen basischeren pl (5,85) als das menschliche FADD (pl 5,50) besitzt, was mit dem basischeren Laufverhalten von Maus-FADD im 2D-Gel konsistent ist.

5.1.3.2 Erste Hinweise auf eine Kinase, die FADD phosphoryliert

Aufgrund der Tatsache, daß FADD phosphoryliert wird (s.Kapitel 5.1.3.1), muß eine Proteinkinase existieren. Als Ansatz, um diese Kinase zu identifizieren, wurde ein In-Gel-Kinase (IGK)-Test gewählt (Cahill et al., 1996). Bei diesem Experiment wird das Substrat in die Gelmatrix eines Polyacrylamid (PAA)-Gels einpolymerisiert. Nach der SDS-PAGE werden die Proteine renaturiert. Anschließend wird $[\gamma^{32}P]$ -ATP zu dem Gel gegeben. Nur renaturierte Kinasen, die sich selbst phosphorylieren, oder Kinasen, die das einpolymerisierte Protein als Substrat erkennen und phosphorylieren, werden in diesem Experiment erkannt. Zur Detektion einer FADD-phosphorylierenden Kinase wurde rekombinantes Histidin-FADD-Fusionsprotein als Substrat verwendet. Als Proben wurden GST- und Histidin-FADD-Fusionsproteine verwendet. Nur wenn das GST-FADD-Fusionsprotein vor der SDS-PAGE mit SKW6.4-Lysat für 1 h inkubiert wurde, d. h., eine mögliche Kinase mit GST-FADD präzipitiert wurde, erhielt man eine zusätzliche Bande von ca. 70 kDa (Abb. 5.14B, Bahn 4, Pfeil). Diese Bande erschien nicht in den Kontrollbahnen, die mit GST allein oder mit GST und 1h Vorinkubation mit SKW6.4-Lysat sowie mit GST-FADD allein geladen wurden (Abb. 5.14B, Bahn 1-3). Auch blieb diese Bande in einem Kontrollgel ohne His-FADD (Abb. 5.14A, Bahn 1-3) aus. Eine geringe Autophosphorylierung der FADD-phophorylierenden Kinase konnte beobachtet werden (Abb. 5.14A, Bahn 4). Die gleichen Ergebnisse wurden mit Histidin-FADD-Fusionsprotein als Probe erhalten (Daten nicht gezeigt).



Abb. 5.14: Identifizierung einer Kinase, die FADD phosphoryliert

Die Proben wurden in einem 9% igen *In-Gel-*Kinase-Experiment untersucht ohne kopolymerisierten Substrat (**A**) oder mit 40 µg/ml kopolymerisierten His-FADD (**B**). Es wurden rekombinantes GST (Bahn 1), GST-FADD-Fusionsprotein (Bahn 2), in SKW6.4-Lysat vorinkubiertes GST (Bahn 3) und in SKW6.4-Lysat vorinkubiertes GST-FADD-Fusionsprotein aufgetrennt. Der Bereich spezifischer Kinaseaktivität ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

5.1.4 FADD ermöglicht CAP3 und 4 die Assoziation an den Rezeptor

Überexpression von FADD induziert Apoptose (Chinnaiyan et al., 1995 und Boldin et al., 1995). Eine publizierte Deletionsmutante von FADD, NFD4 (nachfolgend als FADD-DN bezeichnet), konnte mit CD95 interagieren, aber nicht mehr Apoptose initiieren (Chinnaiyan et al., 1995) (Abb. 5.15A), was darauf hindeutet, daß FADD-DN einen dominant-negativen Effekt auf den CD95-Signalweg haben könnte. FADD-DN fehlen die ersten 80 N-terminalen Aminosäuren, aber es besitzt noch die Todesdomäne (DD), die für die Assoziation mit der homologen DD von CD95 notwendig ist (Chinnaiyan et al., 1995). Um die Effekte von der Deletionsmutante auf den DISC zu testen, wurden stabile Zellinien von der Arbeitsgruppe von Vishva Dixit (Universität von Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA) erzeugt (Chinnaiyan et al., 1996c). Die B Lymphom-Zellinie BJAB wurde hierzu mit dem Expressionsvektor pcDNA3 oder mit dem FADD-DN-Expressionskonstrukt transfiziert. FADD-DN enthielt zusätzlich noch ein AU-1-Peptid, um das Protein in den Zellen mit einem anti-AU-1-Ak nachweisen zu können (AU-1-FADD-DN). Die Expression von FADD-DN in einer Mischpopulation von selektierten Klonen (BJAB-sFADD-DN) zeigte eine vollständige Inhibition des CD95-induzierten Zelltodes (Abb. 5.15B). Die FADD-DN-exprimierenden BJAB-Zellen waren nicht vollkommen resistent gegenüber Apoptose, denn der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin und das Calciumionophor A23187 waren in der Lage, sowohl die FADD-DN als auch die Vektor-transfizierten Zellen gleich gut umzubringen (Daten nicht gezeigt). Die CD95-Oberflächenexpression war vergleichbar in beiden Zellinien, was durch Durchflußzytometrie ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Um die Möglichkeit einer klonalen Variation in den stabilen Zellinien auszuschließen, (das hätte der Grund für die beobachtete Resistenz sein können), wurde FADD-DN transient in BJAB- und Jurkat-Zellen überexprimiert (Chinnaiyan et al., 1995).

Die Vektor- und FADD-DN-transfizierten BJAB-Zellen wurden von uns auf DISC-Bildung untersucht. Der unstimulierte Rezeptor zeigte in beiden Zellinien, wie erwartet, keine CAP-Assoziation (Abb. 5.16A und C). Die DISC-Bildung an dem stimulierten CD95-Rezeptor in der Vektor-transfizierten BJAB-Zellinie konnte problemlos gezeigt werden und diente als Kontrollexperiment (Abb. 5.16B). Um AU1-FADD-DN auf dem Gel zu lokalisieren, wurde in BJAB-sFADD-DN mit einem anti-AU1-Ak immunpräzipitiert. So ließ sich zeigen, daß FADD-DN ebenfalls als Doppelspot im 2D-Gel migrierte (Abb. 5.16E). Gleiche Resultate wurden durch IP mit anti-FADD Ak (F01) erzielt (Daten nicht gezeigt). In den BJAB-sFADD-DN ließ sich nun eine Assoziation von FADD-DN an den stimulierten CD95-Rezeptor zeigen, jedoch fehlten endogenes FADD, CAP3 und CAP4 (Abb. 5.16D). Ähnliche Ergebnisse wurden mit MCF7-Zellen, transfiziert mit FADD-DN, erhalten (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Resultaten läßt sich schließen, daß der N-Terminus von FADD, welcher bei FADD-DN fehlt, für die Rekrutierung und Assoziation von CAP3 und 4 verantwortlich ist.



Abb. 5.15 FADD transduziert das CD95-Signal

A: Schematische Darstellung von FADD und FADD-DN (NFD-4). Die As für bestimmt Bereiche sind angegeben. Die DED ist in dunkelblau, die DED ist in rot gezeichnet.

B: Messung der Apoptosesensitivität nach der Nicoletti-Methode von BJAB-Zellklonen transfiziert mit Kontrollvektor (•____•) und mit FADD-DN (sFADD-DN ist eine Mischpopulation von selektierten hoch exprimierenden Klonen (•---•). Zellen wurden mit der angegebenen Menge an anti-APO-1 für 20 h inkubiert.



Abb. 5.16: FADD-DN verhindert die Assoziation von CAP3 und 4 mit CD95 (Fortsetzung Abb 5.16)

A-D: BJAB-Zellen transfiziert mit dem Kontrollvektor (BJAB-Vektor) (**A** und **B**) und BJAB-sFADD-DN-Zellen (**C** und **D**) wurden metabolisch markiert, lysiert, mit anti-APO-1/Protein A-Sepharose CL-4B immunpräzipitiert und anschließend das Immunpräzipitat auf 2D-Gelen analysiert. CAP1-4 sind nicht in den unstimulierten (**A**), aber in den stimulierten (**B**) BJAB-Vektor-Zellen mit CD95 assoziiert. CAPs sind mit weißen Pfeilen markiert. In den unstimulierten BJAB-sFADD-DN (**C**) sind ebenfalls keine CAPs assoziiert. In den stimulierten BJAB-sFADD-DN (**C**) sind ebenfalls keine CAPs assoziiert. In den stimulierten BJAB-sFADD-DN (**D**) ist lediglich FADD-DN mit dem Rezeptor assoziiert (FADD-DN ist mit schwarzen Pfeile gekennzeichnet).

E: IP mit anti-AU-1-Ak im Lysat von metabolisch markierten BJAB-sFADD-DN. Immunpräzipitat wurde auf 2D-Gelen aufgetrennt und analysiert.

F: Schematische Darstellung der Migrationspositionen von CD95, CAP1-4 und FADD-DN.

Aus diesen Untersuchungen ergeben sich zwei wichtige Schlußfolgerungen: 1. CAP3 und 4 benötigen den N-Terminus von FADD zur Bindung und 2. CAP3 und 4 sind wahrscheinlich Apoptose-Effektormoleküle, die das Todessignal weiter in die Zelle leiten. Aus der Tatsache, daß diese Effektormoleküle an den N-Terminus von FADD banden, ergab sich, daß FADD selber wahrscheinlich keine zytotoxische Wirkung hat, vielmehr als Adapter fungiert und den Rezeptor an die Effektormoleküle CAP3 und 4 koppelt (Abb. 5.17).



Abb. 5.17: Der Mechanismus der dominant-negativen Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose durch FADD-DN

5.1.5 Identifizierung von CAP4 als Caspase-8 (FLICE/MACH/Mch5)

5.1.5.1 Identifizierung von CAP4

Zur Identifizierung von CAP4 wurde die Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (Nano-ES-MS/MS) verwendet (Mann und Wilm, 1995; Wilm und Mann, 1996). Sie ermöglicht, Peptidsequenzen aus Proteinen zu erhalten, die aus SDS-PAA-Gelen isoliert wurden. Die Sequenzierung geschah in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Matthias Mann (EMBL, Heidelberg). Die Gruppe um M. Mann hatte kurz zuvor die erste Klonierung eines unbekannten Testproteins mit dieser Technik publiziert (Wilm et al., 1996). Dies bedeutet, daß der Versuch zur Detektion des DISC in großem Ansatz gefahren und die Proteine mit Silber angefärbt werden mußten (Abb. 5.18). Der CAP4-Spot enthielt ca. 0,5 pmol Protein. Daraus wurden komplette Sequenzen von 5 Peptiden bestimmt, die insgesamt 41 Aminosäurereste umfaßten (Abb. 5.18). Zusätzlich konnten noch zwei Peptide, von denen Teilinformationen zur Verfügung standen, zur Proteinsuche verwendet werden (Abb. 5.19A). Homologiesuche in einer nicht redundanten Datenbank (NRDB, von C. Sander, European Molecular Biology Laboratory) zeigte keine Übereinstimmung zu bekannten Proteinen. Jedoch konnte in der cDNA-Datenbank der Firma Human Genome Sciences eine 3,0 kb cDNA identifiziert werden, die ein offenes Leseraster von 1437 bp besaß und ein neues Protein mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 55,3 kDa und pl von 4,91 kodierte (Abb. 5.19A). Die Größe und der isoelektrische Punkt dieses neuen Proteins entsprach den Daten von CAP4, die über 2D Gel-Analyse ermittelt wurden. Das vermutete Initiator-Methionin (AAGATGG) stimmte mit der Konsensus Kozaks

Sequenz für die Initiation der Translation überein. Eine BLAST-Suche in der Protein-Datenbank GenBank zeigte, daß es sich um eine neue cDNA handelt, die Homologie sowohl zu FADD als auch zu Caspasen hat. Deshalb wurde sie von uns FLICE (FADD-ähnliches ICE, bzw. "FADD-like ICE") genannt (Muzio et al., 1996). Exakt dasselbe Molekül wurde zeitgleich von einer anderen Gruppe publiziert und als MACH bezeichnet (Boldin et al., 1996). Eine dritte Gruppe klonierte eine Isoform des Moleküls und nannte es Mch5 (Fernandes-Alnemri et al., 1996).



Abb. 5.18: Nano-ES-MS/MS Sequenzierung von CAP4

A: Präparation eines Silber-gefärbten 2D-Gels von immunpräzipitiertem DISC aus K50-Zellen.

Autoradiographie einer DISC-IP von metabolisch markierten K50-Zellen. CD95 wurde durch eine gestrichelte Box und CAP mit einem rotem Pfeil markiert.

B: Teil des Massenspektrums von dem Peptid-Mix, das aus dem CAP4-Spot und anschließendem *In-Gel*-Verdau (Fortsetzung Abb 5.18)

mit Trypsin. Die Peaks der tryptischen Peptide (T1-T7) wurden mit Nano-ES-MS/MS sequenziert. Die meisten

nicht gekennzeichneten Peaks sind Produkte, die durch Trypsinautolyse entstanden sind.

Sequenzierung des in Abb. 5.18C gezeigten Peptids Nr. 4 (m/z = 626.5) mit Tandemmassenspektrometrie. Die Fragmentierung des tryptischen Peptids an seinen Amidbindungen erzeugt hauptsächlich Ionen, die den C-Terminus des Peptids besitzen (bezeichnet als Y"1, Y"2, usw.; Roepstorff und Fohlman, 1984). Die Hälfte des tryptischen Verdaus wurde in diesem Experiment verwendet.

C: Die sequenzierten Peptide; aufgrund der Sequenziermethode ließen sich die As Isoleucin und Leucin nicht unterscheiden, da sie beide das gleiche Molekulargewicht haben. Für die Peptide T6 und T7 wurden "peptide sequence tags" erhalten (Mann und Wilm, 1994), die eindeutig die entsprechenden Peptide VFFIQACQGDNYQK und GIPVETDSEEQPYLEMKLSSPQTR in der Caspase-8-Sequenz identifizieren konnten.



Abb. 5.19: Sequenzanalyse von Caspase-8

A: Abgeleitete Aminosäuresquenz aus dem Caspase-8-Genprodukt. Die durch Nano-ES-MS/MS erhaltenden Sequenzen (T1-T7) sind fett gedruckt. Peptid T5 wurde in der Sequenz des Peptids T1 gefunden. Die Peptide T6 und T7 (unterstrichende As) waren "peptide sequence tags".

B: Schematisches Modell des Caspase-8-Proteins. Der N-terminale Teil von Caspase-8 (Prodomäne) enthält zwei Domänen, die hohe Ähnlichkeit zur N-terminalen DED von FADD besitzen. Der C-Terminus von Caspase-8 identifiziert das Molekül als neues Mitglied der Caspasen. Zum Vergleich sind Caspase-3, FADD und FADD-DN ebenfalls dargestellt. Die DEDs sind in blau, die DDs in rot, die große Untereinheit in rosa und die kleine Untereinheit der Caspasen in pink gekennzeichnet.

Später stellte sich mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern heraus, daß zwei Isoformen (FLICE/MACHa1 und MACHa2) bevorzugt in Zellen exprimiert werden und beide Isoformen

Bestandteil des CD95-DISC sind (Scaffidi et al., 1997). Nach neuer Nomenklatur (Alnemri et al., 1996) wird dieses Protein Caspase-8 und die Isoformen werden Caspase-8/a (FLICE/MACHα1) und Caspase-8/b (MACHα2) genannt. Der Unterschied zwischen den beiden Isoformen liegt lediglich in einer 15 As langen Deletion im Bereich zwischen den DEDs und der Proteasedomäne (Abb. 6.2). Das heißt, beide Isoformen erzeugen die gleiche aktive Protease. Außerdem konnte bis jetzt kein Unterschied in der Aktivierung und Funktion der Isoformen gefunden werden, so daß im nachfolgenden Text die Protease als Caspase-8 bezeichnet wird. Nur wenn explizit auf die spezielle Isoform von CAP4 hingewiesen werden soll, wird von Caspase-8/a gesprochen.

5.1.5.2 Die verschiedenen CAP4-Spots repräsentieren Caspase-8/a

Caspase-8 existiert in mehreren Isoformen, die vermutlich verschiedene Spleißvarianten repräsentieren. Diese wurden als MACHα2-4/MACHβ1-3 (Boldin et al., 1996) und Mch5 (Fernandes-Alnemri et al., 1996) bezeichnet. Zusätzlich wurde eine Caspase-8-ähnliche Protease, die Caspase-10, (Mch4/FLICE2) gefunden, die von einem anderen Gen stammt (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Vincenz und Dixit, 1997). Da CAP4 mindestens als Triplett-Spot in allen soweit getesteten Zellinien auftritt, wurde ermittelt, ob alle CAP4-Spots Caspase-8/a oder verschiedene Isoformen von Caspase-8 repräsentieren. Der CAP4-Spot, der zur Sequenzierung mit Hilfe der Nano-ES-MS/MS benutzt wurde (Muzio et al., 1996), war der prominenteste (Abb. 5.20D, Spot 1). Um auszuschließen, daß der andere CAP4-Spot Abb. 5.20D, Spot 2) ein anderes Caspase-8-ähnliches Molekül wie Caspase-10 darstellt, die lediglich mit Caspase-8 an ähnlicher Stelle komigriert, wurden beide Spots mit der MALDI-Massenspektrometrie analysiert (Abb. 5.20A und B). Im Spektrum A stimmten neun Peptide mit der Caspase-8-Sequenz überein. Die Massengenauigkeit war besser als 0,1 Da und deckte einen Bereich von 22% der Caspase-8-Sequenz ab. Dieselben Peptide wurden im Spektrum von Spot 2 gefunden (Abb. 5.20B). Dies zeigt, daß die beiden Spots vom gleichen Gen abstammen. Zur Kontrolle wurden jeweils noch drei Peptide mit Nano-ES-MS/MS sequenziert.

Zusätzlich wurde die *in vitro*-translatierte ³⁵S-markierte Caspase-8/a mit dem DISC-assoziierten CAP4 (Abb. 5.20C und D) verglichen. Das *in vitro*-markierte Protein (Abb. 5.20C) lief als Triplett-Spot exakt in derselben Position wie das DISC-gebundene CAP4 (Abb. 5.20D). Die Inhomogenität im CAP4-Spot muß daher entweder von der post-transkriptionale Modifikation oder von verschiedenen strukturellen Konformationen von Caspase-8/a während der IEF herrühren. Damit ließ sich zeigen, daß alle CAP4-Spots ein und dasselbe Protein darstellen, nämlich Caspase-8/a.



Abb. 5.20: Die verschiedenen CAP4-Spots repräsentieren Caspase-8/a

A und B: Vergleich der MALDI Peptidspektren von CAP4 (Spot 1, **A**) und CAP4 (Spot 2, **B**). Silber-gefärbte Mengen an CAP4 wurden, wie in Abb. 5.18 beschrieben, präpariert.

C und D: *In vitro*-translatierte 35S-markierte Caspase-8 (**C**) und *in vivo*-35S-markierte CD95koimmunpräzipitierte CAP4-Formen (**D**) analysiert auf 2D-Gelen. Lediglich der Teil des Gels, der die CAP4-Spots zeigt, ist dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen auf die drei verschiedenen Spots, welche in beiden Gelen an den identischen Positionen laufen.

5.1.5.3 Caspase-8 hat Homologie zur DED von FADD

Die Assoziation von CD95 mit FADD wird durch deren C-terminale DD (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995) ermöglicht. Die Deletionsmutante FADD-DN besitzt die DD, jedoch nicht den N-Terminus. Wie in Kapitel 5.1.4 gezeigt, verhält sich diese Mutante als dominant-negativer Regulator der CD95induzierten Apoptose. Im Gegensatz dazu sind die N-terminalen 117 Aminosäuren von FADD in der Apoptose auszulösen. Aus diesem Grund wurde dieser Teil von FADD Lage, als Todeseffektordomäne (DED, "Death Effector Domain ") bezeichnet (Chinnaiyan et al., 1995). Interessanterweise besitzt Caspase-8 zwei Bereiche am N-Terminus von jeweils 60 Aminosäuren Länge, die ähnlich der DED von FADD sind (Abb. 5.19B und Abb. 5.21A). Eine BLAST-Suche ergab, daß die Bereiche 7-75 und 101-169 von Caspase-8 der DED von FADD (Reste 4-76) ähnlich sind. Die Identität mit DED von FADD beträgt 39% (55% Ähnlichkeit) für die erste DED und 28% (55% Ähnlichkeit) für die zweite DED (vom N-Terminus ausgehend). Ein anderes Protein mit Namen PEA-15 wurde ebenfalls als Protein mit einer DED durch BLAST-Suche identifiziert. PEA-15 ist ein astrozytisches Phosphoprotein mit unbekannter Funktion (H. Cheneiweiss, unpublizierte Daten; GenBank Zugangsnummer S55384). Mittlerweile sind andere Proteine mit DED-Domänen gefunden worden, die in Kapitel 6.3 besprochen werden.

5.1.5.4 Caspase-8 ist ein neues Mitglied der Caspasenfamilie

Während der N-Terminus von Caspase-8 FADD Homologiedomänen besitzt, zeigt der Rest des Proteins hohe Ähnlichkeit mit den Caspasen, insbesonders in der Region, die zum aktiven Zentrum von Caspase-1 gehört (Abb. 5.21B). Die phylogenetische Analyse der Familienmitglieder zeigt, daß Caspase-8 ein Familienmitglied der CED-3-Unterfamilie ist (Abb. 3.3A). Ebenso wie CED-3 von C. elegans besitzt Caspase-8 eine lange N-terminale Prodomäne. Jedoch zeigt in diesem Fall die Prodomäne Ähnlichkeit mit der DED von FADD.

Aus der Röntgen-Kristallstrukturanalyse von Caspase-1 (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994) läßt sich schließen, daß die Aminosäuren (As) His-237, Gly-238 und Cys-285 von Caspase-1 an der Katalyse direkt beteiligt sind, während die Reste Arg-179, Gln-283 und Arg-341 eine Bindungstasche für die Carboxylat-Seitenkette der P1-Aspartatsäure bilden. Diese sechs As sind in allen Caspasen konserviert, die soweit kloniert wurden. Auch Caspase-8 besitzt diese As. Die Reste jedoch, die die P2-P4-Bindungstasche formen, sind unter den Familienmitgliedern nicht stark konserviert. Das könnte die unterschiedlichen Substratspezifitäten erklären. Interessanterweise besitzt Caspase-8 ein neuartiges Pentapeptid, QACQG, anstelle von QACRG, welches von den meisten Caspasen geteilt wird (Abb. 5.21B), mit der Ausnahme von Caspase-9, welche ein QACGG-Pentapeptid besitzt (Duan et al., 1996b). In der Zwischenzeit wurde eine weitere Caspase mit diesem Pentapeptid kloniert (Caspase-10) (Abb. 5.21B).

In der gemeinsamen Veröffentlichung mit der Arbeitsgruppe von V. Dixit konnte zusätzlich gezeigt werden, daß Caspase-8 mit FADD assoziiert (FADD benötigt die DED hierzu) und *in vitro* durch Granzym B aktiviert werden kann (Muzio et al., 1996). Bei der Aktivierung entstehen die vorhergesagten Peptide p10, p18 (Untereinheiten des aktiven Enzyms) und p26 (die Prodomäne).

Diese so aktivierte Caspase-8 konnte dann ein typisches Substrat der Caspase-3 Protease, die Poly-(ADP-ribose) Polymerase (PARP), spalten.

A	L .																								
		M D F M D - I S A M V F	FL FSAYR ZYG	VLI RNI VMI TLF	H S Y D Y Q Q D	V S S I G H I S I L T I	SSI QI EVNNI	SS DS SR	S E E D S E E D	L T L A L R L E	E L S L S F Q L	K F K F K F	L C L S L I A C	L G L D Q E K E	R V Y I D I	G K P Q S K P S	R K R K C K E K	FAI Cas Cas PE	DD (1 spase spase A-15	-35) -8 (1- -8 (10 (1-35)	-34) 01-13	2)			
		L E F Q E F L D I S E F	RVQ PIK DDM SIT	SGI DAI NLI TGS	D L M L D I A W	FSN FQ1 FI1 FSN	MLL RLÇ EME FLE	E Q E K K R S H	N RM VI NK	L E L G L D	PG ES KD	H T N L K L N L	E L S F D I S I	L R L K L K I E	E L E L R V H I	L F F	RΙ	FAI Cas Cas PE	DD (3 spase spase A-15	6-67) -8 (34 -8 (13 (36-6)	4-66) 33-18 7)	4)			
B)																								
177 136 163 45 234 241 183 161	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	I C I C I N I N F N F N V N V S I N	N T H N T H N E H N K N N K M H E H N H S N V H N V H	K F - E F - E F - N F D N F H R F F N F A S F T H F C	 K V K S W H K A G E R E	 T - L - R E - K E S -		 P K 	- D - D - D L H L H	H L S I G M G M T L S I S L - L G L	P A P H G V T S F H R I E H R T		N G T G S G R R N G S G S G T G	A H A D A E T D T C T H G D S N	Y D F D V D K D V D A D L D K D V D I D	I V I T A E A A R C H S C E	7 G N 7 G N 7 G N 1 A N 2 A I 3 N I 4 N I 5 A I 6 T I 7 T I 8 T I 9 K I	4 K 4 T 1 F . R . T . S . V . R	R L E L K C E T R R I T H V I R R	L Q L E Q R R R F F S E F F F F F F F	G L G L N L N L L L S L S L	G D G K G H G G H	Y T Y S F D Y E F E F T Y D F M	V V D V D V V D V V I V V R N V R N V K C I K P V H I V H V V E V	CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9
217 176 203 111 88 284 284 281 226 204	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	A R A R C A S C A R E A E V E K V C A Q A K	D M E D M E D M J E I V E I V E I V E I V K M V	S V S A C T E D L C E L K C M V C M V C M V C M V C A X Z A X X Z A X X X X X X X X X X X X X X X X X X X	L R L E L K M R I H L Q L Q L L	A F A F K A D V E V I Y K Q N F E L	A A A T A H S - S - S - Q - K C A Q A -	R P R P E E K E K T V L P Q	E H H H H H H H H A H H A H H H	K S K T T N S K A D S N A D R V G A	S I S I A A R 3 A I G I T I L I		T F T F F A F V F I F V C I C V	L V L V C I C V C V C C F C V A V V	L M L M F M L L L L I L I L L L L	SH SH SH SH SH SH SH SH SH SH SH		L L R E E E G C K R F Z Q	E G E G A S	I - I - H L	- C - C 	G G G	T A T V K K N V G I G A G A G A	H K K H D E H S E I Y G I F G I Y A I Y G V Y S I Y G V Y G	CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9
265 224 251 153 130 326 324 269 253	K K P D V K K P P D V Q V P D I K D G V - T N G P - Y D A K - T D G C F S D E A I V D G K I T D G C F	I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I V S	Y D Y Y D Y I N 7 I K I L K H I Q 1 I Y H I R H I Q H V E H	I I F I I F I I T I T I T I T I T I T I T I T I T I	Q I M M A H G L S Q S H S L N I	F N F N F R F R F K F T F D F N	N R N R G D G D G D G L A L N A G T	N C N C R C C C C C N C C C C	LSS PST RSS P P S P S	L K L K L L L T L A L Q L G	D H D H E H G H H G H H H G H H H G H	X P X P X P X P X P X P X P X P X P X P	K V K V K L K L K I K V K L K M K L	н н н н ғ н н н ғ ғ ғ ғ ғ ғ	V V V V V V V V V V V V V V V V V V V	A 0 A 0 A 0 A 0 A 0 A 0 A 0 A 0 A 0 A 0			K H N R S P C - C - C - C - C - C - C - C - C - C -	G E G V D V Q K D R D R D H	L W L W V W P V G I S V G F	I V I V I F 7 I - 7 7 D	R D R D K D P L Q Q V A	S P A S V G - - L 0 V V V V V S I E O G K S I S N S T	CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9
315 274 301 192 169 179 373 371 319 303	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	S S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	QSS QSS PTT SGE SGV DTN QAE SNE	S E N S E N T D D N I T N T S T S D S S D	L E F E D T D M E V L S L Q A G D A	A - E - D A A C D A S P D S K - T P		 E G		 T F		 E K 2 L	D S D A D A N P H - A S Q T L P D A	V C V Y I K R Y V Y R Y K M I S	K I K T K A K I T L - I - I R L S L	H E H I P V P I P I P I P I P I		X D X D X D A D A D A D A D A D A D A D A D A D A D A D A D A D A D B D	F I F I F L F L F L F L	A F A F F A Y A C C C V S	C S C S Y S Y S Y S M A L A Y A Y A		T P T P V P A P A E V N V P L K F P	H N V H N V G Y Y G Y Y G Y Y N C V G Y V G T A G F V	CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9
353 312 339 231 205 218 411 405 359 353	S W R D F S W R D F S W R N F S W R N F S W R N F S Y R N F S Y R N T S W R N T S W R N T S W R N T	R T R G T M O G R O G R O K D O K N O A E O K S K S K	G S I G S I G S V G S V G S V G S V G S V G S V	I F I I F I 7 F I 7 F V 7 F V 7 F I 7 Y I 7 Y I 7 Y I 7 Y V	T E T Q Q A Q S Q D Q S Q S E A E T	L I L I L C L C L C L W L W L A L A L D	T C E H S I A M E M Q S N H Q V D I	F Q F Q E L C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	K Y E Y E H Q Y K Y E R K L E R Q W	S C S W A C G K A D G S C P V P A C A H	C 0 C 0 S 0 K 1 S 1 R 0 R 1 R 0 R 1 S		 - I - F D I D I - V D L	 M Q M H T E L T L S A D Q S	- L - L I L I L I L I L M L L L	M E E E T F T F T L T P V K L F	I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I I <tr< td=""><td>R R R R R R R R R R R R R R R R R R R</td><td>K V K V R V K V K V E V D V L I A V</td><td>Q K Q Q R F A R A T S Q S N S R K D S V</td><td>SF SF HF RF KC RV R - KC</td><td></td><td>V P P P Q P P Q F F K Q F F K Q Y -</td><td>Q A K R A K D G R S D D C K D C K D N M G G T K A P G </td><td>CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9</td></tr<>	R R R R R R R R R R R R R R R R R R R	K V K V R V K V K V E V D V L I A V	Q K Q Q R F A R A T S Q S N S R K D S V	SF SF HF RF KC RV R - KC		V P P P Q P P Q F F K Q F F K Q Y -	Q A K R A K D G R S D D C K D C K D N M G G T K A P G 	CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9
398 357 384 280 254 267 461 455 407 398	A Q M P T A Q M P T P H F H E A T F H F P S A T F H A F S Q M P Q K Q M P Q K Q M P Q T E F H F	I E I E K K K K C P T C P A C K - K	R A T R L S R V T Q I H Q I H C V H F T I F T I F T I		 VSS KLL FN	- L - M - L M L M L V F V F V F T L F	T R T R T K T K T K P - V C R K	D F Y F E L K L P L H L K	Y L Y L Y F F H F Y L F F	F P F P S - Y - F P - D F P - 1	G	- N - N K S A L H P K T	Q. H. S. D S. I P. T.												CASP5 CASP4 CASP1 CASP7 CASP3 CASP6 CASP8 CASP10 CASP2 CASP9

Abb. 5.21: Caspase-8 besitzt Homologie zu FADD und den Caspasen

A: Zwei Domänen des N-terminalen Teils von Caspase-8 (As 1-34 und 101-132) wurden mit dem N-Terminus von FADD und PEA-15 verglichen. Schwarze Boxen zeigen identischen Aminosäuren.

B: Der C-terminale Bereich von Caspase-8 wurde mit den anderen bekannten humanen Caspasen verglichen. Das "Alignment" wurde mit der Clustal Methode der DNASTAR Software (PAM=250, "gap penalty" = 10, "gap length (Fortsetzung Abb. 5.21)

penalty" = 10) durchgeführt. Die Caspasen wurden mit CASP abgekürzt. Schwarze Boxen sind identische As; das konservierte Pentapeptid-Motiv ist grau eingekreist. Konservierte As, die an der Katalyse beteidigt sind basierend auf der Kristallstruktur von Caspase-1, wurden mit Kreisen (J)gekennzeichnet; Dreiecke (H)zeigen die

As, die die Bindungstasche für das Carboxylat des P1-Aspartats formen; die Vierecke (B) repräsentieren die Reste, die den P2-P4 Aminosäuren am nächsten sind.

5.1.5.5 Chromosomale Lokalisierung von Caspase-8 in Mensch und Maus durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die chromosomale Lokalisierung der Caspase-8 beim Menschen und der Maus war eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Peter Lichter (DKFZ, Heidelberg) und Petra Kioschis aus der Arbeitsgruppe von Annemarie Poustka (DKFZ, Heidelberg). Dabei wurden die genomischen Klone in Zusammenarbeit mit P. Kioschis isoliert, während die chromosomale Lokalisierung von Sandra Weitz aus der Arbeitsgruppe von P. Lichter durchgeführt wurde.

Für die chromosomale Lokalisierung der Caspase-8 beim Menschen wurden genomische Klone aus einer menschlichen PAC-Bank isoliert, die aus der DNA einer männlichen, menschlichen Fibroblasten-Zellinie hergestellt wurde (Ioannou et al., 1994). Zwei überlappende PAC-Klone (LLNLP704A24229; LLNLP704H11233) wurden durch Hybridisierung mit Hochleistungsfiltern (Lehrach et al., 1990) identifiziert, analysiert durch Restriktionsverdauung mit *Eco*RI und nochmals mit der Caspase-8 cDNA (GenBank Zugangsnummer U58143) überprüft. Zwei Banden wurden erhalten, und die Gesamtgröße der Fragmente entspricht ungefähr 19 kb (Daten nicht gezeigt).

Parallel wurden eine embryonische Maus-cDNA-Bank (DNA-Verdau von C57/Black 6 Maus-DNA legiert in pAd10SacBII) und eine Maus-Cosmid-Bank (Mbol-partieller DNA-Verdau von 129/O1a Milzzellen kloniert in lawrist 7) (Lehrach et al., 1990) bei niedrigerer Stringenz mit der menschlichen Caspase-8 cDNA durchsucht, um das Homolog der Maus zu isolieren. Dies führte zur Isolierung von drei Maus-Cosmid-Klonen (MPMGc 121:H23227, A1958 und L15272), zwei P1-Klonen (1CRFP703: L2173 und N2173) und zwei cDNA-Klonen (mem1 und mem8). Cosmid-Klone wurden mit EcoR1 verdaut und Southern-Blots wurden mit den Caspase-8-cDNA-Sonden des Menschen und der Maus durchgeführt. Mit diesen cDNA-Sonden wurden die gleichen Bande von ungefähr 20 kb beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der kleinere cDNA-Klon mem1 enthielt eine 959 bp große cDNA und wurde vollkommen sequenziert. Er überlappte mit der Teilsequenz, die vom cDNA-Klon mem8 erhalten wurde. Die Analyse und die Zusammensetzung der Sequenzen endete in einer übereinstimmenden Sequenz von 1266 bp (flicem1, EMBL Zugangsnummer AJOOO641). Die Datenbanksuche ergab, daß die Maus-Caspase-8-Consensus-Sequenz mit zwei Maus-ESTs übereinstimmt (Aa071802, Aa175850). Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuren der partiellen Maus-Caspase-8 cDNA (flicem1) mit der humanen Caspase-8 cDNA wiesen 75,8% Homologie auf (64,4% Identität) (Abb. 5.22A). Dagegen beträgt die Homologie zwischen der beschriebenen humanen Caspase-10-Sequenz und flicem1 nur ungefähr 55,6% (38,2% Identität) (Daten nicht gezeigt) und belegt somit , daß die isolierte cDNA das Maus-Homolog zur Caspase-8 ist. Die Northern-Blot-Analyse des Caspase-8-Gens in der Maus zeigt Expression in Herz, Milz, Lunge, Leber und Nieren, während Maus-Caspase-8-Transkripte in Testis, Skelettmuskulatur und Gehirn kaum zu erkennen sind (Abb. 5.22B). Die Gewebeverteilung entspricht der des Menschen (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Die Transkriptgröße beträgt ca. 2,2 kb, damit ist sie kleiner als die Größe der humanen Caspase-8-Transkripte.



Abb. 5.22: Maus-Caspase-8-Teilsequenz und Gewebeverteilung

A: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Caspase-8 von Mensch und Maus (entsprechende GenBank Zugangsnummern: U58143 und AJ000641). Das Alignment wurde mit der Clustal Methode der DNASTAR Software (PAM=250, "gap penalty" = 10, "gap length penalty" = 10) durchgeführt. "Mensch" ist die humane Caspase-8/a und "Maus" ist die murine Teilsequenz (flicem1). Identische As sind mit schwarzen Boxen, funktional konservierte As sind mit offenen Boxen gekennzeichnet.

B: Northern-Blot-Analyse von Poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Mausgeweben (Clontech) hybridisiert mit einer ³²P-markierten cDNA-Sonde (mem1).

Die chromosomale Lokalisierung der humanen und murinen Caspase-8-Gene erfolgte wie beschrieben (Lichter et al., 1990) durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH). DNAs, die Caspase-8-Gen-Informationen enthielten, humane PAC ICRFp700A24229 und murine Sequenzen (entweder drei gemischte Cosmid-Klone MPMGc121:H23227, A1958 und L15272 oder zwei kombinierte P1-Klone ICRFP703:L2173 und N2173), wurden durch Nick-Translation mit Biotin- und Digoxigenin-gekoppelten Nucleotiden entsprechend markiert. Metaphase-Chromosome von menschlichen peripheren Blutzellkulturen, die durch Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert wurden, und von Maus-Milzzellen-Kulturen, stimuliert durch Concavalin A und β -Mercaptoethanol (Sawyer et al., 1987), wurden aemäß dem Standardprotokoll der hypotonischen Behandlung und Methanol/Essigsäure-Fixierung vorbereitet. Die mit Biotin-markierte Sonde wurde mit Avidingekoppeltem Fluorescin-Isothiodcyanat (FITC) (Fig. 2A) detektiert, während die mit Digoxigeninmarkierte Sonden-DNA mit anti-Dioxigenin-gekoppeltem Rhodamin nachgewiesen wurde (Abb. 5.23B). Die Chromosomen wurden mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) angefärbt. Digitalisierte Bilder von FITC-, Rhodamin- und DAPI-Fluoreszenz wurden mit einer CCD-Kamera (Photometrics) aufgenommen, elektronisch überlagert und sorgfältig verglichen. Spezifische Hybridisierungssignale wurden auf dem menschlichen Chromosom 2q33-q34 und auf dem Maus-Chromosom 1 im Bereich 1B-proximalC gefunden. Die entsprechenden Beispiele sind in Abb. 5.23A und Abb. 5.23B gezeigt. Die Fluoreszenzsignale waren sehr spezifisch, da keine weiteren Signale an anderen Chromosomen beobachtet wurden. Es gibt also keinen Hinweis auf Pseudogene. Zur Bestätigung der Identität des Maus-Chromosoms 1 wurde eine mit Biotin-markierte Chromosomen1-Farbsonde (Cambio, Cambridge, UK) mit der Maus-Caspase-8-Sonde kohybridisiert und mit FITC (Abb. 5.23C) detektiert.



Abb. 5.23: Chromosomale Lokalisierung der Caspase-8-Gene in Mensch und Maus durch FISH

A: Sektion von humanen Metaphase-Chromosomen nach *in situ*-Hybridisierung mit Biotin-markiertem humanen PAC-Klon (ICRFp700A24229) und Nachweis über FITC. Spezifische Hybridisierungssignale wurden auf den zwei Homologen des Chromosoms 2 in der Region 2q33-q34 gefunden. Chromosomen wurden mit DAPI angefärbt. **B und C:** Sektion von Maus-Metaphase-Chromosomen nach Kohybridisierung von Digoxigenin-markierten P1-Klonen (ICRFP703:L2173 und N2173) und Nachweis über Rhodamin (**B**, Signale auf DAPI-angefärbten Chromosomen) und von Biotin-markierten Maus-Chromosom 1-Markern und Nachweis über FITC (**C**). Spezifische Lokalisierung wurde auf den beiden Homologen des Chromosoms 1 in der Region 1B-proximalC nachgewiesen.

5.1.6 Partielle Charakterisierung von CAP3

Zur Identifizierung von CAP3 wurde ebenfalls die Nano-ES-MS/MS eingesetzt. Die Probenbereitung erfolgte wie bei CAP4 (vgl. Kapitel 5.1.5.1). Es konnten lediglich zwei Peptide (T1' und T2') sequenziert werden. Diese waren identisch mit den Peptiden T2 und T4, die bei der Sequenzierung von CAP4 (Caspase-8) gefunden wurden (Abb. 5.24). Die beiden Peptide liegen jeweils in einer der beiden DEDs von Caspase-8. Folglich ist CAP3 ein Molekül, welches vermutlich im N-terminalen Bereich identisch ist mit Caspase-8. Damit würde es entweder eine Isoform oder ein Spaltprodukt von Caspase-8 darstellen. Gegen ein Spaltprodukt spricht, daß CAP3 nicht mit einem Antikörper immunpräzipitiert werden konnte, der gegen ein Peptid aus dem N-terminalen Bereich von Caspase-8 gerichtet war(Abb. 5.24A). Dieser polyklonale Kaninchen-Antikörper R1 immunpräzipitiert Caspase-8 (Abb. 5.24B, Pfeil), jedoch wird CAP3 nicht erkannt (Abb. 5.24B, Kasten). Dieses Resultat spricht dafür, daß CAP3 eine Isoform von Caspase-8 ist. Die Struktur von CAP3 ist in Abb. 5.24A schematisch dargestellt, wie sie aus den jetzigen Daten hervorgeht. Der Cap3-N-Terminus besteht aus den zwei DEDs von Caspase-8, und der C-Terminus besitzt eine noch zu bestimmende Sequenz. Wenn diese Struktur tatsächlich existiert, sollte sich CAP3 mit einem Antikörper anreichern lassen, der gegen einen anderen Bereich



Abb. 5.24: CAP3 ein Molekül mit DEDs

A: Schematisches Modell von CAP3. Es wurden zwei Peptide sequenziert, die identisch mit den sequenzierten Peptiden von Caspase-8 sind (T1'=T4 und T2'=T2). Somit scheint der N-terminale Bereich wie Caspase-8 zwei DEDs zu beinhalten. Der C-Terminus ist noch unbekannt. Zum Vergleich ist Caspase-8 ebenfalls dargestellt. Die DEDs sind in blau, die DDs in rot, die große Untereinheit in rosa und die kleine Untereinheit der Caspasen in pink gekennzeichnet. Der unbekannte Bereich von CAP3 ist hellgrün markiert. Angegeben sind ferner die Positionen der sequenzierten Peptide, deren Sequenzen und die Position des Peptids, gegen das der Ak R1 generiert wurde.

B: IP mit dem R1-Ak und einem Kontrollantikörper. Die Immunpräzipitate wurden auf 2D-Gelen analysiert. Die Migrationsposition von Caspase-8 (CAP4) ist als weißer Pfeil und die theoretische Migrationsposition von CAP3 ist mit einer Box angegeben.

des N-Terminus von Caspase-8 gerichtet ist.

5.1.7 Aktivierungsmodell der Caspase-8

5.1.7.1 Identifizierung von CAP5 und 6 als Prodomäne von Caspase-8

Der DISC bildet sich innerhalb von Sekunden (vgl. Kapitel 5.1.2.2). Ob sich die Zusammensetzung des DISC nach längerer Stimulation ändert, wurde in Raji B-Zellen, die mit anti-APO-1 30 min bei 37℃ inkubiert wurden, untersucht. Neben CAP1-4 konnten zwei neue Proteine identifiziert werden, die als CAP5 und 6 bezeichnet wurden (Abb. 5.25A, Einsatz b). Eine Kinetik zeigte, daß der DISC mit CAP1-4 nach 10 s detektiert werden konnte (Abb. 5.25B). CAP2 und 3 waren nur schwach in diesem Experiment zu sehen. Die Assoziation der CAPs erreichte nach 1-5 min ihr Maximum. Nach 20 min nahm die Intensität von CAP4 (Caspase-8) ab. Gleichzeitig erschienen CAP5 und 6. Nach 40 min war kein CAP4 (Caspase-8) mehr im DISC zu finden. Dafür nahm die Intensität von CAP5 und 6 weiter zu. Nach 60 minütiger Stimulation, als die Zellen schon begannen zu desintegrieren, war die Intensität aller Spots auf dem Gel reduziert. Interessanterweise änderte sich die Intensität von CAP1-3 über die gesamte Kinetik nicht. Die Vermutung lag nah, daß CAP5- und 6-Prodomänen von Caspase-8 sind. Um dies zu untersuchen, wurde der Antikörper R1 verwendet. Dieser Antikörper ist gegen die Region von Caspase-8 gerichtet, die zwischen der zweiten DED und der Proteasedomäne liegt (vgl. Kapitel 5.1.6). Daher müßte R1 sowohl unprozessierte Caspase-8 als auch die Caspase-8-Prodomäne erkennen. In den Lysaten aus der anti-APO-1-Kinetik, aus denen der DISC bereits herausimmunpräzipiert wurde, ließ sich dann mit dem R1 zytosolische Caspase-8 immunpräzipitieren (Abb. 5.26A). Ungespaltenes CAP4 (Caspase-8) konnte in Lysaten von unstimulierten und bis zu 5 min stimulierten Zellen in gleichen Mengen detektiert werden. Nach 20 min Stimulation war die Menge von ungespaltener Caspase-8 im Zytosol reduziert und nach 60 min fast vollständig umgesetzt. Beginnend mit 20 min Stimulation ließen sich CAP5 und 6 von R1 im Zytosol immunpräzipitieren. Die relative Menge stieg bis zum 60 min-Wert stetig an.

Die Existenz von CAP5 als Prodomäne von Caspase-8 konnte durch ReIP des DISC mit einem anti-Caspase-8-Ak gezeigt werden (Abb. 5.26D). Bemerkenswerterweise konnte CAP6 nicht äquivalent reimmunpräzipitiert werden. Die Erklärung hierfür lieferten die späteren Untersuchungen von Scaffidi et al. (1997) aus unserer Arbeitsgruppe. Sie konnten nachweisen, daß Caspase-8 primär in zwei Proteinebene exprimiert Diese Isoformen Isoformen auf wird. sind Caspase-8/a (CAP4/FLICE/MACHα1) und Caspase-8/b (MACHα2). Sie unterscheiden sich in 15 Aminosäuren, die zwischen der zweiten DED und der Caspasendomäne p18 liegen (Abb. 6.2). Beide Isoformen assoziieren über FADD mit der CD95-DD und werden mit vergleichbarer Kinetik prozessiert. Da der verwendete Antikörper für die ReIP fast ausschließlich gegen den Bereich, der nur in Caspase-8/a enthalten ist, generiert wurde, ließ sich dadurch in der ReIP des DISCs fast nur CAP5 immunpräzipitieren. Scaffidi et al. (1997) konnten später CAP5 als Prodomäne von Caspase-8/a und CAP6 als Prodomäne von Caspase-8/b identifizieren. Die Isoform Caspase-8/b läßt sich auch im DISC finden, jedoch liegt sie unter einem Hintergrundsspot und konnte deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert wurde. Interessanterweise konnte die Spaltung von DISC-gebundener Caspase-8 (Abb. 5.26B) etwas früher detektiert werden als das Auftreten von gespaltener zytosolischer Caspase-8 (Abb. 5.26C). Das ist mit der Initiation des Todessignals am Rezeptor zu erklären. Aus den Daten läßt sich schließen, daß fast die gesamte Caspase-8 in der Zelle während der CD95-vermittelten Apoptose aktiviert wird.



Abb. 5.25: Zwei neue DISC-Bestandteile können nach verlängerter Stimulation beobachtet werden

A: DISC-Analyse von metabolisch markierten Raji-Zellen nach 30 min Stimulation mit anti-APO-1. Die Positionen von CD95, CAP1-4 und die zwei neuen Bestandteile CAP5 und CAP6 sind markiert.

B: Kinetik der CAP4-Spaltung im DISC. Raji-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit anti-APO-1 stimuliert. Anschließend wurden sie schnellstmöglichst auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurde der DISC auf 2D-Gelen analysiert. Die gezeigten Gelregionen sind die Bereiche, in denen CAP4 (Caspase-8) (a) und CAP3-6 (b) laufen (wie in A. angegeben).



Abb. 5.26: Die gesamte zytosolische Caspase-8 wird gespalten

A: Kinetik der Caspase-8-Spaltung im Zytosol. Metabolisch markierte Raji-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit anti-APO-1 stimuliert. Die Zellen wurden dann lysiert und von dem CD95-DISC im Lysat befreit. Anschließend wurde zytosolische Caspase-8 mit dem R1-Ak immunpräzipitiert und die Analyse wie in Abb. 5.25durchgeführt.

B und C: Densitometrische Analyse der CAP4, 5 und 6 Spots. Die Intensität von CAP4, 5 und 6 entweder von CD95-DISC-IPs (**B**) wie in Abb. 5.25 gezeigt oder von zytosolischer Caspase-8-IP (**C**) wie in (**A**) gezeigt, wurden bestimmt und gegen die Zeit der anti-APO-1-Stimulation aufgetragen.

D: ReIP von CAP5 und 6 mit dem R1-Ak aus dem CD95-DISC, der aus 40 min stimulierten Raji-Zellen immunpräzipitiert wurde (Analyse wie in A.).

5.1.7.2 Caspase-8 wird am DISC gespalten und aktiviert

Caspase-8 assoziiert indirekt mit dem CD95-Rezeptor über FADD (Kapitel 5.1.4). Damit stellte sich die Frage, ob die Bindung von Caspase-8 zu FADD allein ausreicht, um Caspase-8 zu spalten. Dies wurde durch Inkubation von ³⁵S-markierter, *in vitro*-translatierter Caspase-8 entweder mit His-FADD- oder GST-FADD-Fusionsprotein, das an Agarose gebunden wurde, untersucht. Um post-transkriptionale Modifikatitonen von FADD zu berücksichtigen, die eventuell eine Rolle bei der Caspase-8-Aktivierung spielen könnten, wurde an Agarose immobilisiertes FADD mit Lysaten von unstimulierten (Abb. 5.27A, Bahnen 4 und 7) und stimulierten (Abb. 5.27A, Bahn 5 und 8) SKW6.4 Zellen vor der Zugabe von Caspase-8 inkubiert. Nach Inkubation der Ansätze bei 4℃ für 24 h wurden alle ungebundenen Proteine weggewaschen. Eine kleine Form von Caspase-8 wurde während der *in vitro*-Translation generiert und stellt sehr wahrscheinlich eine N-terminale verkürzte Caspase-8 dar, die durch eine unterschiedliche Initiation an einem zweiten Methionin entstand (Abb. 5.27A, Bahn 1, Pfeil). Dies

konnte durch IP mit den Antikörpern R1 und R2 bestätigt werden (s. unten; Abb. 5.28A). Zusätzlich stimmten das Molekulargewicht und der pl exakt mit den berechneten Werten überein (Daten nicht gezeigt; Medema et al., 1997). Bemerkenswert ist, daß die N-terminal-verkürzte Form nicht an FADD bindet. Daraus läßt sich folgern, daß die erste der zwei DEDs von Caspase-8 intakt sein muß, damit eine Assoziation mit FADD stattfinden kann. Trotzdem ist die Bindung an FADD nicht ausreichend für die Aktivierung von Caspase-8, da keine Spaltung beobachtet wurde. Wenn ³⁵S-markierte Caspase-8 zu immunpräzipiertem CD95 von unstimulierten (Abb. 5.27B, Bahn 1 und 3) oder stimulierten (Abb. 5.27B, Bahn 2 und 4) Zellen gegeben wurde, ließ sich eine Spaltung von Caspase-8 in Fragmente beobachten, die denen in der in vivo-Situation gefundenen ähnelten (Abb. 5.25). Sowohl das 26 kDa-Fragment (p26), identisch mit CAP5 (s. unten), als auch die ungespaltene Caspase-8 wurden im DISC gefunden (Abb. 5.27B, Bahn 2). Zusätzlich ließ sich noch ein Intermediat der Caspase-8-Spaltung bei 43 kDa (p43) detektieren. Beide Fragmente, p43 und p26, die Caspase-8-Prodomäne, assoziierten mit dem DISC. Daraus läßt sich folgern, daß beide Moleküle mindestens die erste DED des Caspase-8-N-Terminus besitzen müssen (Abb. 5.27B, Bahn 2). Im Überstand des Ansatzes ließen sich Caspase-8-Fragmente identifizieren, die nicht an den DISC gebunden haben oder während der Aktivierung freigesetzt wurden. Das waren p18, p12 und p10 sowie p26 (Abb. 5.27B, Bahn 4). Die p18, p12 und p10 repräsentieren sehr wahrscheinlich die aktiven Enzym-Untereinheiten. Diese Vermutung wurde bestätigt, indem dieser Überstand benutzt wurde, um PARP zu spalten. Dieses wurde effizient gespalten. Es bildete sich das charakteristische 85 kDa PARP-Fragment (Abb. 5.27C, Bahn 2). Daß die Aktivität im Überstand von Caspase-8 stammte, wurde mit einem polyklonaler Kaninchen-Antikörper (R2) demonstriert, der gegen den C-Terminus von Caspase-8 generiert war. Wenn der Überstand mit dem R2-Antikörper von den aktiven Caspase-8-Untereinheiten depletiert wurde, so war der Überstand nicht mehr in der Lage, PARP zu spalten (Abb. 5.27C, Bahn 3).

Um die Identität der Caspase-8-Spaltprodukte zu bestätigen, wurden IPs in den Überständen des in vitro-prozessierten, ³⁵S-markierten Caspase-8-Moleküls durchgeführt. Hierzu wurden die R1 und R2 Antikörper verwendet. Dabei konnte p26 als Prodomäne von Caspase-8 identifiziert werden, welches lediglich von R1 immunpräzipiert wurde, da R1 ein Peptid im C-terminalen Bereich der Prodomäne erkannte (Abb. 5.28A, Bahn 4). Zusätzlich blieb p26 auch teilweise am DISC selber gebunden. Daraus ist zu schließen, daß p26 auch die erste DED besitzen muß. Unter denaturierenden Bedingungen immunpräzipitierte R2 lediglich p12 und p10. Damit enthalten diese beiden Moleküle den C-Terminus von Caspase-8 (Abb. 5.28A, Bahn 5). Diese Ergebnisse wurden durch eine zweidimensionale Auftrennung der Caspase-8-Spaltprodukte bestätigt. Auf dem 2D-Gel hatten alle Caspase-8-Fragmente die entsprechenden Molekulargewichte und pl-Werte (Medema et al., 1997) Ferner wurden durch Vergleich mit der Primär-Proteinsequenz die Spaltstellen definiert (Medema et al., 1997, Abb. 5.28B). Bei Caspase-1 erfolgt die erste Spaltung während der Aktivierung an dem Aspartat-Rest, der dem aktiven Zentrum folgt (Wilson et al., 1994; Walker et al., 1996). Im Einklang mit dem Laufverhalten der Fragmente auf dem 2D-Gel (Medema et al., 1997) erfolgt eine Spaltung am Asp-374 bei der Bildung von p43 und p12. Das p43 wird dann weiter gespalten, vermutlich an Asp-216, worauf sich die zwei Fragmente p26 und p18 bilden. Schließlich wird p12 an Asp-384 gespalten. Die Spaltung nach dieser Aminosäure führt zu einer Änderung des pl-Wertes von 4,63 (p12) auf 6,5 (p10). Dieser verändert pl ist auf dem 2D-Gel gut zu erkennen (Medema et al., 1997).



Abb. 5.27: Caspase-8 wird am DISC gespalten und aktiviert.

A: *In vitro*-translatierte ³⁵S-markierte Caspase-8 wurde entweder direkt mit SDS-PAGE aufgetrennt (Bahn 1) oder es wurde erst 24 h bei 4 °C in Caspase-8-Reaktionspuffer mit entweder GSH-Agarose allein (Bahn 2), 10 μg His-FADD-Fusionsprotein an Ni²⁺-Agarose gekoppelt (Bahnen 3-5) oder 10 μg GST-FADD-Fusionsprotein an GSH-Agarose gekoppelt (Bahnen 6-8) inkubiert. Zusätzlich wurden sowohl GST-FADD als auch His-FADD 1 h bei 37 °C mit unstimulierten (Bahnen 4 und 7) oder 5 min mit anti-APO-1-stimulierten (Bahnen 5 und 8) Lysaten von 10⁶ SKW6.4-Zellen vor der Inkubation mit ³⁵S-markierter Caspase-8 behandelt. Anschließend wurde die Agarose gewaschen und die gebundenen Proteine wurden über 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Position der zusätzlichen 50 kDa Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Dieses Protein repräsentiert eine N-terminal verkürzte Caspase-8.

B: CD95 wurde von unbehandelten (Bahn 1 und 3) und mit anti-APO-1 behandelten (5 min), unmarkierten SKW-Zellen (Bahnen 2 und 4) immunpräzipitiert. Immunpräzipitate wurden viermal gewaschen und mit *in vitro*translatierter ³⁵S-markierter Caspase-8 inkubiert. Nach 24 h wurde der Überstand (Bahnen 3 und 4) von der Protein A-Sepharose (Bahnen 1 und 2) getrennt. Die Sepharose wurde dreimal gewaschen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Positionen von Caspase-8 und deren Fragmente p43, p26, p18, p12 und p10 sind markiert.

C: Analyse der PARP-Spaltung durch Zugabe von rekombinantes PARP zu dem Überstand eines *in vitro*-Caspase-8-Experiments mit immunpräzipitiertem CD95 aus unbehandelten SKW6.4-Zellen (Bahn 1), aus anti-APO-1-stimulierten Zellen (Bahn 2) oder von anti-APO-1-stimulierten Zellen, wobei im Lysat vorher zweimal mit dem R2-Ak immunpräzipitiert wurde (Bahn 3). Nach 8 h Inkubation bei 37 °C wurden die Proteine im Überstand über SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot mit dem CII-10-mAk, der gegen die p85-Untereinheit von rPARP gerichtet ist, durchgeführt.



Abb. 5.28: Identifizierung der Spaltprodukte von Caspase-8 und die Notwendigkeit des DISC für die Prozessierung

A: *In vitro*-translatierte ³⁵S-markierte Caspase-8 (Bahn 1). ³⁵S-markierte Caspase-8 wurde durch den CD95-DISC von anti-APO-1-behandelten (5 min) SKW6.4-Zellen gespalten. Der CD95-DISC allein (Bahn2) und der Überstand (Bahnen 3-5) dieses Experimentes wurde, wie in Abb. 5.27B beschrieben, hergestellt. Der Überstand wurde (Fortsetzung Abb. 5.28) entweder direkt aufs Gel aufgetragen (Bahn 3) oder das Immunpräzipitat des R1-Ak aus diesem Überstand (Bahn 4) oder das Immunpräzipitat des R2-Ak (Bahn 5). Die Migrationsposition der N-terminal verkürzten Caspase-8 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

B: Modellmechanismus der Caspase-8-Spaltung (Beschreibung im Text). Die identifizierten Spaltstellen und die Bindungsstellen des R1- und R2-Ak sind angegeben.

C: *In vitro*-translatierte ³⁵S-markierte Caspase-8 wurde entweder für 2 h (Bahnen 1 und 3) oder 24 h (Bahn 2) mit dem CD95-DISC in einem *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsexperiment inkubiert. Die Reaktion in den Überständen wurde entweder durch die Zugabe von 5x reduzierenden SDS-Auftragspuffer gestoppt (Bahnen 1 und 2) oder für weitere 22 h inkubiert und dann analysiert (Bahn 3).

Das p43 konnte *in vivo* in den untersuchten Zellinien nicht gefunden werden (Abb. 5.25A). Auch das p12-Fragment konnte *in vivo* durch IP und Western-Blot mit dem R2-Antikörper nicht detektiert werden (Abb. 5.29E; Daten nicht gezeigt). Deshalb sind p43 und p12 wahrscheinlich Intermediate während der Spaltung, die lediglich im *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsexperiment bei 4 ℃ detektiert werden konnten. Die Existenz des CAP6-Moleküls *in vivo* wurde ursprünglich als weitere Prozessierung von CAP5 (p26) interpretiert. Mittlerweile wurde CAP6 jedoch von Carsten Scaffidi als Prodomäne der Isoform Caspase-8/b identifiziert (vgl. Kapitel 5.1.7.1 und Kapitel 6.2; Scaffidi et al.,1997).

Damit läßt sich aus diesen Daten folgender Mechanismus der Caspase-8-Spaltung ableiten: Caspase-8 bindet an den DISC und wird dort im ersten Schritt am Asp-374 gespalten. Dabei formen sich die Spaltprodukte p43 und p12. Im zweiten Schritt erfolgt eine Spaltung an Asp-216 und an Asp-384, worauf sich das aktive Enzym p18/p10 und die Prodomäne p26 (CAP5) bilden können (Abb. 5.28B).

5.1.7.3 Caspase-8 kann sich nicht selber spalten

Der komplette Umsatz von zytosolischer Caspase-8, wie gezeigt in Abb. 5.26A, könnte durch zwei Mechanismen erfolgen. Entweder wird Caspase-8 am DISC aktiviert und das aktive Enzym spaltet dann im Zytosol die noch unaktivierte Caspase-8, oder Caspase-8 kann nur am DISC aktiviert werden. Es stellt sich also die Frage, ob Caspase-8 in der Lage ist, sich selbst zu prozessieren. Um das zu beantworten, wurde Caspase-8 unterschiedlich lang mit dem DISC inkubiert. Man konnte einen klaren Anstieg der Caspase-8-Prozessierung im Laufe der Zeit beobachten. Während in 2 h wenig Caspase-8 gespalten wurde, erfolgte nach 24 h erheblich mehr Caspase-8-Spaltung (Abb. 5.27C, Bahn 1 und 2). Dieser Umsatzanstieg benötigte die Präsenz von aktivem DISC, da der Anstieg bei der 24 h-Inkubation nicht beobachtet wurde, wenn der DISC nach 2 h entfernt wurde (Abb. 5.27C, Bahn 3). Caspase-8 akzeptiert sich also selbst nicht als Substrat, während z. B. PARP unter gleichen Bedingungen von Caspase-8 gespalten wird (Abb. 5.27C, Bahn 2). Zusätzlich wurde das Ergebnis noch durch eine inaktive Caspase-8-Deletionsmutante bestätigt (Medema et al., 1997). Die Schlußfolgerung ist, daß im CD95-Signalweg Caspase-8 nur am DISC aktiviert werden kann.

5.1.7.4 Die Wirkung von Inhibitoren auf die Caspase-8-Spaltung

In unserer Veröffentlichung (Medema et al., 1997) wurden verschiedene Inhibitoren für Caspasen auf ihren Effekt auf die Caspase-8-Aktivität getestet. Zum einen wurden Peptid-Caspaseninhibitoren im *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsexperiment auf ihre Wirkung titriert. zVAD-fmk , zDEVD-fmk (Ac-DEVD-CHO zeigte vergleichbare Resultate) und zIETD-fmk, das die erste Spaltungsstelle von Caspase-3 simuliert, waren effektive Inhibitoren von Caspase-8-Aktivierung durch den DISC *in vitro*, während Ac-

YVAD-CHO keinen Effekt in den benutzten Konzentrationen hatte (Medema et al., 1997). Die *in vivo*-DISC-Analyse wurde exemplarisch mit zVAD-fmk durchgeführt und zeigte eine komplette Inhibition der Spaltung von Caspase-8 (Caspase-8/a (CAP4) und Caspase-8/b (nicht gezeigt)) in CAP5 und CAP6 (Abb. 5.29B). Also wirkt zVAD-fmk auf der DISC-Ebene.

Dann wurde der Effekt der Überexpression von CrmA auf die Caspase-8-Aktivierung getestet. Überexpression von CrmA in BJAB-Zellen blockte CD95-vermittelte Apoptose vollständig (Abb. 5.29C), während Überexpression einer inaktiven CrmA-Mutante keinen Einfluß der Zellen auf die anti-APO-1-Sensitivität hatte (Abb. 5.29C). Eine Untersuchung der beiden Transfektanten auf DISC-Bildung und Prozessierung von Caspase-8 *in vivo* zeigte, daß nach 15 min Stimulation mit anti-APO-1 CAP4 (Caspase-8) in beiden Fällen bereits teilweise in vergleichbaren Mengen gespalten wurde und CAP5 und CAP6 erschienen (Abb. 5.29D). Zu einem späteren Zeitpunkt (60 min Stimulation) konnten in beiden Transfektanten gleiche Mengen von der aktiven Protease mit R2 immunpräzipitiert werden (Abb. 5.29E). Dies bedeutet, daß CrmA den CD95-Signalweg nicht auf der DISC-Ebene blockierte.


Abb. 5.29: Die Wirkung von Inhibitoren auf die Caspase-8-Aktivierung

A und B: *In vivo*-Inhibition der CAP5- und CAP6-Bildung. Raji-Zellen wurden metabolisch markiert und entweder nicht (**A**) oder mit 20 μM zVAD-fmk (**B**) 30 min vorbehandelt. Dann erfolgte eine Stimulation für 30 min mit anti-APO-1. Der CD95-DISC wurde auf 2D-Gelen analysiert. Die Gelregionen sind dargestellt, die CAP4 (Caspase-8) (obere Bilder) und CAP5 und 6 (untere Bilder) zeigen. Die Migrationspositionen der CAPs sind mit Pfeilen markiert.

C: BJAB-Zellen, die entweder Wildtyp-CrmA (E) oder eine CrmA-Mutante (J) exprimierten, wurden mit verschiedenen Konzentration von anti-APO-1 16 h inkubiert. Die Messung der Apoptosesensitivität erfolgte nach der Nicoletti-Methode.

D und E: Metabolisch markierte BJAB-Zellen, die entweder Wildtyp-CrmA (crmA) oder eine CrmA-Mutante (crmA^{mt}) exprimierten, wurden für 15 (D) oder 60 min (E) mit anti-APO-1 behandelt. Die Zellen wurden dann lysiert und entweder die CD95-DISC-IP (D) oder die p10- und p18- Caspase-Untereinheiten durch IP mit dem R2-Ak (E) wurden auf 2D-Gelen analysiert. Die Pfeile in (D) kennzeichnen CAP4-6, während die Positionen von p18 und p10 in (E) angegeben sind.

5.2 Aktivierung von SAP-Kinasen durch Caspasen bei CD95-induzierter Apoptose

5.2.1 Die CD95-induzierte Aktivierung von mehreren Proteinkinasen geht der DNA-Fragmentierung voraus

Zur Identifizierung der Moleküle, die im CD95-Signalweg involviert sind, wurde die Aktivierung der streßaktivierte Proteinkinasen untersucht. Streßaktivierte Proteinkinasen (SAPK), auch als Jun-Nterminale Kinasen (JNK) bezeichnet, sind Teil einer alternativen MAP-Kinasekaskade, die durch diverse Arten von Streß, wie UV Strahlung, Hitzeschock oder Proteinsyntheseinhibitoren (Derijard et al., 1994; Hibi et al., 1993; Zanke et al., 1996; Meier et al., 1996), induziert werden. Da auch der CD95-Signalweg als ein Streßsignal interpretiert werden kann, wurde in Zusammenarbeit mit Alfred Nordheim (MHH, Hannover) ein In-Gel-Kinase (IGK)-Nachweissystem etabliert und getestet. Hierzu wurde c-Jun (das klassische Substrat dieser Kinasen) in der SDS-PAGE kopolymerisiert. Anschließend wurden Kinetiken mit anti-APO-1 als Stimulus in verschiedenen Zellinien durchgeführt und entsprechend Lysate zu bestimmten Zeitpunkten hergestellt. Wenn c-Jun als Substrat in 12,5 % igen PAA-IGK-Gelen benutzt wurde, stellte sich heraus, daß anti-APO-1-Stimulation die Aktivität von Kinasen mit Molekulargewichten von ungefähr 35, 38, 46 und 54 kDa in den humanen Zellinien SKW6.4, HUT78, Jurkat (Abb. 5.30A) und BJAB (Daten nicht gezeigt) induzierte. Auch im Kontroll-IGK-Gel ohne Substrat ließen sich die Kinasen detektieren, was auf eine autokatalytische Aktivität hindeutete. Jedoch nahm die Intensität des Signals bei Zugabe von c-Jun stark zu (Abb. 5.30A). Die Intensität der Kinaseinduktion korrelierte dabei mit der Kinetik des Zelltodes (Abb. 5.31A). In den Boe^R-Zellen, die resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (vgl. Kapitel 5.1.2.6), ließ sich keine Kinaseaktivität detektieren (Abb. 5.30A). Es zeigte sich auch keine Induktion in den BL-60-Zellen, die nur sehr wenig CD95 exprimieren (vgl. Kapitel 5.1.1.1). Ebenfalls keine Aktivierung von Kinasen war in BL-60-Zellen zu beobachten, die stabil mit einer C-terminal-deletierten Mutante von CD95, transfiziert wurden (K2.2-Zellen, vgl. Kapitel 5.1.2.3). Durch die Expression des gesamten CD95-Moleküls in BL60-Zellen (K50 Zellen, vgl. Kapitel 5.1.1.1) ließ sich aber das gleiche Muster der CD95-induzierten Kinasen inklusive autokatalytische Aktivität beobachten (Abb. 5.30B), wie in den CD95-sensitiven Zellen (Abb. 5.30A). Die Induktion dieser Kinasen in den K50-Zellen war etwas verzögert, was mit der langsameren Kinetik der Apoptose in diesen Zellen übereinstimmt (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierung der Kinasen im CD95-Signalweg geschieht zeitlich vor der Degradation der chromosomalen DNA (Abb. 5.31A). In SKW6.4-Zellen konnte die 35 kDa-Kinase bereits nach 15 min CD95-Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 5.30A und Abb. 5.31B). Eine signifikante DNA-Degradation ließ sich jedoch erst nach 60 min Inkubation mit dem anti-APO-1-Antikörper erkennen (Abb. 5.31B). Die frühe Aktivierung der Kinasen im CD95-Signalweg deutet auf eine Rolle der Kinasen beim CD95-vermittelten Zelltod hin.

Ein 9% iges PAA IGK-Gel zeigte eine bessere Auflösung für die induzierten Kinasen in SKW6.4-Zellen. Damit ließ sich eine SKW6.4 spezifische weitere autokatalytische Kinase von ungefähr 120 kDa detektieren (Abb. 5.32A). Diese Kinase wurde in den anderen getesteten Zellinien nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach Induktion des CD95-Signalweges in den getesteten CD95-sensitiven Zellinien Kinasen mit Molekulargewichten von 35, 38, 46 und 54 kDa induziert wurden. Andere Kinasen könnten ebenfalls aktiviert worden sein, ließen sich aber nicht detektieren, da sie entweder nicht renaturiert werden konnten oder ein anderes Substrat benötigten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Stimulation des CD95-Rezeptors intrazellulär Signalwege induziert, die Kinasen aktivieren. Die Aktivierung dieser Kinasen geschieht noch, bevor die zelluläre DNA-Degradation einsetzt.



Abb. 5.30: CD95-Stimulation aktiviert eine Reihe von Proteinkinasen in CD95-sensitiven Zellen (Fortsetzung Abb. 5.30)

A: Verschiedene humane T- und B-Zellinien wurden mit anti-APO-1 für die angegebene Zeit inkubiert. **B**: Eine intakte Todesdomäne ist notwendig, um die Kinasen zu induzieren. BL60-, K2.2- und K50-Zellen wurden analysiert. Alle Zellen in (**A**) und (**B**) wurden lysiert und die Lysate im 12,5 % *In-Gel-*Kinase-Test ohne Substrat (Kontrolle) oder mit 40 µg/ml kopolymerisiertem c-Jun (Jun) untersucht.



Abb. 5.31: Die Aktivierung der CD95-Kinasen geschieht vor dem Beginn der DNA-Fragmentierung A: Messung der Apoptosesensitivität in SKW6.4- (J), HUT78- (E), Jurkat- (B) und Boe^R- (G) Zellen nach der Nicoletti-Methode, die die DNA-Fragmentierung mißt. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit anti-APO-1 inkubiert.

B: Der Anstieg der Bandenintensität von den Kinasen p35 (G), p46 (E) und p54 (J) nach Stimulation der SKW6.4-Zellen mit anti-APO-1, wie in (**A**) gezeigt, ist dargestellt. Das Gel wurde gescannt und densitometrisch mit Hilfe des Programms ScanAnalysis (Biosoft, Feruson, MO, USA) ausgewertet.

5.2.2 Die CD95-induzierten Kinasen sind für die CD95-vermittelte Apoptose spezifisch

Die Frage nach einer generellen Induktion von Kinasen bei Apoptose wurde beantwortet, indem Zellen mit verschiedenen apoptotischen Stimuli behandelt wurden (Abb. 5.32). Die oben beobachteten Kinasen wurden während der Kontrollbehandlung der SKW6.4-Zellen bei 37°C nicht induziert, was die Notwendigkeit des CD95-Signals verdeutlicht (Abb. 5.32A). Die Induktion ließ sich durch Vorbehandlung mit Cycloheximid nicht verhindern, was zeigt, daß die CD95-stimulierte Kinaseaktivierung, wie die gesamte CD95-induzierte Apoptose in SKW6.4-Zellen (Abb. 5.32A) oder Jurkat-Zellen (Daten nicht gezeigt) keine Proteinsynthese benötigt. In K50-Zellen läßt sich durch Stimulation des Oberflächen-Immunglobulin M (IgM) mit anti-human IgM-Antikörper Apoptose induzieren (Peter et al., 1995a). Im Gegensatz zur mit anti-APO-1 induzierten Apoptose (Abb. 5.30B) führte ein IgM-Stimulus nur zu einer Induktion von Kinasen mit niedrigem Molekulargewicht (35 und 38 kDa) (Abb. 5.32B). Gleiche Ergebnisse wurden mit den untransfizierten BL60-Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt). Anti-Maus-IgM (anti-mulgM)-Behandlung von der Maus-B-Zellinie WEHI231, eine Modellzellinie zur Untersuchung von IgM-vermittelter Apoptose (Abb. 5.32C; Benhamou et al., 1990), induzierte ebenfalls nur Kinasen von 35/38 kDa (Abb. 5.32C). Daraus ergibt sich, daß Oberflächen-IgM- und CD95-vermittelte Apoptose gemeinsame Elemente im Hinblick auf die Kinaseaktivierung enthalten kann, diese jedoch nicht identisch sind.

Als nächstes wurde der Effekt von nicht-Rezeptor-vermittelten Formen der Apoptose bei SKW6.4-Zellen getestet. Staurosporin ist ein Proteinkinase-Inhibitor, der Apoptose auslösen kann (Bertrand et al., 1994). Keine der CD95-induzierbaren SKW6.4-Kinasen wurden mit diesem Stimulus induziert, dafür aber eine andere Kinase autokatalytischer Aktivität, die ein Molekulargewicht von ungefähr 63 kDa besitzt. Die Aktivierung geschah bereits 15 min nach Staurosporin-Zugabe und blieb aktiv, bis der

Zelltod gemessen werden konnte (Abb. 5.32D). Thapsigargin ist ein Inhibitor der ATP-abhängigen Ca²⁺-Pumpe des endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran, die eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumionen aus zelleigenen Reservoirs verhindern (Kaneko et al., 1994). Apoptose induziert durch Thapsigargin aktivierte Kinasen von 38 und 45 kDa, jedoch konnte keine Induktion der 35, 46, 54 oder 120 kDa-Kinasen in SKW6.4-Zellen detektiert werden (Abb. 5.32E). Das Ca2+ -lonophor A23187 läßt die Konzentration der intrazellulären Calciumionen ansteigen, aktiviert dabei Ca²⁺-abhängige Prozesse und induziert in vielen Zellen Apoptose (Zhivotovsky et al., 1994). Bei diesem Typ der Apoptose konnte keine Aktivierung von Kinasen festgestellt werden (Abb. 5.32F). In Jurkat-Zellen konnte Apoptose auch durch Hitzeschock (43 ℃, 60 min, Daten nicht gezeigt) induziert werden. Hierbei kam es zu einer transienten Induktion von 46 und 54 kDa-Kinasen bis zu 120 min. Diese Aktivierung kann zur Hitzeschockantwort gehören und braucht nichts mit der Apoptose zu tun zu haben, da die Aktivität bereits verschwunden war, als nach 9 h DNA-Fragmentierung gemessen werden konnte. Hierbei war keine Induktion von 35 und 38 kDa-Kinasen meßbar (Daten nicht gezeigt). Die CD95-vermittelte Apoptose in Jurkat-Zellen zeigte die typische Kinetik des CD95-vermittelten Todes inklusive die anhaltende Aktivierung der CD95-induzierten Kinasen (Abb. 5.30B). Diese Ergebnisse zeigen, daß CD95 solche Kinasen aktiviert, deren Molekulargewichtsverteilung im IGK-Experiment ein spezifisches Profil ergibt und sich von dem der durch Oberflächen-IgM-, Chemikalienoder hitzeinduzierter Apoptose induziertem Profil unterscheidet. Durch anti-IgM- oder Thapsigargininduzierte Apoptose scheinen einige der CD95-induzierten Kinasen aktiviert zu werden (38 und 45 kDa), doch gleichzeitige Induktion der 35, 46 und 54 kDa-Kinasen konnte nur durch den CD95-Signalweg erreicht werden.

5.2.3 CD95 induziert Jun-Kinasen der JNK/SAPK-Familie

Die CD95-induzierten Kinasen wurden näher charakterisiert, um zu ermitteln, ob einige der Kinasen zur JNK/SAPK-Familie gehörten. Ein Weg, Kinasen der JNK/SAPK-Familie zu aktivieren, ist die Behandlung mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin (Zinck et al., 1995). Die Inkubation von HeLa-Zellen mit Anisomycin induziert Aktivierung von 46 und 54 kDa-Kinasen, die mit den anti-APO-1-induzierten Banden komigrieren (Abb. 5.33A, Bahnen 2 und 4). Das weist auf eine Aktivierung von Mitgliedern der JNK/SAPK-Familie durch CD95 hin.



Abb. 5.32: Die Induktion von Apoptosis durch unterschiedliche Stimuli resultiert in der Aktivierung von spezifischen Kinasen

A: SKW6.4-Zellen wurden mit 5 μ g/ml CHX (+) oder Medium (-) inkubiert und dann mit anti-APO-1 stimuliert.

B: K50-Zellen wurden mit 10 μg/ml anti-human-lgM-Ak behandelt.

C: WEHI231-Zellen wurden mit 10 µg/ml anti-murin-IgM-Ak inkubiert.

D-F: SKW6.4-Zellen wurden mit entweder 50 nM Staurosporin (**D**), 100 nM Thapsigargin (**E**) oder 5 μM A23187 (**F**) inkubiert. Alle Zellen wurden mit den verschiedenen Reagentien für die angegebene Zeit stimuliert. Zellysate wurden im 9 % IGK-Test analysiert. Nach Inkubation für 16 h war die induzierte, spezifische Apoptose ausgelöst durch anti-human-IgM-Ak: 17 %; anti-murin-IgM-Ak: 22 %; Staurosporin: 26 %; Thapsigargin: 18 % und A23187: 30 %.

Es wurde bereits diskutiert, daß die p34^{cdc2} -Kinase generell in die Induktion von Apoptose involviert ist (Shi et al., 1994). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die cdc2-ähnliche Kinase PITSLRE während CD95-vermittelter Apoptose aktiviert wird (Lahti et al., 1995). Weil beide Kinasen Histon H1 phosphorylieren, wurde ein IGK Experiment mit CD95-aktivierten SKW6.4-Zellextrakten und Histon H1 wie auch c-Jun als Substrat durchgeführt, um nachzuprüfen, ob Histonkinasen ebenfalls induziert werden (Abb. 5.33B, Bahnen 1 und 2). Relativ zum Kontrollgel ohne Substrat war das Muster der substratspezifischen CD95-induzierten Kinasen gleich für beide Substrate. Eine sichtbare Verstärkung von 35, 46 und 54 kDa autokatalytischer Aktivität war zu erkennen, doch die Phosphorylierung von c-Jun war effizienter.

Da die 46 und 54 kDa c-Jun-Kinasen mit den SAPK aus Anisomycin induzierten HeLa-Zellen komigrierten (Abb. 5.33A), wurden SAPKs aus CD95-induzierten Zellen mit zwei verschiedenen Antikörpern immunpräzipitiert (Abb. 5.33B). Anti-SAPK α,β,γ ist ein polyklonales Serum, generiert gegen Ratten-SAPK β , welches nicht zwischen den α -, β - oder γ -SAPK-Isoformen dieser Kinasefamilie

unterscheiden kann. Der anti-JNK1 ist ein monoklonaler Antikörper, generiert gegen humanes JNK1. Diese zwei Antikörper immunpräzipitierten c-Jun-Kinaseaktivität von induzierten Extrakten, welche mit den 46 und 54 kDa-Kinasen komigrierten. Das identifizierte sie als Mitglieder der JNK/SAPK-Familie. Jedoch im Widerspruch zu den Kinasen im Lysat (Abb. 5.33B, Bahnen 1 und 2) waren die immunpräzipitierten Kinasen wiederholt nicht in der Lage, Histon H1 zu phosphorylieren (Abb. 5.33B, untere Grafik) und zeigten auch keine Autophosphorylierungsaktivität (Abb. 5.33B, obere Grafik). Daraus ist zu ersehen, daß die Kinasen, die Histon H1 und sich selbst phosphorylieren, wahrscheinlich nicht Mitglieder der JNK/SAPK-Familie sind. Dies deutet darauf hin, daß es zusätzliche autokatalytische Kinasen von 35/38, 46 und 54 kDa gibt, die Histon H1 phosphorylieren können.

Antikörper gegen Cdc2, Cdk2 oder PITSLRE konnten keine Histon H1-Kinaseaktivität, die im IGK-Experiment beobachtet werden konnte, immunpräzipitieren (Daten nicht gezeigt). Daher kann nicht davon ausgegangen werden, daß die 54 kDa Histon H1-Kinase die p58 PITSLRE oder die 50 kDaproteolytisch aktivierte Form darstellt (Lahti et al., 1995) oder daß die 35 kDa-Kinase Cdc2 oder Cdk2 entspricht. Das letztere ist umso unwahrscheinlicher, als diese Kinasen von ihren Cyclinen im Experiment getrennt wurden, die sie jedoch für ihre Aktivität benötigen. Da für die PITSLRE-Kinase gezeigt wurde, daß sie durch CD95 aktiviert wird, ist es eher möglich, daß sie im IGK-Experiment nicht renaturiert werden konnte und damit nicht detektierbar war.



Abb. 5.33: CD95-Stimulation resultiert in der Aktivierung von Mitgliedern der JNK/SAPK-Familie

(Fortsetzung Abb. 5.33)

A: SKW.6.4-Zellen wurden mit anti-APO-1 und HeLa-Zellen mit 10 μM Anisomycin für die angegebene Zeit stimuliert. Das Gesamtlysat wurde analysiert.

B: 10^7 SKW6.4-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit anti-APO-1 stimuliert. Gesamtlysate wurden analysiert oder in Lysaten wurde entweder mit anti-SAPK α , β , γ oder anti-JNK1 immunpräzipitiert (zweimal



Abb. 5.34: Die Aktivierung der CD95-Kinasen wird durch zVADfmk inhibiert

A: SKW6.4-Zellen wurden ohne (-) oder mit (+) zVAD-fmk 30 min vorinkubiert, bevor für die angegebene Zeit mit anti-APO-1 stimuliert wurde. In den Bahnen 1 und 2 wurden zum Vergleich die gleichen SKW6.4-Lysate aufgetragen, wie in Abb. 5.33B (Bahnen 1 und 2). Alle Proben wurden in einem 9 % IGK-Test analysiert.

B: Messung der Apoptosesensitivität von SKW6.4-Zellen ohne (J) und mit (E) Zugabe des Peptids zVAD-fmk. Zellen wurden mit steigenden Mengen an anti-APO-1 für 16 h inkubiert. Die Messung erfolgte nach der Nicoletti-Methode.

wiederholt). Alle Proben wurden in einem 9 % IGK-Test ohne Substrat (Kontrolle) oder kopolymerisiertes c-Jun (Jun) oder Histon H1 (Hist. H1) analysiert.

Zusammengefaßt identifizieren diese Daten einen Teil der CD95stimulierten p46 und p54 c-Jun-Kinaseaktivität als Mitglieder der JNK/SAPK-Mitogen-aktivierten

Proteinkinasen. Zusätzlich könnten die Charakteristika der 35/38, 45 und 54 kDa CD95-stimulierten Kinasen mit ähnlichem isoelektrischem Punkt (Daten nicht aezeiat). ähnlicher autokatalytischer Aktivität und Histon H1- und c-Jun-Substratspezifität sehr wahrscheinlich auf die Existenz einer zusätzlichen und unterschiedlichen Klasse CD95verwandten von induzierbaren Kinasen hindeuten.

5.2.4 CD95-induzierte Kinasen benötigen Caspasen

Ein Ansatz, die Ebene der CD95aktivierten Kinasen innerhalb des CD95-Signalweges zu bestimmen, ist, die Notwendigkeit der Caspasen für die Aktivierung der Kinasen zu untersuchen. Das Peptid zVAD-fmk wurde als Protease-Inhibitor benutzt. Dieses Peptid inhibiert bereits die erstaktivierte Caspase-8 (vgl. Kapitel 5.1.7.4). Die Vorinkubation von SKW6.4-Zellen mit dem Inhibitor resultierte sowohl in einer vollständigen Resistenz gegenüber anti-APO-1-induzierter Apoptose (Abb. 5.34B) als auch in einer

Inhibition aller CD95-induzierten Kinasen inklusive der SKW6.4-spezifischen substratunabhängigen Kinase p120 (Abb. 5.34A). Ähnliche Resultate wurden mit der humanen B-Zellinie BJAB, die stabil mit dem Poxvirus CrmA-Gen transfiziert wurde, erhalten (Daten nicht gezeigt). Crm A kann ebenfalls Caspasen inhibieren (vgl. Kapitel 5.1.7.4; Komiyama et al., 1994; Tewari et al., 1995a) und verhindert ebenfalls CD95-vermittelten Zelltod und Aktivierung der Kinasen. Folglich ist die Prozessierung der Caspasen im CD95-Signalweg essentiell für die spätere Aktivierung der CD95-induzierten Kinasen. Zusammenfassend kann daher gesagt werden, daß die detektierten Kinasen unterhalb der Caspasen und oberhalb der DNA-Fragmentation im CD95-Signalweg liegen.

5.3 Modell für die Regulation des CD95-Systems: die T-Lymphozyten

Nicht-aktivierte periphere T-Zellen exprimieren geringe Mengen von CD95 auf ihrer Oberfläche (Abb. 5.35A, Tag 0 (d0) T-Zellen). Nach Aktivierung mit PHA für 16 bis 20 h wurde die CD95-Expression hochgeregelt (Abb. 5.35A, Tag 1 (d1) T-Zellen). Sowohl d0 als auch d1 T-Zellen waren resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Abb. 5.35B). Längere Kultivierung der T-Zellen in IL-2 nach der PHA-Stimulation veränderte die Expression von CD95 auf der Zelloberfläche nicht wesentlich (Abb. 5.35A, Tag 6 (d6) T-Zellen). Jedoch gegen Tag 4 der Kultivierung entwickelten die T-Zellen einen CD95-vermittelten Apoptose-sensitiven Phänotyp (Klas et al., 1993; Daten nicht gezeigt), der besonders am d6 der Kultivierung ausgeprägt war. Die meisten T-Zellen wurden am d6 durch anti-APO-1 getötet (Abb. 5.35B). Die unterschiedliche CD95-vermittelte Apoptosesensitivität am d1 und d6 kann ebenfalls durch Stimulation mit dem anti-CD3 mAk OKT3 beobachtet werden, der aktivierungsinduzierten Zelltod (AIZT) auslöst (Klas et al., 1993). Da dieser AIZT besonders durch das CD95-Rezeptor/Ligand-System vermittelt wird (Dhein et al., 1995), kann die Sensitivität gegenüber dem anti-APO-1-Antikörper als ähnlich der Empfindlichkeit der T-Zellen gegenüber dem AIZT durch den CD95-Ligand (CD95L) angesehen werden. Aufgrund der Tatsache, daß d1 und d6 T-Zellen vergleichbare Mengen an CD95 exprimieren, muß die Regulation im CD95-Signalweg erfolgen. Der erste Schritt in diesem Signalweg ist die DISC-Bildung. Beide T-Zellpopulationen wurden daraufhin getestet, und es zeigte sich, daß die Bindung von FADD (CAP1 und 2) an den DISC unverändert war. Dies wurde sowohl mit 2D-Gel-Analyse (Abb. 5.36A und B) als auch mit Western-Blot unter Verwendung eines anti-FADD mAk (Daten nicht gezeigt) demonstriert. CAP3 assoziierte ebenfalls an beiden Tagen (d1 und d6) mit dem stimulierten CD95-Rezeptor (Abb. 5.36A und B). Dennoch war der DISC von d1 T-Zellen nicht vollständig, da er kein CAP4 (Caspase-8) enthielt, was zur Bildung von aktiven Untereinheiten notwendig gewesen wäre (Medema et al., 1997). Neben CAP1-3 sind auf den 2D-Gelen zwei Spots zu erkennen, die CAP5 und 6 (die Prodomänen von Caspase-8) darstellen könnten (Medema et al., 1997). Da kein Unterschied in der Intensität zwischen diesen Spots in d1 und d6 T-Zellen beobachtet werden konnte, scheinen die Spots nicht an der Regulation der Sensitivität beteiligt zu sein.



Abb. 5.35: CD95-Expression in peripheren T-Zellen korreliert nicht mit der Sensitivität gegenüber anti-APO-1-vermittelter Apoptose

A: Oberflächenfärbung von peripheren T-Zellen auf CD95 und CD3. Nicht-stimulierte T-Zellen (d0) wurden mit PHA für 16 h inkubiert (d1), gewaschen und dann in der Gegenwart von IL-2 für 5 Tage kultiviert (d6).

B: Messung der Apoptosesensitivität von T-Zellen nach der Nicoletti-Methode. Es wurden die T-Zellen ohne (-) oder mit (+) anti-APO-1 für 16 h inkubiert.

Die Färbung und die Apoptosemessung sind repräsentativ für zehn unabhängige Experimente.

Ob der DISC von d1 T-Zellen, bei dem Caspase-8 (CAP4) fehlte, auch funktionell inaktiv im Vergleich zu dem DISC von d6 T-Zellen war, ließ sich mit den immunpräzipitierten DISCs im *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsexperiment (vgl. Kapitel 5.1.7.2) untersuchen. Als Positivkontrolle diente immunpräzipitierter DISC von H9 T-Zellen, der die aktiven Caspase-8-Untereinheiten p18, p12 und p10 prozessierte (Abb. 5.36C, Bahn 2). Immunpräzipierter CD95 von unstimulierten Zellen zeigte keine Aktivität in diesem Experiment (Abb. 5.36C, Bahn 1). Ein Vergleich der DISCs von d1 und d6 T-Zellen (Abb. 5.36C, Bahnen 3 und 4) zeigte, daß nur der DISC von d6 T-Zellen Caspase-8 prozessieren konnte (Abb. 5.36C, Bahn 4), während keine aktiven Caspase-8-Untereinheiten detektiert wurden, wenn der DISC von d1 T-Zellen benutzt wurde (Abb. 5.36C, Bahn 3). Da die T-Zellen von d0, d1 und d6 vergleichbare Mengen an zytoplasmatischer Caspase-8 besaßen (Abb. 5.36D), wurde die Fähigkeit des DISCs, Caspase-8 zu rekrutieren und zu prozessieren, nicht durch die Expression von Caspase-8 geregelt. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe semiquantitativer PCR eine Reihe von verschiedenen Signalmolekülen getestet, von denen berichtet wurde, daß sie im CD95-Signalweg und einige von ihnen sogar in die Regulation der Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose involviert sind. In

d0, d1 und d6 T-Zellen waren die mRNA-Expressionen von FADD und RIP, einem anderen Molekül mit Todesdomäne, identisch (Abb. 5.37). Für FADD wurden die gleichen Expressionsmengen auch auf Proteinebene bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die mRNA-Mengen von zwei Proteintyrosinphosphatasen (PTPase) wurden am d1 hochgeregelt, zum Vergleich mit d0. Von der einen der beiden PTPasen wurde berichtet, daß sie die CD95-vermittelte Apoptose verstärkt (HCP), während die andere sie inhibiert (FAP-1) (Su et al., 1995; Sato et al., 1995). Die Expression änderte sich jedoch zwischen d1 und 6 nicht signifikant (Abb. 5.37). Die Caspase-8-Expression wurde mit zwei Primerpaaren getestet. Das eine war gegen den N-Terminus, das andere gegen den C-Terminus gerichtet. Mit beiden Primerpaaren ließen sich keine Veränderungen der Expression feststellen (Abb. 5.37), was die oben gezeigte Analyse bestätigt (Abb. 5.37D). Die Interpretation der Daten läßt den Schluß zu, daß die Rekrutierung von Caspase-8 oder den anderen getesteten Molekülen abhängig ist.



Abb. 5.36: Nur der DISC von Tag 6 T-Zellen aktiviert Caspase-8

(Fortsetzung Abb. 5.36)

A und B: Metabolisch markierte Tag 1 (d1, **A**) und Tag 6 (d6, **B**) T-Zellen wurden 5 min mit anti-APO-1 stimuliert und lysiert. Der DISC wurde immunpräzipitiert und auf 2D-Gelen analysiert. Die Migrationspositionen von CD95 sind durch eine große Box, von Caspase-8 durch einen weißen Pfeil und von CAP1-3 durch eine kleine Box gekennzeichnet. Die jeweils zwei schwarzen Pfeile markieren Proteine, die identisch mit CAP5 und CAP6

migrieren (s. Text). Die gezeigten Gele sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

C: Das *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsexperiment mit CD95-IP aus Lysaten von unstimulierten (Bahn 1) und stimulierten (Bahn 2) H9-T-Zellen oder von stimulierten d1 (Bahn 3) und d6 (Bahn 4) T-Zellen. Die p43, p18, p12 und p10 Spaltprodukte von Caspase-8 sind markiert. die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

D: Zytosolische Caspase-8 wurde in metabolisch markierten T-Zellen mit dem R1-Ak detektiert. Die Migrationsposition von CAP4 (Caspase-8) ist durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet. Der zusätzliche Spot unterhalb von CAP4 in d1 T-Zellen ist ein Hintergrundspot und wurde nicht spezifisch durch den R1-Ak erkannt.

Es wurde beschrieben, daß Mitglieder der Bcl-2-Familie Zellen vor einer Reihe von apoptotischen Stimuli schützen können (Korsmeyer, 1992). Außerdem wurde gezeigt, daß bei bestimmtem Umgang mit T- und B-Zellen diese dann resistent gegenüber Apoptose werden, was durch die Menge der Bcl-x_L



Abb. 5.37: Die mRNA-Expression von CD95-Signalmolekülen der Tag 0, Tag 1 und Tag 6 T-Zellen korreliert nicht mit der Sensitiviät gegenüber CD95-vermittelter Apoptose

Die Detektion der mRNA erfolgte über RT-PCR; die Migrationsposition des 508 bp Caspase-8-C-terminalen Fragmentes ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Expression vermittelt werden soll (Broome et al., 1995; Boise et al., 1995b; Choi et al., 1995). Aufgrund dessen wurden die Expressionen von Bcl-2-Familienmitgliedern in d0, d1 und d6 T-Zellen untersucht (Abb. 5.38). Es stellte sich heraus, daß sich die Proteinmenge von Bcl-2 durch T-Zell-Aktivierung nicht änderte (Abb. 5.38B). Auch die Expression der apoptosefördernden Moleküle Bax- α und Bik blieb unverändert, was durch RT-PCR und Western-Blot gezeigt werden konnte (Abb. 5.38, Daten nicht gezeigt). Es ließ sich jedoch ein bemerkenswerter Unterschied in der Expression von Bcl-x_L sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene zeigen (Abb. 5.38A und B). Während Bcl-x_L in d0 T-Zellen kaum detektierbar war, wurde Bcl-x_L in den resistenten d1 T-Zellen stark hochreguliert. In den Apoptosesensitiven d6 T-Zellen war Bcl-x_L hingegen wieder fast undetektierbar.





RT-PCR und Western-Blots werden gezeigt. Aufgrund einer sehr geringen Anzahl von Bcl-2 mRNA-Kopien konnte Bcl-2 nicht durch RT-PCR nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit war der Signalweg des CD95-Rezeptors noch wenig erforscht. Der damalige Kenntnisstand umfaßte die Notwendigkeit der Rezeptoroligomerisierung für die Signaltransduktion (s. Kapitel 3.5.1) und die Entdeckung der entscheidenden signalübermittelnden Domäne im intrazellulären Teil von CD95, der Todesdomäne ("Death Domain", DD) (s. Kapitel 3.5.2). Welche Moleküle an CD95 binden und das Apoptosesignal weiterleiten würden, war unbekannt. Erst im Laufe dieser Arbeit wurden sieben mögliche Kandidaten publiziert. Sie wurden mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems in Hefe gefunden (s. Kapitel 3.5.3). Auch der Signalweg unterhalb der Rezeptorebene ließ Fragen offen. Es wurden die Ceramide, Protein-Tyrosin-Kinasen, Phosphatasen und PKC diskutiert (s. Kapitel 3.5.4). Von den Mitgliedern der Caspasen waren zu Beginn dieser Arbeit lediglich drei bekannt (Caspase-1 bis -3) (s. Kapitel 3.5.5). Ihre Rolle in den Apoptosesignalwegen war nicht gesichert.

6.1 Der Tod-induzierende Signalkomplex (DISC) des CD95-Rezeptors

In dieser Arbeit wurden mit einem biochemischen Ansatz drei Moleküle (FADD, Caspase-8 und CAP3) gefunden und charakterisiert, die an stimulierte CD95-Rezeptoren binden und das Apoptosesignal in die Zelle weiterleiten. Sie wurden anfangs als CAPs (für "Cytotoxicity-dependent APO-1-associated Proteins ") bezeichnet, und oligomerisierte Rezeptoren mit den assoziierten CAPs erhielten den Namen DISC (für "Death-Inducing Signaling Complex") (Kischkel et al., 1995). Die Identifikation der CAPs ergab, daß von den sieben publizierten CD95-assoziierten Proteinen FADD/MORT1 (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995) als CAP1 und 2 charakterisiert werden konnte. CAP1 und 2 entstehen durch unterschiedliche Serinphosphorylierung von FADD (Kischkel et al., 1995; Zhang und Winoto, 1996). Erste Hinweise auf eine Proteinkinase, die FADD phosphoryliert, konnten in dieser Doktorarbeit etabliert werden (s. Kapitel 5.1.3.2). Es handelt sich um ein ca. 70 kD großes Protein, das eine Autophosphorylierungsaktivität besitzt. Jedoch ist die Funktion dieser Phosphorylierung noch vollkommen unklar und wird von C. Scaffidi im Rahmen seiner Doktorarbeit eingehend untersucht. Die anderen sechs möglichen Signalmoleküle entsprechen keinem CAP. Damit bleibt für diese Moleküle die Frage zu beantworten, ob sie im CD95-Signalweg überhaupt benötigt werden, insbesondere da alle bisherigen Daten aus in vitro-Experimenten stammen. Ein großer Nachteil der in vitro-Systeme besteht darin, daß die Proteine überexprimiert werden. Die Funktion des überexprimierten Moleküls kann dabei aber von der des Proteins im physiologischen Kontext abweichen. So kann es z. B. zu Bindungen zwischen Molekülen kommen, die in vivo aufgrund zu geringer Affinitäten keine Wechselwirkung zeigen. Wird die Konzentration eines Moleküls jedoch durch Überexpression erhöht, können schon diese geringen Bindungsaffinitäten für eine Assoziation ausreichen. Die Proteine können dann in Signalwege und zelluläre Funktionen eingreifen, in denen sie in vivo nicht involviert sind. Dieser Punkt wird im nachfolgenden wiederholt aufgegriffen werden.

Die anderen CAPs, CAP3-6, stimmten nicht gleichzeitig im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt (pl) mit den veröffentlichten CD95-assoziierten Proteinen überein. Diese CAPs stellten somit unbekannte Moleküle dar. Die Sequenzierung von CAP3 und 4 ergab, daß CAP4 ein neues Mitglied der Caspasen war und CAP3 zumindestens im N-terminalen Bereich identisch mit CAP4 zu sein scheint (s. Kapitel 6.2). CAP4 wurde in unserer Veröffentlichung FLICE und von zwei anderen Gruppen, die zeitgleich und später dieselbe Protease publizierten, MACH und Mch5 genannt (Muzio et al., 1996; Boldin et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996). Ende 1996 wurde dann eine neue Nomenklatur für diese Cysteinproteasenfamilie eingeführt und damit bekam CAP4 (FLICE) den Namen Caspase-8 (Alnemri et al., 1996). Die Charakterisierung von CAP5 und 6 führte zur Erkenntnis, daß sie die Prodomänen von Caspase-8 sind (s. Kapitel 6.2).

Um die Identität von CAP 3 und 4 zu klären, wurden diese Proteine, die bis dahin ausschließlich als ³⁵S-markierte Spots vorlagen, so angereichert, daß sie auf silbergefärbten 2D-Gelen sichtbar wurden. Die so erzielten Mengen hätten aber bei weitem nicht gereicht, CAP3 und 4 mit konventionellem Edmanabbau zu sequenzieren. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Matthias Mann (EMBL, Heidelberg) die Methode der direkten Sequenzierung von Femtomolen silbergefärbter Proteine von 2D-Gelen mittels Nano-Electrospray Tandem-Massenspektrometrie (Nano-ES-MS/MS) genutzt. Die Gruppe um M. Mann hatte kurz zuvor die erste Klonierung eines unbekannten Testproteins mit dieser Technik publiziert (Wilm et al., 1996). Es wurde auf einem analytischen Standard-2D-Gel der immunpräzipitierte DISC von K50-Zellen aus etwa 5 l Zellkultur aufgetrennt. Die beiden silbergefärbten Proteinspots, die CAP3 und 4 entsprachen, wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und diese Mischung zur Sequenzierung verwendet. Die Menge an CAP4, die schließlich sequenziert wurde, entsprach etwa 200 fmol. Dies ist etwa 1/1000 der zur Sequenzierung mit herkömmlichen Techniken benötigten Menge. Die Sequenzierung erbrachte die vollständige Sequenz von 5 Peptiden, die 41 Aminosäuren des gesuchten Proteins abdeckten (s. Kapitel 5.1.5.1). Es wurde zuerst versucht, das gesuchte Protein mit Hilfe von Proteindatenbanken zu identifizieren. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren etwa 60 % der cDNAs des menschlichen Genoms in Bruchstücken in den sogenannten "Expressed Sequence Tags", den EST-Sequenzen, enthalten. In der Tat ergab eine Suche mit den sequenzierten Peptiden, daß sich das Peptid T1 in einem Klon der EST-Datenbank (GenBank Zugangsnummer N43544) wiederfand. Diese 103 Aminosäure-lange Sequenz war homolog zum C-Terminus aller bekannten Caspasen. Um die vollständige Sequenz dieser neuen Caspase zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe V. Dixit die private cDNA-Datenbank von Human Genome Sciences (Rockville, Maryland, USA) durchsucht. Diese Firma besaß nach eigenen Angaben schon etwa 80 % der exprimierten Gene in cDNA Form in ihrer Datenbank. Tatsächlich fand sich ein vollständiger Klon, der alle 5 durchsequenzierten Peptide enthielt (GenBank Zugangsnummer U58143). CAP3 wurde auf die gleiche Weise sequenziert (s. Kapitel 5.1.6).

Caspase-8 stellt das erste auf diese Weise klonierte Molekül dar. Mit etablierten Methoden hätte die Klonierung erheblich länger gedauert. Es hätte 100- bis 1000-fach mehr Protein aufgereinigt werden müssen, um es mit der Methode über Edman-Abbau zu sequenzieren. Auch die Nutzung der Datenbanken, in denen im Zuge des humanen Genomprojektes die menschlichen Gene sequenziert werden, ließ die Notwendigkeit einer Klonierung im herkömmlichen Sinn überflüssig werden. Zusätzlich begünstigte der schnelle Datenaustausch über das Internet das Arbeiten mit den Kooperationspartnern. Dies führte letztendlich dazu, daß zwischen dem Austausch der ersten

80

Caspase-8-Peptidsequenzen und der fertigen Publikation (Muzio et al., 1996) lediglich 8 Tage vergingen. So scheint in Zukunft die Identifikation von Banden und Spots direkt von Proteingelen wesentlich einfacher zu werden, da mit den verbesserten Methoden in der Massenspektrometrie in Kombination mit den Nukleotid- und Protein-Datenbanken, diese Proteine direkt zugänglich werden.

6.2 Caspase-8 als Schlüsselmolekül im Todesrezeptor-Signalweg?

Die Entdeckung, daß zu dem CED-3-Protein in C. elegans menschliche Homologe (Caspasen) existieren, deutete auf die Konservierung der Todessignalwege im Tierreich und auf die Wichtigkeit der Caspasen generell in der Apoptose hin. Jedoch gab es zu Beginn dieser Arbeit wenig experimentelle Daten, die diese Idee untermauerten. Die Notwendigkeit der Caspasen speziell im CD95-Signalweg war bis dahin vollkommen ungeklärt. Im Laufe dieser Arbeit konnte von anderen Gruppen gezeigt werden, daß sowohl Caspase-1 als auch Caspase-3 in der CD95-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen. So waren Thymozyten in Caspase-1^{-/-}-Mäusen resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Kuida et al., 1995). Diesen Zelltod konnte man mit zwei Inhibitoren blockieren, die spezifisch Caspase-1 hemmen konnten, nämlich mit CrmA (Komiyama et al., 1994; Schlegel et al., 1996) und mit dem Peptid Ac-YVAD-CHO (Walker et al., 1994; Nicholson et al., 1995). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß eine Caspase-3-ähnliche Protease im CD95-Signalweg existiert (Enari et al., 1996). Später wurde jedoch klar, daß beide Caspasen nicht essentiell für die CD95vermittelte Apoptose sind. Eine Reihe von Zellen, die Caspase-1 nicht exprimieren, sind sehr sensitv gegenüber dem CD95-induzierten Zelltod. In Jurkat-T-Zellen und zwei Karzinomzellinien konnte gezeigt werden, daß sie keine Caspase-1 exprimierten und auch nicht durch Ac-YVAD-CHO am CD95-vermittelten Zelltod gehindert werden konnten (Hasegawa et al., 1996; Schlegel et al., 1996). Der Caspase-3-spezifische Inhibitor AC-DEVD-CHO konnte jedoch die Apoptose in diesen Zellen gut blockieren. Dies bedeutet, daß eine Caspase-3-ähnliche Protease im CD95-Signalweg involviert ist. Neuere Untersuchungen zeigen, daß weder Caspase-1 noch Caspase-3 essentiell für den durch ZTLs-induzierten CD95-Signalweg ist (Darmon und Bleackley, 1996). Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß eine zusätzliche Caspase oberhalb von Caspase-1 und -3 existieren muß.

Das in dieser Arbeit charakterisierte CAP4 führte zur Erkenntnis, daß es sich um eine Caspase handelt, die Bestandteil des CD95-DISC ist und damit die oberste Caspase im CD95-Signalweg darstellt. Im Verlauf dieser Doktorarbeit führten weitergehende Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die Aktivierung dieser Caspase-8 den CD95-DISC benötigt. *In vitro*-Caspase-8-Aktivität konnte durch Ac-DEVD-CHO, jedoch nicht durch Ac-YVAD-CHO, inhibiert werden. Dies bestätigt, daß Caspase-8 eine Caspase-3-ähnliche Substratspezifität besitzt. Caspase-8 wurde ebenfalls effektiv *in vivo* und *in vitro* durch zVAD-fmk inhibiert. Die Inhibiton erfolgte dabei bereits auf der DISC-Ebene. Überexpression von CrmA blockierte ebenfalls den CD95-Signalweg. Jedoch hemmte CrmA den CD95-Signalweg nicht auf der DISC-Ebene. CrmA scheint die aktive Caspase-8 im Zytosol zu blockieren, wie mit rekombinanter Caspase-8 gezeigt wurde (Srinivasula et al., 1996a; Muzio et al., 1997). Somit blockt dieser virale Inhibitor wahrscheinlich den CD95-Signalweg ebenfalls sehr früh, nämlich auf der Stufe der aktiven Caspase-8-Untereinheiten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Caspase-8 nur gespalten wird, wenn sie an den DISC gebunden ist. Durch Bindung der Caspase-8 an den DISC könnte es zu einer Konformationsänderung kommen, wodurch das Enzym proteolytisch aktiv wird. Die erste Spaltung der Caspase-8 erfolgt am Asp-374. Dies führt zur Bildung der N-terminalen p43- und der C-terminalen p12-Intermediate. Weitere Prozessierung geschieht wahrscheinlich am Asp-223 und Asp-398. Dabei entstehen die aktiven Untereinheiten p10 und p18 und die Caspase-8-Prodomäne p26. Die autoproteolytische Aktivierung scheint ein allgemeingültiger Mechanismus für Caspasen zu sein. Es konnte sowohl für Caspase-1 als auch für Caspase-3 gezeigt werden, daß sie sich selbst spalten können (Ramage et al., 1995; Wang et al., 1996; Yamin et al., 1996). (Pro)-Caspase-1 muß für die Aktivierung oligomerisieren (Gu et al., 1995b), ähnlich wie (Pro-)Caspase-8, die die Oligomerisierung mit FADD am DISC benötigt. Die erste Spaltung bei Caspase-1 erfolgt am Asp-297, welches die erste der zwei distalen Spaltstellen darstellt (Ramage et al., 1995; Yamin et al., 1996). Diese ähnelt der für Caspase-8 gefundenden Spaltstelle, die von uns publiziert wurde (Medema et al., 1997). Dann wird bei Caspase-1 ein 19 As-langer und bei Caspase-8 ein 24 As-langer Bereich, der sich zwischen den großen und kleinen Untereinheiten befindet, proteolytisch entfernt. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß bei Pro-Caspase-1 während der Konformationsänderungen auch intermolekulare Proteolyse stattfindet (Yamin et al., 1996). Interessanterweise ließ sich eindeutig eine Spaltung von enzymatisch inaktiver Caspase-8 beobachten, die am C-Terminus deletiert war und eine Mutation im aktiven Zentrum von Cys-360 zu Ser-360 besaß. Dies deutet ebenfalls auf eine intermolekulare Spaltung hin. Dabei könnten Moleküle der Wildtyp-Caspase-8, die mit dem DISC immunpräzipitiert wurden, die mutierte Caspase-8 spalten. Obwohl die Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-8 analog zu geschehen scheint, kann nicht ausgeschlossen werden, daß nicht die Oligomerisierung, sondern vielleicht andere Faktoren im DISC für die Aktivierung verantwortlich sind. Einer dieser Faktoren könnte CAP3 sein.

Wie die Caspase-8 *in vivo* aktiviert wird, faßt Abb. 6.1 zusammen. Die Aggregation von CD95, die z. B. durch den agonistischen Antikörper anti-APO-1 induziert werden kann, führt dazu, daß FADD (CAP1 und 2) an die zytoplasmatische Todesdomäne des CD95-Moleküls rekrutiert wird. FADD wirkt als Adapter und bindet Caspase-8 über eine DED-DED-Wechselwirkung an den Rezeptor (Abb. 6.1I). Caspase-8 wird daraufhin autoproteolytisch in die aktiven Untereinheiten p10 und p18 gespalten, die, vom Rezeptor freigesetzt, im Zytosol weitere Substrate spalten können (Abb. 6.1 II). Dabei wird die gesamte zelluläre Caspase-8 aktiviert. Die Bindung von Caspase-8 an FADD ohne den restlichen DISC reicht nicht aus, um Caspase-8 zu aktivieren. Die Prozessierung von Caspase-8 führt außer der Bildung des aktiven Enzyms (p10 und p18) noch zur Entstehung der Prodomänen (p26 (CAP5) und p24(CAP6)), die sowohl am DISC (Abb. 6.1 III) als auch im Zytosol gefunden werden.



Abb. 6.1: Modell der Caspase-8-Aktivierung

(Fortsetzung Abb. 6.1)

Durch Oligomerisierung von CD95 durch den agonistischen Antiköper anti-APO-1 werden FADD (CAP1 und 2), CAP3 und Caspase-8 (CAP4) an die zytoplasmatische Todesdomäne von CD95 über DD-DD-, bzw. DED-DED-Wechselwirkungen angelagert (I). Caspase-8 wird in einem zweistufigen - wahrscheinlich autoproteolytischen -Mechanismus zu aktivem Enzym gespalten, das, so postuliert, ähnlich wie Caspase-1 und Caspase-3, als Heterodimer (p18/p10)₂ vorliegt (II). Die Prodomänen p26 (CAP5) und p24 (CAP6) verweilen kurz am DISC, bevor sie in das Zytoplasma abgegeben werden und eine neue Caspase-8 aktiviert werden kann. Mit Hilfe des R2-Ak, der die p10-Untereinheit der Caspase-8 erkennt, konnte die gespaltene p10-Untereinheit bereits 1 min nach anti-APO-1-Stimulation im Western-Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Damit ist die Spaltung von Caspase-8 das schnellste proteolytische Geschehen, das in allen bekannten Apoptoseformen bekannt ist.

Es konnte gezeigt werden, daß die physiologische Aktivierung von Caspase-8 im CD95-Signalweg am DISC erfolgt. Versuche, den DISC in vitro zu rekonstituieren, waren nicht erfolgreich. So wurden in vitro-translatierte ³⁵S-markierte Caspase-8 und der rekombinante zytoplasmatische Teil von CD95 (CD95zT) zusammen mit GST-FADD-Fusionsprotein bzw. GST-FADD-Fusionsprotein nach Inkubation mit SKW6.4-Lysat - damit sollte endogenes FADD an CD95zT binden - inkubiert (s. Kapitel 5.1.7.2). Hierbei konnte keine Caspase-8-Spaltung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine FADD-IP von unstimulierten oder stimulierten Zellen führte ebenfalls nicht zu einer Caspase-8-Spaltung. Ein Grund könnte das Fehlen von CAP3 in diesen Experimenten sein. Die Rolle von CAP3 im DISC bleibt noch zu bestimmen. Obwohl die Sequenzierung von zwei Peptiden aus CAP3 ergab, daß CAP3 die Prodomäne von Caspase-8 besitzt, kann es kein Spaltprodukt von Caspase-8 sein. Hierfür gibt es drei Gründe. Erstens verändert sich CAP3 nicht während der Spaltung von Caspase-8 zu CAP5 und 6. Zweitens ähnelt kein Produkt im in vitro-Caspase-8-Spaltungsexperiment CAP3, und drittens ließ sich mit dem Caspase-8-spezifischen R1-Ak im Gegensatz zu CAP5 und 6 kein CAP3 immunpräzipitieren. Obwohl die Identität von CAP3 immer noch nicht vollständig bekannt ist, scheint es eine wichtige regulatorische Funktion zu besitzen, denn CAP3 ist im DISC von allen getesteten Zellinien vorhanden. CAP3 könnte eventuell eine der Isoformen von Caspase-8 sein, die keine Caspasendomäne besitzt (Boldin et al., 1996). Doch stimmt keine der publizierten N-terminalen MACHβ-Isoformen mit dem Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt von CAP3 überein.

Es wurden mehrere Isoformen veröffentlicht, die das Bild der Caspase-8-Aktivierung komplizierter erschienen ließen (Boldin et al., 1996; Alnemri et al., 1996). Scaffidi et al. (1997) konnten jedoch mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (mAks) zeigen, daß zwei Isoformen bevorzugt in Zellen exprimiert werden und daß beide Isoformen Bestandteil des CD95-DISC sind. Nach neuer Nomenklatur (Alnemri et al., 1996) werden diese Isoformen Caspase-8/a (CAP4/FLICE/MACHa1) und Caspase-8/b (MACHa2) genannt. Der Unterschied zwischen den beiden Isoformen liegt lediglich in einer 15 As langen Deletion im Bereich zwischen den DEDs und der Proteasedomäne (Abb. 6.2). Das heißt, beide Isoformen erzeugen die gleiche aktive Protease. Außerdem konnte bis jetzt kein Unterschied in der Aktivierung und Funktion der Isoformen gefunden werden. Aus den in vitro-Caspase-8-Spaltungsexperimenten und der nachfolgenden Arbeit von Scaffidi et al. (1997) läßt sich nun ein detaillierter Mechanismus der Caspase-8-Spaltung ableiten: Nach Stimulation des CD95-Systems und Ausbildung des DISC werden die beiden Caspase-8-Isoformen (Caspase-8/a (CAP4) und Caspase-8/b) zunächst in ein 43-kDa-, ein 41-kDa- (p43, p41) und ein 12-kDa-Fragment (p12) gespalten. Aus dem p12-Fragment entsteht daraufhin das p10-Fragment. p43 bzw. p41 werden weiter prozessiert, wodurch p26 (CAP5) bzw. p24 (CAP6) und p18 entstehen. Die aktive Form von Caspase-8 bildet sich wahrscheinlich durch Assoziation von p10 mit dem p18-Fragment und anschließender Dimerisierung zu (p10/p18)₂. Ein solches Heterodimer wurde auch für die verwandten Proteasen Caspase-1 und -3 kristallographisch nachgewiesen (Walker et al., 1995; Wilson et al., 1994) und wurde daher auch für Caspase-8 postuliert (Medema et al., 1997). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 6.2 illustriert.



Abb. 6.2: Aktivierungsmechanismus der beiden Caspase-8-Isoformen

Mit I., II. und III. sind die im Text erläuterten Proteolyseschritte gekennzeichnet. Die DEDs, die p10- und p18-Untereinheiten des Enzyms sind als Kästchen gekennzeichnet. Die schwarze Box symbolisiert die 15 Aminosäuren, die Caspase-8/a von Caspase-8/b unterscheiden (Spaltstellen nach Medema et al., 1997).

Die Notwendigkeit der Caspase-8 im CD95-Signalweg konnte in dieser Arbeit wie oben beschrieben gezeigt werden. Da die anderen Todesrezeptoren ebenfalls eine intrazelluläre DD besitzen, liegt die Vermutung nah, daß auch sie Caspase-8 (indirekt über FADD oder FADD-ähnliche Moleküle) als essentielles Signalmolekül rekrutieren. Im Einklang mit dieser Vermutung blockierten FADD-DN und die funktionell inaktive Caspase-8 nicht nur den CD95-Signalweg, sondern verhinderten auch die TNF-RI-induzierte Apoptose in Überexpressionssystemen (Chinnaiyan et al., 1996c; Boldin et al., 1996). Überexpression von Molekülen mit DEDs oder DDs wie Caspase-8 oder FADD könnten jedoch jede andere DED- oder DD-Proteinbindung zum Rezeptor blockieren und damit den ganzen Signalweg unterbinden. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnten weder wir noch andere eine direkte Interaktion von FADD mit TNF-RI nachweisen (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe; H.-B. Shu und D. Goeddel, persönliche Mitteilung). Daraus folgt, daß TNF-RI entweder einen anderen

Satz von Signalmolekülen benutzt (z. B. ein FADD-ähnliches Molekül) oder daß FADD indirekt an den Rezeptor koppelt (Abb. 6.3). Die Beantwortung der Frage, ob Caspase-8 durch TNF-RI aktiviert wird, sollte dieses Problem klären. Mit TNFα-stimulierte Zellen zeigten, daß Caspase-8 prozessiert wird (unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe), woraus zu schließen ist, daß TNF-RI tatsächlich einen ähnlichen Signalweg zur Induktion der Apoptose benutzt. Zur Zeit ist es noch unklar, ob Caspase-8 durch Assoziation mit TNF-RI aktiviert wird, oder ihre Aktivierung das Ergebnis einer sekundären Aktivierung ist. Im Gegensatz zu CD95-Signalen sind TNF-RI-Signale, die zur Induktion des Zelltods führen, viel differenzierter (Abb. 6.3). So führt die Stimulation des TNF-RI neben der Induktion von Apoptose über Caspasen zusätzlich sowohl zur Aktivierung von NF-κB und MAPKs als auch zur Arachidonsäure-Freisetzung (Liu et al., 1996; Ichijo et al., 1997). Die verantwortlichen Moleküle TRADD, RIP, TRAF2, MADD und c-IAP1 binden dabei zum Teil direkt bzw. indirekt an den oligomerisierten Rezeptor (Liu et al., 1996; Hsu et al., 1996; Shu et al., 1996; Schievella et al., 1997). Diese Moleküle wurden alle mit dem Two-Hybrid-System gefunden. Dabei sind TRAF2 und c-IAP1 die einzigen Moleküle ohne eine DD. Sie binden auch nicht direkt, sondern indirekt über TRADD an den TNF-RI (Shu et al., 1996). Ebenso scheint RIP TRADD zur Assoziation zu benutzen (Hsu et al., 1996). Bis jetzt konnte eine in vivo-Assoziation lediglich von TRADD, TRAF2, RIP und c-IAP1 gezeigt werden (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996; Shu et al., 1996). In der Veröffentlichung von Liu et al. (1996) wurde eine anti-apoptotische Wirkung von NF-kB nachgewiesen. Dabei wird NF-kB durch TRAF2 und RIP aktiviert. Die Funktion der MAPK, die durch TRAF2, RIP und MADD induziert werden, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Die MADD-vermittelte Arachidonsäure-Freisetzung führt zur Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen, die proinflammatorische Mediatoren darstellen (Heller und Kronke, 1994). Kürzlich wurde ein weiteres DD-Protein identifiziert, welches an TNF-RI in vitro und bei Überexpression in 293-Zellen bindet. Dieses Protein, RAIDD/CRADD (Duan und Dixit, 1997; Ahmad et al., 1997) trägt eine DD an seinem C-Terminus, und an seinem N-Terminus hat es Homologie zur Caspase-2-Prodomäne. Es assoziierte effizienter mit TNF-RI in Gegenwart von RIP. Daher wurde angenommen, daß RAIDD an TNF-RI koppelt und die Aktivierung von Caspase-2 induziert. Es sind allerdings keine in vivo-Daten verfügbar, und der Mechanismus der Caspase-2-Aktivierung bleibt noch zu bestimmen.

Für den Todesrezeptor DR3 wurde berichtet, daß er an FADD, TRADD, TRAF2 und an Caspase-8 bindet (Chinnaiyan et al., 1996a) (Abb. 6.3). Seine TNF-RI-ähnliche Struktur läßt erwarten, daß er eine ähnliche Signalfunktion wie TNF-RI besitzt. Wie TNF-RI kann DR3 Apoptose induzieren und NF-κB aktivieren (Chinnaiyan et al., 1996a; Bodmer et al., 1997; Kitson et al., 1996; Marters et al., 1996b; Screaton et al., 1997b; Degli-Esposti et al., 1997). Eine mögliche Caspase-8-Rekrutierung in den Rezeptorsignalkomplex könnte daher möglich sein. Es ist jedoch noch kein Ligand kloniert und noch kein agonistischen Antikörper erzeugt worden. Alle Informationen über Signalwege sind durch Verwendung von Überexpressionssystemen entstanden, die - wie besprochen - vorsichtig zu bewerten sind.

DR4, ein weiteres Mitglied der Todesrezeptoren, war der erste klonierte Rezeptor, der TRAIL binden konnte (Pan et al., 1997b) (s. Kapitel 3.2). Der TRAIL-Rezeptorsignalweg scheint kein FADD zu benötigen, da FADD-DN TRAIL-induzierte Apoptose nicht verhindern konnte (Marters et al., 1996a).

Sara Mariani aus unserer Arbeitsgruppe beobachtete aber einen kompletten TRAIL-R-Signalblock, als sie BJAB-Zellen mit TRAIL behandelte, die FADD-DN überexprimierten (persönliche Mitteilung). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten mit unterschiedlichen Mengen an überexprimiertem FADD-DN erklärt werden, denn FADD-DN ist kein echtes dominant-negatives Molekül, sondern dient als kompetitiver Inhibitor. Vor kurzem wurde ein zweiter TRAIL-R identifiziert (TRAIL-RII/DR5), der FADD bindet (Walczak et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997a) (Abb. 6.3). Die Existenz von zwei

bindet (Walczak et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Pan et al., 1997a) (Abb. 6.3). Die Existenz von zwei TRAIL-Rezeptoren könnte eine alternative Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse sein, die hinsichtlich der Beteiligung von FADD am Signalweg bestehen. Weiterhin stellte sich heraus, daß TRAIL-R-Signale die Aktivierung von Caspasen einschließen (Mariani et al., 1997). Bei Untersuchungen der TRAIL-sensitiven BJAB-Zellen durch unsere Arbeitsgruppe wurde kürzlich eine Caspase-8-Aktivierung nach Inkubation mit TRAIL entdeckt (S. Mariani, persönliche Mitteilung). Es ist wahrscheinlich, daß Caspase-8 oder andere Caspasen im TRAIL-R-Signalweg involviert sind. Dies deutet darauf hin, daß der TRAIL-R-Signalweg ähnlich wie der CD95-Signalweg strukturiert ist, zumal auch der TRAIL-induzierte Zelltod sehr schnell abläuft. Damit scheint sich anzudeuten, daß alle Todesrezeptoren dieselbe Art von Signalweg benutzen, um Apoptose auszulösen. Diese Signalweg scheinen alle Caspasen zu aktivieren. Vielleicht unterscheiden sie sich lediglich in den Adaptormolekülen an den Rezeptoren und eventuell den ersten Caspasen, um Spezifität zu gewährleisten. Anschließend könnten sie alle in einem gemeinsamen Signalweg zusammenkommen, denn der durch die einzelnen Todesrezeptoren ausgelöste Zelltod ist ähnlich.







Ein anderer Ansatz, die Bedeutung der Caspase-8 in den Signalwegen der Todesrezeptoren oder zumindestens im Signalweg von CD95 zu zeigen, ist die Untersuchung des Caspase-8-Gens in bezug auf Krankheiten. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Peter Lichter (DKFZ, Heidelberg) und Petra Kioschis aus der Arbeitsgruppe von Annemarie Poustka (DKFZ, Heidelberg) Mensch- und Maus-Caspase-8-Gene durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung auf Chromosom 2g33q34 beim Menschen und auf Chromosom 1 in der Region 1B-proximalC bei der Maus lokalisiert (Kischkel et al., 1997). Anschließend wurden die Datenbanken nach Krankheiten, die den Regionen auf diesen Chromosomen zugeordnet worden sind, durchsucht. Die Fluoreszenzsignale waren spezifisch, da keine weiteren Signale an anderen Chromosomen beobachtet wurden. Es gibt also keinen Hinweis auf Pseudogene. Das humane Caspase-8-Gen wurde in der gleichen Region wie Caspase-10 und c-FLIP (auch FLAME-1, Casper, I-FLICE oder CASH genannt) lokalisiert (Srinivasula et al., 1997; Wallach, 1997). Das c-FLIP-Molekül scheint ein Regulator der Apoptose mit Ähnlichkeit zu Caspase-8 und -10 zu sein. Dies entspricht der kürzlich berichteten Lokalisierung des Caspase-8-Gens auf Radiation-Hybrid-Panels (Srinivasula et al., 1997). Da Caspase-8, Caspase-10 und c-FLIP miteinander verwandt sind, läßt diese Kolokalisierung der funktionell verwandten Gene einen Multigen-Ort vermuten, an dem die Gen-Expression durch einen gemeinsamen Mechanismus koordiniert sein könnte. Wegen der Genhomologien und analog zu anderen Multigen-Orten kann angenommen werden, daß dieses Gen-Cluster durch Gen-Duplikation entstand. Für einige der anderen Caspasen sind die Gene jedoch auf anderen Chromosomen lokalisiert (Caspase-2, -3, -6, -7 auf Chromosom 7q35, 4q34, 4q25, 10q25) (Tiso et al., 1996; Nasir et al., 1997; Bullrich et al., 1996; Juan et al., 1997). Die Lokalisierung der Mensch- und Maus-Caspase-8-Gene erweitert den bekannten syntenen Bereich zwischen humanem Chromosom 2g33-34 und Chromosom 1 im Gebiet 1B-proximalC bei der Maus (DeBry und Seldin, 1996).

Eine Datenbanksuche in "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) ergab eine Reihe von Krankheiten, die in dieser Chromosomenregion (2q33-34) beim Menschen lokalisiert wurden. Nachfolgend sind die Krankheiten aufgelistet, die durch eine Mutation der Caspase-8 verursacht sein könnten: familiäre atypische Mykobakteriosis, Insulin-abhängiger Diabetes mellitus, Asthma und T-Zell-Leukämie/Lymphom-4 (TCL-4). Die Rolle von Caspase-8 in diesen Krankheiten muß in späteren Experimenten getestet werden. Zusätzlich ergab eine MEDLINE-Datenbanksuche eine homozygote Deletion beim kleinzelligen Lungenkarzinom auf Chromosom 2q33 (Kohno et al., 1994). Weitere Studien begrenzten die Region auf 220 kbp (Kohno et al., 1995; Kohno et al., 1996). Es wird ein Tumorsuppressorgen in diesem Bereich vermutet. Die derzeit von unserer Gruppe durchgeführten Untersuchungen könnten Caspase-8 als das gesuchte Gen identifizieren. In der Tat zeigen vorläufige Untersuchungen, daß in dieser Tumorart Caspase-8 in vier von sieben Zellinien nicht exprimiert wird (Ute Sartorius, persönliche Mitteilung). In allen anderen getesteten Zellinien aus unterschiedlichen Geweben war Caspase-8 dagegen normal exprimiert (Scaffidi et al., 1997). Die Datenbanksuche in der "Mouse Genome Database" (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) ergab keine unbekannten lokalisierten Krankheiten auf dem Chromosom 1 im Gebiet 1B-proximalC bei der Maus.

Die Untersuchungen zeigen, daß das Caspase-8-Gen ein Krankheitspotential besitzt. Sollten die identifizierten Krankheiten jedoch nichts mit diesem Gen zu tun haben, könnte dies trotzdem für die Relevanz des Proteins für die Signaltransduktionen der Todesrezeptoren sprechen. Mutationen im CD95 oder CD95L führen zum Phänotyp von *lpr-* und *gld-*Mäusen oder ALPS-Patienten (s. Kapitel 3.4.1). Sollte Caspase-8 lediglich im CD95-Signalweg essentiell sein, würde bei Ausfall dieses Proteins ein ähnlicher Phänotyp erwartet werden. Wird jedoch diese Protease auch von den anderen Todesrezeptoren benötigt, könnte eine homozygote Mutation eine verheerende Wirkung aufweisen und letal wirken. Die Antwort wird die Generierung und Charakterisierung einer Caspase-8-"knock-out"-Maus liefern. Der Phänotyp dieser Maus - soweit vorhanden - wird die Funktion dieses Moleküls erklären helfen.

6.3 Die DD und DED repräsentieren Bindungsmotive

Die Identifizierung des CD95-DISC zeigte die Wichtigkeit zweier Domänen im initialen Schritt des CD95-vermittelten Zelltodes auf. Diese Domänen sind die DD ("Death Domain") und DED ("Death Effector Domain"). Die DD ist im CD95-Rezeptor und in FADD, während die DED in FADD und der Caspase-8 zu finden ist. Für beide Domänen konnte bis jetzt keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Ihre Aufgabe scheint die Wechselwirkung mit anderen Molekülen zu sein. Für die DD des CD95 konnte gezeigt werden, daß sie selbstaggregiert (Varfolomeev et al., 1996) und zusätzlich andere Moleküle mit und ohne DD bindet (s. Kapitel 3.5.3). Proteine mit DD sind die Moleküle FADD und RIP. Für FADD konnte eine in vivo-Assoziation gezeigt werden (s. Kapitel 5.1.2). Im Gegensatz zur ursprünglichen Idee, daß RIP im CD95-Signalweg eine Rolle spielt, wurde RIP zusätzlich als wichtiger Bestandteil der TNF-RI-vermittelten NF-κB-Aktivierung identifiziert. In einer mutanten Zellinie, die kein RIP exprimierte, war der CD95-Signalweg nicht gestört, während die TNF-RI-vermittelte NF-kB-Aktivierung blockiert war (Ting et al., 1996). Nach Rekonstitution der RIP-Expression war auch die NF-kB-Aktivierung in dieser Zellinie wiederhergestellt. Zusätzlich konnte eine aktivierungsabhängige Assoziation von RIP an den TNF-RI-Signalkomplex in vivo gezeigt werden (Hsu et al., 1996), wohingegen ein Nachweis einer in vivo-Assoziation an den CD95-Rezeptor bis jetzt nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Folglich könnte die Wechselwirkung von RIP mit CD95 ein Überexpressionsartefakt sein. Auf der anderen Seite wäre es auch möglich, daß RIP für die JNK/SAPK-Aktivierung im CD95-Signalweg notwendig ist. Dies wird in Kapitel 6.5 eingehend diskutiert. Moleküle ohne DD, die an die CD95-DD binden, sind die schon in Kapitel 3.5.3 erwähnten Proteine DAXX, UBC-FAP, FAF1 und Sentrin. Ob diese Bindung in vivo existiert, ist nicht geklärt. Auch die mögliche Bindungsstelle ist unbekannt. Der Wissensstand über die DED im Vergleich zur DD ist geringer. Wie schon gesagt, ist keine Enzymaktivität identifiziert worden. Es ist ebenfalls unklar, ob die DEDs selbstaggregierend sind und ob sie an andere Motive außer DEDs binden. Gesichert ist, daß die DED zur Assoziation des DED-Proteins FADD mit den DED-Molekülen Caspase-8 und CAP3 dient.

Da beide Domänen Bindungsmotive darstellen und FADD damit als Adaptor agiert, stellt sich die Frage nach dem Sinn dieses Adaptors. Die direkte Bindung der Caspase-8 und CAP3 an die CD95-DD wäre eine einfachere Lösung gewesen. Dazu hätte Caspase-8 und CAP3 anstatt einer DED lediglich eine DD besitzen müssen. Ein Grund könnte die Notwendigkeit einer Komplexbildung zur Aktivierung der Caspase-8 sein. Dieser Komplex benötigt entsprechende Moleküle, die sich eventuell aus sterischen Gründen nicht entsprechend konfigurieren könnten, wenn das Adaptormolekül FADD fehlen würde. So könnte FADD die Assoziation von Molekülen ermöglichen, die für die Aktivierung der Caspase-8 essentiell sein könnten, wie eventuell CAP3. FADD würde somit die Rolle eines Bindungsvermittlers, ähnlich dem Molekül STE5, übernehmen. STE5 bindet die MAPK FUS3, die MKK STE7 und die MKKK STE11 in Hefe und ermöglicht dadurch die Aktivierung der Pheromon-induzierten MAPK-Kaskade (Choi et al., 1994). Eventuell könnte auch ein Vergleich mit den Chaperonen gezogen werden, wenn es zu einer Konformationsänderung von z. B. Caspase-8 durch die Anlagerung an den Komplex kommen würde (Hartl, 1996). Ein zweiter Grund für dieses Adaptormolekül könnte wiederum eine Komplexbildung sein, die weitere Signale neben der Caspase-8-Aktivierung zulassen könnte. Es würde sich dann eventuell ein Komplex bilden, der ähnlich dem TNF-RI-Signalkomplex aufgebaut sein könnte, d. h., Assoziation von TRADD, RIP, TRAF2, MADD (s. Kapitel 6.2). Dies würde die Klonierung von DAXX, UBC-FAP, FAF1 und Sentrin als assoziierte Moleküle von CD95 erklären. Der Grund, daß diese Moleküle nicht in den DISC-IPs und in der anschließenden Analysen auf dem 2D-Gel detektiert wurden, könnte an der Labilität des Komplexes oder an der Menge der assoziierten Proteine liegen. Es wäre auch möglich, daß ein Hintergrundsspot die Detektion verhinderte, wie es bei der Isoform Caspase-8/b der Fall war (s. Kapitel 6.2). Diese klonierten Signalmoleküle könnten andere Signalwege aktivieren oder aber für die Aktivierung der Caspase-8 wichtig sein. Für DAXX ist eine Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges gezeigt worden und eine mögliche CD95-vermittelte Apoptose über diesen JNK/SAPK-Signalweg. Dies deutet auf einen alternativen Apoptosesignalweg hin. Die Proteine UBC-FAP und FAF1 zeigen dagegen Homologien zu Proteinen, die dem Ubiquitin-Signalweg angehören. Wenn FAF-1 überexprimiert wird, steigt auch die Zahl der apoptotischen Zellen nach CD95-Stimulation an, was auf eine positive regulatorische Funktion schließen läßt (Chu et al., 1995). Dagegen konnte bei der Überexpression von UBC-FAP kein direkter Effekt auf Säugetierzellen festgestellt werden (Becker et al., 1997). Dies könnte die hohe endogene Expression dieses Moleküls in den meisten Säugetiersystemen widerspiegeln (Kovalenko et al., 1996). Die physiologische Relevanz der Assoziation von CD95 mit diesen zwei Proteinen muß jedoch erst noch beantwortet werden. Auch Sentrin benötigt die CD95-DD zur Bindung an den Rezeptor. Im Gegensatz zu den anderen Signalmolekülen scheint es eine inhibierende Wirkung auf den CD95-vermittelten Zelltod bei Überexpression auszuüben (Okura et al., 1996). Interessanterweise besitzt Sentrin wie FAF1 eine Homologie zu Ubiquitin, was den Ubiquitin-Signalweg als regulatorisches Element im CD95-Signalweg möglich erscheinen läßt.

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, sind mittlerweile weitere DD-Rezeptoren gefunden worden. Basierend auf den DD-Sequenzen von CD95 und TNF-RI sind durch Datenbanksuche zusätzliche intrazelluläre DD-Proteine identifiziert worden (Feinstein et al., 1995; Hofmann und Tschopp, 1995). Mittlerweile sind durch die NMR-Struktur der CD95-DD und zusätzliche Punkt-Mutationsanalysen zehn kritische As-Positionen bekannt, die für die Funktion der DD essentiell sind (Huang et al., 1996; Tartaglia et al., 1993). Von diesen zehn As sind mindestens sieben in den bekannten DD-Rezeptoren (CD95, TNF-RI, DR3, DR4, DR5) und in den DD-Rezeptor-bindenden DD-Proteinen (FADD, TRADD, RIP, DAXX,

MADD, RAIDD/CRADD) identisch oder strukturell konserviert. Die damals durch Sequenzvergleiche als DD-Proteine definierten Rezeptoren niedrigaffiner NGF-R und CD40 (Feinstein et al., 1995; Hofmann und Tschopp, 1995) sowie das Zelltod-auslösende Molekül Reaper (Goldstein et al., 1995; Cleveland und Ihle, 1995) sind nach dieser neuen Definition keine DD-Proteine, da sie maximal vier von zehn As strukturell konserviert haben, was auch durch Proteine ohne DD erreicht wird (Daten nicht gezeigt). Für Reaper wurde dies auch schon von Hofmann und Tschopp (1995) und später von Huang et al. (1996) diskutiert. Einige Proteine, die auch noch nach den neuen Kriterien eine DD besitzen, scheinen in den Apoptosesignalwegen keine Rolle zu spielen. Dies deutet darauf hin, daß dieses konservierte Bindungsmotiv nicht nur für Zelltodsignale benutzt wird.

Dagegen scheinen alle bis jetzt bekannten DED-Moleküle für die Vermittlung und Regulation des Apoptosesignals verwendet zu werden. Alle DED-Proteine wurden in Datenbanken gefunden. Hierzu dienten die Sequenz der DED von FADD und die beiden DED-Sequenzen von Caspase-8 als Suchkriterien. Das erste Protein, das so identifiziert wurde, war PEA-15 (vgl. Kapitel 5.1.5.3; Muzio et al., 1996; Boldin et al, 1996), ein Phosphoprotein mit unbekannter Funktion, das in Astrozyten exprimiert wird. Als nächstes wurde eine neue Caspase (Caspase-10/Mch4/FLICE2) von Fernandes-Alnemri et al. (1996b) und später von Vincenz und Dixit (1997) in den Datenbanken gefunden. Caspase-10 besitzt ähnlich wie Caspase-8 zwei DEDs. Sie soll in den CD95- und TNF-RI-Signalwegen involviert sein. In in vitro-Versuchen wurde eine Assoziation von Caspase-10 mit FADD, keine Inhibition durch CrmA und die Fähigkeit, Caspase-3 und Caspase-7 zu spalten, gezeigt (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Srinivasula et al., 1996a; Vincenz und Dixit, 1997). Doch müssen diese Überexpressions- und in vitro-Experimente ebenfalls vorsichtig bewertet werden (vgl. Diskussion der FADD-DN-Überexpression). Überexpression eines Moleküls in der Zelle könnte nämlich zu einer Bindung zweier Moleküle, wie z. B. FADD und Caspase-10, führen, die unter in vivo-Bedingungen nicht zustandekommt. Das berechnete Molekulargewicht von Caspase-10 beträgt 58,9 kDa (für FLICE2) und 54,6 kDa (für Mch4), und der berechnete pl liegt bei 7,39 (für FLICE2) und 6,20 (für Mch4). Trotz dieser Unterschiede im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt, die wahrscheinlich durch das Vorhandensein von unterschiedlichen Isoformen entstehen (vgl. Caspase-8), müßte das Molekül im Auflösungsvermögen der 2D-Gele liegen. Doch konnte kein zusätzliches Protein in dieser Region auf den Gelen gefunden werden. Somit ist die in vivo-Rolle von Caspase-10 im CD95-Signalweg unklar. Klärung bringt vielleicht die Entwicklung entsprechender Antikörper, die das Molekül auf Proteinebene werden nachweisen können.

Kürzlich wurde eine ganze Familie von DED-Proteinen in den Datenbanken gefunden. Sie werden von Herpesviren der γ-Klasse, wie vom Herpesvirus Saimiri (HVS), vom Karposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus 8 (HHV-8) und von zwei Moluscipockenviren kodiert (Peter et al., 1997b). Diese Proteine werden E8-Proteine oder v-FLIPs (für virale FLICE-inhibierende Proteine) genannt. Die v-FLIPs haben eine einzigartige Struktur, bestehend aus zwei DEDs. Biochemische Analysen von v-FLIP-transfizierten Zellen zeigten, daß sie an den CD95/FADD-Komplex binden und so die Rekrutierung der Caspase-8 und damit funktionelle DISC-Bildung verhindern. Interessanterweise wurde in v-FLIP-transfizierten Zellen die durch sämtliche Todesrezeptoren (CD95, TNF-RI, DR3 und DR4) ausgelöste

Apoptose gehemmt, was darauf hindeutet, daß sie alle ähnlich-strukturierte Signalwege haben (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997a; Bertin et al., 1997). Kürzlich wurde ein humanes Homolog c-FLIP/FLAME/I-FLICE/Casper/CASH gefunden und von mehreren Gruppen publiziert (Irmler et al., 1997; Srinivasa et al., 1997; Hu et al., 1997b; Shu et al., 1997; Goltsev et al., 1997). Seine Funktion ist noch nicht geklärt. Die Daten variieren und reichen von der Inhibition bis zur Induktion von Apoptose.

6.4 Die Modulation des CD95-Signalweges

Mögliche Ebenen der Signalmodulation

Bei einer Reihe von Krankheiten, an denen das CD95-Rezeptor/Liganden-System beteiligt ist, kommt es zu einer Dysregulation von Apoptose. Sei es, daß sich Zellen der Apoptose entziehen, wie resistente Krebszellen, oder daß es zu einer erhöhten Apoptoserate kommt, wie bei AIDS. Die Gründe für diese Dysregulation können auf der Ebene der CD95-Signaltransduktion liegen. Diese besser zu verstehen, ist Voraussetzung, um in diesen Prozeß regelnd einzugreifen. Im Laufe dieser Arbeit wurden von unserer Gruppe und anderen mehrere Ebenen definiert, in denen eine positive oder negative Steuerung von CD95-vermittelter Apoptose möglich ist:

1. Die Unfähigkeit des Rezeptors zur Trimerisierung muß unweigerlich zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose führen. Eine Mutation in der DD des Rezeptors verhindert diese Trimerisierung und damit die Bildung des DISC und führt zur völligen Apoptose-Resistenz. Solch eine Mutation liegt in bestimmten Mäusen vor (*lpr^{cg}*) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992b). Man findet sie aber auch zum Teil im Menschen (Rieux-Laucat et al., 1995) (vgl. Kapitel 3.4.1). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die DD des CD95 selbst assoziiert und an das Molekül FADD bindet (Huang et al., 1996; Kischkel et al., 1995). Dies wurde über Strukturanalyse von normaler und mutierter DD mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (Huang et al., 1996). Im inaktiven Zustand wäre es notwendig, eine Oligomerisierung des Rezeptors auf der Zelloberfläche zu verhindern. Diese Rolle könnte zum großen Teil die Sialylierung von CD95 übernehmen, denn sie bestimmt in gewissem Maße die Sensitivität gegenüber dem CD95L (Peter et al., 1995b). Eine Desialylierung des Rezeptors sensitiviert die Zellen erheblich gegenüber anti-APO-1 und CD95L.

2. Sowohl die Mutation oder die Modifikation von FADD oder von Caspase-8 (Chinnaiyan et al., 1996c; Muzio et al., 1996) als auch die Bindung von speziellen Inhibitorproteinen an diese Signalmoleküle könnten sowohl positiv als auch negativ auf den Signalweg wirken (vgl. Kapitel 5.3).

3. Die Untersuchungen der resistenten Zellinie Boe^R könnten auf die Existenz eines alternativen Signalweges hindeuten. Obwohl die Expression des CD95 in dieser Zellinie vergleichbar ist mit der Expression von CD95 in sensitiven Zellen, zeigt Boe^R eine Resistenz gegenüber anti-APO-1-Behandlung. Diese Resistenz ließ sich durch Transkriptions-/Translationsinhibitoren wie CHX oder Act D überwinden. In den resistenten und sensitivierten Boe^R-Zellen konnte keine DISC-Bildung gefunden werden (Kapitel 5.1.2.6), was auf einen alternativen Signalweg hindeutet, der die DISC-Bildung nicht benötigt. Die Bedeutung dieses Signalweges müßte aber erst noch gezeigt werden, da in den sensitiven Zellen die Inhibition der DISC-Bildung z. B. durch FADD-DN die Zellen resistent macht.

Es wäre interessant, die Aktivität von Caspasen, insbesondere die Caspase-8-Aktivierung, in den sensitivierten Zellen zu überprüfen. Ebenso könnte versucht werden, die Zellen von *Ipr*^{cg}-Mäusen, die eine inaktive CD95-DD besitzen, mit der gleichen Behandlung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose zu sensitivieren. Dies könnte einen Hinweis liefern, ob dieser vermutete alternative Signalweg lediglich in dieser Zellinie existiert oder ob er einen neuen parallelen Signalweg darstellt. Auf der anderen Seite haben Untersuchungen von Marcus Peter aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt, daß der DISC aus dieser Zellinie geringe Aktivität besitzt. Dies konnte er im *in vitro*-Caspase-8-Spaltungsexperiment zeigen. Daher könnten die Effekte bei den mit CHX-sensitivierten Zellen auch auf die geringe Restaktivität des CD95-DISC zurückgeführt werden.

4. Es deutet einiges darauf hin, daß sowohl bestimmte Tyrosinphosphorylierungsereignisse (Eischen et al., 1994; Sato et al., 1995; Su et al., 1995) als auch die Modulation der Proteinkinase C sich aktivierend oder inhibierend auf die CD95-vermittelte Apoptose auswirken können (Ni et al., 1994; Copeland et al., 1994). Die Zielproteine dieser Phosphorylierungen sind aber noch nicht bekannt.

5. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie können sowohl positiv als auch negativ modulierend wirken. Ihre Funktion im CD95-Signalweg wird in diesem Kapitel weiter unten besprochen.

6. Bestimmte virale und synthetische Substanzen können Caspasen spezifisch inhibieren und so den CD95-Signalweg völlig blockieren. Solche Substanzen müssen aber nicht spezifisch für CD95 sein (vgl. auch Kapitel 6.3).

Die hier aufgeführten sechs Ebenen, auf denen das CD95-Signal moduliert werden könnte, sind eventuell nur ein Teil der möglichen Regulationswege. Um spezifisch in die CD95-vermittelte Apoptose eingreifen zu können, ist es notwendig, einen für CD95 spezifischen Mechanismus der Resistenzbildung zu finden. So ist durch die Funktion des DISC nicht zu erklären, warum bestimmte CD95- und TNF-R-doppelt-exprimierende Zellen nur sensitiv gegenüber der Induktion von Apoptose durch den einen oder anderen Rezeptor sind (Grell et al., 1994; Wong und Goeddel, 1994; Leist et al., 1996). Es gibt somit zusätzlich zur Bildung des DISC noch Rezeptor-spezifische Mechanismen zur Apoptoseregulation. Die genaue Analyse der DISCs der anderen Todesrezeptoren und das weitergehende Studium des CD95-Signalwegs könnte zu Möglichkeiten führen, spezifisch die CD95-vermittelte Apoptose positiv oder negativ zu beeinflussen.

Modulation auf der Rezeptorebene in peripheren T-Lymphozyten

Ein gutes Modellsystem, um die Modulation des CD95-Signalweges zu untersuchen, stellen periphere T-Lymphozyten dar. Dieses System wurde von mehreren Gruppen beschrieben. Es handelt sich um ein *in vitro*-System, daß die Sensitivität der T-Zellen im Verlauf einer Immunantwort gegenüber T-Zellrezeptor (TZR)-vermitteltem aktivierungsinduzierten Zelltod (AIZT) beschreibt (Klas et al., 1993; Lenardo, 1991; Owen-Schaub et al, 1992). In der frühen Phase sind periphere T-Zellen resistent gegenüber Apoptose. Nach erfolgreicher Beendigung der Immunantwort müssen die aktivierten T-Zellen jedoch durch Apoptose beseitigt werden. AIZT kann durch verschiedene Todessysteme reguliert werden. AIZT der CD4⁺-T-Zellen scheint überwiegend vom CD95/CD95L-System abzuhängen

(Dhein et al., 1995; Alderson et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995; Singer et al., 1994; Van Parijs et al., 1996), während die Elimination der CD8⁺-T-Zellen hauptsächlich durch das TNF-R/TNF-System geschieht (Zheng et al., 1995; Sytwu et al., 1996; Zimmerman et al., 1996). Mäuse mit einem Defekt im TNF-RI- oder TNF-RII-Molekül sind trotzdem in der Lage, periphere Lymphozyten zu deletieren (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993; Erickson et al., 1994). Ein Defekt in der CD95-Expression oder das Fehlen des CD95 resultiert dagegen in Lymphadenopathie, Akkumulation von anomalen T-Zellen und der Bildung von Autoantikörpern. Dieses Phänomen zeigte sich in der lpr - und der CD95-"knock-out"-Maus. Beim Menschen führt dieser Defekt im CD95-System zu einem ähnlichen Phänotyp (vgl. Kapitel 3.4.1). Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose muß daher genauestens reguliert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß resistente CD95⁺-T-Zellen einen nicht funktionierenden DISC aufgrund der Fehlens von Caspase-8 besitzen (Abb. 5.36A). Nur Apoptose-sensitive T-Zellen bildeten einen funktionsfähigen DISC (Abb. 5.36B). Es ist unklar, wie die Caspase-8-Rekrutierung an den DISC der resistenten T-Zellen verhindert wurde, da die Menge der Caspase-8-Expression im Zytoplasma von resistenten und sensitiven T-Zellen vergleichbar war. Die Assoziation von Caspase-8 mit dem DISC könnte sowohl durch post-translationale Modifikation von FADD oder von Caspase-8 als auch durch Bindung eines unbekannten Inhibitormoleküls an die DED dieser Moleküle verhindert werden. Kürzlich wurde ein neues Molekül kloniert, das an die DD des CD95- und des TNF-RI-Rezeptors binden kann. Es wurde gezeigt, daß dieses Molekül (Sentrin) sowohl CD95- als auch TNF-RI-vermittelte Apoptose inhibieren konnte (s. Kapitel 3.5.3). Sentrin besitzt keine DD und bindet direkt an die DD dieser Rezeptoren, jedoch nicht an FADD. Da die FADD-Assoziation im DISC von resistenten und sensitiven T-Zellen unverändert war (Abb. 5.36), scheint das vermutete Resistenzprotein nicht Sentrin zu sein. Es ist wahrscheinlicher, daß es eine DED enthält. Solch ein Molekül ist mittlerweile von mehreren Gruppen kloniert worden (c-FLIP/FLAME/I-FLICE/Casper/CASH; vgl. Kapitel 6.3). Es wurde in der Publikation von Irmler et al. (1997) gezeigt, daß c-FLIP in den resistenten T-Zellen exprimiert wird und korrelierend mit der Sensitivierung der T-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose die Expression heruntergeregelt wird. Dieser Daten deuten darauf hin, daß c-FLIP das gesuchte Regulatorprotein sein könnte. Zusätzlich liegt der pl von c-FLIP mit 8,4 außerhalb des Auflösungsvermögens der verwendeten 2D-Gele, was erklären würde, warum das Protein in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnte. Im Moment finden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe statt, die klären sollen, ob c-FLIP im DISC zu finden ist. Neuere Untersuchungen zeigen, daß in den resistenten Zellen Caspase-8 nicht prozessiert wird, d. h., es ließen sich keine aktiven Untereinheiten der Caspase-8 (p10 und p18) in den resistenten, sondern nur in den sensitiven T-Zellen detektieren (Daten nicht gezeigt). Damit werden die Ergebnisse dieser Arbeit, daß der Signalweg direkt auf der Rezeptorebene blockiert wird, erhärtet.

Zusätzlich zur anomalen DISC-Bildung in resistenten T-Zellen konnten wir zeigen, daß eine transiente Expression von Bcl- x_L mit der CD95-Resistenz während der T-Zell-Aktivierung korrelierte. Dieses Resultat stimmt mit einer Reihe von vorhergehenden Berichten überein, die Bcl- x_L als Regulator der Apoptose-Resistenz in Lymphozyten vermuten. In Mäuse-T-Zellen korreliert die Expression von Bcl- x_L , aber nicht von Bcl-2 oder Bax, mit der Apoptose-Resistenz in aktivierten T-Zellen (Broome et al., 1995). CD40-Stimulation von B-Zellen resultiert sowohl in einer Bcl- x_L -Hochregulation als auch in einer

Resistenz gegenüber Apoptose (Choi et al., 1995). Schließlich führt die Kostimulation über CD28, die die Apoptose-sensitiven T-Zellen zu resistenten macht, ebenfalls zu einer Heraufregulation von Bcl- x_L (Boise et al., 1995b). Im Widerspruch zu diesen korrelativen Studien existiert eine Reihe von Veröffentlichungen, die keine signifikante Inhibition des CD95-Signalweges durch Bcl-2, das ähnlich wie Bcl- x_L wirkt, finden konnten (Memon et al., 1995; Chiu et al., 1995; Gottschalk et al., 1994; Itoh et al., 1993). Im Einklang mit diesen Berichten konnten wir keine direkte Inhibitorfunktion von Bcl- x_L auf den DISC nachweisen (Medema et al., 1997c).

Entweder wirkt Bcl-x_L auf Caspase-8 unterhalb des DISC, oder die T-Zellen besitzen neben der Caspase-8-Rekrutierung an den DISC einen anderen unabhängigen Mechanismus zur Regulation der CD95-Apoptose-Resistenz, in den Bcl-x_L involviert ist. Untersuchungen mit transienten Transfektionen von Bcl-x_L zeigten kürzlich, daß Bcl-x_L Caspase-8 wahrscheinlich indirekt binden kann, wodurch die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert werden könnte (Chinnaiyan et al., 1997). In MCF7-Fas-Zellen, die gegenüber CD95-vermittelter Apoptose durch Überexpression von Bcl-x_L resistent gemacht wurden, zeigte sich jedoch keine Assoziation von Bcl-x_L und Caspase-8 (Medema et al., 1997b). Zusätzlich war die Aktivierung von Caspase-8 in MCF7-Fas-Zellen nicht beeinträchtigt. Da die resistenten T-Zellen jedoch Caspase-8 überhaupt nicht aktivieren, scheint in den T-Zellen ein anderer Mechanismus vorzuliegen. Bcl-x_L mag auf den CD95-Signalweg wirken, aber wahrscheinlicher ist, daß es andere Apoptose-Signalwege reguliert, um aktivierten resistenten T-Zellen vollen Schutz gegenüber einer Vielzahl von Apoptose-induzierenden Stimuli zu geben. Übereinstimmend mit dem letzteren Modell sind Berichte, die Bcl-x_L in verschiedene Apoptose-Signalwege parallel zu dem CD95-vermittelten plazieren (Chinnaiyan et al., 1996b; Strasser et al., 1995).



Abb. 6.4: Modell zur T-Zellresistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose

d1: Einen Tag nach Stimulation von peripheren T-Zellen sind diese resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Dies geschieht durch Inhibition der Rekrutierung und der Aktivierung von Caspase-8 im DISC. Zusätzlich ist es möglich, daß Bcl-x_L eine zusätzliche Inhibitorfunktion im CD95-Signalweg einnimmt. Diese liegt - wenn überhaupt - weiter unten im Signalweg.

d6: Sechs Tage nach Stimulation von peripheren T-Zellen werden die Zellen sensitiv. Die DISC-Bildung funktioniert wieder, d. h., Caspase-8 kann mit den DISC assoziieren und wird dort aktiviert. Zeitgleich exprimieren die T-Zellen kein Bcl-x_L mehr.

Es wurde diskutiert, ob PTPasen in die Regulation der CD95-Apoptose-Resistenz involviert sind. Die hämatopoetische Zellphosphatase (HCP) soll das CD95-Signal verstärken (s. Kapitel 3.5.4), wohingegen Überexpressionen der PTPase (FAP-1) die CD95-vermittelte Apoptose inhibieren (s. Kapitel 3.5.4). In den getesteten T-Zellen wurde keine Korrelation zwischen den Expressionsmengen dieser PTPasen und der Apoptose-Sensitivität gefunden. Es stimmt mit den Ergebnissen unserer Gruppe überein, daß Tyrosin-Phosphorylierung keine entscheidende Rolle im CD95-Signalweg in T-Zellen spielt (Schraven und Peter, 1995) (vgl. Kapitel 6.5).

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß Resistenz und Sensitivität von CD95-vermittelter Apoptose in aktivierten T-Zellen auf mindestens zwei verschiedenen Ebenen reguliert werden: auf der Ebene eines funktionellen DISC und auf der Ebene von Bcl-x_L. Diese Mechanismen könnten ebenfalls in der Entwicklung von T-Zell-Subpopulationen wie Gedächtnis-T-Zellen, die einen Apoptose-Resistenz-Phänotyp haben mögen, eine Rolle spielen (Abb. 6.4).

6.5 Distale Ereignisse im CD95-Signalweg?

In diesem Kapitel sollen die distalen Ereignisse und die Relevanz der anderen publizierten Signalmoleküle im CD95-Signalweg diskutiert werden. Dabei wird speziell auch auf die in Kapitel 3.5.4 und Kapitel 3.5.5 aufgeführten Moleküle eingegangen.

Der Sphingomyelin-Signalweg

Über den Second-Messenger Ceramid ist bekannt, daß durch Hydrolyse des er Plasmamembranphospholipids Sphingomyelin oder durch de novo-Synthese mittels der Ceramidsynthetase gebildet werden kann (Hannun und Obeid, 1995; Bose et al., 1995). Sphingomyelin-Degradation wird durch die Sphingomyelinase (SMase), eine Sphingomyelinspezifische Form der Phospholipase C, gebildet. Zwei Formen der SMase konnten, basierend auf deren pH-Optima, identifiziert werden. Die saure SMase (pH-Optimum 4,5 - 5) wurde in Lysosomen und in der Plasmamembran gefunden. Die neutrale SMase hat ein pH-Optimum von 7.4. Ceramid besitzt eine Reihe von direkten Substraten, wie die Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase und die Proteinkinase-C-Isoform ζ. Ceramidproduktion wurde für eine Reihe von apoptotischen Stimuli inklusive ionisierende Strahlung und Daunorubicin-Behandlung beschrieben (Bose et al., 1995; Jaffrezou et al., 1996). Zusätzlich zeigt auch die Stimulation von CD95 und TNF-RI eine Aktivierung des Sphingomyelin-Signalweges. Auch läßt sich in bestimmten Zelltypen mit dem zellpermeablen, synthetischen Ceramidanalog C2-Ceramid Apoptose induzieren (Sweeney et al., 1996; Jarvis et al., 1994). Jedoch deuten andere Veröffentlichungen darauf hin, daß Ceramidproduktion unabhängig vom Zelltod ist und auch nicht in den CD95-Signalweg involviert ist (Sillence et al., 1997; Watts et al.,

1997). Ein mutierter CD95, der keine Zelltodsignale transduziert, kann trotzdem noch die neutrale SMase aktivieren (Cifone et al., 1995). Daher ist die durch die neutrale SMase vermittelte Ceramidproduktion unabhängig vom Zelltod-Signalweg bei CD95. Zusätzlich wurde gezeigt, daß die Zellen von Patienten mit der Nieman-Pick-Type-A-Krankheit, die keine funktionsfähige saure SMase besitzen, resistent gegenüber ionisierender Strahlung, aber nicht gegenüber CD95- oder TNF-RI-induzierter Apoptose sind (Santana et al., 1996). Obwohl beide, neutrale und saure SMase, zur Ceramidproduktion beitragen und nach CD95- oder TNF-RI-Stimulation aktiviert werden, scheinen sie demnach weder notwendig noch ausreichend für die Induktion von Apoptose durch diese Rezeptoren zu sein. Außerdem wurde in einer kürzlich erschienenen Publikation die Ceramidproduktion unterhalb der Caspasen plaziert, da die Produktion durch Caspaseninhibitoren wie CrmA, zVAD oder DEVD (s. Kapitel 5.1.4) blockiert werden konnte (Dbaibo et al., 1997; Sillence et al., 1997; Gamen et al., 1996). Daher scheint die Ceramidproduktion eher ein am Ende des Signalweges zu plazierendes Signal zu sein, welches auch vollkommen unabhängig von Apoptose auftreten kann, da es auch nach Behandlung mit Ca²⁺-lonophoren (Sillence et al., 1997) oder in seneszenten Zellen (Venable et al., 1995) beobachtet wurde. Alternativ könnte es auch als sekundärer Modulatorsignalweg dienen.

• Tyrosinphosphorylierung als regulatorische Modifikation?

Daß in CD95-vermittelter Apoptose die Aktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) essentiell ist (Eischen et al., 1994), wurde inzwischen durch Veröffentlichungen mehrerer Arbeitsgruppen in Frage gestellt, die keine Aktivierung einer PTK nach Stimulation von CD95 beobachten konnten (Schraven und Peter, 1995; Oyaizu et al., 1995; Janssen et al., 1996; Latinis und Koretzky, 1996). Herbimycin A, ein src-Kinaseinhibitor, war nicht in der Lage, die CD95-vermittelte Apoptose zu hemmen (Schulze-Osthoff et al., 1994b; Schraven und Peter, 1995). Somit bleibt die von Eischen et al. (1994) gemachte Beobachtung, die einzige Veröffentlichung in dieser Richtung und muß daher vorsichtig bewertet werden.

Die Aktivierung von streßaktivierten Proteinkinasen (JNK/SAPK)

Caspasen spielen eine entscheidende Rolle in verschiedensten Apoptosesignalwegen. Sie wurden bis jetzt allerdings am Ende des Signalwegs vermutet. Die Klonierung der Caspase-8 zeigt nun, daß eine Protease dieser Familie schon ganz am Anfang des CD95-Signalwegs wichtig ist. Was sind aber die Signale unterhalb der Caspasen? Streßaktivierte Proteinkinasen (SAPK), auch als Jun N-terminale Kinasen (JNK) bezeichnet, sind Teil einer alternativen MAP-Kinasekaskade, die durch diverse Arten von Streß, wie UV Strahlung, Hitzeschock oder Proteinsyntheseinhibitoren (Derijard et al., 1994; Hibi et al., 1993; Zanke et al., 1996; Meier et al., 1996), induziert wird.

Um zu testen, ob sie auch nach CD95-Stimulation aktiviert werden, wurde in Zusammenarbeit mit Alfred Nordheim (MHH, Hannover) ein *In-Gel*-Kinase-Nachweissystem etabliert und getestet, ob JNK/SAPKs nach CD95-Stimulation aktiviert werden (Kapitel 5.2; Cahill et al. 1996). Hierzu wurde c-Jun (das klassische Substrat dieser Kinasen) in der SDS-PAGE kopolymerisiert. Eine Reihe von Kinasen wurde gefunden, die nach CD95-Stimulation aktiviert wurden (Kapitel 5.2.1). Wegen ihrer Substratspezifität werden sie nachfolgend als MAPKs bezeichnet. Mindestens fünf MAPKs werden im

98

CD95-Signalweg aktiviert. Zwei konnten als JNK1(SAPKγ/p46) und JNK2 (SAPKα/p54) identifiziert werden. Sie komigrieren jeweils mit mindestens einer weiteren MAPK. Die Identität der restlichen Kinasen ist nicht bekannt. Sie stellen entweder unbekannte JNK/SAPKs dar oder sind bereits bekannte MAPKs, die eine Kreuzreaktivität mit dem Substrat c-JUN im *In-Gel-*Kinase-Nachweissystem haben. Die p38-Kinase könnte die p38-MAPKs repräsentieren (vgl. Kapitel 3.5.5.3). Dies muß aber in weiterführenden Experimenten verifiziert werden. Die Aktivierung all dieser Kinasen konnte komplett verhindert werden, wenn Caspasen entweder durch CrmA oder durch zVAD-fmk inhibiert wurden (Kapitel 5.2.4). Diese Daten zeigen, daß die Aktivierung der MAPKs eine der möglichen Signalwege darstellt, die das CD95-Signal unterhalb der Caspasen weiterleiten.

Ahnliche Resultate wurden sowohl von Latinis und Koretzky (1995) als auch von Juo et al. (1997) veröffentlicht. Jedoch scheint die Aktivierung von JNK/SAPK nicht essentiell für CD95 vermittelte Apoptose zu sein. SEK1 ist ein direkter Aktivator von JNK/SAPK, induziert durch Streß- und Mitogenfaktoren, und kann die JNK/SAPK-Aktivierung inhibieren, wenn es als dominant-negative Mutante exprimiert wird. Dabei ist die CD95-vermittelte Apoptose nicht betroffen (Lenczowski et al., 1997). Auch beim TNF-RI scheint die Aktivierung von JNK/SAPK nicht notwendig für die Apoptose zu sein. So induziert TNF-RI auch noch dann die JNK/SAPK, wenn der Zelltod durch eine dominantnegative FADD-Mutante blockiert wird. Außerdem wurde gezeigt, daß JNK/SAPK-Aktivierung beim TNF-RI durch TRAF2 und RIP über ein nicht-zytoxisches Signal vermittelt wird (Natoli et al., 1997; Liu et al., 1996b). Widersprüchliche Resultate existieren darüber, wo die JNK/SAPK-Aktivierung im Apoptosesignalweg plaziert werden soll. So inhibiert ASK1, ein direkter Aktivator von SEK1, den TNFvermittelten Zelltod, wenn es als dominant-negative Mutante exprimiert wird (Ichijo et al., 1997), d. h., ASK1 könnte ein Mediator der TNF-induzierten Apoptose sein. Im Gegensatz dazu wurde von SEK1 berichtet, daß es die CD95-vermittelte Apoptose blockiert, da SEK1 defiziente Zellen empfindlicher gegenüber CD95-Stimulation sind (Nishina et al., 1997). Zusätzlich wurde vor kurzem berichtet, daß die JNK/SAPK-Aktivierung durch DAXX vermittelt wird, einem Protein, von dem angenommen wird, daß es direkt mit der CD95 DD interagiert (Yang et al., 1997b). Dies würde bedeuten, daß die Aktivierung der JNK/SAPK unabhängig von Caspasen wäre, was unseren Daten klar widerspricht. Dann konnte auch noch mit einer dominant-negativen SEK1-Mutante sowohl JNK/SAPK-Aktivierung als auch Apoptose in bestimmten Zellen blockiert werden (Yang et al., 1997b). Dies könnte mit einem sekundären Apoptosesignalweg erklärt werden, der in einigen Zellen von der Aktivierung der JNK/SAPK abhängt. Jedoch muß die Relevanz solch eines Signalweges in biologischen Systemen erst noch gezeigt werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die JNK/SAPK während der Induktion von Apoptose durch CD95 und TNF-RI aktiviert werden. Ob sie jedoch relevant für den Zelltod sind und wo genau sie im Signalweg lokalisiert sind, bleibt kontrovers. Unsere Daten sprechen für eine Aktivierung durch Caspasen.

• Die Rolle von distalen Caspasen in der Signaltransduktion von Todesrezeptoren

Durch die Identifizierung der Caspase-8 als Teil des CD95-DISC wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Rezeptorstimulation und den Caspasen gezeigt (vgl. Kapitel 5.1.5; Muzio et al, 1996). Die Proform der Caspase-8 wird an multimerisierte Rezeptoren rekrutiert und dann vermutlich durch

autoproteolytische Spaltung am DISC aktiviert (vgl. Kapitel 5.1.7; Medema et al., 1997a). Daher ist Caspase-8 die im CD95-Signalweg als erstes prozessierte Caspase. Sowohl Caspase-8 als auch Caspase-8-ähnliche Familienmitglieder wie Caspase-10 könnten bei den anderen Todesrezeptoren in ähnlicher Weise involviert sein.

Obwohl Uberexpression der Caspasen in Säugetier- und Insektenzellen Apoptose auslöst, konnte lediglich für Caspase-3, -6, -7 und -8 gezeigt werden, daß sie in vivo nach Todesrezeptorstimulation aktiviert werden (Kapitel 5.1.7, Medema et al., 1997a; Scaffidi et al., 1997; Orth et al., 1996b; Duan et al., 1996a; Schlegel et al, 1996; Faleiro et al., 1997). Caspase-8 konnte in vitro Caspase-3, -4, -7 und -10 direkt spalten, wohingegen Caspase-2 und -6 indirekt über im Zellextrakt anwesende Caspase-8 aktivierte Familienmitglieder prozessiert wurden (Muzio et al., 1997). Daher läßt sich annehmen, daß Caspase-8 eine Art Caspasenkaskade starten kann. Die Anordnung der Caspasen in dieser Kaskade ist noch nicht geklärt. Orth et al. (1996b) plazierten Caspase-6 oberhalb von Caspase-3 und -7, jedoch wurde auch gezeigt, daß die aktive Caspase-3 umgekehrt Caspase-6, -7 und -9 spalten und aktivieren kann (Fernandes-Alnemri et al., 1995b; Fernandes-Alnemri et al., 1996b; Srinivasula et al., 1996b). Bis jetzt gibt es noch keinen Hinweis, daß eine einzelne Caspase essentiell für einen Todessignalweg ist. Wie bereits erwähnt, wurde Caspase-1 als notwendig für die CD95-vermittelte Apoptose diskutiert. Es wurde berichtet, daß Thymozyten von Caspase-1^{-/-}-Mäusen resistent gegenüber CD95-vermitteltem Zelltod sind (Kuida et al., 1995). Doch konnten andere Gruppen entweder keine Verschlechterung der Apoptose in Caspase-1^{-/-}-Mäusen finden (Li et al., 1995b; Smith et al., 1997) oder aber keine Aktivierung von Caspase-1 nach CD95-Stimulation zeigen (Muzio et al., 1997). Daher spielt Caspase-1 entweder keine Rolle im Signalweg der Todesrezeptoren oder ein anderes Caspase-1-ähnliches Familienmitglied kann deren Funktion ersetzen. Auch Mäuse, defizient für Caspase-3, zeigten lediglich eine Verschlechterung der Gehirnentwicklung, wohingegen sich die Thymozyten vollkommen normal verhielten (Kuida et al., 1996). Wenn die Redundanz von verschiedenen Caspasen mit einer Caspase-3-ähnlichen Aktivität berücksichtigt wird, stellt sich die Frage, ob die "knock-out"-Technologie der geeignete Weg ist, die Rolle einzelner Caspasen in Apoptosesignalwegen zu untersuchen. Zusätzlich sind für eine zunehmende Zahl von Caspasen verschiedene Spleißvarianten beschrieben worden (Wang et al., 1994; Alnemri et al., 1995; Fernandes-Alnemri et al., 1996b; Fernandes-Alnemri et al., 1995b; Boldin et al., 1996; Wang et al., 1996c; Vincenz und Dixit, 1997). Solche Spleißvarianten zeigten zum einen Aktivator- zum anderen Inhibitorfunktion bei der Aktivierung von Caspasen. Einige von ihnen könnten auch inaktive Proteasespezies darstellen. Jedoch sind die meisten beschriebenen Spleißvarianten lediglich auf mRNA-Ebene gefunden worden, und die Anzahl der Isoformen, die als Proteine exprimiert werden, scheint limitiert zu sein (Scaffidi et al., 1997).

Da Apoptose mit ihren typisch morphologischen und biochemischen Merkmalen, wie Zeiose, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung, durch spezifische Inhibitoren für Caspasen inhibiert werden kann, stellen diese Proteasen die Moleküle der Exekutionsphase in der Apoptose dar. Daher könnte die Suche nach Substraten, die von den Caspasen während der Apoptose gespalten werden, neue Einsichten in die unteren Ebenen der Apoptosesignalwege gewähren.

Distale Ereignisse innerhalb der Apoptose-Signaltransduktion

Einige dieser sogenannten "Todessubstrate" sind bereits bekannt. Erstens können Caspasen andere Familienmitglieder spalten und aktivieren, was, wie oben beschrieben, zu einer Kaskade von Caspasenaktivierung führt. Zweitens werden Moleküle, die in die DNA-Reparatur involviert sind, wie Poly-(ADP-ribose) Polymerase (PARP) oder die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), gespalten und inaktiviert. Dies geschieht durch Caspase-3-ähnliche Proteasen (Lazebnik et al., 1994; Gu et al., 1995a; Casciola-Rosen et al., 1995; Song et al., 1996b). Ebenso werden die Ribonukleoproteine U1-70kDa, C1 und C2, die an Spleißreaktionen von prämRNA-Molekülen beteiligt sind, durch Spaltung inaktivert (Casciola-Rosen et al., 1994; Tewari et al., 1995a; Waterhouse et al., 1996). Caspasen spalten und inaktivieren somit Proteine, die an zellulären Prozessen, welche für den apoptotischen Prozeß nicht notwendig sind, oder sogar an Prozessen, die dem Zelltod entgegenwirken, beteiligt sind.

Eine weitere Gruppe von "Todessubstraten" stellen solche Moleküle dar, die in die Regulation anderer Signalprozesse involviert sind. Dazu gehören die SREBP-1 und SREBP-2 (für "sterol regulatory element binding protein"), die von Caspase-3 und Caspase-7 gespalten werden (Wang et al., 1995; Pai et al., 1996), die delta-Isoform der Proteinkinase C (PKCδ), die mit Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung in Verbindung gebracht wird (Ghayur et al., 1996; Emoto et al., 1995), ein GDP-Dissoziationsinhibitor von GTPasen der Rho-Familie (D4-GDI) (Na et al., 1996; Danley et al., 1996), die PITSLRE-Kinase (Bunnell et al., 1990; Lahti et al., 1995; Beyaert et al., 1997) und die zytosolische Phospholipase A₂ (PLA₂) (Wissing et al., 1997).

Darüber hinaus wurden einige zelluläre Strukturproteine als "Todessubstrate" identifiziert. Dazu gehören Lamin, das durch Caspase-6 gespalten wird (Orth et al., 1996a; Neamati et al., 1995; Zhivottovsky et al., 1997), ferner α -Fodrin (Cryns et al., 1996; Martin et al., 1995b), Actin, das durch Caspase-3 gespalten wird und Gas2, eine Komponente des Mikrofilamentsystems (Brancolini et al., 1995). Die Spaltung dieser Substrate könnte zum Teil die massiven morphologischen Veränderungen erklären, denen eine Zelle während des apoptotischen Prozesses ausgesetzt ist.

Einige Onkogene wie Rb und MDM-2 werden ebenfalls durch Caspasen gespalten und damit inaktiviert (Bing und Dou, 1996; Janicke et al., 1996; Ehrhardt et al., 1997). Ebenso konnte kürzlich gezeigt werden, daß die p21-aktivierte Kinase PAK2 während CD95- und TNF-vermittelter Apoptose gespalten und damit konstitutiv aktiviert wird. Da PAK2 den JNK-Signalweg aktiviert, scheint mit PAK2 ein Enzym identifiziert zu sein, daß die Brücke zwischen Caspasen und JNK herstellt (vgl. Kapitel 5.2). Wird die PAK2-Aktivität durch eine dominant-negative Mutation blockiert, so werden keine apoptotischen Körper mehr gebildet. Sowohl die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung als auch die Phoshatidylserinexternalisierung bleiben jedoch unbeeinflußt (Rudel und Bockoch, 1997). Verschiedene apoptotische Teilprozesse können offensichtlich auf der Ebene der Caspasenaktivierung selektiv aktiviert werden.

Zusätzlich wurde der Faktor DFF (für "**D**NA-**F**ragmentation **F**actor") beschrieben, der durch Caspase-3 gespalten und daraufhin aktiviert wurde (Liu et al., 1997). DFF selbst scheint keine DNAase-Aktivität aufzuweisen. Es ist daher wahrscheinlich, daß DFF eine oder mehrere Nukleasen aktiviert,
möglicherweise die bereits beschriebene Ca²⁺/Mg²⁺-abhängige Nuklease (Gaido und Cidlowski, 1991; Nikonova et al.,1993; Peitsch et al., 1993). Somit konnte zum ersten Mal eine direkte Verbindnung zwischen Caspasenaktivieurng und DNA-Fragmentierung etabliert werden.

Zusammenfassend läßt sich damit folgendes Bild des CD95-Todesrezeptor-Signalweges zeichnen (Abb. 6.5): Durch Rezeptorstimulation kommt es im ersten Schritt zur Bildung des Todesrezeptor-Signalkomplexes (DISC). Bei CD95 ist Caspase-8 Bestandteil dieses Komplexes. Caspase-8 wird am DISC gespalten und aktiviert. Das aktive Enzym kann dann im zweiten Schritt eine noch zu definierende Caspasenkaskade auslösen oder eventuell direkt Todessubstrate spalten. Die anderen aktivierten Caspasen prozessieren dann ebenfalls Todessubstrate. Diese Substrate werden dabei entweder aktiviert oder inaktiviert, je nachdem ob sie wichtig oder hinderlich für den apoptotischen Prozeß sind. Dies führt dann im letzten Schritt zu dem morphologischen Bild, das als Apoptose bezeichnet wird und im Kapitel 3.1 beschrieben wurde. Da Caspasen am Anfang dieser Signalkette stehen, ist es nicht erstaunlich, daß Caspaseninhibitoren (wie CrmA oder zVAD-fmk) effiziente Hemmstoffe des Zelltodes sind. Dieser Signalweg kann wahrscheinlich - wie bereits besprochen - in ähnlicher Weise auf die anderen Todesrezeptoren übertragen werden. Die Existenz mehrerer Todesrezeptoren zeigt zum einen die Notwendigkeit von Apoptose in einem multizellulären Organismus auf, wie es der Mensch darstellt. So wird der Tod von einzelnen Zellen für das Überleben des gesamten Organismus essentiell. Zum anderen läßt sich daraus auch die Gefährlichkeit dieser Rezeptoren ablesen, denn ein Todesrezeptor/Liganden-System scheint nicht auszureichen, um Apoptose gezielt in bestimmten Zelle oder Geweben auszulösen.

Es läßt sich festhalten, daß in den letzten Jahren das Wissen über den Mechanismus des programmierten Zelltods, insbesondere in den Signalwegen der Todesrezeptoren von CD95 und TNF-RI, angewachsen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen dabei einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des CD95-Signalweges dar. Denn im Gegensatz zu den sonst üblichen in vitro-Versuchen wurde ein biochemischen Ansatz gewählt, der zur Identifizierung von Molekülen unter physiologischen Bedingungen führte. Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine stellen somit reale Elemente der CD95-vermittelten Apoptose dar. Viele Moleküle, die in der Apoptoseforschung und speziell auch im CD95-Signalweg publiziert wurden, sind dagegen über in vitro-Ansätze spezifiziert worden und ein eindeutiger Beweis für deren Notwendigkeit steht zum Teil noch aus. Es zeichnet sich das Bild ab, daß alle Todesrezeptoren einen ähnlichen oder eventuell den gleichen Signalweg benutzen. Hierbei konnte die zentrale Bedeutung der Caspasen aufgezeigt werden. Die Erkenntnisse über diese Mechanismen geben der Wissenschaft vielleicht die Möglichkeit, Medikamente gegen Krankenheiten zu entwickeln, in denen Apoptose eine Rolle spielt. Speziell für das CD95/CD95L-System sind die in Kapitel 3.4 aufgeführten Krankheiten als mögliche Therapieziele von Interesse. So könnte das spezifische Auslösen von Apoptose in bestimmten Zellen des Körpers Krebs- und Autoimmunerkrankungen heilen, umgekehrt könnte die gezielte Inhibition zu Erfolgen bei der Bekämpfung von der AIDS-Erkrankung und neurodegenerativen Erkrankungen führen. Vielleicht kann der programmierte Zelltod auch zur Akzeptanz von Transplantaten in der Transplantationsmedizin beitragen.



Abb. 6.5: Model des CD95-Signalweges (Erklärungen s. Text)

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien

Amersham-Buchler, Frankfurt: [γ-³²P]ATP (400 MBq/ml), , SDS-PAGE-Molekulargewichtsmarker ("Rainbow Coloured Protein", ¹⁴C-methylierte Proteine, "¹⁴C-methylated Rainbow Coloured Proteins"), Western-ECL-Kit, ECL-Membranen, [α-³⁵S]ATP (530 MBq/ml), Amplify.

Baker, Deventer, Niederlande: Szintillator-Cocktail Hydroluma, Methanol, Salzsäure 37%.

BioRad, München: Proteinmarkermischungen für die IEF

Biozym, HameIn: NuSieve(3:1)-Agarose.

Boehringer, Mannheim: ATP, dNTPs

Conco, Wiesbaden: Fötales Kälberserum (FKS)

Diagen, Düsseldorf: QiaExpress Expressionskit für Proteine mit Histidin-Hexapeptid, DNA-

Isolierungssäulen T100, T500.

Dianova, Hamburg: Peroxidase-konjugiertes Streptavidin,

Difco, Detroit, USA: Hefeextrakt, Trypton.

Gibco-BRL, Karlsruhe: Agarose, Gentamycin, Penicillin/Streptomycin, Glutamin, HBSS (Hank's buffered salt solution), Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]), "low melting

point"-Agarose, DMEM-Pulvermedium, RPMI-1640-Pulvermedium, RPMI- und DMEM-Mangelmedien.

Glücksklee, Frankfurt a. M.: Magermilchpulver

Goos, Heidelberg: Verstärkerfolien für Autoradiographien

Hartmann Analytics, Braunschweig: [7-32P]ATP, [32P]Orthophosphat

ICN Biomedicals, Meckenheim: Trans ³⁵S-LabelTM ([³⁵S]Cys/[³⁵S]Met) (530 MBq/ml)

Kodak, Rochester, USA: Röntgenfilme X-Omat AR, Autoradiographiemappen.

LKB, Bromma, Schweden: Ampholine, Repelsilan.

Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA: Gene Amp dNTPs.

Pharmacia, Freiburg: Ficoll 400, Sepharose CL-4B, Protein A-Sepharose CL-4B, Ampholine pH 5,0-

7,0, Ampholine pH 3,5-10. Carbamolyt[™]-Mischung (Mischung aus modifiziertem Carbamolyt für einen pH-Bereich von 4,9 bis 7,1)

Pierce, Rockford, USA: BMH (Bismaleimidohexan), DPDPB (1,4-Di-[3'-(2'-pyridyldithio)-

propionamido)]butan), BCA-Proteinassay.

Promega, Heidelberg: Glutathion-Agarose

Qiagen, Hilden: Ni²⁺-NTA-Agarose

Roth, Karlsruhe: Phenol, Acrylamid/Bisacrylamidlösung 30% (w/v).

Serva, Heidelberg: Brij-58, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), NP-40, PEG 8000, BSA

(Rinderserumalbumin), SDS (Natriumdodecylsulfat), Triton X-100, Trypanblau, Xylencyanol, Acrylamid,

N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Ampholine pH 5,0-7,0.

Sigma, München: anti-IgG1-Agarose, APS (Ammoniumpersulfat), DTT (Dithiothreitol), Ethidiumbromid, IPTG (Isopropyl-thiogalactosid), MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure), MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid), Propidiumiodid, Tween-20, Nonidet P-40 (NP-40, Nonylphenylpolyethylenglykol), Ampicillin, Kanamycin, Tetrazyclin, TEMED (N,-N,-N´,-N´,-Tetraethylmethylendiamin), Cycloheximid (CHX), Anisomycin, Staurosporin, Thapsigargin und A23187. **Schleicher und Schüll, Dasseln:** Gel-Blotting-Papiere.

Alle übrigen Chemikalien wurden in reinster Form (p.a.) von den Firmen Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma, Deisenhofen oder Fluka, Neu-Ulm bezogen.

7.1.2 Häufig verwendete Puffer

50xTAE-Puffer

2 M	Tris-Base
2 M	konz. Essigsäure
50 mM	EDTA, pH 8,0

10xTBE-Puffer

0,45 M	Tris-Base
0,45 M	H_3BO_3
10 mM	EDTA, pH 8,0

TE-Puffer

10 mM	Tris•HCl, pH 7,5
1 mM	EDTA

DNA-Probenpuffer

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol
30 % (w/v)	Glycerin

PBS

10 mM	Phosphatpuffer, pH 7,5
2,7 mM	KCI

	138 mM	NaCl
тв	S	
	25 mM	Tris•HCl, pH 7,5
	2,7 mM	KCI
	138 mM	NaCl
100x SPI (small peptide inhibitors)		
	1 mg/ml	Leupeptin
	1 mg/ ml	Antipain
	1 mg/ml	Pepstatin

1 ma/ml	Chymostatin A
i mg/m	Onymostatin A

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

7.1.3 Biologisches Material

7.1.3.1 Eukaryontische Zellen

Zellinie	wichtige Eigenschaften	Referenz
SKW6.4	humane B-lymphoblastoide Zellinie	ATCC TIB 215
BL60	humane Burkitt-Lymphomzellinie, Subtyp P7	Wolf et al., 1990
K50	CD95-transfizierte BL-60-Zellinie	Oehm et al., 1992
K2.2	deletierter CD95 (∆57 As) transfizierte BL-60-Zellinie, freundlicherweise von Dr. M. Pawlita, Heidelberg, zur Verfügung gestellt	Kischkel et al., 1995
BJAB	humane B-lymphoblastoide Zellinie	Clements et al., 1975
BJAB-CrmA	CrmA-transfizierte BJAB-Zellinie	Chinnaiyan et al., 1996b
BJAB-CrmA ^{mt}	inaktive Mutante von CrmA-transfizierter BJAB-Zellinie	Chinnaiyan et al., 1996b
Raji	humane Burkitt-Lymphomzellinie	ATCC CCL 86
Boe ^R	humane prä-B-Zellinie, für mehr als 4 Monate in Anwesenheit von 1 µg/ml anti-APO-1 kultiviert	Kischkel et al., 1995
HUT78	humane T-Zellinie mit T-Helferzell-Phänotyp	ATCC TIB 161
Jurkat	humane T-Zellinie Subtyp J16 (akute lymphozytäre Leukämie)	Dr. J. Borst, Holland, Cancer Institute
Н9	humane T-Zellinie	Dr. V. Bosch, DKFZ, Heidelberg
HT29 (WiDr)	humane Colonkarzinomzellinie, CD95 ^{low}	ATCC CCL 218
HepG2	humane Hepatomzellinie	ATCC HB 8065

MCF7-CD95- Vektor	humane Brustkarzinomazellinie, CD95- und Kontrollvektor- transfiziert	Jäätela et al., 1995
MCF7-CD95- Bcl-x _L	humane Brustkarzinomazellinie, CD95- und Bcl- x_L -transfiziert	Jäätela et al., 1995
WEHI231	Maus-Thymom-Zellinie	Cahill et al., 1996
430	Maus-Fibroblasten-Zellinie L929, transfiziert mit dem humanen CD95	Ratter et al., 1996

7.1.3.2 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Verwendung	Referenz, Bezugsquelle
XL1 blue	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene, Heidelberg
SG13009[pREP4]	Produktion des CD95zT	Gottesman et al., 1981

7.1.4 Nährmedien

7.1.4.1 Medium für die Zellkultur

RPMI-Kulturmedium (Kat.-Nr. 51800-035)

10 mM	HEPES

2 mM Glutamin

50 mg/ml Gentamicin in RPMI-1640, pH 7,3

Dem Medium wurde 10 % FKS hinzugefügt, das zuvor 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert worden war, und der pH auf 7,3 eingestellt.

DMEM-Kulturmedium (Kat.-Nr. 31885-023)

10 mM	HEPES
2 mM	Glutamin

50 mg/ml Gentamicin

1 mM Pyruvat

nicht-essentielle Aminosäuren

Dem Medium wurde 10 % FKS hinzugefügt, das zuvor 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert worden war, und der pH auf 7,3 eingestellt.

RPMI-Mangelmedium für die metabolische Markierung von Proteinen

(Kat.-Nr. 51871-010)

L-Arginin, L-Cystin, L-Glutamin, i-Inositol, L-Leucin, Glukose, L-Methionin,

Natriumphosphat

ohne:

Komplementiert mit:	10 mM	HEPES
	2 mM	L-Glutamin
	50 mg/ml	Gentamicin
	0,084 mg/m	L-Arginin
	7,2 μg/ml	i-Inositol
	0,105 mg/ml	L-Leucin
	0,125 mg/ml	Natriumphosphat
	4,5 mg/ml	Glukose

Dem Medium wurde 10 % FKS hinzugefügt, das zuvor 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert worden war, und der pH auf 7,3 eingestellt.

7.1.4.2 Bakterienanzuchtmedien

Luria Broth (LB)

5 g/l	NaCl
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Trypton

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

Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur von ca. 45 ℃ Ampicillin (150 µg/ml), Tetrazyclin (10 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) in der angegebenen Endkonzentration zugesetzt.

7.1.5 Seren und Antikörper

Name	Antigen	Herkunft
Anti-APO-1 (IgG3, IgG2b)	anti-CD95 (human)	Dr. P.H. Krammer, DKFZ, Heidelberg (Trauth et al., 1989; Dhein et al.,1992)
FII23c (IgG3)	auf menschlichen und murinen Zellen nicht-bindend	Dr. P.H. Krammer, DKFZ, Heidelberg (Trauth et al., 1989)
PA-1 (lgG1)	erkennt den humanenTransferrin- Rezeptor	Dr. Dr. G. Moldenhauer (Van Endert und Moldenhauer, 1992)
F01 (Kaninchen, polyklonal)	anti-FADD (138-148 As) erkennt (CEDRYPRNLTERVRESLRIW), affinitätsgereinigt	Dr. P.H. Krammer, DKFZ, Heidelberg (Kischkel et al., 1995)
FADD (lgG1)	anti-FADD (human)	Dianova, Hamburg

R1 (Kaninchen, polyklonal)	anti-FLICE (human, 183-201 As) erkennt (CKERSSSLEGSPDEFSNGE), affinitätsgereinigt	Dr. P.H. Krammer, DKFZ, Heidelberg (Medema et al., 1997)
R2 (Kaninchen, polyklonal)	anti-FLICE (human, 466-479 As) erkennt (CVEVSNKDDKKNMGKQMPQ), affinitätsgereinigt	Dr. P.H. Krammer, DKFZ, Heidelberg (Medema et al., 1997)
Bax (N-20) (Kaninchen, polyklonal)	anti-Bax (human, 11-30 As), affinitätsgereinigt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bcl-2 (N-19) (Kaninchen, polyklonal)	anti-Bcl-2 (human, 4-21 As), affinitätsgereinigt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bik (Ziege, polyklonal)	anti-Bik (human), affinitätsgereinigt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bcl-x _∟ (Kaninchen, polyklonal)	anti-Bcl-x _L (human, 18-233), affinitätsgereinigt	Dianova, Hamburg
CII-10 (mAk)	anti-PARP (human)	Dr. A. Bürkle, DKFZ, Heidelberg
(Ziege, polyklonal)	Peroxidase-konjugierter anti-Maus (Isotypen IgG, IgG1, IgG2b), affinitätsgereinigt	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
(Ziege, polyklonal)	Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen- IgG, affinitätsgereinigt	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
(Kaninchen, polyklonal)	Biotin-SP-konjugierter anti-Maus-IgG Fc- spezifisch, affinitätsgereinigt	Dianova, Hamburg
(Ziege, polyklonal)	Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)- konjugierter anti-Maus-IgG, affinitätsgereinigt	Dianova, Hamburg
(Kaninchen, polyklonal)	anti-Maus-IgG Fc-spezifisch, affinitätsgereinigt	Dianova, Hamburg
(Ziege, polyklonal)	anti-human-IgM Fc-spezifisches F(ab') ₂ - Fragment, affinitätsgereinigt	Dianova, Hamburg
(Ziege, polyklonal)	anti-human-IgM, affinitätsgereinigt	Dianova, Hamburg
Kaninchen- serum	Kaninchen-IgG	Dianova, Hamburg
anti-SAPK	anti-SAPK α , β , γ generiert gegen Ratten- SAPK β ; kann jedoch nicht zwischen α -, β - und γ -SAPK-Isofomen dieser Kinasenfamilie unterscheiden	Dr. J. Kyriakis, Massachusetts General Hospital, Charlestown, USA
anti-JNK1 (mAk)	anti-JNK1 (human)	Pharmingen, Hamburg
αhscdc2 (Kaninchen, polyklonal)	anti-cdc2 (human)	Dr. I. Hoffmann, EMBL, Heidelberg
αhscdk2	anti-cdk2 (human)	Dr. I. Hoffmann, EMBL, Heidelberg
GN1 (Kaninchen, polyklonal)	anti-PITSLRE (human), affinitätsgereinigt	Dr. V. Kidd, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

OKT3 (IgG2b)	anti-CD3 (human)	Dr. P.H. Krammer, DKFZ, Heidelberg
Anti-AU1 (IgG1)	erkennt ein Hexapeptid (AU1) aus Papillomviren	Babco (Richmond, USA), (Lim et al., 1990)

Alle monoklonalen Antikörper (mAk) stammten aus der Maus. Isotyp ist angegeben, wenn bekannt.

7.1.6 Molekularbiologische Materialien

7.1.6.1 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von W. Weinig (Angewandte Tumorvirologie, DKFZ, Heidelberg) oder MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, an einem automatisierten DNA-Synthetisierer (Applied Biosystems, Weiterstadt) hergestellt und durch HPLC gereinigt.

Die verwendeten Oligonukleotide waren:

Bcl-x _L -F	TTGGACAATGGACTGGTTGAGCC
Bcl-x _L -R	TGGGAGGGTAGAGTGGATGGTC
Bax-F	GAAAAACACAGTCCAAGGCAGC
Bax-R	CTTTTTGTGTCAGGTTCCGTCG
BIK-F	TGATGGAGACCCTCCTGTATGAGCAG
BIK-R	CCTTAAGTGTGGTGAAACCGTCCATG
FAP-F	CAGCAGTCAGGATCATCAAACACC
FAP-R	GAACTGGAACCCGTAAGACTAGAC
Caspase-8 N-Domäne-F	GGACTACATTCCGCAAAGGAAGCAAG
Caspase-8 N-Domäne-R	TGGGCACAGACTCTTTTCAGGATGTC
Caspase-8 C-Domäne-F	GGACAGGAATGGAACACACTTGGATG
Caspase-8 C-Domäne-R	CTGCCAAAGTGACTGGATGTACCAGG
HCP-F	CCCTACAGAGAGATGCTGTCCCTGG
HCP-R	GGTACTTGAGGTGGATGATGGTGCC
FADD-F	GGAGAAGGCTGGCTCGTCAGCTCAAA
FADD-R	CCAGGCTGTGTAGATGCCTGTGGT
RIP-F	CGAAAATGCAGTTGTGAAGAGAATG
RIP-R	GCGAGGTGAAGTCGACGGCATC
β-Aktin-F	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCCTA
β-Aktin-R	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG
GAPDH-F	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA
GAPDH-R	TCTAGACGGCAGTCAGGTCCACC

Der Primer für β -Aktin und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAPDH) wurde von Stratagene erworben. Die cDNA-Längen, definiert durch die Primer, sind: bax: 628 bp, bcl-x_L: 772 bp, bik: 312 bp, FAP: 445 bp,

Caspase-8-N-Domäne: 417 bp, Caspase-8-C-Domäne: 508 bp, β -Aktin: 661 bp, GAPDH: 600 bp, HCP: 313 bp, FADD: 320 bp und RIP: 1120 bp.

7.1.6.2 Vektoren

pQE8	Expressionsplasmid abgeleitet von pDS56 und pDS781/RBSII-DHFRS	Stüber et al., 1990
pBluescriptKS(+)	Hochkopiezahlvektor	Stratagene Heidelberg
FADD-pGSTag	FADD in pGSTag kloniert, ein Glutathion-S- Transferase-Fusionsprotein-Expressions-vektor	Dr. V. Dixit (Chinnaiyan et al., 1995)
FADD-AU1-pcDNA3	FADD mit einem AU1-Epitop am N-Terminus in pcDNA3 kloniert, ein Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor	Dr. V. Dixit (Chinnaiyan et al., 1995)
FADD-DN-AU1- pcDNA3	FADD-DN mit einem AU1-Epitop am N-Terminus in pcDNA3 kloniert, ein Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor	Dr. V. Dixit (Chinnaiyan et al., 1995)
FADD-pET	FADD in pET kloniert, ein 6xHis-Fusionsprotein- Expressionsvektor	Dr. V. Dixit (Muzio et al., 1995)
FLICE-pcDNA3	FLICE in pcDNA3 kloniert	Dr. V. Dixit (Muzio et al., 1996

7.1.6.3 Enzyme und Kits

Folgende Enzyme und Kits wurden verwendet:

Enzym	Bezugsquelle
ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit FS	Perkin Elmer, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase aus Krabben	USB , Ohio, USA
Bakterielle, alkalische Phosphatase	Genofit, Heidelberg
DNAse (RNAse frei)	Boehringer, Mannheim
DNA-Polymerase I	Pharmacia, Freiburg; Amersham, Braunschweig
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Gene Amp RNA PCR Core Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Mungobohnennuklease	Gibco BRL, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, München
Vent _R TM DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
RNAse H	Boehringer, Mannheim
RNAse A	Boehringer, Mannheim

7 Experimenteller Teil

BNeasy Total BNA Kit	Olagen Hilden
Sequenase	USB, Ohio, USA
TNT (in vitro-Translations-Kit)	Promega, Heidelberg
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase	Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL, Karlsruhe; Pharmacia, Freiburg

Die Restriktionsenzyme stammten von AGS, Heidelberg. Außerdem wurde der Sequenase[™] System-Kit Version 2.0 von USB, Ohio, USA, verwendet. Zur Proteinbestimmung in Lösungen wurde das BCA-Proteinbestimmungs-Kit von Pierce, Rockford, USA, benutzt.

7.1.7 Caspaseninhibitoren

Name	Verbindung	Bezugsquelle
zVAD-fmk	Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-	Enzyme System Products (Dublin,
	Fluoromethylketon	CA, USA)
zDEVD-fmk	Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-	Enzyme System Products (Dublin,
	(O-Methyl)-Fluoromethylketon	CA, USA)
zIETD-fmk	Benzoxycarbonyl-lle-Glu-Thr-Asp-	Enzyme System Products (Dublin,
	(O-Methyl)-Fluoromethylketon	CA, USA)
Ac-YVAD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd	Bachem (King of Prussia, PA, USA)
Ac-DEVD-CHO	Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-Aldehyd	Bachem (King of Prussia, PA, USA)

7.1.8 Computer und Software

Es wurde mit dem Apple Macintosh Computer gearbeitet. Modelle: Power Macintosh 6100/66 und 7200/66. Die benutzte Software waren: Microsoft Word Version 6.01 für Power Macintosh von Microsoft Corporation; Lasergene Version 1.61 von DNAStar, Inc.; Canvas Version 3.5.3b von Deneba Systems, Inc.; Microsoft Power Point Version 4.0 für Power Macintosh von Microsoft Corporation; Reference Manager Version 2.51 für Macintosh von Research Information Systems; Netscape Navigator Version 3.0 von Netscape Communications Corporation und ScanAnalysis von Biosoft (Feruson, MO, USA). Für die Datenbank- und die Literaturrecherche wurde das National Center of Biotechnology Information, World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/; die "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM (TM). Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), 1996, World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/), die "Mouse Genome Database" (Jackson Laboratory, Bar Harbor. Maine. USA, World Wide Web URL: http://www.informatics.jax.org/mgd.html) und das Husar-Paket vom Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg verwendet.

7.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Autoradiographiekassetten	Suprema, Heidelberg
Blotting Apparatur Trans-Blot Semi-Dry	Biorad, München
Brutschränke Steri-Cult Incubator, Forma Scientific	Labotech, Göttingen
Durchflußphotometer UV-1	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresis Power Supply Phero-Stab 500	Biotec Fischer
Elektrophoresis Power Supply ECPS 3000/15	Pharmacia, Freiburg
ELISA Reader EAR 400 AT	SLT-Labinstruments, Österreich
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzdurchflußzytometer (FACScan)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank -20℃	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank -70 ℃, Forma Scientific	Labotech, Göttingen
Geltrockner Drygel SR SE1160	Hoefer, San Francisco, USA
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart
Kühlzentrifuge Sorvall RC 3B Plus	DuPont, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Sorvall RC 5B	DuPont, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer Ikamag	IKA Labortechnik, Heidelberg
Membran Vakuumpumpe MD8C	Vacuubrand, Mannheim
Mikrowellengerät	Bosch, Stuttgart
Minigelelektrophoresekammer	LMS Labortechnik, Heidelberg
pH-Meter Calimatic, Knick, Österreich	LHD Labortechnik, Heidelberg
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Japan
Quarzküvetten	Hellma, München
Schlauchpumpe P-1	Pharmacia, Freiburg
Schüttelinkubator Unimax 2010	Heidolph, Hanau
Spektralphotometer U-1100	Hitachi, Japan
Sterilarbeitsplatz Laminar-air-flow	Gelman, Labotech, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
Vakuum-Konzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Bruchsal
Wasserbad	Julabo, Heidelberg
Zählkammer nach Neubauer	Brandt, Mannheim
Überkopfrührer	Kühn+Bayer, Nidderau

7.2 Methoden

7.2.1 Zellkultur

7.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

• Stammhaltung

Die *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agar-Platten bei 37 ℃ angezogen. Für die Anzucht von Plasmidtragenden Stämmen wurden Selektionsmedien verwendet, denen die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt worden waren. Für die Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit Zellen einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (220 UpM, 37 ℃) inkubiert. Stammkulturen der Bakterienstämme wurden auf LB-Agar-Platten bei 4 ℃ aufbewahrt und nach Bedarf überimpft. Glycerinkulturen der Bakterien wurden angelegt, indem zu einer frischen Übernachtkultur Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) gegeben wurde. Die Lagerung erfolgte bei -80 ℃.

7.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter ("kompetenter") Bakterien

200 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtkultur des verwendeten Bakterienstammes angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 im Schüttler inkubiert (37 °C, 200 UpM). Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Bakteriensuspension in 50 ml-Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (10 min, 720x g, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 60 ml eiskalter TFB I-Lösung (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach 90 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension wiederum abzentrifugiert (s. oben), und das Pellet wurde in 8 ml eiskalter TBF II-Lösung (10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 (v/v) Glycerin, 10 mM MOPS, pH 7,0) resuspendiert. Davon wurden 200 μ I-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Die nach dieser Methode hergestellten "kompetenten" Bakterien wiesen eine Transformationseffizienz von 1x10⁷ bis 1x10⁸ Transformanden pro μ g Plasmid-DNA auf.

7.2.1.3 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden in einem Brutschrank (Forma Scientific, Marietta, USA) bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt (steriler Arbeitsplatz, sterile Geräte und Medien).

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden mikroskopisch mit einem Neubauer-Hämozytometer im Trypanblau-Ausschlußtest bestimmt. Lebende Zellen erschienen farblos, tote Zellen wurden durch Trypanblau gefärbt. Aus einer gut suspendierten Zellkultur wurde ein Aliquot steril entnommen, 1:2 mit Farbpuffer (0,16 % (w/v) Trypanblau, 150 mM NaCl) gemischt und im Hämozytometer unter dem Mikroskop betrachtet. Es wurden jeweils zwei der Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl/ml = (Anzahl der Trypanblau-negativen Zellen) x 10^4 .

Adhärente Zellen HepG2 (HT29) wurden in DMEM (RPMI)-Medium kultiviert und alle drei bis vier Tage 1:4 umgesetzt. Zur Zelldissoziation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Sobald sich die Zellen ablösten, wurden sie mit mindestens der zehnfachen Menge Kulturmedium abgespült und in neue Flaschen überführt.

Alle übrigen Zellinien wurden in RPMI-Medium mit 10 % (v/v) FKS kultiviert und zwei- bis dreimal pro Woche 1:10 in frischem Kulturmedium verdünnt.

Zum Einfrieren wurden 1x10⁷ Zellen abzentrifugiert (10 min, 465x g, Heraeus-Zentrifuge) und in 0,5 ml eiskaltem RPMI-Medium mit 40 % (v/v) FKS aufgenommen. Anschließend wurde 0,5 ml RPMI-Medium mit 20% (v/v) DMSO unter vorsichtigem Schütteln tropfenweise zugesetzt. Die Zellen wurden bei -70 °C eingefroren und bei -192 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen im 37 °C-Wasserbad schnell aufgetaut und sofort seriell mit frischem Kulturmedium verdünnt.

7.2.1.4 Präparation von peripheren T-Zellen

Humane periphere T-Zellen wurden, wie von Klas et al. (1993) beschrieben, präpariert. Zusammenfassend gesagt: periphere mononukleare Zellen aus dem Blut von gesunden Spendern wurden mit einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Pharmacia, Freiburg) isoliert. Adhärente Zellen wurden durch Anhaften an Kulturflaschen aus Plastik entfernt (1 h Inkubation). T-Zellen wurden von den peripheren mononuklearen Zellen durch Rosettierung mit 2-Amino-Ethylisothyouroniumbromidbehandelten Schaferythrozyten, wie von Pellegrino et al. (1975) beschrieben, isoliert. Die unstimulierten (d0) T-Zellen (2x10⁶ Zellen/ml) wurden mit Phytohaemagglutinin (PHA)-P (1 μg/ml) für 18-20 h aktiviert (d1 T-Zellen), gewaschen und in der Gegenwart von 20-25 U/ml rekombinatem, humanem IL-2 für 5 Tage kultiviert (d6 T-Zellen).

7.2.2 Arbeiten mit DNA/RNA

7.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

• Plasmid-DNA-Isolierung aus E. coli

Bei den im folgenden beschriebenen Isolierungsmethoden von Plasmid-DNA werden die Bakterien zunächst lysiert, anschließend wird die DNA durch Hitze- oder Alkalibehandlung denaturiert. Zirkuläre Plasmid-DNA kann nach Abkühlung bzw. nach Neutralisierung bevorzugt renaturieren, während die denaturierte, chromosomale DNA durch Zentrifugation abgetrennt werden kann.

• Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab, I

Diese Methode dient zur Gewinnung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA, die hinreichend rein zur Restriktionsanalyse ist.

1,5 ml einer Übernachtkultur von Bakterien wurden pelletiert (5 min, 320x g) und anschließend in 150 µl GTE-Puffer (0,01 M EDTA, 0,05 M Glukose, 0,025 M Tris•HCl, pH 8,0) resuspendiert. Dazu wurden 300 µl einer frisch angesetzten NaOH-SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden zur Neutralisation 250 µl 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,8, zugegeben und nach vorsichtigem Mischen weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die chromosomale DNA wurde durch Zentrifugation (5 min, 13600x g, 4 °C) abgetrennt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe eines gleichen Volumens Ethanol_{abs/-20 °C} zum Überstand gefällt und abzentrifugiert (5 min, 13600x g, 4 °C). Das mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschene Pellet wurde in 20 µl TE aufgenommen.

• Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab, II

Sollte Plasmid-DNA für eine Sequenzanalyse verwendet werden, so wurde sie unter Verwendung von Qiagen T100-Säulen isoliert.

150 ml Bakterien einer Übernachtkultur wurden abzentrifugiert (2900x g, 15 min). Das Pellet wurde in 4 ml Puffer P1 (100 mg/ml RNase A, 50 mM Tris•HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert, mit 4 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) versetzt und durchmischt. Danach wurden 4 ml P3-Lösung (3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugegeben. Das Bakterienlysat wurde für 30 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (30 min, 2900x g). Der Überstand wurde durch eine Nylonmembran filtriert. Mit 4 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100, pH 7,0) wurde eine Qiagen T100-Säule äquilibriert. Die DNA-Lösung wurde auf die Säule gegeben, die anschließend zweimal mit 10 ml Puffer QC (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol, pH 7,0) gewaschen wurde. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris•HCl, 15 % (v/v) Ethanol, pH 8,5). Zum Eluat wurde das gleiche Volumen Isopropanol gegeben. Nach 30 min auf Eis wurde die DNA abzentrifugiert (30 min, 2900x g), mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und in 100 μl TE-Puffer gelöst.

• Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Große Mengen von Plasmid-DNA wurden unter Verwendung von Qiagen T500-Säulen isoliert.

300 ml Bakterien einer Übernachtkultur wurden abzentrifugiert (13000x g, 5 min). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 suspendiert, mit 10 ml Puffer P2 versetzt und durchmischt. Danach wurden 10 ml P3-Lösung hinzugegeben. Das Bakterienlysat wurde für 30 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (30 min, 13600x g, 4 °C). Der Überstand wurde durch eine Nylonmembran filtriert. Eine Qiagen T500-Säule wurde mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Die DNA-Lösung wurde auf die Säule gegeben, die dann zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen wurde. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Zum Eluat wurde das gleiche Volumen Isopropanol gegeben. Nach 30 min auf Eis wurde die DNA abzentrifugiert (30 min, 13600x g, 4 °C), mit 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen und in 200 μ l TE-Puffer gelöst.

Isolierung von RNA

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Total RNA Kits von Quiagen (Hilden) nach deren Protokoll durchgeführt.

7.2.2.2 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

• Deproteinierung durch Phenolisierung

Mit Proteinen verunreinigte DNA-Präparationen können durch eine Phenolextraktion gereinigt werden.

Zur wässrigen DNA-Lösung wurde dasselbe Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1/v:v:v) gegeben, geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (1 Minute, 13600x g, RT). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol extrahiert. Anschließend wurden Phenolreste durch zweimalige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1/v:v) entfernt.

• Konzentrierung von DNA durch Alkoholfällung

Nach Zugabe von Ethanol oder Isopropanol zu einer DNA-Lösung bildet sich in Anwesenheit von einwertigen Kationen ein DNA-Präzipitat, das sich durch Zentrifugation pelletieren läßt.

Zu einer DNA-Lösung wurde 1/10x Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2, gegeben. Entweder wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol oder das einfache Volumen Isopropanol hinzugefügt. Nach zehnminütiger Inkubation bei -70 °C wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C, 13600x g, 4 °C), das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

• Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Die DNA wurde nach einer Restriktionsspaltung in einem einprozentigen "low-melting-point"-Agarosegel in TE-Puffer mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Auf dem UV-Leuchttisch wurde bei einer Wellenlänge von 315 nm die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten und mit dem GeneClean II-Kit (La Jolla, USA) gereinigt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in TE- aufgenommen.

• Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) gemessen. Die Konzentration einer Lösung mit doppelsträngiger DNA berechnet sich nach folgender Formel:

OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50 = DNA-Konzentration [mg DNA/ml].

Die Konzentration einer Lösung mit einzelsträngiger DNA berechnet sich nach der folgenden Formel:

OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40 = DNA-Konzentration [mg DNA/ml].

Die Konzentration einer Lösung mit RNA berechnet sich nach der folgenden Formel:

OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 33 = RNA-Konzentration [mg RNA/ml].

Die Molarität einer Lösung mit Oligonukleotiden läßt sich nach der folgenden Formel berechnen:

 $OD_{260}/(Anzahl der Nukleotide des Oligonukleotids x 10) = Oligonukleotidkonzentration [mmol/ml].$

Zusätzlich wurde jeweils die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD₂₈₀) bestimmt. Das Verhältnis der optischen Dichten (OD₂₆₀/OD₂₈₀) erlaubt eine Aussage über die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen oder Phenolresten. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 ist die Nukleinsäurelösung hinreichend rein und kann für gentechnologische Untersuchungen eingesetzt werden.

• Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit Lösungen definierter Konzentration

Ein Aliquot der zu untersuchenden Lösung wurde im Agarosegel mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid parallel zu Proben mit einer definierten DNA-Menge analysiert. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten auf dem Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 315 nm konnte die Konzentration abgeschätzt werden.

7.2.2.3 Synthese des ersten cDNA-Stranges (Reverse Transkription, RT)

Die Erststrang-cDNA-Synthese wurde nach der Anleitung des Gene Amp RNA PCR Core Kits von Perikin Elmer (Weiterstadt) mit Hlife von Random-Primern und der Moloney Murine Leukemia Virus Reversen Transkriptase (50 U/Ansatz) gemacht. Die Gesamt-RNA (1 mg) wurde im Reaktionsansatz 45 min bei 42 ℃ inkubiert und anschließend 5 min bei 95 ℃ Hitze-inaktiviert.

7.2.2.4 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Aliquots von 10 µl cDNA (Äquivalent von 500 ng Gesamt-RNA) wurden in 50 µl Endvolumen mit dem Gene Amp Kit RNA PCR Kit (Perikin Elmer, Weiterstadt) amplifiziert. Die Proben wurden mit 100 µl Mineralöl überschichtet und 2 min bei 95 °C, 50 s bei 55 °C und 1 min bei 72 °C, gefolgt von 33 Zyklen für 35 s bei 95 °C, 50 s bei 55 °C und 1 min bei 72 °C, amplifiziert. Der letzte Zyklus bestand aus 35 s bei 95 °C, 50 s bei 55 °C und 7 min bei 72 °C, um die Reaktion abzuschließen. Die PCR wurde in einem automatischen DNA Thermal Cycler (Stratagene, Heidelberg) in Gegenwart von 0,2 pmol eines Forward (F)- und eines Reverse (R)-Primers durchgeführt (Primer: s. Kapitel 7.1.6.1). Alle PCR-Reaktionen wurden elektrophoretisch auf 2% Agarosegelen aufgetrennt und die Banden mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Identität jeder Bande wurde durch Sequenzierung mit dem "ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit FS" und dem 373A DNA Sequnzierer (Perkin Elmer) überprüft.

7.2.2.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

• Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden TBE- oder TAE-Agarosegele benutzt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Agarose in einer Konzentration von 0,7 % bis 2 % eingesetzt.

Die Agarose wurde in TBE- bzw. TAE-Puffer im Mikrowellenofen erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 55℃ wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml hinzugegeben. Das Gel

wurde in einen waagerechten Gelschlitten gegossen, und ein Kamm wurde zur Formung der Taschen eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Laufpuffer für 1-12 h bei 2-8 V/cm. Die durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar gemachten Nukleinsäuren wurden unter UV-Licht (315 nm) fotografiert (Sony Video Graphic Printer Device). Der Logarithmus des Molekulargewichts linearer DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional ihrer Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die Länge unbekannter DNA-Fragmente konnte so durch den Vergleich mit der Wanderstrecke bekannter DNA-Fragmente (DNA-Marker), die parallel dazu aufgetrennt wurden, ermittelt werden.

7.2.2.6 Gentechnologische Methoden

• Restriktionsspaltungen von DNA

Je nach Enzym wurden die Reaktionsbedingungen durch Einsatz der 10-fachen Verdünnung des jeweiligen vom Hersteller (AGS, Heidelberg) empfohlenen Reaktionspuffers eingestellt. Für Restriktionsspaltungen im analytischen Maßstab wurde die DNA in 10 bis 20 µl gespalten, wobei 1 µg DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym 1-2 h bei 37 °C inkubiert wurde. Das Ansatzvolumen für Spaltungen im präparativen Maßstab richtete sich nach der Menge der eingesetzten DNA (Endkonzentration: 0,1-0,2 mg/ml). Sollte noch eine RNAse-Behandlung durchgeführt werden, so wurde nach der Spaltung 1/10x Volumen einer RNAseA-Lösung (2 mg/ml) hinzugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Vor der Gelelektrophorese wurde 1/5x Volumen des Auftragepuffers zum Spaltungsansatz hinzugefügt.

• Dephosphorylierung von DNA

Soll linearisierte Vektor-DNA für eine Ligation eingesetzt werden, so können die endständigen Phosphatgruppen durch eine Phosphatase abgespalten werden, um eine intramolekulare Religierung des Vektors im Ligationsansatz zu verhindern. Replikationsfähige DNA-Moleküle entstehen nur dann, wenn Insertions-DNA mit endständigen Phosphat-Gruppen zwischen die beiden dephosphorylierten Vektor-Enden ligiert wird. Dadurch kann eine höhere Klonierungseffizienz erreicht werden.

1 μg linearisierte Vektor-DNA wurde mit 5 μl 10x Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris•HCl, pH 8,0) und ddH₂O auf 50 μl aufgefüllt. 75 U des Enzyms BAP (bacterial alkaline phosphatase) oder SAP (shrimp alkaline phosphatase) wurden hinzugegeben und 30 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese in einem 1x TAE-Agarosegel und eine Reinigung mit dem GeneClean II-Kit (La Jolla, USA).

Ligationen

T4-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH- und 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA-Moleküle in Gegenwart von ATP. Vektor-DNA (0,05 bis 0,1 pMol) wurde mit der zu inserierenden DNA gemischt, so daß eine etwa zweifach höhere Konzentration der Insertions-DNA vorlag. Durch Zugabe von 5-fach konzentriertem Ligationspuffer wurden folgende Reaktionsbedingungen hergestellt: 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5 % (w/v) Polyethylenglykol-8000 und 50 mM Tris•HCl, pH 7,6. Nach Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase wurde das Reaktionsgemisch in einem Volumen von 5-10 μl über Nacht bei 16 °C inkubiert.

7.2.2.7 Herstellung von gentechnologisch veränderten Organismen

• Transformation "kompetenter" Bakterien

Tiefgefrorene, "kompetente" Bakterien (200 µl) wurden auf Eis aufgetaut. Eine 0,02 bis 0,05 pMol Plasmid-DNA wurde in einem Höchstvolumen von 5 µl zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in einem Wasserbad 120 s auf 42 °C erwärmt und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.2.2.8 cDNA-Klonierung von Caspase-8

Die Sequenzen, die von den charakterisierten Peptiden erhalten wurden, konnten zur Datenbanksuche eingesetzt werden. In der privaten Human Genome Sciences Datenbank wurde ein Klon mit Namen HHFHY89 gefunden, der das gesamte offene Leseraster ("open reading frame", ORF) besaß. Dies wurde durch automatische und manuelle Sequenzierung überprüft. Zusätzlich wurde die cDNA-Bank, die aus Poly(A)⁺-RNA von Endothelzellen aus humanen Nabelschnur-Venen stammt und die in den pcDNA1-Vektor kloniert wurde (Invitrogen), mit einem ³²P-markierten *Bam*HI-*Xho*I Restriktionsfragment des HHFHY89-Klons (Sambrock, 1989) durchsucht. Die DNA-Sequenzanalyse der hybridisierten Klone bestätigte die Orginalsequenz.

Diese Arbeit wurde in den Laboren von V. Dixit und von Human Genome Sciences durchgeführt.

7.2.3 Zellbiologische Methoden

7.2.3.1 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden während der Markierung auf Eis gehalten und sämtliche Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt. 1x10⁶ Zellen pro Ansatz wurden abzentrifugiert (7 min, 200x g) und anschließend in 100 µl PBS, das 5% FKS, 0,1% (w/v) Natriumazid und 1 µg/ml Erstantikörper oder Kontrollantikörper enthielt, aufgenommen. Die Zellen wurden 20 min inkubiert und anschließend zweimal mit PBS (5 % FKS, 0,1 % (w/v) Natriumazid) gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit einem FITC- oder Phycoerythrin-konjugierten, spezifischen Zweitantikörper (1:50 verdünnt, 50 µl/Ansatz) 20 min lang. Nach zweimaligem Waschen wurde das Zellpellet in 400 µl PBS mit 5% FKS und 0,1% (w/v) Natriumazid aufgenommen und gut resuspendiert. Wurde die Fluoreszenz der Zellen erst am folgenden Tag untersucht, erfolgte eine Fixierung der Zellen durch Zugabe von Formaldehyd

(Endkonzentration: 1 % (w/v)). Die Analyse erfolgte in einem Fluoreszenzdurchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg).

7.2.3.2 Biotinylierung von Oberflächenmolekülen auf Zellen

Durch Anhängen von Biotingruppen an Lysinreste von Proteinen können diese einer anschließenden Detektion durch Streptavidin zugänglich gemacht werden. Dabei läßt sich die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin nutzen. Zusätzlich ist es eine Möglichkeit, ausschließlich Oberflächenmoleküle zu markieren, da Biotin nicht membrangängig ist. Eine Interferenz der Markierung mit der Erkennung durch Antikörper wird durch einen Abstandhalter erreicht, der zwischen Biotin und der lysinreaktiven Gruppe eingefügt ist.

Hierzu wurden die Zellen einmal mit HBS oder PBS gewaschen und 1x10⁷ Zellen in 1 ml Biotinylierungspuffer (10 mM Na-Borat, pH 8,8, 150 mM NaCl) resuspendiert. Unmittelbar vorher wurde das Biotin-X-NHS, in DMSO gelöst (10 mg/ml), zur Zellsuspension gegeben (Endkonzentration: 50 μg/ml). Nach 15 min bei Raumtemperatur im Überkopfrührer wurde Ammoniumchlorid (ad 10 mM) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen und anschließend mit 50 ml Quenchingpuffer (50 mMTris•HCl pH 7,4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend lysiert und weiterverarbeitet.

7.2.3.3 Isolation von DNA-Fragmenten und Darstellung einer DNA-Leiter

2,5x10⁶ Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 120 μ l 0,5x TBE/0,25 % (v/v) NP-40 lysiert. Die RNA wurde durch Inkubation mit 20 μ g/ml RNAse H (DNAse-frei) 30 min bei 37 °C verdaut. Nach Inkubation in 1 mg/ml Proteinase K 30 min bei 37°C wurde 5-fach DNA-Probenpuffer zugefügt und die Probe in einem 1,2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

7.2.3.4 Zytotoxizitätstest

Der Test beruht auf dem Zellzahl-abhängigen Umsatz des Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid) [Mosmann, 1983].

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit frischem Kulturmedium auf 1x10⁵ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 2x10⁴ Zellen wurden in 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatten gegeben und über Nacht kultiviert. Danach wurden 100 μl von seriellen Verdünnungen der Stimuli (anti-APO-1 oder FII23c) zugegeben. Das Endvolumen eines Ansatzes betrug 200 μl/Loch. Die Zellen wurden bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Vor Abbruch der Mikrokulturen wurden die Platten mikroskopisch betrachtet. Dabei korrelierte die später gemessene Inhibition des MTT-Umsatzes mit den für Apoptose charakteristischen morphologischen Zellveränderungen. Während der letzten vier oder sechs Stunden wurden 25 μl MTT (5 mg/ml in PBS) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl HCI/SDS-Lösung (0,01 N HCI, 20 % (w/v) SDS) abgebrochen. Zum Auflösen der Farbstoffkristalle wurden die Ansätze mehr als 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alle Proben wurden in Triplikaten angesetzt.

7.2.3.5 Messung apoptotischer Zellen nach der Methode von Nicoletti

Diese Messung beruht auf dem Verlust kleiner DNA-Fragmente während der Apoptose von Zellen. Durch Einlagerung von Propidiumiodid in die verbleibende DNA kann diese unter UV-Einstrahlung sichtbar gemacht und im Fluoreszenzdurchflußzytometer quantifiziert werden. Kerne apoptotischer Zellen zeigen einen subdiploiden Gehalt an DNA (Nicoletti et al., 1991).

 1×10^{6} Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur wurden 16 Stunden in einer Konzentration von 1×10^{6} Zellen/ml mit PBS oder anti-APO-1 bei 37°C kultiviert. Die Inhibition der Caspasen wurde durch Vorinkubation der Zellen von 30 min mit 10 µM von zVAD-fmk, zDEVD-fmk oder zIETD-fmk getestet. Vor Abbruch der Inkubation wurden die Platten im Mikroskop auf apoptotische Zellen kontrolliert. Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert (1300x g, 5 min), einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl Propidiumiodidlösung (50 µg/ml in 0,1 % (w/v) Natriumcitrat, 0,1 % (v/v) Triton X-100) lysiert. Nach achtstündiger Inkubation bei 4°C (im Dunkeln!) wurde der DNA-Gehalt von 1x10⁴ Kernen pro Probe im Fluoreszenzdurchflußzytometer (Becton Dickinson) gemessen.

7.2.4 Proteinchemische Methoden

7.2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Ladung wurde die isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Dazu wurden Acrylamidzylindergele mit einem Durchmesser von 2,3 mm und einer Länge von 250 mm gegossen. Für fünf Gele wurde folgender Ansatz gewählt:

IEF-Gele

4,0 g	Harnstoff
0,933 ml	IEF-Acrylamidlösung (28,38 % (w/v) Acrylamid, 1,62 % (w/v) Bis-acrylamid)
1,225 ml	ddH ₂ O
0,193 ml	Ampholin Serva, pH 5,0 - 7,0
0,193 ml	Ampholin LKB, pH 5,0 - 7,0
0,140 ml	Ampholin LKB, pH 3,5 - 10,0
1,4 ml	10 % (v/v) NP-40
4,9 ml	TEMED
7,0 ml	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat.

Vor der Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wurde die Gellösung entgast. Die Polymerisierung benötigte wenigstens zwei Stunden. Danach wurden in der IEF-Kammer unten 10 mM H_3PO_4 und oben gründlich entgaste 20 mM Natronlauge vorgelegt. Die Gele wurden gespült und mit je

10 ml Überschichtungspuffer (8 M Harnstoff, 1 % (v/v) Ampholin LKB pH 5,0 - 7,0, 5 % (v/v) NP-40, 10 mM DTT) überschichtet. Der Vorlauf erfolgte bei konstantem Strom von 0,33 mA/Gel, bis eine Spannung von 1200 V erreicht wurde. Dann wurden die Proben in zehnfachem Volumen IEF-Probenpuffer (9,8 M Harnstoff, 2% (v/v) Ampholin LKB pH 5,0-7,0, 4 % (v/v) NP-40, 100 mM DTT) aufgenommen. Dabei betrug das maximale Volumen 200 µl. Matrixgebundene Proben wurden 30 min bei RT geschüttelt. Die so vorbereiteten Proben wurden auf die Zylindergele gegeben und mit 10 µl Überschichtungspuffer überschichtet. Der Lauf erfolgte bei 1200 V 18 bis 20 Stunden lang. Durch Wasserdruck wurden die Gele dann aus den Zylindern gepreßt und 5 min in 3 ml Äquilibrierungspuffer (0,06 M Tris•HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 50 mM DTT, 10 % (w/v) Glycerin) inkubiert. Die Gele wurden direkt für eine Auftrennung in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

7.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelen (Laemmli, 1970) mit 7,5-15 % (w/v) Acrylamid-Trenngel und einem 5 % (w/v) 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.

Folgende Stammlösungen wurden verwendet:

30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung

29,2 % (w/v)	Acrylsäureamid	
0,8 % (w/v)	Bisacrylamid	

SDS-Auftragspuffer

lycerin

- 60 mM Tris•HCl, pH 6,8
- 3 % (v/v) SDS
- 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Reduzierendem Probenpuffer wurde β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 5 % zugefügt.

Ammoniumpersulfat-Lösung

10% (w/v) Ammoniumpersulfat

Laufpuffer

0,25 M	Tris-Base	
1,9 M	Glycin	

4-fach Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris•HCl, pH 6,8
0,4 % (w/v)	SDS

4-fach Trenngelpuffer

1,5 M	Tris•HCl, pH 8,8	
0,4 % (w/v)	SDS	

Fixier- und Entfärbelösung

20 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Die Acrylamid- und Ammoniumpersulfatlösungen wurden bei 4℃, die übrigen Stammlösungen bei Raumtemperatur gelagert.

Aus den Stammlösungen wurden die Gelmischungen hergestellt. Sie enthielten:

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	7,5-15 % (w/v)	5 % (w/v)
Tris•HCl, pH 6,8	0,24 M	-
Tris•HCl, pH 8,8	-	0,375 M
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,1 % (w/v)	0,025 % (w/v)

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 dem mindestens zweifachen Volumen 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 % Glycerin, 1 % (w/v) Agarose, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) fixiert, die zuvor durch Aufkochen gelöst und mit DTT (Endkonzentration 50 mM) versetzt wurde.

Die Gele wurden entweder angefärbt oder bei radioaktiven Proben amplifiziert (Amplify, Amersham), getrocknet und autoradiographiert.

7.2.4.3 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

• Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Nach Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE wurden die Gele zurechtgeschnitten und durch Schwenken in der Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 45,4 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure) durchgefärbt. Nach Waschen mit Wasser wurde das Gel in Fixierlösung entfärbt, so daß die Proteine auf Grund ihrer höheren Affinität zum Farbstoff sichtbar wurden.

• Färbung der Proteine mit elementarem Silber

Durch die Anlagerung von Silbernitrat an die im Gel vorhandenen Proteine und die anschließende Reduktion zu elementarem Silber wurden diese sichtbar gemacht.

Dazu wurde das Gel eine Stunde fixiert (50 % Methanol, 5 % Essigsäure), 10 min in 50 % Methanol und 10 min in destilliertem Wasser geschwenkt. Danach wurde das Gel 5 min in 0,0123 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung inkubiert, dreimal kurz mit Wasser gewaschen und 40 min in der Silbernitratlösung (0,2 % (w/v) Silbernitrat) bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde das Gel in Entwickler (6,024 % (w/v) Na₂CO₃, 0,018 % (v/v) Formaldehyd) gegeben, bis die Proteine als schwarzbraune Banden oder Flecken sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde durch Waschen mit Wasser und anschließender Inkubation in Fixierer (5 % Essigsäure) abgebrochen.

Zu stark entwickelte Gele wurden mit 0,5 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung entfärbt.

7.2.4.4 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 (2,93 g/l Glycin, 0,375 g/l SDS, 5,81 g/l Tris-Base, 20 % Methanol) befeuchtet. Darauf wurden sechs Lagen mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran B (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und sechs Lagen befeuchtete Filterpapiere gebracht. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² 120 min lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation 16 Stunden mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS bei 4 °C abgesättigt. Der Blot wurde dreimal mit PBS/Tween (0,05 % (w/v) Tween-20 in PBS) gewaschen. Der Primärantikörper wurde in PBS/Tween verdünnt (Hybridomüberstand: 1:5-Verdünnung und aufgereinigte Antikörper: 0,1-1,0 μg/ml) und der Blot unter Schütteln 90 min bei 25 °C mit dem Antikörper inkubiert. Danach wurde sechsmal je 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde im PBS/Tween verdünnten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung nach Herstellerangaben) 60 min bei 16 °C unter Schütteln inkubiert und sechsmal je 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (ECL-Kit,

Amersham-Buchler, Braunschweig) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

• Detektion von monomerem und aggregiertem CD95 durch Western-Blot

CD95 wurde aus 10⁷ unmarkierten Zellen durch Zugabe von 2 μg/ml anti-APO-1 (IgG3) 5 min bei 37 °C vor der Lyse oder durch Zugabe von 10 μg anti-APO-1 kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B oder 30 μl Protein A-Sepharose CL-4B nach der Lyse immunpräzipitiert (vgl. Kapitel 7.2.4.7). Das Immunpräzipitat wurde durch 10 % SDS-PADE aufgetrennt, geblottet, die Membran geblockt, gewaschen und mit biotinyliertem anti-APO-1 (1:5000), wie in Peter et al. (1995a) beschrieben, inkubiert. Der Blot wurde nach dem Waschen mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (1:3000; Amersham) anstatt mit einem Zweitantikörper behandelt. Nach erneutem Waschen wurde der Blot mit der ECL-Methode entwickelt.

7.2.4.5 Kopplung von Antikörpern an Bromcyan-aktivierte Sepharose (kovalent gekoppelter Antikörper)

Der zu koppelnde Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Freiburg) mit der gequollenen, mit 1 M HCl gewaschenen Bromcyan-aktivierten Sepharose CL-4B in 0,1 NaHCO₃, pH 8,3; 0,5 M NaCl bei 4 ℃ im Überkopfrührer 16 Stunden inkubiert (5-10 mg Protein/ml Gelmatrix). Nach fünfmaligem Waschen mit Kopplungspuffer wurden noch freie, reaktive Gruppen 2 Stunden durch Inkubation in 0,1 M Tris•HCl pH 8,0 abgeblockt. Danach wurde die Matrix fünfmal abwechselnd mit 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0, 0,5 M NaCl und 0,1 M Tris•HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl gewaschen.

7.2.4.6 Produktion und Präparation von Fusionsproteinen

Der CD95zT sowie die hergestellten Mutanten wurden mit Hilfe von Bakterien produziert. Dazu wurden die mit Isopropyl-thiogalactosid (IPTG) inkubierten Bakterien lysiert und die Proteine mit Hilfe von 250 mM Guanidinhydrochlorid (Gu•HCI) extrahiert. Der CD95zT konnte durch das zusätzliche, N-terminale Histidin-Hexapeptid, welches stark mit Nickel komplexiert, mittels Präzipitation gereinigt werden.

• Induktion der Expression

Eine Übernachtkultur von Bakterien wurde mit der zehnfachen Menge an LB-Medium (mit 150 μg/ml Ampicillin, 25 μg/ml Kanamycin) verdünnt und im Schüttler 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Die OD_{600nm} der Kultur wurde bestimmt und auf 0,7-0,8 eingestellt. Nach Erwärmung der Kultur auf 37°C wurde IPTG bis zur Konzentration von 0,5 mM zugefügt und 4-6 Stunden inkubiert. Die Induktion wurde durch Auftrennung des Bakterienlysats in einem 15%-SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau überprüft. Die Bakterien wurden dann weiterverarbeitet.

• Lyse der Bakterien und Extraktion der Proteine

Die induzierten Bakterien wurden abzentrifugiert (10000x g; 15 min) und in Lysepuffer in einer Konzentration von 0,4 g/ml völlig resuspendiert (1,5 M Tris•HCl, pH 7,6; 10 mM β -Mercaptoethanol; 10 μ M PMSF; 1x SPI; 1 mM NaN₃ bzw. 0.1 % (w/v); 1 mM EDTA, pH 7,5). Nach 5 min Inkubation im Überkopfrührer bei RT wurde Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugefügt und weitere 10 min gerührt. Durch Zugabe von Desoxycholat (Endkonzentration: 0,16 % (w/v)) wurden die Bakterien lysiert und etwa 10 min gerührt, bis die Lösung viskos wurde. Die austretende DNA wurde durch DNAse-Verdau (0,01 mg/ml; 10 mM MgCl₂) gespalten und die Bakterienmembranen in der nun dünnflüssigen Lösung 30 min bei mindestens 15300x g in einer gekühlten Zentrifuge pelletiert.

Das Pellet wurde in einer Extraktionslösung (250 mM Gu•HCl; 0,01 M Tris•HCl, pH 8,0; 0,1 M NaP pH 8,0) resuspendiert und eingefroren.

Nach dem Auftauen wurde die Lösung eine Stunde im Überkopfrührer bei Raumtemperatur gerührt und unlösliche Bestandteile 30 min bei 15300x g in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert.

• Reinigung der Fusionsproteine

Zurklaren Extraktionslösung wurde mit PBS gewaschene Ni²⁺-NTA-Agarose gegeben und zwei Stunden bei 4 °C im Überkopfrührer inkubiert. Um eine Sättigung der Gelmatrix zu gewährleisten, wurde dies wiederholt, bis eine Abnahme der Proteinbande, die dem zytoplasmatischen Teil entsprach, im SDS-PAGE festgestellt werden konnte.

Der erhaltene immobilisierte CD95zT wurde zweimal mit Waschpuffer (1 M NaCl; 10 % (w/v) Glycerol; 50 mM Natriumphosphat, pH 6,0; 1 % (v/v) Triton X-100; 25 mM Imidazol) gewaschen und in PBS (mit 1 mM PMFS; 1 mM Natriumorthovanadat; 1x SPI) bei 4 °C aufbewahrt.

7.2.4.7 Metabolische Markierung, Immunpräzipitation und DISC-Analyse

Für die radioaktive metabolische Markierung wurden $3x10^7$ Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 60 min bei 37°C in 15 ml RPMI-1640 ohne Met und Cys inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 mCi [³⁵S]Met/[³⁵S]Cys (³⁵S-Translabel, ICN, Meckenheim) wurde weitere 20-24 h bei 37°C inkubiert. Die Inhibition der Caspasen wurde durch Vorinkubation der Zellen von 30 min mit 10 µM von zVAD-fmk getestet. Zur Stimulation wurden die Zellen mit 2 µg/ml anti-APO-1 i.d.R. 5 min behandelt, bzw. wie in den Abbildungen angegeben. Dann wurde die Reaktion mit Trockeneis/Isopropanol gestoppt. Alle Arbeiten wurden anschließend bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 1000 µl Lysepuffer 20 min lysiert.

Lysepuffer

1%	Triton X-100, Brij-58 oder NP-40
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
1x	SPI (s. Kapitel 7.1.2)
30 mM	Tris•HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

10 % (v/v) Glycerin

Zellkerne wurden durch Zentrifugation abgetrennt (12500x g, 15 min). Die unspezifischen Bindungen wurden durch 10 µg FII23c mAk, kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B gekoppelt (Pharmacia, Freiburg), reduziert. Zu den unstimulierten Zellen wurden 10 µg anti-APO-1 gegeben und mit 30 µl Protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) 1-3 h bei 4°C präzipitiert. Die gleichen Bedingungen wurden für die stimulierte Situation verwendet, jedoch ohne Zugabe von anti-APO-1 nach der Lyse. Sämtliche anderen IPs wurden ebenfalls nach dem gleichen Schema durchgeführt (jeweils 20 ug Ak gekoppelt an 30 ul Protein A-Sepharose CL-4B mit entsprechender, vorhergehender Kontroll-IP), wobei für die IP des TfR anti-IgG1-Agarose (Sigma, Deisenhofen) sowohl als Kontroll-IP als auch zur IP mit anti-TfR Ak benutzt wurde. Für die IP von FADD und aktive Caspase-8-Untereinheiten wurden die Zellen in 100 µl Lysepuffer mit NP-40 lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 0,5% SDS 3 min bei 95 °C erhitzt und nach Zugabe von weiteren 900 μl Lysebuffer ließ sich FADD mit dem 20 µg F01 Ak und Caspase-8 mit 20 µg R2 gekoppelt an 30 µl Protein A-Sepharose CL-4B immunpräzipitieren. Ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen konnte mit CD95zT gekoppelt an Ni²⁺-NTA-Agarose in Lysaten von unstimulierten Zellen präzipitier werden . Durch Zentrifugation (30 Sekunden, 1300x g) wurde ein Präzipitat erhalten, das sechsmal mit dem Lysepuffer gewaschen wurde.

Zur ReIP wurde das gewaschene Immunpräzipitat in 100 µl Lysepuffer mit zusätzlich 1 % (w/v) SDS 5 min bei 95 °C inkubiert, auf Eis gekühlt und nach Zugabe des 10-fachen Volumens Lysepuffer in einer weiteren IP verwendet.

Das (Immun)-Präzipitat wurde entweder zweidimensional (s. Kapitel 7.2.4.1) oder eindimensional nach Erhitzen in reduzierenden SDS-Auftragspuffer (vgl. Kapitel 7.2.4.2) gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Die Proteinsequenzanalyse zur Bestimmung der pls und molekularen Massen der Caspase-8-Fragmente wurde mit dem Protean-Modul der Lasergene-Software (DNAstar, Madison, WI, USA) durchgeführt.

7.2.4.8 Präparation von CAP3 und 4 zum Sequenzieren

Die K50-Zellinie wurde in 5 I RPMI-Medium bis zu einer Dichte von 2,8x10⁶ Zellen/ml hochgezogen. Die Zellen (1,4x10¹⁰) wurden in 100 ml Medium mit 10 µg/ml anti-APO-1 (IgG3) 10 min bei 37 °C stimuliert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen auf Eis 30 min mit 50 ml Lysepuffer mit 1 % Triton X-100 (s. Kapitel 7.2.4.7) lysiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand mit 400 µg FII 23 mAk, gekoppelt an CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B, von Proteinen, die unspezifisch an IgG3 Ak und Sepharose binden, befreit (24 h). Der DISC wurde dann mit 200 µl einer 50 %igen Suspension von Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Nach 12 h wurde das Immunpräzipitat fünfmal mit Lysepuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden im IEF- Probenpuffer (s. Kapitel 7.2.4.1) aufgenommen und zweidimensional aufgetrennt. Für die zweite Dimension wurde ein 1 mm dickes, 10 %iges Gel verwendet. Die Proteine wurden mit Silber angefärbt (s. Kapitel 7.2.4.3). Die Identität der silbergefärbten CAP3 und 4 konnten in einem parallelen Experiment, im unmarkiertes und markiertes Protein auf dem gleichen Gel aufgetrennt, dann zuerst mit Silber angefärbt und anschließend getrocknet und autoradiographiert wurde, bestätigt werden.

7.2.4.9 In vitro - Translation und in vitro-Spaltungsexperiment

Die Caspase-8 wurde *in vitro* mit dem T7-Polymerase-Retikulat-Lysat-System (TNT, Promega) translatiert. Das *in vitro*-Spaltungsexperiment wird nachfolgend beschrieben. Der CD95-DISC wurde von 5x10⁷ unmarkierten Zellen immunpräzipitiert (vgl. Kapitel 7.2.4.7). Dann wurde das Immunpräzipitat in 50µl Reaktionspuffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 100mM Dithiothreitol und 20 % Saccharose) 24h bei 4°C, wenn nicht anders im Ergebnisteil erwähnt, mit entweder *in vitro*-translatierter Caspase-8 allein oder mit 300 ng rekombinatem PARP (rPARP) (freundlicherweise von Dr. G. De Murcia (Universität von Strasbourg, Frankreich) zur Verfügung gestellt)) inkubiert. Die Ansätze ließen sich auf 2D-Gelen (IEF/SDS-PAGE) oder mit SDS-PAGE (15%) auftrennen. Die Gele wurden amplifiziert (Amplify, Amersham), getrocknet und autoradiographiert. Alternativ wurden die Ansätze mit 10 % SDS-PAGE separiert und ein Western-Blot durchgeführt.

7.2.4.10 In-Gel-Kinase-Test

Der In-Gel-Kinase-Test wurde durchgeführt, wie bei Zinck et al. (1995) beschrieben. Es wurden 10⁶ Zellen pro Bahn aufgetragen. In einigen Fällen wurden Zellen mit 1µg/ml anti-APO-1 bei 37℃ mit 10⁶ Zellen/ml stimuliert. Das PAA-Gel enthielt entweder 40 µg/ml kopolymerisiertes c-Jun (Zinck et al., 1995), 40 µg/ml kopolymerisiertes Histon H1 (Sigma), 40 µg/ml kopolymerisiertes His-FADD oder kein kopolymerisiertes Substrat. Für die Immunpräzipitationsexperimente wurden 5 µl des Immunserums oder des mAk mit 25 µl Protein A-Sepharose CL-40 oder Protein G-Sepharose CL-40 (Pharmacia, Freiburg) 400 Rinderserumalbumin (Boehringer, Mannheim) und μg in 500 μl Gesamtzellextraktionsbuffer vorinkubiert. Dann gab man Gesamtzellextrakt von 2x10⁶ Zellen hinzu und ließ den Reaktionsansatz über Nacht inkubieren. Die IPs wurden fünfmal mit 500 µl Gesamtzellextraktpuffer gewaschen. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nachdem der Überstand entfernt worden war, konnte man die Proben mit reduzierendem SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 ℃ aufkochen und dann ein Viertel jeder Probe auf eine IGK-Testgel laden.

Gesamtzellextraktpuffer:

1,5 %	Triton X-100
10 mM	Tris/HCL, pH 7,05
30 mM	Natriumpyrophosphat

50 mM	NaCl
5 μΜ	ZnCl ₂
0,5 mM	PMSF
0,5 μg/ml	Leupeptin
2 μg/ml	Aprotinin
0,5 μg/ml	Pepstatin
1 U/ml	α_2 -Makroglobin
0,5 mM	Benzamidin
4 mM	Na ₃ VO ₄
50 mM	NaF
20 mM	β-Phosphoglycerin
10 mM	p-Nitrophenylphosphat
400 nM	Okadeinsäure

7.2.5 Sequenzierung von CAP3 und 4 mittels Nano-ES-MS/MS

Die silbergefärbten CAP3- und CAP4-Proteine wurden aus dem Gel geschnitten und mit Trypsin im Gel verdaut, gefolgt von einem einzigen Reinigungs- und Konzentrierungsschritt (Shevchenko et al., 1996; Wilm et al., 1996). Der nicht-separierte Proteinmix wurde mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API III (Sciex, Ontario, Canada), ausgerüstet mit einer Nano-ES-Ionenquelle (Wilm und Mann, 1996), sequenziert.

Die Sequenzierung wurde von Andrej Shevchenko in der Arbeitsgruppe von Matthias Mann (EMBL, Heidelberg) durchgeführt.

7.2.6 Analyse der CAP4-Isoformen mittels Massenspektrometrie

Die Strategie, die für diese massenspektrometrische Analyse verwendet wurde, ist kürzlich beschrieben worden (Shevchenko et al, 1996a). Zusammenfassend gesagt: CAP4-Isoformen wurden aus dem Gel geschnitten, im Gel mit Trypsin verdaut (Shevchenko et al., 1996b). Nach Übernachtverdau wurde ein Aliquot der Lösung - dies entspricht 1-2 Volumenprozent des Gesamtverdaus - mittels MALDI MS analysiert. MALDI Massenspektren wurden auf einem modifizierten Bruker REFLEX "time-of-flight" Massenspektrometer (Bruker-Franzen, Bremen), der mit einem SCOUT Multiprobeneinlaß und einer "gridless delayed" Extraktionsionenquelle ausgestattet war, aufgenommen (Jensen et al., 1996). Der Rest des tryptischen Verdaus wurde dann aus den Gelpartikeln extrahiert, eingeengt und mit Nano-ES-MS/MS sequenziert, wie bereits beschrieben (Wilm et al., 1996). Nano-ES-MS/MS wurde mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API III

(Sciex, Ontario, Canada), ausgerüstet mit einer Nano-ES-Ionenquelle (Wilm und Mann, 1996), durchgeführt.

7.2.7 Chromosomale Lokalisierung durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Es wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Lichter (DKFZ, Heidelberg) und Dr. Petra Kioschis aus der Arbeitsgruppe von Dr. Annemarie Poustka (DKFZ, Heidelberg) Mensch- und Maus-Caspase-8-Gene durch Fluoreszenz auf Chromosom 2q33-q34 und zur Maus-Syntene-Region auf Chromosom 1 in der Region 1B-proximalC lokalisiert.

Die Isolierung der menschlichen PAC-Klone (LLNLP704A24229; LLNLP704H11233), sowie der drei Maus-Cosmid-Klone (MPMGc 121:H23227, A1958 und L15272), zwei Maus P1-Klone (1CRFP703: L2173 und N2173) und zwei Maus cDNA-Klone (mem1 und mem8), geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Kioschis. Die genomischen Klone wurden auf ihre Identität mit Restriktionsverdau und Southern-Blots überprüft und die Maus-cDNA-Klone wurden fast vollständig durchsequenziert. Die Konsensus-Sequenz betrug 1266 bp (flicem1, EMBL Zugangsnummer AJOOO641).

Die chromosomale Lokalisierung erfolgte durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), wie beschrieben (Lichter et al., 1990) in der Arbeitsgruppe von Dr. Lichter. DNAs, die Caspase-8-Gen-Informationen enthielten, humane PAC ICRFp700A24229 und Maus-Sequenzen (entweder drei gemischte Cosmid-Klone MPMGc121:H23227, A1958 und L15272 oder zwei kombinierte P1-Klone ICRFP703:L2173 und N2173), wurden durch Nick-Translation mit Biotin- oder Digoxigeningekoppelten Nucleotiden entsprechend markiert. Metaphase-Chromosomen von menschlichen peripheren Blutzellkulturen, die durch Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert wurden, und von Maus-Milzzellen-Kulturen, stimuliert durch Concavalin A und β -mercatoethanol (Sawyer et al., 1987), wurden gemäß dem Standardprotokoll der hypotonischen Behandlung und der Methanol/Essigsäure-Fixierung vorbereitet.

Für die Mensch- und Maus-Probencocktails wurden 60ng Biotin, markiert mit DNA, kombiniert mit 3 μg von Mensch- oder Maus-Cot1-DNA gleichermaßen und 7 μg Lachssperma-DNA in einem Hybridisierungsvolumen von 10 μl verwendet. Nach einer Hybridisierung bei 37 °C über Nacht und nach Waschungen danach wurde die mit Biotin-markierte Sonde durch Avidin-gekoppelt mit Fluorescin-Isothiodcyanate (FITC) detektiert, während die mit Digoxigenin-markierte Sonden-DNA durch anti-Dioxigenin gekoppelt mit Rhodamin nachgewiesen wurde. Die Chromosomen wurden mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) angefärbt. Digitalisierte Bilder von FITC-, Rhodaminund DAPI-Fluoreszenz wurden mit einer CCD-Kamera (Photometrics) aufgenommen, elektronisch überlagert und sorgfältig verglichen. Spezifische Hybridisierungssignale wurden auf dem menschlichen Chromosom 2q33-q34 und auf dem Maus-Chromosom 1 im Bereich 1B-proximalC gefunden. Die Fluoreszenzsignale waren sehr spezifisch, da keine weiteren Signale an anderen Chromosomen beobachtet wurden. Zur Bestätigung der Maus-Chromosomen wurde eine mit Biotin-markierte Chromosomen1-Farbsonde (Cambio, Cambridge, UK) mit der Maus-Caspase-8-Sonde kohybridisiert und mit FITC detektiert.

8 Literaturverzeichnis

- Abreu Martin, M.T., Vidrich, A., Lynch, D.H. und Targan, S.R. (1995). Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J. Immunol.* **155**: 4147-4154.
- Adachi, M., Watanabe Fukunaga, R. und Nagata, S. (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 1756-1760.
- Adachi, M., Suematsu, S., Kondo, T., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N. und Nagata, S. (1995). Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat. Genet.* **11**: 294-300.
- Aggarwal, B.B., Singh, S., LaPushin, R. und Totpal, K. (1995). Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett.* **364**: 5-8.
- 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**: 615-619.
- 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: 2231-2235.
- Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F. und Lynch, D.H. (1995). Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**: 71-77.
- Ales Martinez, J.E., Scott, D.W., Phipps, R.P., Casnellie, J.E., Kroemer, G., Martinez, C. und Pezzi, L. (1992). Cross-linking of surface IgM or IgD causes differential biological effects in spite of overlap in tyrosine (de)phosphorylation profile. *Eur. J. Immunol.* 22: 845-850.
- Allen, R.D., Marshall, J.D., Roths, J.B. und Sidman, C.L. (1990). Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules. J. Exp. Med. 172: 1367-1375.
- Allison, J., Georgiou, H.M., Strasser, A. und Vaux, D.L. (1997). Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 3943-3947.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. und Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171.
- Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B. und Dixon, F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* **148**: 1198-1215.
- Arends, M.J. und Wyllie, A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **32**: 223-254.
- Arends, M.J., Morris, R.G. und Wyllie, A.H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* **136**: 593-608.
- Baens, M., Chaffanet, M., Cassiman, J.J., van den Berghe, H. und Marynen, P. (1993). Construction and evaluation of a hncDNA library of human 12p transcribed sequences derived from a somatic cell hybrid. *Genomics.* 16: 214-218.
- Bajorath, J. und Aruffo, A. (1997). Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. *Proteins.* **27**: 59-70.
- Baker, M.B., Altman, N.H., Podack, E.R. und Levy, R.B. (1996). The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J. Exp. Med.* **183**: 2645-2656.

- 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.
- Barker, C.F. und Billingham, R.E. (1977). Immunologically privileged sites. Adv. Immunol. 25: 1-54.
- Becker, K., Schneider, P., Hofmann, K., Mattmann, C. und Tschopp, J. (1997). Interaction of Fas(Apo-1/CD95) with proteins implicated in the ubiquitination pathway. *FEBS Lett.* **412**: 102-106.
- Beidler, D.R., Tewari, M., Friesen, P.D., Poirier, G. und Dixit, V.M. (1995). The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**: 16526-16528.
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A. und Duke, R.C. (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* **377**: 630-632.
- Benhamou, L.E., Cazenave, P.A. und Sarthou, P. (1990). Anti-immunoglobulins induce death by apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1405-1407.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Ottilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H., Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., Lenardo, M.J., Tomaselli, K.J. und Cohen, J.I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 1172-1176.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W. und Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.* **211**: 314-321.
- Beyaert, R., Kidd, V.J., Cornelis, S., Van de Craen, M., Denecker, G., Lahti, J.M., Gururajan, R., Vandenabeele, P. und Fiers, W. (1997). Cleavage of PITSLRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 272: 11694-11697.
- Bing, A. und Dou, Q.P. (1996). Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* **56**: 438-442.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. und Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385: 729-733.
- 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.
- Boise, L.H., Gonzalez Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. und Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608.
- Boise, L.H., Gottschalk, A.R., Quintans, J. und Thompson, C.B. (1995a). Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **200**: 107-121.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T. und Thompson, C.B. (1995b). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* **3**: 87-98.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. und Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* **270**: 7795-7798.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. und Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815.
- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. und Kolesnick, R. (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* 82: 405-414.

- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J. und et al, (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene.* **11**: 1921-1928.
- Brancolini, C., Benedetti, M. und Schneider, C. (1995). Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* **14**: 5179-5190.
- Braun, M.Y., Lowin, B., French, L., Acha Orbea, H. und Tschopp, J. (1996). Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **183**: 657-661.
- Broome, H.E., Dargan, C.M., Krajewski, S. und Reed, J.C. (1995). Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J. Immunol.* **155**: 2311-2317.
- Browning, J.L., Ngam ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E.P., Hession, C., O'Brine Greco, B., Foley, S.F. und Ware, C.F. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**: 847-856.
- 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**: 441-444.
- Bullrich, F., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. und Croce, C.M. (1996). Chromosomal mapping of cell death proteases CPP32, MCH2, and MCH3. *Genomics.* **36**: 362-365.
- Bunnell, B.A., Heath, L.S., Adams, D.E., Lahti, J.M. und Kidd, V.J. (1990). Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1991 Mar 15;88(6):2612]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 7467-7471.
- Buxser, S., Puma, P. und Johnson, G.L. (1985). Properties of the nerve growth factor receptor. Relationship between receptor structure and affinity. *J. Biol. Chem.* **260**: 1917-1926.
- Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnaiyan, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H. und Nordheim, A. (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE- like proteases. *Oncogene.* 13: 2087-2096.
- Camerini, D., Walz, G., Loenen, W.A., Borst, J. und Seed, B. (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J. Immunol.* **147**: 3165-3169.
- Casciola Rosen, L.A., Miller, D.K., Anhalt, G.J. und Rosen, A. (1994). Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **269**: 30757-30760.
- Casciola Rosen, L.A., Anhalt, G.J. und Rosen, A. (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J. Exp. Med.* **182**: 1625-1634.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A. und et al, (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**: 97-100.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J. und Mountz, J.D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**: 1759-1762.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. und Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domaincontaining protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. und Dixit, V.M. (1996a). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* **274**: 990-992.

- Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G. und Dixit, V.M. (1996b). Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.* **271**: 4573-4576.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E. und Dixit, V.M. (1996c). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**: 4961-4965.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. und Dixit, V.M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* **275**: 1122-1126.
- Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I. und Guild, B.C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**: 733-736.
- 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.
- Choi, K.Y., Satterberg, B., Lyons, D.M. und Elion, E.A. (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in S. cerevisiae. *Cell* **78**: 499-512.
- Choi, M.S., Boise, L.H., Gottschalk, A.R., Quintans, J., Thompson, C.B. und Klaus, G.G. (1995). The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur. J. Immunol.* 25: 1352-1357.
- Chow, S.C., Weis, M., Kass, G.E., Holmstrom, T.H., Eriksson, J.E. und Orrenius, S. (1995). Involvement of multiple proteases during Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes. *FEBS Lett.* **364**: 134-138.
- 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 Fasmediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 11894-11898.
- Cifone, M.G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A. und Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* **180**: 1547-1552.
- Cifone, M.G., Roncaioli, P., De Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G. und Testi, R. (1995). Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J.* **14**: 5859-5868.
- Clarke, P.G. und Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol. Berl.* **193**: 81-99.
- Clements, G.B., Klein, G. und Povey, S. (1975). Production by EBV infection of an EBNA-positive subline from an EBNA-negative human lymphoma cell line without detectable EBV DNA. *Int. J. Cancer* **16**: 125-133.
- Cleveland, J.L. und Ihle, J.N. (1995). Contenders in FasL/TNF death signaling. Cell 81: 479-482.
- Cohen, J.J. und Duke, R.C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* **132**: 38-42.
- Cook, W.D., Metcalf, D., Nicola, N.A., Burgess, A.W. und Walker, F. (1985). Malignant transformation of a growth factor-dependent myeloid cell line by Abelson virus without evidence of an autocrine mechanism. *Cell* **41**: 677-683.
- Copeland, K.F., Haaksma, A.G., Goudsmit, J., Krammer, P.H. und Heeney, J.L. (1994). Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **10**: 1259-1268.
- Crowe, P.D., VanArsdale, T.L., Walter, B.N., Ware, C.F., Hession, C., Ehrenfels, B., Browning, J.L., Din, W.S., Goodwin, R.G. und Smith, C.A. (1994). A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* **264**: 707-710.

- Cryns, V.L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H. und Yuan, J. (1996). Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor- induced apoptosis is mediated by an interleukin-1betaconverting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J. Biol. Chem.* **271**: 31277-31282.
- Cuende, E., Ales Martinez, J.E., Ding, L., Gonzalez Garcia, M., Martinez, C. und Nunez, G. (1993). Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J.* **12**: 1555-1560.
- Danley, D.E., Chuang, T.H. und Bokoch, G.M. (1996). Defective Rho GTPase regulation by IL-1 betaconverting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor. *J. Immunol.* 157: 500-503.
- Darmon, A.J. und Bleackley, R.C. (1996). An interleukin-1beta converting enzyme-like protease is a key component of Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**: 21699-21702.
- Dbaibo, G.S. (1997). Regulation of the stress response by ceramide. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 557-561.
- 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 [letter]. *Blood.* **83**: 3101-3103.
- Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1995). Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a BCL-2 independent anti-apoptotic program. *Leukemia* **9**: 815-820.
- DeBry, R.W. und Seldin, M.F. (1996). Human/mouse homology relationships. *Genomics.* 33: 337-351.
- Degli-Esposti, M.A., Din, W.S., Cosman, D., Smith, C.A. und Goodwin, R.G. (1996). AIR, A Novel Member of the TNF Receptor Family, Is a Strong Inducer of Apoptosis. unpubliziert.
- Dembic, Z., Loetscher, H., Gubler, U., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M. und Lesslauer, W. (1990). Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine.* 2: 231-237.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037.
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moller, P. und Krammer, P.H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* **149**: 3166-3173.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**: 438-441.
- Duan, H. und Dixit, V.M. (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. Nature 385: 86-89.
- Duan, H., Chinnaiyan, A.M., Hudson, P.L., Wing, J.P., He, W.W. und Dixit, V.M. (1996a). ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 1621-1625.
- Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G.G., Froelich, C.J., He, W.W. und Dixit, V.M. (1996b). ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* 271: 16720-16724.
- Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B. und Stein, H. (1992). Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* **68**: 421-427.
- Duvall, E., Wyllie, A.H. und Morris, R.G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology.* **56**: 351-358.
- Earnshaw, W.C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 337-343.
- Eck, M.J. und Sprang, S.R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.* **264**: 17595-17605.

- Eck, M.J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos, A.M. und Sprang, S.R. (1992). The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J. Biol. Chem.* **267**: 2119-2122.
- Eischen, C.M., Dick, C.J. und Leibson, P.J. (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J. Immunol.* **153**: 1947-1954.
- Ellis, H.M. und Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. *Cell* **44**: 817-829.
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., Weichselbaum, R. und et al, (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 14: 6148-6156.
- Enari, M., Hase, A. und Nagata, S. (1995a). Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J.* **14**: 5201-5208.
- Enari, M., Hug, H. und Nagata, S. (1995b). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* **375**: 78-81.
- Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W. und Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380**: 723-726.
- Erhardt, P., Tomaselli, K.J. und Cooper, G.M. (1997). Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.* **272**: 15049-15052.
- Erickson, S.L., de Sauvage, F.J., Kikly, K., Carver Moore, K., Pitts Meek, S., Gillett, N., Sheehan, K.C., Schreiber, R.D., Goeddel, D.V. und Moore, M.W. (1994). Decreased sensitivity to tumournecrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 372: 560-563.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A. und Henson, P.M. (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.* **149**: 4029-4035.
- Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H. und Lazebnik, Y. (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J.* **16**: 2271-2281.
- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B. und Johnson, G.L. (1997). MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c- Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 67-74.
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C. und Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K [published erratum appears in Nature 1995 Jun 1;375(6530):431]. *Nature* **374**: 731-733.
- Faucheu, C., Diu, A., Chan, A.W., Blanchet, A.M., Miossec, C., Herve, F., Collard Dutilleul, V., Gu, Y., Aldape, R.A., Lippke, J.A. und et al, (1995). A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J.* 14: 1914-1922.
- Faucheu, C., Blanchet, A.M., Collard Dutilleul, V., Lalanne, J.L. und Diu Hercend, A. (1996). Identification of a cysteine protease closely related to interleukin-1 beta-converting enzyme. *Eur. J. Biochem.* 236: 207-213.
- Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M. und Varfolomeev, E. (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions [letter]. *Trends. Biochem. Sci.* 20: 342-344.
- Fernandes Alnemri, T., Litwack, G. und Alnemri, E.S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**: 30761-30764.
- Fernandes Alnemri, T., Litwack, G. und Alnemri, E.S. (1995a). Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res.* **55**: 2737-2742.
- Fernandes Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K.J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C.M., Salveson, G. et al. (1995b). Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* 55: 6045-6052.
- 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 FADDlike domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 7464-7469.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J. und Puck, J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 935-946.
- Freiberg, R.A., Spencer, D.M., Choate, K.A., Duh, H.J., Schreiber, S.L., Crabtree, G.R. und Khavari, P.A. (1997). Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **108**: 215-219.
- Gagliardini, V., Fernandez, P.A., Lee, R.K., Drexler, H.C., Rotello, R.J., Fishman, M.C. und Yuan, J. (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* **263**: 826-828.
- Gaido, M.L. und Cidlowski, J.A. (1991). Identification, purification, and characterization of a calciumdependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J. Biol. Chem.* **266**: 18580-18585.
- Galle, P.R., Hofmann, W.J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P.H. und Runkel, L. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.* **182**: 1223-1230.
- Gamen, S., Marzo, I., Anel, A., Pineiro, A. und Naval, J. (1996). CPP32 inhibition prevents Fas-induced ceramide generation and apoptosis in human cells. *FEBS Lett.* **390**: 232-237.
- Gardner, A.M. und Johnson, G.L. (1996). Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 14560-14566.
- Gerwins, P., Blank, J.L. und Johnson, G.L. (1997). Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. J. Biol. Chem. 272: 8288-8295.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. und Kufe, D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**: 2399-2404.
- Giannakis, C., Forbes, I.J. und Zalewski, P.D. (1991). Ca2+/Mg(2+)-dependent nuclease: tissue distribution, relationship to inter-nucleosomal DNA fragmentation and inhibition by Zn2+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 915-920.
- Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R. und Galluzzo, A. (1997). Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* **275**: 960-963.
- Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Bio. Rev. 26: 5986.
- Golstein, P., Marguet, D. und Depraetere, V. (1995). Homology between reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1 [letter]. *Cell* **81**: 185-186.
- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M. und Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J. Biol. Chem.* **272**: 19641-19644.
- Goodwin, R.G., Alderson, M.R., Smith, C.A., Armitage, R.J., VandenBos, T., Jerzy, R., Tough, T.W., Schoenborn, M.A., Davis Smith, T., Hennen, K. und et al, (1993a). Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* **73**: 447-456.
- Goodwin, R.G., Din, W.S., Davis Smith, T., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Sato, T.A., Maliszewski, C.R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. und et al, (1993b). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2631-2641.

- Gottesman, S., Gottesman, M., Shaw, J.E. und Pearson, M.L. (1981). Protein degradation in E. coli: the lon mutation and bacteriophage lambda N and cll protein stability. *Cell* **24**: 225-233.
- Gottschalk, A.R., Boise, L.H., Thompson, C.B. und Quintans, J. (1994). Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 7350-7354.
- Graf, D., Korthauer, U., Mages, H.W., Senger, G. und Kroczek, R.A. (1992). Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur. J. Immunol.* **22**: 3191-3194.
- Graninger, W.B., Seto, M., Boutain, B., Goldman, P. und Korsmeyer, S.J. (1987). Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J. Clin. Invest.* **80**: 1512-1515.
- Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P. und et al, (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* **312**: 721-724.
- Grell, M., Krammer, P.H. und Scheurich, P. (1994). Segregation of APO-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **24**: 2563-2566.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. und et al, (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802.
- 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**: 1189-1192.
- Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R. und Ferguson, T.A. (1996). CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* **5**: 7-16.
- Gu, Y., Sarnecki, C., Aldape, R.A., Livingston, D.J. und Su, M.S. (1995a). Cleavage of poly(ADPribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J. Biol. Chem.* 270: 18715-18718.
- Gu, Y., Wu, J., Faucheu, C., Lalanne, J.L., Diu, A., Livingston, D.J. und Su, M.S. (1995b). Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo. *EMBO J.* 14: 1923-1931.
- Hahne, M., Peitsch, M.C., Irmler, M., Schroter, M., Lowin, B., Rousseau, M., Bron, C., Renno, T., French, L. und Tschopp, J. (1995). Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int. Immunol.* 7: 1381-1386.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. und Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-1366.
- Hanada, M., Aime Sempe, C., Sato, T. und Reed, J.C. (1995). Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.* **270**: 11962-11969.
- Hannun, Y.A. und Obeid, L.M. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends. Biochem. Sci.* **20**: 73-77.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579.
- Hasegawa, J., Kamada, S., Kamiike, W., Shimizu, S., Imazu, T., Matsuda, H. und Tsujimoto, Y. (1996). Involvement of CPP32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 56: 1713-1718.
- Heller, R.A. und Kronke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.* **126**: 5-9.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. und Horvitz, H.R. (1992). Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**: 494-499.

- Hengartner, M.O. und Horvitz, H.R. (1994). Activation of C. elegans cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* **369**: 318-320.
- Hess, S. und Engelmann, H. (1996). A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* **183**: 159-167.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UVresponsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes. Dev.* 7: 2135-2148.
- Hill, C.S. und Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**: 199-211.
- Hiramatsu, N., Hayashi, N., Katayama, K., Mochizuki, K., Kawanishi, Y., Kasahara, A., Fusamoto, H. und Kamada, T. (1994). Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **19**: 1354-1359.
- Hofmann, K. und Tschopp, J. (1995). The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Lett.* **371**: 321-323.
- Horvitz, H., Ellis, H. und Sternberg, P. (1982). Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Comment.* **1**: 56-65.
- Horvitz, H.R., Shaham, S. und Hengartner, M.O. (1994). The genetics of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **59**: 377-385.
- Hsu, H., Xiong, J. und Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- kappa B activation. *Cell* **81**: 495-504.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. und Goeddel, D.V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* **4**: 387-396.
- Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M. und Boyle, W.J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* **272**: 13471-13474.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. und Dixit, V.M. (1997a). A novel family of viral death effector domaincontaining molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 272: 9621-9624.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. und Dixit, V.M. (1997b). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD- 95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**: 17255-17257.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. und Fesik, S.W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* **384**: 638-641.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. und Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275: 90-94.
- Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Garnes, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A. und de Jong, P.J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* 6: 84-89.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. und Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195.
- Itoh, N. und Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**: 10932-10937.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. und Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243.
- Itoh, N., Tsujimoto, Y. und Nagata, S. (1993). Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* **151**: 621-627.

- Izui, S., Kelley, V.E., Masuda, K., Yoshida, H., Roths, J.B. und Murphy, E.D. (1984). Induction of various autoantibodies by mutant gene lpr in several strains of mice. *J. Immunol.* 133: 227-233.
- Jaattela, M., Benedict, M., Tewari, M., Shayman, J.A. und Dixit, V.M. (1995). Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene*. **10**: 2297-2305.
- Jaffrezou, J.P., Levade, T., Bettaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., Vermeersch, S., Rousse, A. und Laurent, G. (1996). Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.* **15**: 2417-2424.
- Janicke, R.U., Walker, P.A., Lin, X.Y. und Porter, A.G. (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* **15**: 6969-6978.
- Janssen, O., Lengl-Janssen, B., Oberg, H.H., Robertson, M.J. und Kabelitz, D. (1996). Induction of cell death via Fas (CD95, Apo-1) may be associated with but is not dependent on Fas-induced tyrosine phosphorylation. *Immunol. Lett.* **49**: 63-69.
- Jarvis, W.D., Fornari, F.A., Jr., Browning, J.L., Gewirtz, D.A., Kolesnick, R.N. und Grant, S. (1994). Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 31685-31692.
- Johnson, G.L. und Vaillancourt, R.R. (1994). Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 230-238.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. und Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* **47**: 545-554.
- Johnson, N.L., Gardner, A.M., Diener, K.M., Lange Carter, C.A., Gleavy, J., Jarpe, M.B., Minden, A., Karin, M., Zon, L.I. und Johnson, G.L. (1996). Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J. Biol. Chem.* **271**: 3229-3237.
- Jones, E.Y., Stuart, D.I. und Walker, N.P. (1992). Crystal structure of TNF. Immunol. Ser. 56: 93-127.
- 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 Tcell activation. *Nature* **373**: 444-448.
- Juan, T.S., McNiece, I.K., Argento, J.M., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. und Fletcher, F.A. (1997). Identification and mapping of Casp7, a cysteine protease resembling CPP32 beta, interleukin-1 beta converting enzyme, and CED-3. *Genomics.* **40**: 86-93.
- Juo, P., Kuo, C.J., Reynolds, S.E., Konz, R.F., Raingeaud, J., Davis, R.J., Biemann, H.P. und Blenis, J. (1997). Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol. Cell Biol.* **17**: 24-35.
- Kamens, J., Paskind, M., Hugunin, M., Talanian, R.V., Allen, H., Banach, D., Bump, N., Hackett, M., Johnston, C.G., Li, P. und et al, (1995). Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J. Biol. Chem.* 270: 15250-15256.
- Kamita, S.G., Majima, K. und Maeda, S. (1993). Identification and characterization of the p35 gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. J. Virol. 67: 455-463.
- Kaneko, Y. und Tsukamoto, A. (1994). Thapsigargin-induced persistent intracellular calcium pool depletion and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Lett.* **79**: 147-155.
- Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L. und Thomas, D. (1995). 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*. **3**: 1031-1039.
- 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.

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
- Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D. und Barr, P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**: 736-739.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R. und Farrow, S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* **384**: 372-375.
- Kohno, T., Morishita, K., Takano, H., Shapiro, D.N. und Yokota, J. (1994). Homozygous deletion at chromosome 2q33 in human small-cell lung carcinoma identified by arbitrarily primed PCR genomic fingerprinting. *Oncogene.* **9**: 103-108.
- Kohno, T., Otsuka, T., Takano, H., Yamamoto, T., Hamaguchi, M., Terada, M. und Yokota, J. (1995). Identification of a novel phospholipase C family gene at chromosome 2q33 that is homozygously deleted in human small cell lung carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 667-674.
- Kohno, T., Otsuka, T., Inazawa, J., Abe, T. und Yokota, J. (1996). Breakpoint junction of interstitial homozygous deletion at chromosome 2q33 in a small cell lung carcinoma. DNA Res. 3: 421-424.
- Kolesnick, R.N., Haimovitz Friedman, A. und Fuks, Z. (1994). The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation. *Biochem. Cell Biol.* **72**: 471-474.
- Komiyama, T., Ray, C.A., Pickup, D.J., Howard, A.D., Thornberry, N.A., Peterson, E.P. und Salvesen, G. (1994). Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J. Biol. Chem.* 269: 19331-19337.
- Korsmeyer, S.J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood.* **80**: 879-886.
- Kovalenko, O.V., Plug, A.W., Haaf, T., Gonda, D.K., Ashley, T., Ward, D.C., Radding, C.M. und Golub, E.I. (1996). Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 2958-2963.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. und Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 3516-3520.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H.G. und Reed, J.C. (1994). Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.* **145**: 1323-1336.
- Krammer, P.H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J. und Debatin, K.M. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 279-289.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. und Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267: 2000-2003.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. und Flavell, R.A. (1996).
 Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32- deficient mice. *Nature* 384: 368-372.
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G. und Jenkins, N.A. (1994). Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes. Dev.* **8**: 1613-1626.
- Kwon, B.S. und Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 1963-1967.
- Kwon, B.S., Tan, K.B., Ni, J., Lee, K.O., Kim, K.K., Kim, Y.J., Wang, S., Gentz, R., Yu, G.L., Harrop, J., Lyn, S.D., Silverman, C., Porter, T.G., Truneh, A. und Young, P.R. (1997). A newly identified

member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 14272-14276.

- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. und Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-160.
- Lahti, J.M., Xiang, J., Heath, L.S., Campana, D. und Kidd, V.J. (1995). PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **15**: 1-11.
- Larrick, J.W. und Wright, S.C. (1990). Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB. J.* **4**: 3215-3223.
- Latinis, K.M. und Koretzky, G.A. (1996). Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells. *Blood.* 87: 871-875.
- Lau, H.T., Yu, M., Fontana, A. und Stoeckert, C.J.J. (1996). Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science* **273**: 109-112.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. und Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- Lee, W.Y., Butler, A.P., Locniskar, M.F. und Fischer, S.M. (1994). Signal transduction pathway(s) involved in phorbol ester and autocrine induction of interleukin-1 alpha mRNA in murine keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 17971-17980.
- Leist, M., Auer Barth, S. und Wendel, A. (1996). Tumor necrosis factor production in the perfused mouse liver and its pharmacological modulation by methylxanthines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 968-976.
- 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**: 415-429.
- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* **353**: 858-861.
- Lenczowski, J.M., Dominguez, L., Eder, A.M., King, L.B., Zacharchuk, C.M. und Ashwell, J.D. (1997). Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **17**: 170-181.
- Lennon, S.V., Martin, S.J. und Cotter, T.G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203-214.
- Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V. und Pardee, A.B. (1995a). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* **268**: 429-431.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J. und et al, (1995b). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**: 401-411.
- Lichter, P., Tang, C.J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G.A., Housman, D. und Ward, D.C. (1990). High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* **247**: 64-69.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S. und Prystowsky, M.B. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J. Immunol.* **151**: 1979-1988.
- Lippke, J.A., Gu, Y., Sarnecki, C., Caron, P.R. und Su, M.S. (1996). Identification and characterization of CPP32/Mch2 homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP32. *J. Biol. Chem.* **271**: 1825-1828.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. und Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-576.

- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175-184.
- Lockshin, R.A. und Williams, C.M. (1964). Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J. Insect Physiol.* **10**: 643.
- Loetscher, H., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. und Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**: 351-359.
- Los, M., Van de Craen, M., Penning, L.C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P.A., Droge, W., Krammer, P.H., Fiers, W. und Schulze Osthoff, K. (1995). Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* **375**: 81-83.
- Lynch, D.H., Watson, M.L., Alderson, M.R., Baum, P.R., Miller, R.E., Tough, T., Gibson, M., Davis Smith, T., Smith, C.A., Hunter, K. und et al, (1994). The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity*. **1**: 131-136.
- Mallett, S., Fossum, S. und Barclay, A.N. (1990). Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.* **9**: 1063-1068.
- Mann, M. und Wilm, M. (1994). Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal. Chem.* **66**: 4390-4399.
- Mann, M. und Wilm, M. (1995). Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends. Biochem. Sci.* **20**: 219-224.
- Mapara, M.Y., Bargou, R., Zugck, C., Dohner, H., Ustaoglu, F., Jonker, R.R., Krammer, P.H. und Dorken, B. (1993). APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur. J. Immunol.* 23: 702-708.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A. und Krammer, P.H. (1994). The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur. J. Immunol.* **24**: 3119-3123.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Baumler, C. und Krammer, P.H. (1995). Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2303-2307.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A. und Krammer, P.H. (1997). Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J. Cell Biol.* **137**: 221-229.
- Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M.J., Semon, D., Muller, R. und et al, (1985). Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur. J. Biochem.* **152**: 515-522.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D. und Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr. Biol.* **6**: 1669-1676.
- Martin, S.J., Newmeyer, D.D., Mathias, S., Farschon, D.M., Wang, H.G., Reed, J.C., Kolesnick, R.N. und Green, D.R. (1995a). Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *EMBO J.* **14**: 5191-5200.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C. und Green, D.R. (1995b). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**: 6425-6428.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. und Green, D.R. (1995c). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**: 1545-1556.
- 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.
- McDonald, N.Q. und Blundell, T.L. (1991). Crystallization and characterization of the high molecular weight form of nerve growth factor (7 S NGF). *J. Mol. Biol.* **219**: 595-601.
- McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A. und Blundell, T.L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**: 411-414.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P. und Korsmeyer, S.J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**: 79-88.
- 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**: 2794-2804.
- Meier, R., Rouse, J., Cuenda, A., Nebreda, A.R. und Cohen, P. (1996). Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated- protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* **236**: 796-805.
- 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.
- Menon, S.D., Guy, G.R. und Tan, Y.H. (1995). Involvement of a putative protein-tyrosine phosphatase and I kappa B-alpha serine phosphorylation in nuclear factor kappa B activation by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **270**: 18881-18887.
- Metcalf, D., Roberts, T.M., Cherington, V. und Dunn, A.R. (1987). The in vitro behavior of hemopoietic cells transformed by polyoma middle T antigen parallels that of primary human myeloid leukemic cells. *EMBO J.* **6**: 3703-3709.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli, K.J. und Grutter, M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. J. Biol. Chem. 272: 6539-6547.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E.A. und Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. *Cell* **75**: 653-660.
- Miyashita, T. und Reed, J.C. (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* **52**: 5407-5411.
- Miyashita, T., McIlraith, M.J., Grammer, A.C., Miura, Y., Attrep, J.F., Shimaoka, Y. und Lipsky, P.E. (1997). Bidirectional regulation of human B cell responses by CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol.* **158**: 4620-4633.
- Mogil, R.J., Radvanyi, L., Gonzalez Quintial, R., Miller, R., Mills, G., Theofilopoulos, A.N. und Green, D.R. (1995). Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo. Int. Immunol. 7: 1451-1458.
- Mohit, A.A., Martin, J.H. und Miller, C.A. (1995). p493F12 kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron.* **14**: 67-78.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J. und Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87: 427-436.
- Munday, N.A., Vaillancourt, J.P., Ali, A., Casano, F.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Yamin, T.T., Yu, V.L. und Nicholson, D.W. (1995). Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICErellI and ICErelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J. Biol. Chem.* **270**: 15870-15876.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. und Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827.

- Muzio, M., Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. (1997). FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.* **272**: 2952-2956.
- Na, S., Chuang, T.H., Cunningham, A., Turi, T.G., Hanke, J.H., Bokoch, G.M. und Danley, D.E. (1996). D4-GDI, a substrate of CPP32, is proteolyzed during Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 11209-11213.
- Nakamura, T., Tashiro, K., Nazarea, M., Nakano, T., Sasayama, S. und Honjo, T. (1995). The murine lymphotoxin-beta receptor cDNA: isolation by the signal sequence trap and chromosomal mapping. *Genomics.* **30**: 312-319.
- Nasir, J., Theilmann, J.L., Chopra, V., Jones, A.M., Walker, D., Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hewitt, J.E., Nicholson, D.W. und Hayden, M.R. (1997). Localization of the cell death genes CPP32 and Mch-2 to human chromosome 4q. *Mamm. Genome.* **8**: 56-59.
- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D.J., Woodgett, J.R., Balsano, C. und Levrero, M. (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2- dependent pathway. *Science* 275: 200-203.
- Neamati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J. und McConkey, D.J. (1995). Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J. Immunol.* **154**: 3788-3795.
- Neilan, J.G., Lu, Z., Afonso, C.L., Kutish, G.F., Sussman, M.D. und Rock, D.L. (1993). An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. J. Virol. 67: 4391-4394.
- Newell, M.K., Haughn, L.J., Maroun, C.R. und Julius, M.H. (1990). Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* **347**: 286-289.
- Ni, R., Tomita, Y., Matsuda, K., Ichihara, A., Ishimura, K., Ogasawara, J. und Nagata, S. (1994). Fasmediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **215**: 332-337.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. und et al, (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.
- 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.
- Niehans, G.A., Brunner, T., Frizelle, S.P., Liston, J.C., Salerno, C.T., Knapp, D.J., Green, D.R. und Kratzke, R.A. (1997). Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* 57: 1007-1012.
- Nikonova, L.V., Beletsky, I.P. und Umansky, S.R. (1993). Properties of some nuclear nucleases of rat thymocytes and their changes in radiation-induced apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **215**: 893-901.
- Nishina, H., Fischer, K.D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E.A., Bernstein, A., Mak, T.W., Woodgett, J.R. und Penninger, J.M. (1997). Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* **385**: 350-353.
- Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L.T., Bartoli, A., Moraca, R., Migliorati, G. und Riccardi, C. (1997). A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6216-6221.
- O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. und Shanahan, F. (1996). The Fas counterattack: Fasmediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* **184**: 1075-1082.
- Obeid, L.M. und Hannun, Y.A. (1995). Ceramide: a stress signal and mediator of growth suppression and apoptosis. *J. Cell Biochem.* **58**: 191-198.
- Oberhammer, F.A., Hochegger, K., Froschl, G., Tiefenbacher, R. und Pavelka, M. (1994). Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J. Cell Biol.* **126**: 827-837.

- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C. und et al, (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.
- Ogasawara, J., Watanabe Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. und Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice [published erratum appears in Nature 1993 Oct 7;365(6446):568]. *Nature* **364**: 806-809.
- 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.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. und Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
- Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Garg, M., Froelich, C.J. und Dixit, V.M. (1996a). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem.* **271**: 16443-16446.
- Orth, K., O'Rourke, K., Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. (1996b). Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* **271**: 20977-20980.
- Oshimi, Y. und Miyazaki, S. (1995). Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca2+ level. *J. Immunol.* **154**: 599-609.
- Owen Schaub, L.B., Yonehara, S., Crump, W.L. und Grimm, E.A. (1992). DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol.* **140**: 197-205.
- Oyaizu, N., Than, S., McCloskey, T.W. und Pahwa, S. (1995). Requirement of p56lck in T-cell receptor/CD3-mediated apoptosis and Fas-ligand induction in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**: 994-1001.
- Pai, J.T., Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1996). Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cysteine protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 5437-5442.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R. und Dixit, V.M. (1997a). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**: 815-818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. und Dixit, V.M. (1997b). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**: 111-113.
- Pearson, G.R., Luka, J., Petti, L., Sample, J., Birkenbach, M., Braun, D. und Kieff, E. (1987). Identification of an Epstein-Barr virus early gene encoding a second component of the restricted early antigen complex. *Virology.* 160: 151-161.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. und Tschopp, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* **12**: 371-377.
- Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. und Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**: 724-729.
- Peter, M.E., Dhein, J., Ehret, A., Hellbardt, S., Walczak, H., Moldenhauer, G. und Krammer, P.H. (1995a). APO-1 (CD95)-dependent and -independent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines. *Int. Immunol.* **7**: 1873-1877.
- Peter, M.E., Hellbardt, S., Schwartz-Albietz, R., Westendorp, M.O., Moldenhauer, G., Grell, M. und Krammer, P.H. (1995b). Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1 mediated apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* **2**: 163-167.
- Peter, M.E., Kischkel, F.C., Scheuerpflug, C.G., Medema, J.P., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1997a). Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death

involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1207-1212.

- Peter, M.E., Medema, J.P. und Krammer, P.H. (1997b). Does the Caenorhabditis elegans protein CED-4 contain a region of homology to the mammalian death effector domain? *Cell death and differentiation* **Im Druck**:
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M. und Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* **73**: 457-467.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A. und Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* **271**: 12687-12690.
- Ramage, P., Cheneval, D., Chvei, M., Graff, P., Hemmig, R., Heng, R., Kocher, H.P., Mackenzie, A., Memmert, K., Revesz, L. und et al, (1995). Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor. *J. Biol. Chem.* 270: 9378-9383.
- Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Tough, T.W., Alderson, M.R. und Lynch, D.H. (1994). gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur. J. Immunol.* **24**: 928-933.
- Ratter, F., Germer, M., Fischbach, T., Schulze-Osthoff, K., Peter, M.E., Droge, W., Krammer, P.H. und Lehmann, V. (1996). S-adenosylhomocysteine as a physiological modulator of Apo-1-mediated apoptosis. *Int. Immunol.* 8: 1139-1147.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. und Pickup, D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69: 597-604.
- Reed, J.C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J. Cell Biol. 124: 1-6.
- Reed, J.C., Cuddy, M., Slabiak, T., Croce, C.M. und Nowell, P.C. (1988). Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature* **336**: 259-261.
- 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.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M. und Bluethmann, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. *Nature* 364: 798-802.
- Roths, J.B., Murphy, E.D. und Eicher, E.M. (1984). A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J. Exp. Med.* **159**: 1-20.
- Rudel, T. und Bokoch, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**: 1571-1574.
- Santana, P., Pena, L.A., Haimovitz Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z. und Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**: 189-199.
- 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.
- Saunders, J.W.J. (1966). Death in embryonic systems. Science 154: 604-612.
- Savill, J.S., Henson, P.M. und Haslett, C. (1989). Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J. Clin. Invest.* **84**: 1518-1527.
- Sawyer, J.R., Moore, M.M. und Hozier, J.C. (1987). High resolution G-banded chromosomes of the mouse. *Chromosoma.* **95**: 350-358.

- 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.* Im Druck:
- Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H. und et al, (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361-370.
- 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.
- Schlegel, J., Peters, I. und Orrenius, S. (1995). Isolation and partial characterization of a protease involved in Fas-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **364**: 139-142.
- Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D.K., Thornberry, N.A., Yamin, T.T. und Nicholson, D.W. (1996). CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**: 1841-1844.
- Schraven, B. und Peter, M.E. (1995). APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src kinases or CD45. *FEBS Lett.* **368**: 491-494.
- Schulze Osthoff, K., Krammer, P.H. und Droge, W. (1994). Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J.* **13**: 4587-4596.
- Schwartz, L.M. und Osborne, B.A. (1994). Ced-3/ICE: evolutionarily conserved regulation of cell death. *Bioessays* **16**: 387-389.
- Screaton, G.R., Mongkolsapaya, J., Xu, X.N., Cowper, A.E., McMichael, A.J. und Bell, J.I. (1997a). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.* **7**: 693-696.
- Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J. und Bell, J.I. (1997b). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative premRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 4615-4619.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B. und Korsmeyer, S.J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 7834-7838.
- Seger, R. und Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. FASEB. J. 9: 726-735.
- Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K. und Yagita, H. (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat. Med.* **3**: 165-170.
- Selawry, H.P. und Cameron, D.F. (1993). Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation. *Cell Transplant.* **2**: 123-129.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. und Korsmeyer, S.J. (1991). bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**: 879-888.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P. und Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**: 818-821.
- Shi, L., Kam, C.M., Powers, J.C., Aebersold, R. und Greenberg, A.H. (1992). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.* **176**: 1521-1529.
- Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W. und Greenberg, A.H. (1994). Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* **263**: 1143-1145.
- Shiraki, K., Tsuji, N., Shioda, T., Isselbacher, K.J. und Takahashi, H. (1997). Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6420-6425.

- Shu, H.B., Takeuchi, M. und Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c- IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 13973-13978.
- Shu, H.B., Halpin, D.R. und Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity.* **6**: 751-763.
- Sillence, D.J. und Allan, D. (1997). Evidence against an early signalling role for ceramide in Fasmediated apoptosis. *Biochem. J.* **324**: 29-32.
- Singer, G.G. und Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity.* **1**: 365-371.
- Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, R., Jenkinson, E.J. und Owen, J.J. (1989). Antibodies to CD3/Tcell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337: 181-184.
- Smith, C.A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D. und Goodwin, R.G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248: 1019-1023.
- Smith, C.A., Gruss, H.J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. und et al, (1993). CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* **73**: 1349-1360.
- Smith, C.A., Farrah, T. und Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**: 959-962.
- Smith, D.J., McGuire, M.J., Tocci, M.J. und Thiele, D.L. (1997). IL-1 beta convertase (ICE) does not play a requisite role in apoptosis induced in T lymphoblasts by Fas-dependent or Fasindependent CTL effector mechanisms. *J. Immunol.* **158**: 163-170.
- Sobel, E.S., Kakkanaiah, V.N., Cohen, P.L. und Eisenberg, R.A. (1993). Correction of gld autoimmunity by co-infusion of normal bone marrow suggests that gld is a mutation of the Fas ligand gene. *Int. Immunol.* **5**: 1275-1278.
- Song, Q., Lees Miller, S.P., Kumar, S., Zhang, Z., Chan, D.W., Smith, G.C., Jackson, S.P., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K.K. und Lavin, M.F. (1996). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* **15**: 3238-3246.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. und Alnemri, E.S. (1996a). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmAinhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE- like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 14486-14491.
- Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R.C., Wang, L., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. und Alnemri, E.S. (1996b). The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J. Biol. Chem.* **271**: 27099-27106.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Ottilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. und Alnemri, E.S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 18542-18545.
- Stamenkovic, I., Clark, E.A. und Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* **8**: 1403-1410.
- 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.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L. und Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* **348**: 331-333.
- Strasser, A., Harris, A.W. und Cory, S. (1991a). bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* **67**: 889-899.

- Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D.L., Bath, M.L., Adams, J.M., Cory, S. und Harris, A.W. (1991b). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 8661-8665.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H. und Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* **14**: 6136-6147.
- 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.
- Su, B. und Karin, M. (1996). Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 402-411.
- Su, X., Zhou, T., Wang, Z., Yang, P., Jope, R.S. und Mountz, J.D. (1995). Defective expression of hematopoietic cell protein tyrosine phosphatase (HCP) in lymphoid cells blocks Fas-mediated apoptosis. *Immunity*. 2: 353-362.
- 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**: 1169-1178.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. und Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. *Dev. Biol.* **100**: 64-119.
- Sweeney, E.A., Sakakura, C., Shirahama, T., Masamune, A., Ohta, H., Hakomori, S. und Igarashi, Y. (1996). Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **66**: 358-366.
- Sytwu, H.K., Liblau, R.S. und McDevitt, H.O. (1996). The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity.* **5**: 17-30.
- Szawlowski, P.W., Hanke, T. und Randall, R.E. (1993). Sequence homology between HIV-1 gp120 and the apoptosis mediating protein Fas [letter]. *AIDS* **7**: 1018.
- Takahashi, S., Maecker, H.T. und Levy, R. (1989). DNA fragmentation and cell death mediated by T cell antigen receptor/CD3 complex on a leukemia T cell line. *Eur. J. Immunol.* **19**: 1911-1919.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T. und Nagata, S. (1994a). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**: 969-976.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. und Nagata, S. (1994b). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immunol.* **6**: 1567-1574.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A. und Reed, J.C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80: 279-284.
- Tanaka, M., Suda, T., Yatomi, T., Nakamura, N. und Nagata, S. (1997). Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with Propionibacterium acnes. J. Immunol. 158: 2303-2309.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. und Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**: 845-853.
- Tepper, C.G., Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A., Wolff, R., Yonehara, S., Hannun, Y.A. und Seldin, M.F. (1995). Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8443-8447.
- Tewari, M., Beidler, D.R. und Dixit, V.M. (1995a). CrmA-inhibitable cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **270**: 18738-18741.
- Tewari, M. und Dixit, V.M. (1995b). Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* **270**: 3255-3260.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. (1995c). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmAinhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.

- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., 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**: 517-521.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. und et al, (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**: 768-774.
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X. und Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J.* **15**: 6189-6196.
- Tiso, N., Pallavicini, A., Muraro, T., Zimbello, R., Apolloni, E., Valle, G., Lanfranchi, G. und Danieli, G.A. (1996). Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich-1, involved in cellular apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 983-989.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301-305.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. und Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**: 1097-1099.
- Ucker, D.S., Ashwell, J.D. und Nickas, G. (1989). Activation-driven T cell death. I. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation. *J. Immunol.* 143: 3461-3469.
- Ullrich, A., Gray, A., Berman, C. und Dull, T.J. (1983). Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* **303**: 821-825.
- van der Geer, P., Hunter, T. und Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 251-337.
- Van Endert, P.M. und Moldenhauer, G. (1992). Inhibitory and stimulatory signaling via immunoglobulin receptors: dichotomous responses elicited in clonal B cell populations. *Eur. J. Immunol.* 22: 1229-1235.
- Van Parijs, L., Ibraghimov, A. und Abbas, A.K. (1996). The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* **4**: 321-328.
- Vanhaesebroeck, B., Reed, J.C., De Valck, D., Grooten, J., Miyashita, T., Tanaka, S., Beyaert, R., Van Roy, F. und Fiers, W. (1993). Effect of bcl-2 proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene*. 8: 1075-1081.
- Varfolomeev, E.E., Boldin, M.P., Goncharov, T.M. und Wallach, D. (1996). A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other. *J. Exp. Med.* **183**: 1271-1275.
- 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., Aguila, H.L. und Weissman, I.L. (1992a). Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol.* **4**: 821-824.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L. und Kim, S.K. (1992b). Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. *Science* **258**: 1955-1957.
- Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A. und Obeid, L.M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* **270**: 30701-30708.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz Friedman, A., Fuks, Z. und Kolesnick, R.N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**: 75-79.
- 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 p55mediated death signaling. J. Biol. Chem. 272: 6578-6583.

- Vogt, c. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricans). *Manuskript*
- von Reyherr, U. (1997). Dissertation. Universität Heidelberg.
- Wadsworth, S., Yui, K., Siegel, R.M., Tenenholz, D.E., Hirsch, J.A. und Greene, M.I. (1990). Origin and selection of peripheral CD4-CD8- T cells bearing alpha/beta T cell antigen receptors in autoimmune gld mice. *Eur. J. Immunol.* 20: 723-730.
- 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., Hammill, L.D. und et al, (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 [news; comment]. *Nature* **388**: 123, 125-123, 126.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G. und Rauch, C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16: 5386-5397.
- Wang, A.M., Creasey, A.A., Ladner, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yamamoto, R. und Mark, D.F. (1985). Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228: 149-154.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. und Yuan, J. (1994). lch-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78**: 739-750.
- Wang, X., Pai, J.T., Wiedenfeld, E.A., Medina, J.C., Slaughter, C.A., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1995). Purification of an interleukin-1 beta converting enzyme-related cysteine protease that cleaves sterol regulatory element-binding proteins between the leucine zipper and transmembrane domains. J. Biol. Chem. 270: 18044-18050.
- Wang, X., Zelenski, N.G., Yang, J., Sakai, J., Brown, M.S. und Goldstein, J.L. (1996). Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J.* 15: 1012-1020.
- Ware, C.F., Crowe, P.D., Grayson, M.H., Androlewicz, M.J. und Browning, J.L. (1992). Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. J. Immunol. 149: 3881-3888.
- Watanabe, H., Kanbe, K., Shinozaki, T., Hoshino, H. und Chigira, M. (1995). Apoptosis of a fibrosarcoma induced by protein-free culture involves DNA cleavage to large fragments but not internucleosomal fragmentation. *Int. J. Cancer* 62: 191-198.
- Waterhouse, N., Kumar, S., Song, Q., Strike, P., Sparrow, L., Dreyfuss, G., Alnemri, E.S., Litwack, G., Lavin, M. und Watters, D. (1996). Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**: 29335-29341.
- Watts, J.D., Gu, M., Polverino, A.J., Patterson, S.D. und Aebersold, R. (1997). Fas-induced apoptosis of T cells occurs independently of ceramide generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 7292-7296.
- Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. und Krammer, P.H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**: 497-500.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. **3**: 673-682.
- Wilm, M. und Mann, M. (1996). Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**: 1-8.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. und Mann, M. (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**: 466-469.

- 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., Raybuck, S.A. und et al, (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**: 270-275.
- Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G.G. und Jaattela, M. (1997). Involvement of caspasedependent activation of cytosolic phospholipase A2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 5073-5077.
- Wolf, J., Pawlita, M., Bullerdiek, J. und zur Hausen, H. (1990). Deregulated c-myc gene expression and persistence of EBV are not sufficient to maintain the malignant phenotype in Burkitt's lymphoma x B-lymphoblastoid hybrid cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **166**: 333-336.
- Wong, G.H. und Goeddel, D.V. (1994). Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *J. Immunol.* **152**: 1751-1755.
- 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, J., Zhou, T., He, J. und Mountz, J.D. (1993). Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *J. Exp. Med.* **178**: 461-468.
- Wu, J., Zhou, T., Zhang, J., He, J., Gause, W.C. und Mountz, J.D. (1994). Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 2344-2348.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. und Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331.
- Yamin, T.T., Ayala, J.M. und Miller, D.K. (1996). Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **271**: 13273-13282.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. und Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. und Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**: 1067-1076.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N., Veis Novack, D.J., Linette, G.P. und Korsmeyer, S.J. (1994). Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 59: 387-393.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. und Horvitz, H.R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652.
- Zagury, J.F., Cantalloube, H., Achour, A., Cho, Y.Y., Fall, L., Lachgar, A., Chams, V., Astgen, A., Biou, D., Picard, O. und et al, (1993). Striking similarities between HIV-1 Env protein and the apoptosis mediating cell surface antigen Fas. Role in the pathogenesis of AIDS. *Biomed. Pharmacother.* 47: 331-335.
- Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F. und Woodgett, J.R. (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* **6**: 606-613.
- Zhang, J. und Winoto, A. (1996). A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **16**: 2756-2763.
- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H. und Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**: 348-351.
- Zhivotovsky, B., Cedervall, B., Jiang, S., Nicotera, P. und Orrenius, S. (1994). Involvement of Ca2+ in the formation of high molecular weight DNA fragments in thymocyte apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 120-127.

- Zhivotovsky, B., Gahm, A. und Orrenius, S. (1997). Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**: 96-101.
- Zimmerman, C., Brduscha Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R.M. und Pircher, H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J. Exp. Med.* **183**: 1367-1375.
- Zinck, R., Cahill, M.A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R.A. und Nordheim, A. (1995). Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4930-4938.

9 Publikationen

- 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 deathinducing signalling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C., Lou, L., O'Rourke, K., Seldin, M.A., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M.E. und Dixit, V M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271: 4961-4965.
- Peter, M.E., Chinnayian, A., Hellbardt, S., Kischkel, F.C., Krammer, P.H. und Dixit, V.M. (1996). The CD95 (APO-1/Fas) associating signaling molecules. *Cell Death and Differentiation* 3: 161-170.
- Cahill, M.A., Peter, M.E., Kischkel, F.C., Chinnayian, A.M., Dixit, V.M., Krammer, P.H. und Nordheim, A. (1996). CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. *Oncogene* 13: 2087-2096.
- Muzio, M.*, Chinnaiyan, A.M.*, Kischkel, F.C.*, O' Rourke, K.*, Shevchenko, A.*, Scaffidi, C., Zhang, M., Ni, J., 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 (DISC). *Cell* 85: 817-827.
- 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: 2794-2804.
- Peter, M.E.*, Kischkel, F.C.*, Scheuerpflug, C.G., Medema, J.P., Debatin K.M. und Krammer, P.H. (1997) Resistence of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur. J. Immunol.* 27: 1207-1212.
- Kischkel, F.C*, Kioschis, P.*, Weitz, S., Poustka, A., Lichter, P. und Krammer, P.H. (1997). Localization of the Human and Murine Caspase-8 (FLICE/MACH/Mch5) Genes by Fluorescence in Situ Hybridization, zur Publikation eingereicht.
- * Die Authoren haben gleichermaßen zu der Publikation beigetragen.

10 Lebenslauf

Frank Christian Kischkel Jahnstr.5 32312 Lübbecke

Persönliche Daten

geboren am:	04.08.1969
in:	Kiel
Familienstand:	ledig
Name des Vaters:	Hans-Jürgen Kischkel
Name der Mutter:	Waltraut Anne-Marie Kischkel, geb. Wellpott
Schulbildung	
1975 - 1979	Freiherr-vom-Stein-Grundschule, Lübbecke
1979 - 1988	Wittekind-Gymnasium, Lübbecke
	Abitur: 09.06.1988
Studium	
10/88 - 10/93	Studiengang Diplom-Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität,
	Münster
14.12.1990	Diplom-Chemiker-Vordiplom, Münster
14.05.1992	Mündliche Diplom-Chemiker-Hauptexamen, Zusatzprüfung Anorganische
	Chemie, Münster
01.02.1993	Mündliche Diplom-Chemiker-Hauptexamen, Biochemie, Organische Chemie
	und Physikalische Chemie, Münster
01.04.1993	Beginn der Diplomarbeit amit dem Thema "Anlage und Charakterisierung
	einer cDNA-Bank aus einer von Hep G2-Zellen abgeleiteten Zellinie in einen
	λ -Phagen-Expressionsvektor" am Institut für Biochemie der Westfälischen
	Wilhelms-Universität Münster unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A.
	Lezius
29.10.1993	Studienabschluß Diplom-Chemie
01.07.1994	Beginn der vorliegenden Dissertation am Deutschen Krebsforschungs-
	zentrum in Heidelberg, A bteilung Immungenetik unter der Anleitung von
	Herrn Prof. Dr. P. H. Krammer

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Personen bedanken:

Herrn Prof. Dr. Friedrich Spener für die unkomplizierte Betreuung während der Doktorarbeit im Fachbereich Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.

Herrn Prof. Dr. Peter H. Krammer für die Vergabe dieses aufregenden Arbeitsthemas und für die souveräne Arbeitsgruppenleitung.

Ferner gilt mein Dank Herrn PD Dr. Marcus E. Peter, der mich als Leiter der "Signalgruppe" des Labors Krammer intensiv betreut hat und durch den ich wissenschaftlich gereift bin.

Ebenso bin ich den ganzen Mitarbeitern der "Signalgruppe" Dr. Stefan Hellbardt, Carsten Scaffidi, Uschi Silberzahn, Ingo Schmitz, Dr. Jan-Paul Medema und Renata Zucic sehr dankbar. Wobei ich besonders die Zusammenarbeit mit Katrin Krieger hervorheben möchte. Wir sind über ein Jahr gemeinsam durch "dick und dünn" gegangen.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die teils enge Zusammenarbeit mit Dr. Andrej Shevchenkov, Dr. Petra Kioschis, Dr. Christian Scheuerpflug, Sandra Weitz, Christine Happes, Carmen Götz, Christiane Rutenberg, Dr. Michael Cahill, Prof. Dr. Matthias Mann, Prof. Dr. Vishva Dixit, Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin und Prof. Dr. Alfred Nordheim.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Krammer danke ich für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereichschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Mutter, Hedy von Graff, PD Dr. Marcus E. Peter, Christina Berndt und Ingo Schmitz für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.