INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität,
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Jörg Volkland

aus Heidelberg

November 2002

Die Rolle der Phosphorylierung von FADD/MORT1

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1999 bis Juli 1999 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg, und von August 1999 bis September 2002 am Ben-May Institute for Cancer Research der University of Chicago.

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

PD Dr. Stephan Urban
(Otto Meyerhof Zentrum, Heidelberg)

Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Marcus Peter bedanken. Seine ständige Gesprächsbereitschaft, hohe Motivation, enge Betreuung und Freundschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem ermöglichte er es mir, schon während der Doktorarbeit Zeit in den USA zu verbringen – dafür bin ich ihm sehr dankbar. Ich wünsche ihm von hier auch weiterhin viel Erfolg und Spaß in seinem Labor in Chicago.

Ebenfalls danken möchte ich Privat-Dozent Dr. Stephan Urban, der sich bereit erklärte, meine Arbeit zu begutachten. Durch seine freundliche und unkomplizierte Betreuung wurde die Promotion an der Universität Heidelberg erst möglich.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Peter Krammer, der mir schon während meiner Diplomarbeit die Gelegenheit gab, im Apoptosefeld zu arbeiten und durch den es mir ermöglicht wurde, die Grundkenntnisse der wissenschaftlichen Forschung in einem großartigen Umfeld zu erlernen.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die enge Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Watzl, der mich zu Beginn meiner Diplomarbeit unter seine Fittiche nahm und dessen Tatendrang und gute Laune ansteckend wirkten.

Dankbar bin ich auch Elizabeth „Liz“ Alappat, mit der die Zusammenarbeit viel Spaß gemacht hat und der ich für die Fortsetzung des Projektes, vor allem bei der Aufreinigung der FADD Kinase, viel Glück und Erfolg wünsche.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Ida Blomberg und Dr. Ingrid Hoffmann für die Hilfe bei der Suche nach der FADD Kinase, und Dr. Reinhard Marks, Candace Cham und Fabiola Rivas für die Zusammenarbeit bei der Generierung der Adenoviren und den Experimenten mit den CAR transgenen T Zellen.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Krammer-, Peter-, Gajewski- und Franzoso-Labors, die mit ihrer Hilfbereitschaft und Freundschaft die letzten 3 Jahre wie im Flug vergehen ließen.

Alexander Stegh und Sandra und Olaf Schickling möchte ich für die Zeit in Chicago besonders danken. Zusammen haben wir den Schritt in die Neue Welt gewagt und viel zusammen erlebt. Ich bin mir sicher, daß diese Freundschaft von Dauer ist.

Schließlich danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen – ohne sie wäre ich heute nicht dort, wo ich jetzt bin.

Verwendete Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
AdV	Adenovirus
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CAP	Cytotoxizitäts-abhängig APO-1 assoziierte Proteine
CAR	Coxsackievirus/Adenovirus-Rezeptor
c-FLIP	„**c**ellular **FLI**CE-inhibitory **P**rotein"
Coom.	Coomassiefärbung
CD	„**C**luster of **D**ifferentiation"
CED	„***C***. ***e****legans* **D**eath Gene"
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FADD	"**F**as-**A**ssociated **D**eath **D**omain Protein"
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FACS	”**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orter“
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IF	Intermediärfilament
Ig	Immunglobulin
IKA	*In vitro* Kinase Test
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
p	Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STS	Staurosporin
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
v/v	Volumen zu Volumen
WB	Western Blot
w/v	Gewicht zu Volumen
z.B.	zum Beispiel

Für die Bezeichnung von Aminosäuren wurden der übliche Ein- bzw. Drei-Buchstabencode verwendet.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I. Einleitung		**1**
1.	Die zwei Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose	1
2.	*C. elegans* - Vorbild für die grundlegende Apoptosemaschinerie	2
3.	Die TNF-Rezeptor Superfamilie	3
4.	Die Signaltransduktion des CD95 Rezeptors	4
5.	Zwei CD95 Signalwege	6
6.	FADD/MORT1: Überbringer von Leben und Tod ?	8
7.	Die physiologische Bedeutung des CD95/CD95L-Systems	11
8.	Caspasen: Todbringende Enzyme	12
9.	Die Rolle der Bcl-2 Proteinfamilie und der Mitochondrien	14
10.	Die Rolle von Aktin	16
11.	Aktivierung und Proliferation von T Zellen	17
12.	Aufgabenstellung	19
II. Material und Methoden		**20**
1.	Allgemeine Materialien	20
1.1	Chemikalien	20
1.2	Häufig verwendete Puffer	20
1.3	Geräte	22
1.4	Biologisches Material	23
1.4.1	Bakterienstämme	23
1.4.2	Eukaryontische Zellen	23
1.5	Nährmedien	24
1.5.1	Medien für die Zellkultur	24

1.5.2	Medien für Bakterien	25
1.6	Antikörper	25
1.7	Molekularbiologische Materialien	26
1.7.1	Vektoren	26
1.7.2	Synthetische Oligonukleotide	27
1.7.3	Peptidsequenzen	27
1.7.4	Enzyme und Kits	28
2.	Molekularbiologische Methoden	29
2.1	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA	29
2.1.1	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab mit Hilfe der alkalischen Lyse	29
2.1.2	Plasmid-Präparation im großen Maßstab mit Hilfe des Qiagen Maxiprep Kit	29
2.2	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	30
2.3	Restriktionsspaltung von DNA	30
2.4	Isolierung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel	30
2.5	Dephosphorylierung und Ligation von DNA	31
2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.7	RT/PCR	32
2.8	Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen	32
2.9	Transformation von Bakterien	33
2.9.1	Herstellung chemo-kompetenter Bakterien	33
2.9.2	Transformation chemo-kompetenter Bakterien	33
2.10	Herstellung von Adenoviren	34
2.10.1	Klonierung von Adenoviren	34
2.10.2	Präparation von Adenoviren im großen Maßstab	35
3.	Proteinchemische Methoden	35
3.1	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	35
3.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.3	Western Blot Analyse	37

3.4 Immunpräzipitation 37

3.5 ELISA 37

3.6 Herstellung von GST-Fusionsproteinen 38

3.6.1 Induktion und Expression der GST-Fusionsproteinen 38

3.6.2 Lyse der Bakterien und Extraktion von GST-Fusionsproteinen 38

3.6.3 Elution und Analyse von GST-Fusionsproteinen 38

3.7 DISC Analyse 39

3.8 *In vitro* Kinase Test 40

4. Zellbiologische Methoden 41

4.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen 41

4.2 Aufreinigung von Maus-Splenocyten 41

4.3 Transfektion von Zellen `42

4.4 Subzelluläre Fraktionierung 42

4.5 Radioaktive Markierung von Zellen 43

4.6 FACS Analyse von intrazellulär gefärbten Zellen / Saponin Färbung 43

4.7 Infektion von Zellen mit Adenoviren 44

4.8 Proliferationstest 44

4.9 Elutration von BJAB Zellen 45

4.10 Messung apoptotischer Zellen / Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti 45

4.11 Zellzyklusarrest 46

III. Ergebnisse 47

III-1. FADD wird von einer ca. 70 kDa großen Zellzyklus-regulierten Kinase in G2/M an Serin 194 phosphoryliert 47

III-1.1 Bei CAP1 und CAP2 handelt es sich um unterschiedlich phosphorylierte FADD Formen 47

III-1.2 Charakterisierung eines Phosphorylierungsstellen-spezifischen anti-FADD Antikörpers 49

III-1.3 Die Phosphorylierung von FADD findet an einem C-terminalen Serin Cluster statt 50

III-1.4 Identifizierung der Phosphorylierungsstelle in FADD 52

III-1.5 FADD wird von einer assoziierten, ca. 70 kDa großen Kinase phosphoryliert 53

III-1.6 Die Phosphorylierung von FADD ist Zellzyklus-reguliert 54

III-1.7 Der Phosphorylierungsstatus von FADD kann beeinflußt werden 56

III-1.8 Die Phosphorylierung von FADD hat keinen Einfluß auf CD95 vermittelte Apoptose 57

III-2. Die Suche nach der FADD Kinase 59

III-2.1 HIP-Kinasen sind nicht in der Lage, FADD zu phosphorylieren 59

III-2.2 Jun NH_2-terminale Kinase (JNK) Aktivierung hat keinen Einfluß auf FADD Phosphorylierung 60

III-2.3 Inhibierung von $p70^{S6k}$ hat keinen Effekt auf die FADD Phosphorylierung 61

III-2.4 FADD wird in $RIP^{-/-}$ Jurkat Zellen phosphoryliert 62

III-2.5 Depletion und Überexpression von DRAK2 hat keinen Einfluß auf die FADD Phosphorylierung 63

III-3. Die FADD Kinase lokalisiert im Nukleus und bindet an die C-terminale Hälfte der Todesdomäne von FADD 65

III-3.1 Die Aktivität der FADD Kinase lokalisiert im Kern 65

III-3.2 Die FADD Kinase benötigt einen Teil der Todesdomäne, um an FADD zu binden 67

III-4. Die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 führt zum Wachstumsarrest in G2/M 70

III-4.1 MCF-10A Zellen: eine spontan immortalisierte Brustepithelzelle 70

III-4.2 AdV-C-FADD Expression in MCF-10A Zellen 71

III-4.3 Die AdV-C-FADD Konstrukte schützen MCF-7-Fas Zellen vor CD95 vermittelter Apoptose 72

III-4.4 Expression von AdV-C-FADD führt zur Anreicherung von MCF-10A Zellen in G2/M 73

III-4.5 Der Arrest von MCF-10A Zellen nach C-FADD Infektion in G2/M korreliert mit dem Phosphorylierungsstatus von FADD 74

III-4.6 C-FADD wt moduliert die Proteinexpression von DRAK2 und Caspase-3 75

III-4.7 Das transgene CAR-T Zell Maussystem 76

III-4.8 Infektion von CAR transgenen T Zellen mit Wildtyp-C-FADD führt zur Inhibition der Proliferation 78

III-5. Die Rolle von Aktin bei CD95 vermittelter Apoptose 80

IV. Diskussion **83**

Die Phosphorylierung von FADD erfolgt *in vivo* ausschließlich an Serin 194 83

Die Suche nach der FADD Kinase: 85

HIP-Kinasen und die Phosphorylierung von FADD 86

JNK/SAPK 87

Proteinkinase C (PKC) 87

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) 88

RIP 88

$p70^{S6k}/p85^{S6k}$ 89

DRAK2 89

FADD wird in den Nukleus transportiert – oder transloziert die Kinase in das Cytoplasma ? 90

Für die Interaktion zwischen FADD und der Kinase wird keine funktionelle Todesdomäne benötigt 91

Die Bedeutung der Phosphorylierung von C-FADD an Serin 194 92

Die Inhibition der Proliferation von C-FADD transduzierten T Zellen beruht auf der Phosphorylierung an Serin 194 94

FADD und Aktin regulieren die Bildung des CD95 DISC 96

Ein Modell für die Funktionen von FADD 97

V. Zusammenfassung **99**

VI. Literaturverzeichnis **101**

VII. Publikationen **118**

I. Einleitung

1. Die zwei Formen des Zelltodes: Apoptose und Nekrose

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, wurde zuerst von C. Vogt Mitte des 19. Jahrhunderts bei der Beobachtung sterbender Zellen während der Metamorphose von Amphibien entdeckt. In den folgenden 130 Jahren wurde die gleiche Beobachtung von mehreren Wissenschaftlern gemacht. Kerr, Wyllie und Currie prägten schließlich Anfang der 70er Jahre den Begriff Apoptose für die nicht-nekrotische Form des Zelltodes, bei dem es zu morphologischen Veränderungen wie dem Schrumpfen der Zelle und zur Chromatinkondensation kommt. Seitdem hat sich Apoptose zu einem Hauptinteressengebiet der biomedizinischen Forschung entwickelt. Apoptose ist essentiell für die Gewebshomöostase in multizellulären Organismen. Es spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem, dem Nervensystem und bei der Ontogenie (Krammer 1999; Vaux et al., 1999). So werden z.B. die Zellen des Interdigitalraumes durch Apoptose entfernt, wodurch Finger und Zehen freigelegt werden. Außerdem werden viele Krankheiten, wie z.B. Krebs (Strasser et al., 1990; McDonnell et al., 1991), degenerative Erkrankungen (Barr et al., 1994; Thompson et al., 1995) und verschiedene Autoimmunkrankheiten (Strasser et al., 1991; Watanabe-Fukunaga et al., 1992), mit einer Fehlregulation von Apoptose assoziiert.

Generell können zwei verschiedene Arten von Zelltod unterschieden werden: Nekrose und Apoptose. Nekrotischer Zelltod ist ein passiver Prozeß, der nach Gewebsschädigungen auftritt. Dabei schwellen die Zellen an, die Plasmamembran bricht auf und entläßt das Cytoplasma mit allen Organellen, Proteasen und lysosomalen Enzymen in den extrazellulären Raum, wodurch es im umliegenden Gewebe vielfach zu einer inflammatorischen Reaktion kommt. Bei Apoptose handelt es sich dagegen um einen kontrolliert ablaufenden Prozeß, bei dem alte, mutierte, infizierte oder nach Immunreaktionen überzählige Zellen entfernt werden können (Thompson et al., 1995). Der apoptotische Prozess läßt sich in drei Phasen unterteilen: Initiation, Exekution und Termination. Apoptose kann dabei durch eine Reihe von verschiedenen Stimuli ausgelöst werden. Dazu gehören z.B. der Entzug von Wachstumsfaktoren, UV- oder γ-Strahlung, Chemotherapeutika oder eine Familie von Transmembranproteinen, die Todesrezeptoren genannt werden. In den meisten Fällen ist die Exekutionsphase charakterisiert durch das Schrumpfen der Zelle, der Inversion der Membransymmetrie durch die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Zelloberfläche, Zeiose (Ausstülpungen der Membran, “blebbing”), Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Wyllie, 1980). Dabei wird chromosomale DNA endonukleolytisch gespalten. Zunächst entstehen 50, 150 und 300 kb große DNA-Fragmente (Watanabe et al., 1995; Oberhammer et al., 1993). In einer zweiten Phase der DNA-Spaltung entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von 180 bp und ganzzahligen Vielfachen davon. In der Terminationsphase werden membranumschlossene Vesikel, die sogenannten

apoptotischen Körperchen, von Phagocyten, Immunzellen und den umliegenden Zellen phagocytiert. So wird das gesamte Cytoplasma in kleinen Einheiten abgeschnürt, ohne daß proinflammatorische Moleküle freigesetzt werden, wodurch im Gegensatz zur Nekrose eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes verhindert wird (Krammer 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die intrazelluläre ATP Menge bestimmend ist, ob eine Zelle durch Nekrose oder Apoptose stirbt. Höhere ATP-Konzentrationen begünstigen Apoptose, niedrige ATP-Konzentrationen führen zu Nekrose (Leist et al., 1997; Eguchi et al., 1997).

2. C. elegans – Vorbild für die grundlegende Apoptosemaschinerie

Die Zellen von Metazoen enthalten alle einen ähnlichen enzymatischen Apparat, der für die Apoptose-Signaltransduktion verantwortlich ist (Steller 1995; Jacobson et al., 1997). Der Nematode *Caenorhabditis elegans* hat sich als guter Modellorganismus bewährt, um die zentralen Bausteine der zellulären Todesmaschinerie zu untersuchen. Während der Entwicklung des Wurms sterben genau 131 der 1093 somatischen Zellen durch Apoptose. Drei *C. elegans* Genprodukte sind dabei essentiell für Apoptose: Bei CED-3 und CED-4 handelt es sich um pro-apoptotische Proteine, während CED-9 anti-apoptotisch wirkt (Hengartner und Horvitz, 1994a). CED-3 ist eine mit den humanen Caspasen verwandte Cysteinylprotease, die zelluläre Proteine, die sogenannten Todessubstrate, hinter bestimmten Aspartatresten spaltet. Sie wird als Zymogen synthetisiert und wird durch autoproteolytische Spaltung aktiviert (Salvesen und Dixit, 1997; Thornberry und Lazebnik, 1998). CED-4 bindet und aktiviert CED-3. CED-9 assoziiert ebenfalls mit CED-4, inhibiert aber dadurch die Aktivierung der Caspase CED-3 (Chinnaiyan et al., 1997; Wu et al., 1997a; Seshagiri und Miller, 1997).

Normalerweise liegt CED-9 komplexiert mit CED-3 und CED-4 vor, wodurch CED-3 inaktiv gehalten wird. Verschiedene Apoptose auslösenden Stimuli bewirken die Dissoziation von CED-9 und somit die Aktivierung des apoptotischen Programms, welches schließlich zur Desintegration der Zelle führt. Das pro-apoptotische Molekül Egl-1 kann an CED-9 binden und so den Komplex aus CED-3 und CED-4 freisetzen (Conradt und Horvitz, 1998). Vertebraten haben ganze Genfamilien entwickelt, die den Zelltodgenen von *C. elegans* ähneln. Caspasen sind homolog zu CED-3 (Salvesen und Dixit, 1997; Thornberry und Lazebnik, 1998). Apaf-1 und Nod-1 sind Homologe mit CED-4-ähnlicher Funktion (Zou et al., 1997; Inohara et al., 1999). Die Proteine der Bcl-2 Familie sind mit CED-9 verwandt, wobei diese Gruppe sowohl in anti-, als auch in proapoptotische Proteine unterteilt werden kann. Das proapoptotische Bcl-2 Familienmitglied Bid weist dabei Homologien zu Egl-1 auf. (Yang und Korsmeyer, 1996; Green und Reed, 1998).

3. Die TNF-Rezeptor Superfamilie

Die Mitglieder der Tumor Nekrosefaktor-Familie zeichnen sich durch zwei bis fünf Cystein-reiche extrazelluläre Domänen aus und haben pleiotrope Funktionen. Abhängig vom Zelltyp und anderen Signalen, die die Zelle empfängt, können sie Proliferation, Differenzierung, Überlebenssignale oder Zelltod vermitteln (Nagata 1997, Ashkenazi und Dixit 1998; Wallach et al., 1998). Diese Rezeptoren werden von einer Gruppe von strukturell verwandten Liganden aktiviert, die zur TNF-Ligandenfamilie gehören. Die meisten dieser Liganden werden als membranständige Trimere synthetisiert und es scheint, daß eine durch die Liganden induzierte Rezeptoroligomerisierung zur Signalgebung notwendig ist. CD95 (APO-1/Fas), TNF-RI, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3 und DR6 gehören zur Unterfamilie der sogenannten Todesrezeptoren, die sich alle durch eine Todesdomäne (“Death Domain”, DD) im cytoplasmatischen Teil auszeichnen, welche essentiell für die Induktion des Apoptosesignals ist (Itoh et al., 1993; Tartaglia et al., 1993).

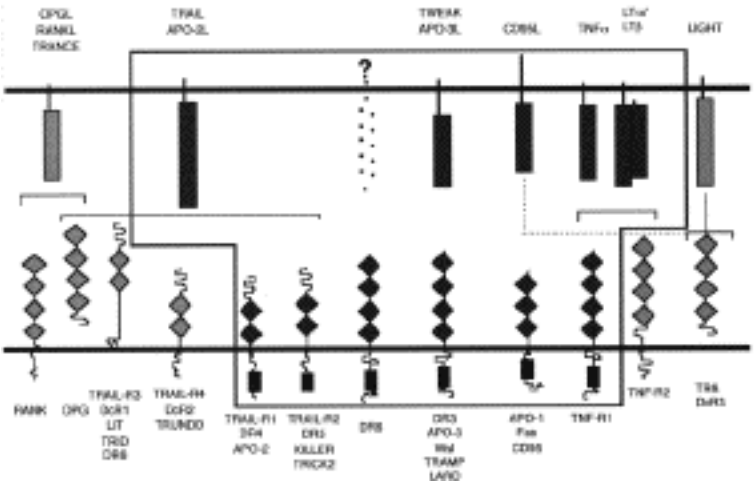


Abbildung 1: Die Todesrezeptor/Ligandenfamilie. Die Todesrezeptoren und ihre Liganden sind in einer Box zusammengefaßt. Der obere Teil zeigt die Ligandenfamilie, der untere Teil die Rezeptoren. Die schwarzen Quadrate in den Rezeptoren symbolisieren die Todesdomäne (DD).

Die Interaktionen zwischen den Tod-induzierenden Liganden und ihren Rezeptoren sind intensiv untersucht worden. TRAIL/APO-2L (“TNF-related apoptosis-inducing ligand”; TRAIL) induziert Apoptose hauptsächlich in transformierten Zellen und ist, im Gegensatz zu anderen Tod-induzierenden Liganden, in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert (Wiley et al., 1995). Für den Liganden TRAIL wurden fünf Rezeptoren identifiziert: DR4 (TRAIL-R1/APO-2), DR5 (TRAIL-R2/KILLER/TRICK2), DcR1 (TRAIL-R3/LIT/TRID/DR6) und

DcR2 (TRAIL-R4/TRUNDD). Allerdings können nur DR4 und DR5 Apoptose auslösen, da den Rezeptoren DcR1 und DcR2 entweder die gesamte intrazelluläre Transmembranregion oder die DD fehlt (Pan et al., 1997a; Pan et al., 1997b; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997). Diese Rezeptoren könnten um den Liganden kompetitieren und so TRAIL/APO-2L-vermittelten Zellod inhibieren. Auch für den CD95 Liganden wurde ein solcher Rezeptor gefunden: DcR3 wird vor allem in Lungen- und Darmtumoren höher exprimiert (Pitti et al., 1998). Der APO-3-Ligand bindet nur an den Todesrezeptor DR3 (auch APO-3/TRAMP/Wsl-1/LARD)(Chinnaiyan et al., 1996a; Marsters et al., 1996; Kitson et al., 1996; Bodmer et al., 1997; Screaton et al., 1997). Experimente mit spezifischen Caspaseninhibitoren und embryonalen Fibroblasten von Caspasen defizienten Mäusen haben gezeigt, daß Caspase-8 essentiell für CD95 (APO-1, Fas), DR4-, DR5- und DR6-vermittelte Apoptose ist (Pan et al., 1997a; Pan et al., 1997b; Walczak et al., 1997; Marsters et al., 1998; Varfolomeev et al., 1998).

Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie können auch den Transkriptionsfaktor NF-κB und die Streßkinase JNK aktivieren. Die Signaltransduktion durch TRADD (für "TNF-Receptor Associated Death Domain") und RIP (für "Receptor Interacting Protein"), die NF-κB induzierende Kinase NIK, die IκB Kinase IKKα und IKKβ führt schließlich zur Phosphorylierung und Degradation der IκB Familie der NF-κB Inhibitoren (Ashkenazi und Dixit, 1998; Wallach et al., 1998). Experimente mit RIP und TRAF2 (für "TNF-Receptor associated Factor 2") defizienten Mäusen zeigen, daß diese Signale eher das Überleben der Zelle fördern, als daß sie Apoptose auslösen, was mit der anti-apoptotischen Rolle von NF-κB und dem JNK Signalweg konsistent ist (Yeh et al., 1997; Lee et al., 1997; Kelliher et al., 1998).

4. Die Signaltransduktion des CD95 Rezeptors

CD95 (APO-1, Fas) ist ein glykosiliertes Oberflächenprotein mit einer Größe von 45–52 kDa (335 Aminosäuren) (Oehm et al., 1992). Es handelt sich um ein Typ I Transmembranprotein, das in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird und auch in löslicher Form vorkommen kann (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992; Cheng et al., 1994). Eine lösliche Form des Rezeptors entsteht durch alternatives Spleißen. Die Transmembranregion wird bei diesem Prozeß entfernt, wodurch der Rezeptor an löslichen oder Membran-gebundenen Liganden binden und so an der Regulation von Apoptose beteiligt sein könnte (Papoff et al., 1999). Der zu CD95 korrespondierende Ligand wird als CD95L bezeichnet und ist ein Typ II Transmembranprotein. Lösliche Formen des Liganden entstehen durch die Aktivität einer Metalloprotease (Mariani et al., 1995). Einige Studien haben gezeigt, daß die lösliche Form des Liganden Apoptose induzieren kann (Dhein et al., 1995), während andere Gruppen nur den membranständigen Liganden als aktive Form betrachten (Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998).

Die Bindung des CD95 Liganden oder eines agonistisch wirkenden Antikörpers führt zur Trimerisierung bzw. Oligomerisierung des CD95 Rezeptors. Dieser Schritt ist notwendig, da gezeigt werden konnte, daß Monomere und Dimere keine Apoptose auslösen können (Dhein et al., 1992). Siegel et al. (2000) konnten zeigen, daß schon der unstimulierte Rezeptor (ohne gebundenen Liganden) über die sogenannte PLAD-Domäne (für "Pre-Ligand Assembly Domain", PLAD) präassoziiert vorliegt. Zusätzlich wurde in mehreren Studien berichtet, daß der Rezeptor Liganden-abhängig Cluster auf der Zelloberfläche bildet (Tollefson et al., 1998; Cremesti et al., 2001; Grassme et al., 2001; Algeciras-Schimnich et al., 2002). Bei der Oligomerisierung entstehen SDS-stabile Mikroaggregate des aktivierten Rezeptors, die in Western Blot Analysen nachgewiesen werden können (Kischkel et al., 1995; Kamitani et al., 1997; Papoff et al., 1999; Algeciras-Schimnich et al., 2002). Diese Aggregate werden alleine durch die Bindung des CD95L oder eines antagonistisch wirkenden Antikörpers an den CD95 Rezeptor gebildet.

Da der Rezeptor jedoch keine intrinsische enzymatische Aktivität besitzt, muß das Todessignal durch die Anlagerung von Signalmolekülen in das Zellinnere übertragen werden. Solch ein Komplex von Proteinen kann nach Stimulation mit dem Rezeptor assoziiert gefunden werden (Kischkel et al., 1995). Die Behandlung von CD95-positiven Zellen mit dem agonistischen Antikörper anti-APO-1 (Trauth et al., 1989) und anschließende Immunpräzipitation des CD95 Rezeptors führte zur Identifizierung von vier Cytotoxizitäts-abhängigen APO-1 assoziierten Proteinen (CAP1-4) auf einem zweidimensionalen isoelektrischen Fokussierungsgel. Die Rekrutierung an den Rezeptor erfolgte innerhalb von Sekunden. Der Komplex aus Rezeptor und CAP1-CAP4 wurde Tod-induzierender Signalkomplex (Death inducing signaling complex) oder DISC genannt (Kischkel et al., 1995). CAP1 und CAP2 wurden später als zwei unterschiedlich phosphorylierte Formen des Adaptormoleküls FADD identifiziert, welche Stimulierungs-abhängig an den CD95 Rezeptor binden (Kischkel et al., 1995; Zhang und Winoto 1996). Überexpression einer dominant-negativen Form von FADD (FADD-DN) führte nicht länger zur Anlagerung von CAP3 und CAP4 und die Zellen wurden nicht mehr apoptotisch (Chinnaiyan et al., 1996b). Damit konnte gezeigt werden, daß FADD eine Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion von CD95 besitzt. Der Einsatz von Nano-Elektrospray Tandem-Massenspektroskopie führte zur Identifizierung von CAP4 (Muzio et al., 1996). Es handelt sich dabei um ein Protein, das zwei Todeseffektordomänen (“Death Effector Domain”, DED) am N-Terminus besitzt, wodurch es an FADD binden kann. Der C-Terminus ähnelt den “ICE-like” Proteasen (für “Interleukin-1β converting enzyme”), wodurch es den Namen FADD-like ICE, oder FLICE bekam. Später wurde FLICE im Zuge der Nomenklaturänderung zu Caspase-8 umbenannt. So konnte die Verbindung zwischen der Rezeptorebene und der intrazellulären Ebene der Caspasen hergestellt werden. Von CAP3 ist nur bekannt, daß es den N-Terminus von CAP4 (Caspase-8) enthält (Muzio et al., 1996). Funktion und genauere Struktur des Proteins sind aber immer noch unbekannt.

Die Entdeckung, daß Caspase-8 Teil des CD95 DISC ist, deutete darauf hin, daß Caspase-8 auch im DISC aktiviert wird. So konnte gezeigt werden, daß das

gesamte cytoplasmatische Caspase-8 der Zelle im DISC in die aktiven Untereinheiten umgesetzt wird (Medema et al., 1997a). Entsprechend dem “induced proximity”-Modell ist die Oligomerisierung von rekrutierter Pro-Caspase-8 ausreichend für die autoproteolytische Aktivierung, wodurch die aktiven Untereinheiten der Protease ins Cytoplasma entlassen werden (Yang et al., 1998; Martin et al., 1998; Salvesen et al., 1999). Von den acht publizierten Caspase-8 Isoformen kommen meist nur Caspase-8/a und Caspase-8/b in Geweben vor (Scaffidi et al 1997). Beide Formen werden auf vergleichbare Art und Weise in den DISC rekrutiert und dabei aktiviert.

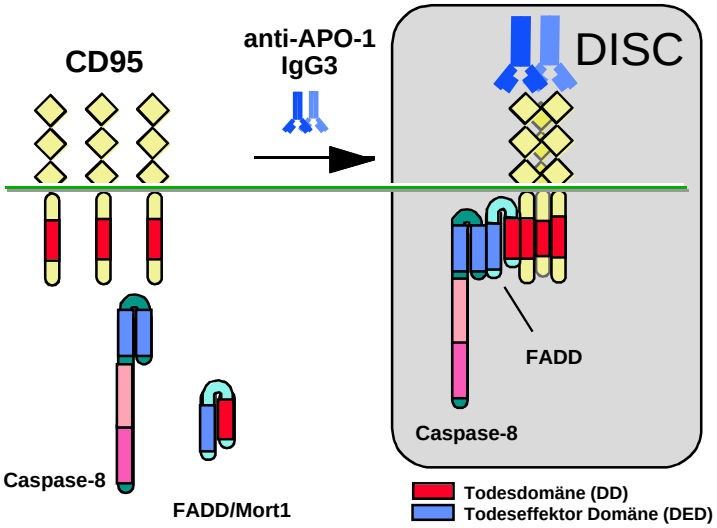


Abbildung 2: Schematische Darstellung des DISC. Die Bindung des CD95 Liganden oder eines anatgonistisch wirkenden Antikörpers führt zur Oligomerisierung des Rezeptors und damit zur Anlagerung von FADD/MORT1 über eine DD-DD Interaktion. FADD rekrutiert im Folgenden Procaspase-8 über die N-terminale DED und bewirkt so die Prozessierung der Caspase in die aktiven Untereinheiten.

5. Zwei CD95 Signalwege

Bei der CD95-vermittelten Apoptose können zwei unterschiedliche Signalübertragungswege unterschieden werden. Scaffidi et al. (1998) konnten zeigen, daß in sogenannten Typ I Zellen wie SKW6.4 und H9 Caspase-8 in ausreichend großer Menge an den DISC rekrutiert und dabei aktiviert wird, so daß Caspase-3 direkt von Caspase-8 aktiviert werden kann (Stennicke et al., 1998). Typ II Zellen (z.B. CEM, Jurkat) besitzen gleiche Mengen an CD95 und allen anderen Signalmolekülen, aber die Bildung des DISC ist so uneffizient, daß nur geringe Mengen an aktiver Caspase-8 auf der Ebene des DISC gebildet werden, die für die direkte Prozessierung von Caspase-3 nicht ausreichen. Allerdings kann mit diesen Mengen das Protein Bid in die aktive Form (tBid oder p15Bid) prozessiert werden (Kuwana et al., 1998; Li et al., 1998; Luo et al., 1998), so daß die apoptogene Aktivität der Mitochondrien induziert werden kann. Dies führt zur Aktivierung großer Mengen von Caspase-3 und –8 unterhalb des mitochondrialen Signalschrittes. Sind die Mitochondrien aber durch Überexpression von Bcl-x_L oder Bcl-2 geschützt, so

kommt es zur Inhibition von Apoptose in Typ II Zellen (Scaffidi et al., 1998). Da Typ I Zellen diesen mitochondrialen Amplifizierungsschritt nicht benötigen, bewirkt Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-x_L keinen Schutz vor CD95-vermittelter Apoptose. Nach dieser Einteilung gehören z.B. Thymocyten und periphere T Zellen zu Typ I, Leberzellen dagegen zu Typ II Zellen.

Die DISC Bindung in Typ I Zellen geht der Bildung von CD95 Oberflächenclustern voraus und ist abhängig von im DISC prozessierter und damit aktivierter Caspase-8 (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Der CD95/CD95L-Komplex wird dabei durch einen endosomalen Signalweg internalisiert. Insgesamt kann der Signalweg in vier verschiedene Schritte aufgeteilt werden:

1.) Die Bindung des Liganden führt zur Bildung von Rezeptor-Mikroaggregaten.
2.) Die Zusammensetzung des DISC erfolgt abhängig von Aktin.
3.) Die Aktivität von Caspase-8 führt zur Formation von höher-molekularen Rezeptorclustern.
4.) Die Internalisierung von CD95 erfolgt Aktin-abhängig.

Die Bildung des DISC ist daher ein aktiver Prozeß. Es muß ein Protein im DISC assoziieren, das CD95 an das Aktingerüst koppelt. Zur Zeit gibt es noch keine Erkenntnisse darueber, durch welchen Mechanismus bzw. welches interagierende Protein CD95 an das Aktingerüst koppelt. Es ist aber gezeigt worden, daß CD95 direkt mit dem Aktin bindenden Protein Ezrin assoziiert und kolokalisiert (Parlato et al., 2000). Dies weist auf eine Verbindung zwischen CD95 und Aktin hin.

Bei Latrunkulin A (LtnA) handelt es sich um ein Toxin, das aus einem vom Roten Meer stammenden Schwamm gewonnen wird. Es inhibiert die Mikrofilament-Organisation durch Bindung an monomeres G-Aktin in einem 1:1 Komplex (Spector et al., 1983). Inkubation mit LtnA vor Aktivierung des CD95/CD95L Systems zeigte, daß die Bindung des Liganden an den Rezeptor alleine nicht ausreicht, um große Mengen an Caspase-8 im DISC zu generieren. FADD und Caspase-8 werden dabei kaum an den DISC rekrutiert, wodurch bis zu 50% der Zellen vor CD95 vermittelter Apoptose geschützt sind (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Typ II Zellen bilden fast keinen DISC (Scaffidi et al., 1998). Deswegen hat die Inhibition der Aktinpolymerisierung keinen Einfluß auf die Prozessierung von Procaspase-8 in die aktiven Untereinheiten. LtnA kann in Übereinstimmung damit die Prozessierung von Caspase-8 nur in Typ I Zellen verhindern. Die Zellen sterben aber trotzdem durch die apoptogene Aktivität der Mitochondrien, wie dies in Typ II Zellen der Fall ist (Scaffidi et al., 1998).

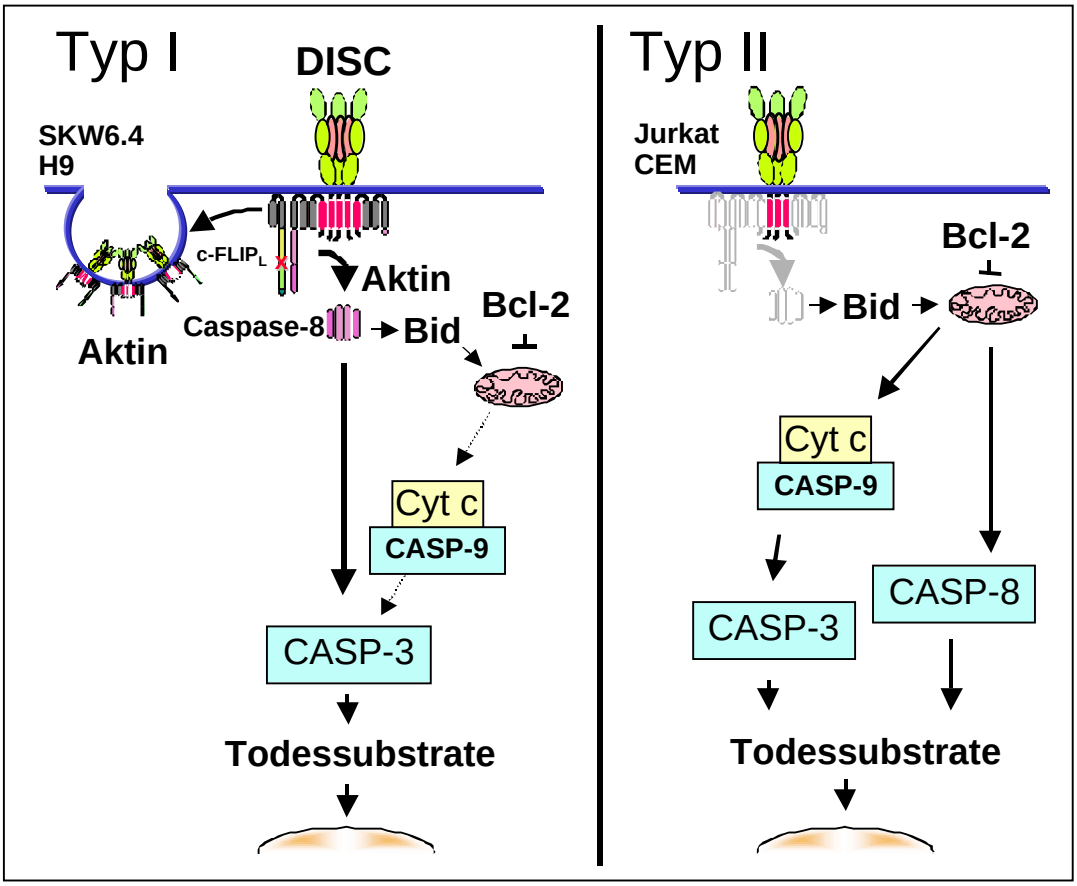


Abbildung 3: Die zwei CD95 Signalwege. Typ I Zellen (links) können Caspase-3 direkt aktivieren, während Typ II Zellen die Mitochondrien zur Amplifikation des Signals benötigen.

6. FADD/MORT1: Überbringer von Leben und Tod ?

Die humanen und murinen FADD Proteine wurden mittels des “yeast-two-hybrid” Systems identifiziert, in dem nach Molekülen gesucht wurde, die mit dem cytoplasmatischen Teil des CD95 Rezeptors assoziieren (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Zhang et al., 1996). Das humane *fadd* Gen besteht aus zwei Exons (286 und 341 Basenpaare), welche durch ein 2 kb Intron getrennt sind. Der Genlokus wurde durch *in situ* Hybridisierung mit 11q13.3 bestimmt (Kim et al., 1996). Diese Genomregion ist in bestimmten Brustadenokarzinomen amplifiziert und wurde auch mit Diabetes in Verbindung gebracht. Es ist daher möglich, daß dieses Gen eine Rolle bei der Tumorgenese und bei Autoimmunität spielt. Northern Blot Analysen und *in situ* Hybridisierungen haben gezeigt, daß die mRNA von FADD in relativ hohen Mengen in fast allen Geweben vorkommt (Chinnaiyan et al., 1995; Yeh et al., 1998). Das humane FADD Protein besteht aus 208 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa (Chinnaiyan et al., 1995). Humanes und murines

FADD Protein sind zu 68 % identisch und haben auf Proteinebene eine Ähnlichkeit von 80 %. Die Konservierung ist besonders in den zwei Regionen sehr hoch, die für die Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind. Ungefähr 70 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins bilden die DD. Diese Region ist sowohl notwendig als auch hinreichend für die Bindung an die DD des CD95 Rezeptors (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Diese Domäne vermittelt gleichzeitig die Interaktion mit TRADD, einem weiteren Adaptormolekül, wodurch FADD indirekt über eine DD-DD Bindung an den aktivierten Todesrezeptor TNF-RI rekrutiert wird (Hsu et al., 1996).

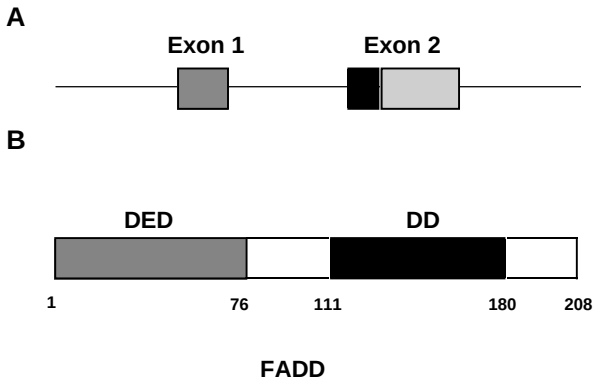


Abbildung 4: Das humane FADD Gen und Protein. (**A**) Exon/Intron-Struktur von FADD/MORT1 auf Chromosom 11q13.3. (**B**) Lokalisation der N-terminalen Todeseffektordomäne (DED, grau) und C-terminalen Todesdomäne (DD,schwarz) in FADD. Nach Strasser und Newton, 1999.

Die 76 N-terminalen Aminosäuren von FADD bilden die DED. DD und DED sind sich in der Struktur sehr ähnlich: beide bestehen aus sechs antiparallelen amphipathischen α-Helices. Die DED von FADD interagiert mit einer der DEDs in der Prodomäne von Caspase-8 und rekrutiert so die Protease als inaktives Zymogen an den aktivierten CD95 Rezeptor (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). In unbehandelten Zellen befindet sich FADD im Cytosol, relokalisiert nach Stimulation des CD95 Rezeptorsystems allerdings an die Plasmamembran, wo es die Autoproteolyse von Caspase-8 ermöglicht (Kischkel et al., 1995). Überexpression von C-FADD führt in sogenannten Typ I Zellen zur Inhibition sowohl der Clusterbildung als auch der Internalisierung des aktivierten CD95 Rezeptors (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Ein substantieller Teil von FADD wird von einer noch unbekannten Serin/Threoninkinase phosphoryliert (Kischkel et al., 1995; Zhang und Winoto 1996). Die Aktivierung von CD95 verändert den Phosphorylierungsstatus nicht und sowohl unphosphoryliertes, als auch phosphoryliertes FADD binden an den aktivierten Rezeptor mit vergleichbarer Affinität (Zhang et al., 1996). Die physiologische Relevanz der Phosphorylierung von FADD ist bisher noch ungeklärt.

Die biologische Funktion von FADD wurde in Experimenten mit Zellinien oder transgenen Mäusen mit der dominant-negativen Form von FADD näher untersucht (Chinnaiyan et al., 1996b; Newton et al., 1998; Walsh et al., 1998; Zörnig et al., 1998). Der Deletionsmutante fehlen die ersten 79 N-terminalen Aminosäuren und damit die für die Assoziation an Caspase-8 notwendige DED. FADD-DN besteht somit aus der Todesdomäne und einem C-terminalen Abschnitt aus 35 Aminosäuren,

dessen Funktion noch unbekannt ist. Diese Deletionsmutante wird daher im Folgenden als C-FADD bezeichnet werden. Durch Überexpression kompetitiert C-FADD mit endogenem FADD um die Bindung am Rezeptor, wodurch Caspase-8 nicht mehr in den DISC rekrutiert werden kann (Chinnaiyan et al., 1996b). Nicht nur die transgene Expression von C-FADD, sondern auch die Deletion des *fadd*-Gens in Mäusen zeigte, daß FADD essentiell für CD95, TNF-RI und DR3 induzierte Apoptose in Lymphocyten und embryonalen Fibroblasten ist (Yeh et al., 1998; Newton et al., 1998; Zhang et al., 1998). Bis vor kurzem war noch kontrovers diskutiert worden, ob die TRAIL-Rezeptoren Caspase-8 durch FADD und/oder TRADD aktivieren oder ob es sich um bisher noch unbekannte Adaptoren handelt (Marsters et al., 1996; Walczak et al 1997; Schneider et al., 1997; Chaudhary et al., 1997; Wajant et al., 1998). Neuere Erkenntnisse verdeutlichen die universelle Rolle des Adaptormoleküls FADD/MORT1 in Todesrezeptor-vermittelter Apoptose. Es konnte gezeigt werden, daß FADD sowohl mit DR4 als auch mit DR5 assoziiert und so Caspase-8 an den aktivierten Rezeptor rekrutiert (Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000; Bodmer et al., 2000).

Durch Expression von C-FADD als Transgen konnte gezeigt werden, daß FADD nicht nur für die Rezeptor-vermittelte Apoptose notwendig ist, sondern auch eine essentielle Rolle bei der Mitogen-induzierten Proliferation von T Zellen spielt (Newton et al., 1998). C-FADD inhibierte dabei den Wiedereintritt von T Zellen in den Zellzyklus beim Übergang von G0 zu G1. Dieser Effekt konnte auch in Fibroblasten beobachtet werden (Hueber et al., 2000). Darüber hinaus entstanden in der Abwesenheit von FADD keine B Lymphocyten mehr (Zhang et al., 1998). FADD defiziente Mäuse im RAG-1$^{-/-}$ Hintergrund zeigen eine reduzierte Zellularität im Thymus und einen Defekt in der Aktivierungs-induzierten Proliferation von reifen T Zellen nach T Zellrezeptor Aktivierung (Zhang et al., 1998). Die Reifung der T Zellen wurde in diesen Mäusen in dem doppelt-negativen Zustand CD4^{-}CD8^{-} inhibiert und es wurden wesentlich weniger reife T Zellen gefunden. T Zellen aus FADD-defizienten Mäusen zeigten außerdem eine dysregulierte Expression von verschiedenen Zellzyklus-Proteinen (Zhang et al., 2001). Die Cyclinkinasen cdc2, cdk2 und cdk6 wurden dabei zusammen mit CyclinE und CyclinA konstitutiv synthetisiert, p21 wurde nach Stimulation des T Zellrezeptors höher exprimiert als in den Wildtyp Kontrollzellen.

Es scheint daher, daß FADD ein Wachstumssignal initiieren kann. Dieses Signal erfordert keine Caspase-8-Aktivität, da T Zellen, die das Kuhpocken Serpin CrmA, einen sehr wirksamen Inhibitor der Caspasen-1 und -8, exprimieren, normal auf Mitogen- und Antigen-stimulierte Proliferationssignale reagieren (Newton et al., 1998). Die Divergenz eines Wachstumssignals vom Apoptosesignal auf der Ebene von FADD muß daher durch Interaktion mit einem anderen Effektormolekül geschehen. Strasser et al (1999) spekulierten daher, daß ein Protein FAX existieren muß (für "FADD assoziiertes Protein X"), das über die Bindung von FADD an den

aktivierten Rezeptor rekrutiert wird und so ein Signal übermittelt, das für die Zellzyklus-Progression sorgt.

FADD-defiziente Mäuse sterben durch Herzversagen und Blutungen in der Bauchhöhle *in utero* an Tag E11,5 (Yeh et al., 1998). Caspase-8-defiziente Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp auf (Varfolomeev et al., 1998), was darauf hindeutet, daß die Todesrezeptoren-vermittelte Apoptose essentiell für die Entwicklung des Herzens ist. Dies macht deutlich, daß von FADD ausgehende Wachstumssignale eine kritische Rolle in der Embryogenese spielen.

7. Die physiologische Bedeutung des CD95/CD95L-Systems

Der CD95 Rezeptor wird auf einer Reihe von lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben exprimiert (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Leithauser et al., 1993; Hiromatsu et al., 1994; Galle et al., 1995). Die Expression des CD95 Liganden ist dagegen wesentlich stringenter reguliert. Ursprünglich schien die Expression des Liganden nur auf T Zellen beschränkt zu sein (Suda et al., 1993), er wurde aber später auch in einigen wichtigen nicht-lymphoiden Geweben gefunden.

Die Identifizierung des CD95/CD95L Systems erklärte die Phänotypen von drei mutanten Mausmodellen: *lpr* (für lymphoproliferation) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992), *gld* (für "generalized lymphoproliferative disease) (Takahashi et al., 1994a) und lpr^{cg} (Matsuzawa et al., 1990). Diese Mäuse zeigen eine unkontrollierte Anhäufung von $CD4^-CD8^-$ T Zellen, wodurch es zu Lymphadenopathie, Splenomegalie und einer dem Systemischem Lupus Erythematosus ähnlichen Autoimmunerkrankung kommt. Die *lpr* Mutation ensteht durch eine Insertion eines Transposons in das zweite Intron der chromosomalen CD95-Sequenz, wodurch die Transkription der kompletten mRNA verhindert wird (Adachi et al., 1993). Bei der Punktmutation lpr^{cg} wird die Signaltransduktion von CD95 durch einen Aminosäurenaustausch in der Todesdomäne des Rezeptors verhindert. Die äquivalente Mutation dieser kritischen Aminosäure in der DD von FADD (V121N, auch "mt-Mutante" genannt) bewirkt, daß die beiden DDs nicht mehr aneinander binden können, wodurch CD95 vermittelte Apoptose unterbunden ist (Chinnaiyan et al., 1995). Dieser Effekt basiert auf der Tatsache, daß es sich bei Valin 121 um eine für die Faltung des Proteins kritische Aminosäure handelt (Berglund et al., 2000). Eine Mutation zu Asparagin führt entweder zu einer lokalen oder globalen Destabilisierung von FADD.

Der *gld* Defekt entsteht durch eine Punktmutation des CD95 Liganden, wobei eine für die Bindung des Liganden an den Rezeptor wichtige Aminosäure andere mutiert ist (Takahashi et al., 1994b). Auch beim Menschen konnte ein solches Krankheitsbild gefunden werden: Kinder mit ALPS ("autoimmune lymphoproliferative syndrome") entwickeln nicht-maligne Lymphadenopathien, die Akkumulation von T Zellen und Anzeichen von Autoimmunität (Fisher et al., 1995;

Rieux-Laucay et al., 1995). Die physiologische Rolle des CD95/CD95L Systems schien daher eng mit dem Immunsystem verbunden zu sein (Adachi et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, daß Stimulation des T Zellrezeptors auf bereits aktivierten T Zellen zur Hochregulation des CD95L führt und die T Zellen anschließend durch das CD95/CD95L System durch Apoptose beseitigt werden (Alderson et al., 1995; Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995). Dieser Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) ist auch bei der Deletion von Immunzellen nach erfolgter Immunantwort beteiligt, um die Zahl der T und B Zellen auf ein Mindestmaß zu reduzieren (Krammer, 2000). Zumindest ein Teil dieser peripheren Deletion von T Zellen ist gestört, wenn das CD95 System nicht funktionsfähig ist oder komplett fehlt (Singer und Abbas, 1994). Killer Zellen (sogenannte Cytotoxische T Zellen) entfernen z.B Virus-infizierte Zellen mit Hilfe des CD95 Systems. Andere Mechanismen nutzen Perforin und Granzym B, womit in der Zielzelle Caspase-8 aktiviert wird und damit die gesamte Apoptosemaschinerie in Gang gesetzt wird (Medema et al., 1997b). Auch bei der positiven und negativen Selektion von Immunzellen spielt das Todesrezeptorprogramm eine wichtige Rolle. Bis zu 40 Millionen Thymocyten werden jeden Tag in einer Maus generiert. Davon verlassen nur ca. 2-3% den Thymus (Krammer, 2000). T Zellen mit einem nicht-funktionellen T Zellrezeptor werden dabei durch Apoptose aus dem Organismus entfernt (Savill und Fadok, 2000). Auch in autoreaktiven B Zellen wird nach somatischer Hypermutation durch den CD95 Liganden Apoptose induziert, um die Gefahr einer Autoimmunerkrankung zu bannen (Craxton et al., 1999). Alle diese Beispiele verdeutlichen, welche zentrale Rolle Apoptose im Immunsystem spielt.

8. Caspasen: Todbringende Enzyme

Eine Reihe von Studien mit knock-out Mäusen hat gezeigt, daß Caspasen eine wichtige Rolle bei Apoptose und bei der Entwicklung spielen (Los et al., 1999; Zheng et al., 1999). Sie scheinen die Schlüsselmoleküle bei der Exekution von Apoptose zu sein, da sie eine Reihe von zellulären Substraten spalten und so die charakteristische Morphologie von apoptotischen Zellen (Abrunden der Zellen, Chromatinkondensation, etc) hervorrufen. Caspasen gehören zu einer Familie von Proteasen, die ein Cystein im aktiven Zentrum besitzen und nach einem Aspartatrest spalten (Cystein Aspartasen = Caspasen) (Alnemri et al., 1996). Bisher sind 14 Caspasen in Säugerzellen identifiziert worden, welche entsprechend ihrer Sequenzhomologie und Substratspezifität in drei Unterfamilien unterschieden werden können (Nicholson et al., 1999). Gruppe I umfaßt die Caspasen-1, -4 und -5 und ist hauptsächlich für die Prozessierung von Cytokinen verantwortlich. Zu den Effektorcaspasen der Gruppen II und III gehören Caspase-2, -3 und -7 bzw. Caspase-6, -8, -9 und -10.

Caspasen werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden müssen. Die Aktivierung erfolgt entweder durch Autoproteolyse oder durch die Spaltung einer anderen Caspase. Dadurch können große Mengen in der Zelle gelagert und falls notwendig, auf einmal aktiviert

werden, wodurch der Prozeß wesentlich beschleunigt wird. Dies erfordert, daß die Regulation dieser Proteasen sehr strikt erfolgen muß, um die ungewollte Aktivierung des Selbstmordprogrammes zu verhindern. Das aktive Enzym besteht aus einem heterotetrameren Komplex von zwei großen Untereinheiten, die das aktive Zentrum beinhalten, und zwei kleinen Untereinheiten. Die Struktur wurde durch Kristallographie der Caspasen-1, -3 und -8 aufgeklärt (Wilson et al., 1994; Walker et al., 1994; Mittl et al., 1997; Blanchard et al., 1999; Watt et al., 1999). Die Spezifität der Caspasen-Untereinheiten scheint sowohl auf Spaltungsmotiven (bestimmte Abfolge von Aminosäuren) als auch der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur des Substrates zu beruhen. Dies und die limitierte Zahl von Substraten pro Caspase bewirken ein streng reguliertes Programm zur Desintegration der Zelle (Thornberry und Lazebnik, 1998). Allerdings können Caspasen das Fehlen einer anderen Caspase ausgleichen. Caspase-3 defiziente Mäuse zeigen z.B. keinen generellen Defekt in der Apoptoseinduktion (Kuida et al., 1996). Dies erklärt sich wahrscheinlich durch die große Zahl der in Säugerzellen vorkommenden Caspasen. Caspase-8 defiziente Zellen sind im Gegensatz dazu resistent gegenüber CD95 vermittelter Apoptose. Dies belegt die essentielle Rolle, die Caspase-8 als am DISC aktivierte Protease spielt (Varfolomeev et al., 1998).

Viele verschiedene apoptotische Stimuli können die Aktivierung von Caspasen veranlassen (Krammer, 1999) und so zur Spaltung von Proteinen mit den unterschiedlichsten Funktionen führen. Martin und Green (1995) wiesen nach, daß bei der Induktion des apoptotischen Prozesses etwa 200 Polypeptide proteolytisch degradiert werden. Untersuchungen haben z.B. gezeigt, daß der Cytolinker Plektin das erste Substrat für die gerade im DISC aktivierten Caspase-8 darstellt (Stegh et al., 2000). Andere cytoskelettale Todessubstrate sind Strukturproteine wie Gelsolin, Lamin A und B, Cytokeratin 18, Lamin und Fodrin (Nicholson, 1999). Eine andere Gruppe von Proteinen, die von aktivierten Caspasen gespalten werden, sind Signalmoleküle der unterschiedlichsten Signalwege (z.B. Rb, STAT-1, PAK2, PKC, PP2A, Bid und MEKK-1 (Nicholson, 2000)). RNA Metabolismus, DNA-Replikation und Translation, Splicing Vorgänge und Zellzyklusprogression sind energieverbrauchende Prozesse, die nach Einleitung des apoptotischen Programms nicht mehr benötigt und daher abgeschaltet werden.

Typische Ereignisse für Apoptose sind Chromatinkondensation und DNA Fragmentierung. Bei den dafür verantwortlichen Proteinen handelt es sich um Acinus (für "Apoptotic Chromatin Condensation Inducer in the Nukleus") bzw. die Endonuklease CAD (für "Caspase Activated Deoxyribonuclease"). Acinus wird von Caspase-3 aktiviert und bewirkt die Kondensation von Chromatin, ohne dabei DNA zu fragmentieren (Sahara et al., 1998). In nicht-apoptotischen Zellen liegt CAD komplexiert mit dem Inhibitor ICAD vor. Nach Induktion von Apoptose spaltet Caspase-3 den Inhibitor, wodurch CAD freigesetzt wird und in den Nukleus translozieren kann, um DNA zu fragmentieren (Enari et al., 1998; Halenbeck et al., 1998; Sakahira et al., 1998).

Zwischenzeitlich sind verschiedene Proteine beschrieben worden, die die Aktivierung von Caspasen inhibieren können. Ein Protein des Kuhpockenvirus, CrmA ("Cytokine response modifier A"), ist ein Serpin-ähnliches Molekül, das nach Spaltung durch Proteasen stabil an das aktive Enzym bindet und so das Enzym inaktiviert. CrmA kann z.B. CD95 und TNF-RI vermittelte Apoptose inhibieren (Tewari und Dixit, 1995; Enari et al., 1995; Los et al., 1995; Miura et al., 1995). Das von Baculoviren kodierte p35 Protein blockiert Apoptose über einen ähnlichen Mechanismus (Xue und Horvitz, 1995). Die sogenannten IAP (für "Inhibitor of Apoptosis Proteins") wurden wie p35 als baculovirale Proteine identifiziert. Die in Säugetieren gefundenen IAP XIAP (MIHA, hILP), cIAP-1 (MIHB), cIAP-2 (MIHC), NAIP und Survivin können an Caspasen binden und diese inhibieren (Salvesen und Duckett, 2002). Bei FLIP handelt es sich um ein sowohl zelluläres ("c-FLIP, cellular FLICE inhibitory protein"), wie auch virales Protein ("v-FLIP"), das Homologien mit Caspase-8 aufweist. Das Cystein im aktiven Zentrum liegt in diesem Protein mutiert vor. Da FLIP an FADD assoziiert, kann es mit endogener Caspase-8 um die Bindungsstelle am Rezeptorkomplex kompetitieren und die katalytische Proteolyse von Caspase-8 inhibieren (Goltsev et al., 1997; Irmler et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Dita et al., 1998; Scaffidi et al., 1999b).

9. Die Rolle der Bcl-2 Proteinfamilie und der Mitochondrien

Bcl-2 und die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind Schlüsselproteine für die Regulation von Apoptose. Das erste in humanen Zellen entdeckte Regulatorgen war *bcl-2*. Dieses Gen war in einem humanen follikulären Lymphoma durch Chromosomen Translokation aktiviert worden (Tsujimoto et al., 1984; Bakhshi et al., 1985; Cleary et al., 1986) und bewirkte unerwarteterweise das Überleben von Cytokin-abhängigen hämatopoetischen Zellen in Abwesenheit von Cytokinen (Vaux et al., 1988). Nähere Untersuchungen zeigten, daß das Onkogen Bcl-2 ein strukturelles und funktionelles Homolog zu CED-9 darstellt (Vaux et al., 1992; Hengarter und Horvitz, 1994).

Die Apoptose regulierenden Genprodukten der Bcl-2 Familie lassen sich in Apoptoseantagonisten wie Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1 Mcl-1 und A1, und in Apoptoseagonisten wie Bax, Bak, Bcl-x_S, Bad, Bid, Bik und Hrk unterteilen (Kroemer, 1997). Alle Mitglieder besitzen mindestens eine von vier konservierten Motiven, den sogenannten Bcl-2 Homologiedomänen (BH1-BH4). Bcl-2 besitzt alle vier Domänen, während die meisten antagonistisch wirkenden Proteine mindestens BH1 und BH2 enthalten. Die den Bcl-2 am nahesten verwandten Mitglieder enthalten ebenfalls alle vier BH-Domänen. Bax, Bak und Bok besitzen nur BH1, BH2 und BH3. Proteine wie Bid, Bad, Blk, Bim, Nix, Puma und Noxa werden als "BH3 only" bezeichnet und wirken proapoptotisch (Adams und Cory, 1998). Egl-1, das proapoptotisch wirkende Molekül in *C. elegans*, besitzt ebenfalls eine BH3 Domäne, wodurch es an CED-9 bindet und es inaktiviert (Conradt und Horvitz, 1998). Pro- und antiapoptotische Familienmitglieder können heterodimerisieren und beeinflussen so

gegenseitig ihre Funktionen (Oltvai et al., 1993). Die BH1, BH2 und BH3 Domänen sind dabei notwendig für die Interaktion und Assoziation.

Bcl-2 lokalisiert auf der cytoplasmatischen Seite der mitochondrialen Außenmembran, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Kernhülle (Kroemer, 1997; Zamzami et al., 1998; Green und Reed, 1998). In Übereinstimmung mit Daten aus *C. elegans* deuten biochemische Hinweise darauf hin, daß antiapoptotische Bcl-2 Proteine direkt durch Inhibition von CED-4 ähnlichen Proteinen wirken (Hengartner und Horvitz, 1994a). Die BH4 Domäne scheint dabei essentiell für die antiapoptotische Wirkungsweise und Interaktion mit CED-4 zu sein (Huang et al., 1998).

Die Apoptoseforschung hat die Mitochondrien und Cytochrom c wiederentdeckt und in das Zentrum des allgemeinen Interesses gebracht. Während das apoptotische Programm abläuft, können Veränderungen im mitochondrialen Transmembranpotential $\Delta\Psi m$ beobachtet werden. Der Abfall von $\Delta\Psi m$ wird durch die sogenannte Permeabilitäts Transition (PT) hervorgerufen. Poren in der inneren Mitochondrienmembran werden geöffnet und erlauben so die Translokation von mitochondrialen Proteinen in das Cytoplasma (Bernardi et al., 1994). Faktoren wie AIF (für “Apoptosis Inducing Factor”), Cytochrom c, SMAC/Diablo und verschiedene Caspasen induzieren danach Apoptose durch die Aktivierung von Effektorcaspasen und die Spaltung von essentiellen Struktur- und Signalproteinen (Ravagnan et al., 2002).

Die antiapoptotischen Proteine der *bcl-2* Genfamilie scheinen auch die Integrität von Organellen zu schützen. Bcl-2 verhindert dabei die Freisetzung von Cytochrom c von den Mitochondrien, welches im Komplex mit Apaf-1, ATP und Procaspase-9 Caspase-3 in die aktive Form prozessiert (Zou et al., 1997; Li et al., 1997; Kroemer 1997; Zamzami et al., 1998; Green und Reed, 1998). Die Struktur von Bcl-x_L ähnelt der von Membran-inserierenden Domänen von bakteriellen Toxinen, was zu der Hypothese führte, daß Bcl-2 Mitglieder mit BH1 und BH2 Domänen Poren in Organellen wie Mitochondrien formen können (Muchmore et al., 1996, Sattler et al., 1997). Bid, Bax und Bak-ähnliche Proteine können durch Porenformation die Membranpermeabilisierung von Mitochondrien auslösen und repräsentieren somit eine Klasse proapoptotischer Moleküle, die über mitochondriale Porenbildung Apoptose auslösen können (Jürgensmeier et al., 1998; Marzo et al., 1998; Narita et al., 1998; Desagher et al., 1999; Pastorino et al., 1999). Bid wird bei Todesrezeptor-vermittelter Apoptose durch Caspase-8 in p15Bid (tBid) gespalten, lokalisiert zu den Mitochondrien und induziert dort die Permeabilisierung der Membran (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999).

10. Die Rolle von Aktin

Es ist von mehreren Gruppen berichtet worden, daß Aktin während Apoptose als Todessubstrat dient und von Caspase-3 gespalten wird (Mashima et al., 1995; Chen et al., 1996; Kayalar et al., 1996; Brown et al., 1997; Mashima et al., 1997; Song et al., 1997). Interessanterweise führt die ektopische Expression von Spaltfragmenten von Aktin zu morphologischen Veränderungen, die denen von apoptotischen Zellen ähneln (Mashima et al., 1999). Dabei wurde keine Caspasenaktivierung beobachtet, was darauf hindeutet, daß Aktinspaltung zur Entstehung der Morphologie von Apoptose beitragen kann (Mashima et al., 1999). Auch andere cytoskelettale Proteine wie z.B. Plektin, Gelsolin und Gas2 werden durch Caspasen gespalten, wodurch die Zelle ihre innere Struktur verliert und das Cytoplasma in kleinen apoptotischen Körperchen abgeschnürt werden kann.

Die Gestalt und Beweglichkeit einer pro- bzw. eukaryontischen Zelle beruht auf dem Aktin-Cytoskelett (Jones et al., 2001, van den Ent et al., 2001), einem System von Filamenten, das sowohl als mechanische Stütze, wie auch als Gerüst für die Rekrutierung von regulatorisch wirkenden Faktoren, Signal- und Motorproteinen dient. Der Hauptbestandteil dieses Cytoskeletts ist Aktin, ein ATP bindendes und 375 Aminosäuren großes Protein, das in zwei verschiedenen Formen in der Zelle zu finden ist: als monomeres G-Aktin (auch globuläres Aktin genannt) bzw. als filamenöses F-Aktin. Aktin kann stabile und labile Strukturen ausbilden. Stabile Aktinfilamente bilden den Kern der Microvilli und sind ein entscheidender Bestandteil des kontraktilen Apparats in den Muskelzellen. Aktinfilamente werden durch reversible Polymerisierung von Monomeren zusammengesetzt. Die Polymerisierung stimuliert dabei ATP Hydrolyse und die Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i). ADP wird von den Aktinmolekülen nach Konformationsänderung umschlossen und sorgt so wie eine Art Scharnier für die Stabilität des Komplexes. Der Depolymerisationsschritt erfordert die Anwesenheit von ATP. Dabei wird ADP gegen ATP ausgetauscht, wodurch Aktinmonomere wieder als Baustein für den nächsten Polymerisationsschritt zur Verfügung stehen.

Aktinfilamente sind polar aufgebaut und beide Enden haben unterschiedliche biochemische Eigenschaften (Pollard et al., 2000). Das schneller wachsende Ende wird dabei als das *plus*, das langsamere als das *minus* Ende bezeichnet. Die Polymerisierung findet hauptsächlich am *plus* Ende statt und wird strikt durch Monomer und Filament bindende Proteine kontrolliert, die die Menge an Monomeren reguliert, die Formierung der Filamente bewirkt und auch für die Wiederverwertung der Monomeren nach Depolymerisierung der Filamente sorgt (Welch und Mullins, 2002). Polymerisierung und Depolymerisierung werden durch den aus sieben Untereinheiten aufgebauten Arp2/3 Komplex (Machesky et al., 1994) gesteuert. Dieser Komplex besitzt zwei wichtige Aufgaben: Nach Aktivierung durch sogenannte NPF's (für "nucleation-promoting factors") bildet Arp2/3 neue Aktinfilamente als Reaktion auf Signale, die die Zelle durch intrazlluläre bzw. extrazelluläre Rezeptoren und Sensoren empfängt (Ma et al., 1998; Mullins und Pollard, 1999; Rohatgi et al.,

1999). Arp2 und Arp3 formen dabei ein dem Aktindimer ähnliches Heterodimer, das die Filamentformation bewirkt (Kelleher et al., 1995).

Aktinfilamente bewirken durch die Anlagerung von Aktin-bindenden Proteinen viele unterschiedliche Strukturen in der Zelle. Als lockere Gele und steife Bündel koppeln sie an die Plasmamembran und verbinden andere cytoskelettale Proteine mit der Plasmamembran und dem Transportsystem der Zelle. Myosin bewegt sich z.B. mit Hilfe der Hydrolyse von ATP an den Aktinfilamenten entlang und transportiert Organellen und Vesikel zu ihrem Bestimmungsort (Mullins und Pollard, 1999). Gruppen Aktin-bindender Proteine verschieben entweder Aktinbündel gegeneinander (z.B. in Muskeln) oder erzeugen durch kooperative Wirkung Bewegungen der Zelloberfläche wie Cytokinese, Phagocytose und Fortbewegung.

11. Aktivierung und Proliferation von T Zellen

Die koordinierte Aktivierung von T Zellen als Reaktion auf körperfremde Antigene gewährleistet die Antigen-spezifische klonale T Zell Expansion und Differentierung. Die Aktivierung der Lymphocyten wird dabei von Signalwegen kontrolliert, die durch den Antigenrezeptor und kostimulatorische Moleküle initiiert werden. Der physiologische Ligand des T Zellrezeptors (TZR) ist das an den Haupthistokompatibilitäts-Komplex ("Major Histocompatibility Complex", MHC) gebundene körperfremde Peptid, das auf der Oberfläche von Dentritischen Zellen und anderen Antigen-präsentierenden Zellen exponiert wird (Cantrell, 1996). Der TZR besteht aus α/β Untereinheiten, welche den MHC/Peptidkomplex erkennen, und den Signaltransduktionseinheiten CD3 (ε, γ und δ Ketten) und TZR ζ (Weiss, 1993). Biochemische Signale, die durch diesen Rezeptor weitergeleitet werden, bestimmen die Spezifität der T Zellaktivierung. Die vom TZR ausgehenden Signale resultieren dabei in der Phosphorylierung und Aktivierung von Tyrosinkinasen, wodurch wiederum zelluläre Proteine phosphoryliert und aktiviert werden können. Signale, die von anderen Membranproteinen, wie den MHC Rezeptoren CD4 und CD8, den Kostimulatoren CD2 oder CD28 oder von Integrinen ausgehen, modulieren die intrazellulären Schwellenwerte, die für die Initiation der Immunantwort benötigt werden (Shaw et al., 1997; Davis et al., 1998).

CD28 war das erste Oberflächenmolekül, das als Kostimulator identifiziert wurde (June et al., 1990). Seit der Identifizierung von CD28 ist die Zahl der kostimulatorischen Moleküle rasant gewachsen (Watts und DeBenedette, 1999; Mueller, 2000). Basierend auf Sequenzhomologien können diese Rezeptoren in zwei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse besteht aus CD28 verwandten- und ICOS- (für "Inducible Costimulator") Rezeptoren (Mueller, 2000). CD28 und ICOS sind über Disulfidbrücken verbundene Homodimere, die an bestimmte Mitglieder der B7 Familie von Oberflächenproteinen binden. Diese scheinen die eigentlichen kostimulatorischen Moleküle für die Aktivierung von T Zellen zu sein, wobei naïve und ruhende T Zellen CD28 und aktivierte bzw. Effektor T Zellen ICOS benutzen

(Frauwirth und Thompson, 2002). Die zweite Klasse von kostimulatorischen Rezeptoren sind Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie. Dazu gehören CD40, CD30 und CD27 (Watts und DeBenedette, 1999; Whitmire und Ahmed, 2000).

In vitro und *in vivo* Studien haben gezeigt, daß CD28 hauptsächlich ein kostimulatorisches Molekül für naïve T Zellen darstellt. Die Signalwege unterhalb des CD28 Rezeptors sind allerdings sehr komplex und daher nur zum Teil verstanden. Ein Schlüsselereignis scheint aber die Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie zu sein, zu der Rac und CDC42 gehören. Beide aktivieren die p21 aktivierte Kinase, was diese an die MAPK Kaskade (für "Mitogen Activated Protein Kinase") koppelt und schließlich zur Induktion von IL-2 (für "Interleukin-2") Synthese führt (Frauwirth und Thompson, 2002). Ein weiteres Protein, PI3K (für "Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase"), kann an den cytoplasmatischen Teil von CD28 binden. Allerdings ist noch strittig, ob PI3K essentiell für die Signaltransduktion von CD28 ist (Hutchcroft und Bierer, 1996). PKB (für "Protein Kinase B") ist eine Serin/Threonin Kinase, die an der Plasmamembran durch Phosphorylierung aktiviert wird und im Folgenden Substrate phosphorylieren und damit aktivieren kann. Antikörperbindung und dadurch bedingte Quervernetzung von CD28 induzieren PKB Phosphorylierung und Aktivierung auch in Abwesenheit von Signalen des TZR/CD3- Komplex (Parry et al., 1997; Kane et al., 2001). Diese Aktivierung ist PI3K abhängig. Vav ist ein Proto-Onkogen, das als Guanin-Nukleotid Austauschfaktor für Rac und CDC42 dient, wodurch diese Proteine vom inaktiven (GDP ist gebunden) in den aktiven (GTP ist gebunden) Zustand übergehen können (Reif und Cantrell, 1998). Signale, die von CD3 und CD28 ausgehen, können vav phosphorylieren und aktivieren. CD28 Kostimulation induziert auch die Expression von PDE7, einer cAMP Phosphodiesterase, die intrazelluläre cAMP Mengen reduziert. Dieser Schritt scheint für die Proliferation von T Zellen notwendig zu sein (Li et al., 1999).

12. Aufgabenstellung

Apoptose spielt eine essentielle Rolle bei der Gewebshomöostase und der Onkogenese von mehrzelligen Organismen. Fehlregulationen dieses zellulären Prozesses vor allem im CD95-System können zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Autoimmunität, AIDS und Krebs führen. Um therapeutisch in solche Fehlregulationen eingreifen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die Signalwege des CD95 Rezeptors zu entschlüsseln.

CD95 (APO-1, Fas) gehört zu den am besten untersuchten Rezeptoren, die direkt Apoptose auslösen können. FADD/MORT1 ist das Adaptormolekül für die Todesrezeptoren. Es rekrutiert die Cysteinylprotease Caspase-8 an den durch CD95 Liganden oder agonistisch wirkenden anti-APO-1 Antikörper aktivierten Rezeptor, wodurch es zur Bildung des Tod-induzierenden Signalkomplexes (DISC) kommt. FADD defiziente Mäuse sterben *in utero* an Tag E11,5 und T Zellen aus diesen und C-FADD transgenen Mäusen zeigen eine Inhibition der Mitogen-vermittelten Proliferation (Newton et al., 1998; Zhang et al., 1998). FADD wird außerdem an Serinresten phosphoryliert (Kischkel et al., 1995; Zhang und Winoto 1996). Die Funktion dieser Phosphorylierung ist allerdings noch unbekannt.

In dieser Arbeit sollte daher zuerst die Phosphorylierungsstelle von FADD identifiziert und die Rolle der Phosphorylierung in Proliferation und Apoptose näher untersucht werden. Dazu sollte eine nicht-Tumor Zellinie gefunden werden, die durch Expression von C-FADD im Zellzyklus inhibiert werden kann und in der Punktmutanten der Phosphorylierungsstelle auf ihre Fähigkeit, den Zellzyklus zu beeinflussen, untersucht werden können. Schließlich sollte ein System entwickelt werden, mit dem in naïven T Zellen der Effekt von C-FADD Punktmutanten der Phosphorylierungsstelle auf die Proliferation untersucht werden kann. Die Kinase, die FADD phosphoryliert, ist noch unbekannt. Daher sollten mögliche FADD Kinasen untersucht und die Bindedomäne der Kinase im FADD Molekül näher charakterisiert werden.

II. Material und Methoden

1. Allgemeine Materialien

1.1. Chemikalien

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

1.2 Häufig verwendete Puffer

DNA-Probenpuffer (10 x):	50%	Glycerin (v/v)
	0,42%	Bromphenolblau (w/v)
	0,42%	Xylencyanol (w/v)
Fixierlösung:	20%	MeOH (v/v)
	10%	Essigsäure (v/v)
Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM	Tris-Base
	1,9 M	Glycin
	0,1%	SDS (w/v)
Lysepuffer (Eukaryonten):	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1 mM	PMSF
	10%	Glycerin (w/v)
	1%	Triton X-100 (w/v)
	0,5 µg/ml	Antipain
	0,5 µg/ml	Chymostatin A
	0,5 µg/ml	Leupeptin
	0,5 µg/ml	Pepstatin
Nikolettipuffer:	0,1%	Natriumcitrat (w/v)
	0,1%	Triton X-100 (w/v)
	50 µg/ml	Propidiumiodid

PBS:	137 mM	NaCl	
	8,1 mM	Na_2HPO_4	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH_2PO_4	pH = 7,4
Probenpuffer reduz. (5 x):	50%	Glycerin	
	10%	SDS (w/v)	
	50mM	Tris, pH = 6,8	
	25%	β-Mercaptoethanol (v/v)	
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau	
TBE (10 x):	0,45 M	Tris	
	0,45 M	Borsäure	
	10 mM	EDTA	pH = 8,3
TE:	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	pH = 7,5
Sammelgel (5%):	24 mM	Tris-HCl, pH = 6,8	
	5%	Akrylamid (w/v)	
	0,1%	SDS (w/v)	
	0,1%	APS (w/v)	
	0,1%	TEMED (w/v)	
Transferpuffer Westernblot:	25 mM	Tris-Base	
	0,19 M	Glycin	
	20%	MeOH (v/v)	
	0,037%	SDS (w/v)	
Trenngel:	37,5 mM	Tris-HCl, pH = 8,8	
	7,5-15%	Akrylamid (w/v)	
	0,1%	SDS (w/v)	
	0,03%	APS (w/v)	
	0,1%	TEMED (w/v)	

Weitere Lösungen sind in den entspechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Geräte

Gerät		Hersteller
Autoradiographiekassetten		Fisher Scientific
Blotting-Apparatur		Owl
Trans-Blot Semi-Dry		Fisher Scientific
Brutschränke		Fisher Scientific
Steri-Cult Incubator		
Durchflußzytometer FACScan		Becton Dickinson
ELISA-Reader		SLT Labinstruments
Gefrierschränke:	-20 °C	GE
	-80 °C	Legaci Ref. Systems
Geiger-Müller-Zählrohr 900		Series
Gelelektrophoresekammern		Owl, CTI
Heizbad		Köttermann
Heizblock Thermostat 5320		Eppendorf
Mikroskope:	Lichtmikroskop ID 02	Zeiss
	Phasenkontrastmikroskop Labovert FS	Leitz
Mikrowellengerät HMG730B		GE
Minigelelektrophoresekammer		Owl
Netzgerät Electrophoresis Power Supply PS 500		EC Apparatus Corporation
pH-Meter Calimatic		Fisher Scientific
Photoeinheit:	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
	Kamera RA1	Fisher Scientific
	Video Graphic Printer UP-860 CE	Sony
Photometer U-1100		Hitachi
Quarzküvetten Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsgerät Curix 160		Kodak
Schüttelinkubator Certomat HK		Fisher Scientific
Szintillationsmessgerät	TopCount NXT	Packard
Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Company
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Fisher Scientific
	Präzisionswaage PE 3600	Fisher Scientific
Zählkammer Neubauer		Sigma

Zellernter	Filtermate Harvester	Packard Instruments
Zentrifugen:	Allegra 6R	Beckman
	J-6B mit Elutriationsrotor JE-6B	Beckman Instruments
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS	DuPont

1.4 Biologisches Material

1.4.1 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Verwendung	Referenz, Bezugsquelle
XL1 blue	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen
BL21	Produktion von Fusionsproteinen	Novagen

1.4.2 Eukaryontische Zellen

Alle verwendeten Zellen waren menschlichen Ursprungs.

Zellinie	Herkunft
SKW6.4	B-lymphoblastoide Zellinie
BJAB	EBV-negative humane Burkitt-ähnliche lymphoblastoide Zellinie
BJAB-C-FADD	BJAB, stabil transfiziert mit C-FADD wt, den Punktmutanten S194A, S194E, mt und der Deletionsmutante ΔC
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie-Linie
H9	humane T-Zell-Leukämie-Linie
Jurkat RIP$^{-/-}$	humane T-Zell-Leukämie-Line, defizient für RIP
Jurkat Wildtyp und FADD$^{-/-}$	humane T-Zell-Leukämie-Line, parentale und FADD defiziente Zellen
MCF-10A	spontan immortalisierte Brustepithelzellinie
MCF-7	Mammakarzinomzellinie
MCF-7-Fas	Mammakarzinomzellinie mit CD95 (APO-1, Fas) transfiziert
293	embryonale Nierenzellinie zur Amplifizierung von Adenoviren
293T	293 Zellen, mit dem großen T Zellantigen stabil transfiziert

1.5 Nährmedien

1.5.1 Medien für die Zellkultur

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

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

DMEM-F12 Medium (Gibco BRL)) wurde mit 10% (v/v) FKS (Gibco, BRL), 250 µg/ml Hydrocortison (Sigma, St. Louis, MO), 50 µg/ml humanem rekombinantem EGF (Gibco, BRL) und 10 µg/ml Gentamicin (Gibco, BRL) komplementiert.

T Zell Medium bestand aus “High Glucose” (4,5 g/l) DMEM, komplementiert mit 10% FKS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Sigma), 10 mM MOPS (Sigma), 0.05 mM β-Mercaptoethanol (Sigma), 1,5 mM Glutamin (Sigma), 14 µM Folsäure (Gibco), 0,3 M Asparagin und 0,7 M Arginin (beide Gibco).

Geneticin (Sigma) und Hygromycin B (Sigma) wurden zur Selektion von eukaryontischen Zellen eingesetzt.

<u>Für die Markierung von Zellen wurden folgende Mangelmedien verwendet:</u>

[^{35}S**]**Methionin-Cystein Markierung: RPMI und DMEM Mangelmedium (Gibco BRL, Eggenstein und Grand Island, NY), komplettiert mit allen fehlenden Bestandteilen ausser Methionin und Cystein.

[^{32}P**]**Orthophosphat Markierung: DMEM und RPMI Mangelmedium, komplettiert mit allen fehlenden Bestandteilen außer Phosphat.

1.5.2 Medien für Bakterien

LB-Medium:

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

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml) oder Tetracyclin (12,5 µg/ml) zugegeben.

1.6 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind gegen menschliche Proteine gerichtet.

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-APO-1 (IgG3)	CD95	Trauth et al., 1989
FII23 (IgG3)	unbekannt	Trauth et al., 1989
anti-FADD 1C4 (IgG1) (Maus, monoklonal)	FADD	Scaffidi et al., 2000
anti-FADD (IgG1)	FADD	Transduction Laboratories
anti-myc (IgG1) (Maus, monoklonal)	myc	Sigma Aldrich
anti-p70/p85^{S6k} (Kaninchen, polyklonal)	p70/p85^{S6k}	New England Biolabs
anti-AU-1 (IgG3) (Maus, monoklonal)	AU-1	Covance
anti-Caspase-3 (IgG2a) (Maus, monoklonal)	Caspase-3	Transduction Laboratories
anti-Aktin (IgG2a) (Maus, monoklonal)	Aktin	Sigma Aldrich
anti-CD95 (Kaninchen, polyklonal)	CD95	Santa Cruz Biotechnology
anti-DRAK2 (Kaninchen, polyklonal)	DRAK2	MoBiTec

2C11	CD3	Pharmingen, San Diego, CA
PV1	CD28	Pharmingen, San Diego, CA
C15 (IgG2b) (Maus, monoklonal)	Caspase-8 p18 Untereinheit	Scaffidi et al., 1997
anti-IgG1, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2a, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2a	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2b, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti Kaninchen , HRPO (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG, Fc-spezifisch	Dianova, Hamburg und Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG, FITC	Maus IgG, Fc-spezfisch	Santa Cruz Biotechnology

1.7 Molekularbiologische Materialien

1.7.1 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pcDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3-FADD bzw. C-FADD	eukaryontischer Expressionsvektor mit dem für FADD bzw. C-FADD kodierenden Insert	Dr. V.M. Dixit (Genentech, San Francisco, CA)
pLEP, pREP	Cosmidsystem zur Herstellung von rekombinanten Typ 2 Adenoviren	Wang et.al., 2000
pGEX 4T-1, 2, 3	prokaryontischer GST Fusionsprotein Expressionsvektor	Pharmacia Biotech
pRSET A, B, C	prokaryontischer 6His Fusionsprotein Expressionsvektor	Invitrogen

1.7.2 Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
FADDΔC	TATATCTCGAGTTACCTGTTCTGGAGGTCACGG
C-FADD Punktmutante S194A	GGGGCCATGGCCCCGATGTC (sense) GACATCGGGGCCATGGCCCC (antisense)
C-FADD Punktmutante S194E	GTGGGGCCATGGAGCCGATGTCATGG (sense) CCATGACATCGGCTCCATGGCCCCAC (antisense)
C-FADD Punktmutante mt	GCTCGTCAGCTCAAAAACTCAGACACCAAGATCG (sense) CGATCTTGGTGTCTGAGTTTTTGAGCTGACGAGC (antisense)
AdV-C-FADD Klonierungsprimer HindIII	CCCAAGCTTGGGATGGACACATACCGCTAC
AdV-C-FADD Klonierungsprimer NotI	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTATTTCAGGACGCTTCGGAGGT
GST-C-FADD wt/SA/E Klonierungsprimer	CGGGATCCATGGACACATACCGCTACATCG (sense) CGGAATTCTCAGGACGCTTCGGAGGTAGATGC (antisense)
GST-C-FADD mt Klonierungsprimer	CGGGATCCATGGACTTCGAGGCG (sense)
GST-C-FADDΔ2 Klonierungsprimer	CGGGATCCCGGGAGTCACTGAGAATCTGG (sense)
GST-C-FADDΔ3 Klonierungsprimer	CGGGATCCGTACAAGAGGTTCAGCAGGCC (sense)

1.7.3 Peptidsequenzen

Name	Sequenz
C-FADD wt	GRQIKIWFQNRRMKWKKNRSGAM**S**PMSWNSDASTSEAS
C-FADD S194A	GRQIKIWFQNRRMKWKKNRSGAM**A**PMSWNSDASTSEAS
Pep S190E	CNR**E**GAMSPMSWNSDASTSEAS
Pep S194E	CNRSGAM**E**PMSWNSDASTSEAS
Pep S200E	CNRSGAMSPMSWN**E**DASTSEAS
Pep S203E	CNRSGAMSPMSWNSDA**E**TSEAS
Pep S205E	CNRSGAMSPMSWNSDAST**E**EAS

1.7.4 Enzyme und Kits

Enzym / Kit	Bezugsquelle
RNase (DNase frei)	Roche Diagnostics, Mannheim
Deep Vent ™ DNA Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein und Cellgro, Boston
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
Murine LV Reverse Transkriptase	Perkin Elmer, New Jersey, USA
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Qiagen Maxiprep Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

Die verschiedenen Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas und New England Biolabs bezogen.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

2.1.1 Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab mit Hilfe der alkalischen Lyse

1-3 ml einer Bakterienkultur, die sich im exponentiellen Wachstum befand, wurden bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 125 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 250 µl einer frisch angesetzten 200 mM NaOH/1% SDS Lösung und anschließender Inkubation für 5 min auf Eis lysiert. Die Reaktion wurde mit 187,5 µl NaAc pH 4,8 gestoppt und die Zellen für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 14 000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Denaturierung von Proteinen wurde einmal mit einem gleichen Volumen Phenol und danach mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) ausgeschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 rpm) wurden 500 µl der wässrigen Phase abgenommen, zu 750 µl eiskaltem Ethanol (100%) gegeben und sofort abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min). Das Pellet wurde einmal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und danach im Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl TE oder Wasser gelöst. RNA-Bestandteile wurden durch Zugabe von 1 µl DNase-freier RNase (500 µg/ml) eliminiert.

2.1.2 Plasmid-Präparation im großen Maßstab mit Hilfe des Qiagen Maxiprep Kit

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 400 bis 800 ml einer Übernachtkultur bei 6000 rpm für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 10 ml Puffer P2 vorsichtig dazugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere 10 ml eines kalten P3 Puffers wurden hinzugegeben, gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Lyse wurden unlösliche Bestandteile bei 14000 rpm für 30 min im SS34-Rotor abzentrifugiert und der Überstand auf eine mit dem Puffer QBT äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde 2x mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid DNA mit 15 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol gefällt, das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 200 µl TE oder Wasser gelöst. Die Bestimmung des DNA Gehaltes erfolgte im Spektrophotometer bei 260 nm.

2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Durch den Verdau mit Restriktionsenzymen entstehende DNA-Fragmente können elektrophoretisch in Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dazu wurde Agarose in Konzentrationen zwischen 0,7–2% in TBE Puffer gelöst und 2 x kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid wurde die Agaroselösung in einem Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesetzt, der die Taschen frei hielt. DNA Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und danach für 1 bis 4 h bei 60–90 V elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Molekulargewichtsmarker wurden zur Kalibrierung des Gels zu den untersuchenden Proben aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch UV-Bestrahlung des Gels bei 315 nm, wodurch der in die DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt wird.

2.3 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA aus Mini- oder Maxipräparationen wurden 1–2 µg DNA mit 2U einer Endonuklease im vom Hersteller empfohlenen enzymspezifischen Puffer für 1–2 h bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen DNA Fragmente konnten anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und spezifische DNA-Banden aus dem Gel isoliert werden.

2.4 Isolierung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Isolation von DNA Fragmenten zum Zwecke der weiteren Klonierung wurde der QIAquick Gel-Extraction Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde die restriktionsverdaute DNA in einem 1% „low melting point“ Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA Fragmente auf einem Leuchttisch mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Agarosestücke wurden gewogen und mit dem dreifachen Gewicht der Agarose (1 µg 1 µl) an Puffer QX1 versetzt. Die Agarose wurde durch Inkubation bei 50°C für 10 min geschmolzen und die DNA dadurch in Lösung gebracht. Anschließend wurde der Ansatz mit einem Drittel des Volumens an QX1 Puffer versetzt, mit Isopropanol vermischt und auf eine QIAquick Säule gegeben. Die DNA wurde in mehreren Zentrifugationsschritten an das Säulenmaterial gebunden, mit Puffer PE gewaschen und zum Abschluss mit 50 µl Wasser von der Säule eluiert.

2.5 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Bei der Verwendung geschnittener Vektor DNA für eine Ligation kann diese mit einer Phosphatase behandelt werden. Dabei werden Phosphatgruppen an den 5‘ Enden entfernt, was die Religation des linearisierten Vektors ohne Zugabe eines Inserts verhindert. Die Klonierungseffizienz kann dadurch deutlich verbessert werden. Dazu wurde zu einem Restriktionsverdau 10U des Enzyms CIP (Calf intestinal alkaline phosphatase) zugegeben und dieser für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Vektor DNA wurde anschließend durch Gelelektrophorese und Gel-Extraktion aufgereinigt.

Die Bakteriophagen T4 Ligase katalysiert in Gegenwart von ATP die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 3‘ OH- und 5‘ Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Für die Ligation restriktionsverdauter DNA wurde Vektor DNA mit der zwei bis dreifachen Konzentration der zu inserierenden DNA gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde in Ligationspuffer mit 2U T4 DNA-Ligase für 16 h bei 16°C inkubiert und anschließend chemokompetente Bakterien mit dem Ligat transformiert.

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

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

10 µl	10x PCR-Puffer
4 µl	25 mM $MgCl_2$
2 µl	Desoxynukleotide (je 10 mM)
10 µl	Primer 1 (10 µM)
10 µl	Primer 2 (10 µM)
20 ng	Template DNA
1 µl	Vent DNA-Polymerase
ad 100 µl	H_2O

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

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

2.7 RT/PCR

Die RT/PCR (Reverse Transkription/PCR) ermöglicht es, den kodierenden Bereich eines Gens ausgehend von der dazugehörigen mRNA in cDNA zu übersetzen und zu amplifizieren. Hierzu isoliert man zuerst Gesamt-RNA aus Zellen und übersetzt anschließend die Poly(A)-mRNA mit Hilfe der Reversen-Transkription in einzelsträngige DNA (ssDNA). Im zweiten Schritt wird diese mit Hilfe zweier spezifischer Primer amplifiziert. Bei der Reversen-Transkription wurden 1-2 µg Gesamt-RNA mit 2,5 µM Oligo dT16 (16-mer bestehend aus Thymidin), 1 mM dNTPs, 1U RNase-Inhibitor, 5 mM $MgCl_2$ und 2 µl eines 10 x PCR-Puffers in einem Ansatz von 18,5 µl gemischt. Dieser wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, um vorhandene Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören. Zum Ansatz wurden 1,5 µl (1U) MuLV-Reverse Transkriptase (Muriner Leukemia Virus-Reverse Transkriptase) hinzugegeben, für 45 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 5 min auf 90°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Der so erhaltene Ansatz konnte zur Amplifikation der ssDNA direkt in einer PCR verwendet werden.

2.8 Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen

Um Punktmutationen in ein Gen einzuführen, wurde der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene benutzt. Die Durchführung folgte den Angaben des Herstellers. Der Kit basiert auf der Tatsache, daß parentale wt-Plasmid-DNA aus Bakterien stammt, die die Sequenz 5'-GATC-3' durch Methylierung zu 5'-G^{M6}ATC-3' modifiziert haben, während neusynthetisierte und mutierte Plasmide diese Modifikation nicht tragen. 5'-G^{M6}ATC-3' ist die Erkennungssequenz der Endonuklease DpnI. Zur Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Primer (sense und antisense) benötigt, die die gewünschte Mutation eingebettet in die wt-Sequenz enthalten. Ähnlich einer PCR werden diese Mutationsprimer an ein hitzedenaturiertes wt-Plasmid angelagert und dienen so als Ausgangspunkt für die Synthese mutierter Plasmide durch die Polymerase Pfu. Anschließend wird das parentale wt-Plasmid mit der methylierten DNA 5'-G^{M6}ATC-3' durch die

Endonuklease DpnI verdaut. Die übrigbleibenden neusynthetisierten mutierten Plasmide werden in Bakterien transformiert.

Ein 50 µl-Ansatz enthielt neben 5 - 50 ng wt-Plasmid 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 125 ng sense-Primer, 125 ng antisense-Primer, und 2,5U Pfu-Polymerase. Der Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und im Thermocycler in folgenden Zyklen inkubiert:

1. Zyklus:	30 sec;	95°C	(Denaturierung der DNA)
2. bis 17. Zyklus:	30 sec;	95°C	(Denaturierung der DNA)
	1 min;	55°C	(Primer-Annealing)
	12 min;	68°C	(Polymerisations-Reaktion)
18. Zyklus:	2 min;	4°C	(Abkühlung)

Anschließend wurden pro Ansatz 10U DpnI hinzugegeben, die parentalen Plasmide für 2 h bei 37°C verdaut und schließlich 5 bis 15 µl des Ansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

2.9 Transformation von Bakterien

2.9.1 Herstellung chemo-kompetenter Bakterien

200 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtkultur E. coli angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{260} von 0,6 im Schüttler inkubiert (37°C; 200 rpm). Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min; 3000 rpm; 4°C; Heraeus Zentrifuge) und in 60 ml eiskalter TFB1-Lösung (100 mM $RbCl_2$; 50 mM $MnCl_2$; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM $CaCl_2$; 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach 90 min Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min; 3000 rpm; 4°C; Heraeus Zentrifuge) und anschließend wurde das Bakterienpellet in 8 ml eiskalter TFB2-Lösung (10 mM $RbCl_2$; 75 mM $CaCl_2$; 15% Glycerin; 10 mM MOPS; pH 7) aufgenommen. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die nach dieser Methode hergestellten kompetenten Bakterien wiesen eine Transformationseffizienz von 1-5 x 10^7 Transformanten pro µg zirkulärer Plasmid-DNA auf.

2.9.2 Transformation chemo-kompetenter Bakterien

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

2.10 Herstellung von Adenoviren

2.10.1 Klonierung von Adenoviren

C-FADD Adenoviren (AdV-Typ 2) wurden nach der von Xinzhong Wang (Gene Therapy Center, Massachusetts General Hospital, Boston) entwickelten Methode hergestellt (siehe Abb. 5). Anstatt durch homologe Rekombination wird dabei die gesamte AdV DNA durch das Zusammenfügen der zwei konventionellen Klonierungsvektoren pLEP ("left end plasmid", Tet-Resistenz) und pREP ("right end plasmid", Ampicillin-Resistenz) vereinigt. Zuerst wurde die Genexpressionseinheit mit Hilfe der AdV-C-FADD Klonierungsprimer durch PCR amplifiziert, im Agarosegel aufgereinigt und anschließend in die Polylinkerregion des Plasmids pLEP ligiert. Dieses wurde anschließend an einer einzigartigen Intron-kodierten Endonuklease-Sequenz (Pi-PspI) mit pREP zusammgefügt. Das Ligationsprodukt wurde entsprechend den Herstellerangaben in λ Phagen verpackt (Gigapack III Gold Packaging Extract, Stratagene) und DK1 Bakterien damit transformiert. Die Bakterien wurden auf Tet/Amp-Agarplatten herangezogen und einzelne Klone durch Restriktionsverdau mit BglII überprüft. Positive Klone wurden herangezogen und Minipräparationen für Plasmid-DNA durchgeführt. Die rekombinante Adenovirus-DNA wurde durch eine weitere Endonuklease (I-CeuI) freigesetzt und 293 Zellen zur Produktion der E1 defizienten Viren mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode mit diesem Verdau transfiziert.

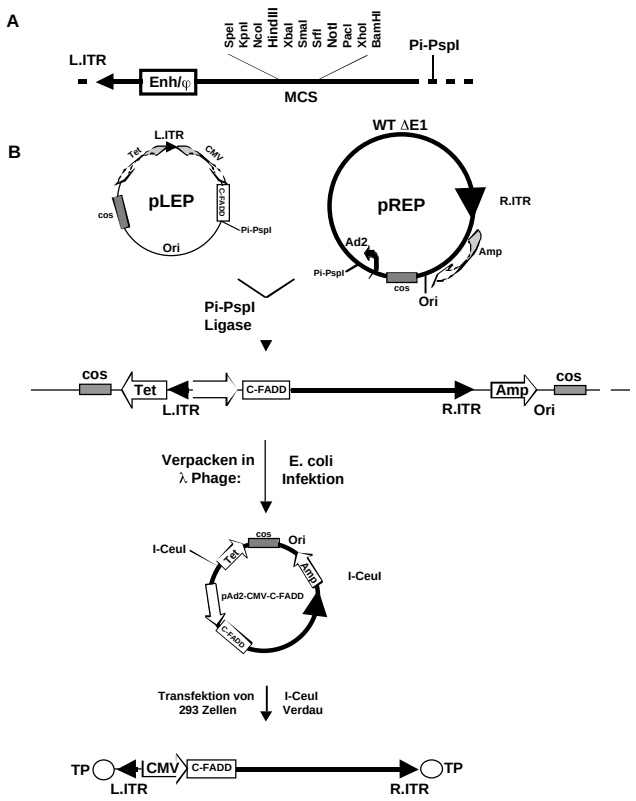


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur des AdV Systems. (**A**) Diagramm der pLEP Cosmid Polylinkerregion und deren Position in Relation zum linken adenoviralen ITR. Die Adenovirus Enhancer (Enh) / Verpackungssequenz (ϕ) ist eingerahmt. (**B**) Herstellung des für ein AdV Genom kodierenden Cosmids durch direkte Ligation zweier kleinerer Plasmide. Eine Gen Expressionseinheit (CMV-C-FADD wt, S194A, S194E und mt) wurde in die Polylinker Region des pLEP Cosmids eingebracht. MCS, Multiple Klonierungsstelle; TP, terminales Protein.

2.10.2 Präparation von Adenoviren im großen Maßstab

Zur Herstellung großer Mengen Adenoviren (AdV Typ 2 oder AdV-C-FADD Typ 5 (Streetz et al., 2000))wurden 30 x 25 cm Zellkulturschalen mit jeweils 10^7 293 Zellen mit Adenoviren in 2% Mangelmedium infiziert. Nach 90 Minuten Inkubation bei 37°C wurde zu den Zellen 15 ml Vollmedium gegeben und die Zellen so lange weiter inkubiert, bis die ersten Zellen anfingen sich langsam abzurunden. Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und das Pellet in 10 mM Tris pH 8 aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 3x abwechselnd in 37°C und einem Trockeneis/Ethanolgemisch inkubiert, bis alle Zellen lysiert waren. Die Membranfraktion wurde bei 3500 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Jeweils 1,5 ml dieser Suspension wurden auf einen Cäsiumchloridgradienten (1,5 ml schweres $CsCl_2$ (42,23 g $CsCl_2$ in 57,77 ml 10 mM Tris pH 8) unter 1,5 ml leichtem $CsCl_2$ (22,39 g $CsCl_2$ in 77,61 ml Tris pH 8)) aufgetragen und über Nacht in einem SW55 Ti Rotor bei 33000 rpm und 4°C in der Ultrazentrifuge separiert. Die die Adenoviren repräsentierende Bande wurde isoliert und auf einen zweiten Cäsiumchloridgradienten (135 g $CsCl_2$ in 300 ml TE pH 8,1, 10 mM Tris und 1 mM EDTA) gegeben. Die Zentrifugation erfolgte in einem 70.1 Ti Rotor bei 55000 rpm und 4°C über Nacht. Die Adenoviren wurden isoliert und danach zuerst gegen einen HBS Puffer (140 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$ und 10 mM Hepes; pH 7,2) über Nacht dialysiert. Nach einem weiteren Dialyseschritt für 1 h in "Forced Dialysis buffer" (140 mM NaCl, 5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4 und 5% Sucrose; pH 7,8) wurden die Viren extrahiert. 20 µl wurden in 980 µl 10 mM Tris pH 8 verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Der Titer wurde mit Hilfe der Formel: A_{260} x 50 x 10^{10} = Viruspartikel (VP) pro ml errechnet und die Viren bei –80°C gelagert.

3. Proteinchemische Methoden

3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

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

Harnstoff	4,0 g
IEF Acrylamid (28,38% (g/v) Acrylamid, 1,62% (g/v) Bisactylamid)	933 µl
H_2O	1,225 ml
Ampholin Serva, pH 5 - 7	193 µl
Ampholin Pharmacia, pH 5 - 7	193 µl
Ampholin Pharmacia, pH 3 - 10	140 µl

10% NP-40	1,4 ml
TEMED	5 µl
10% APS	7 µl

Vor der Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wurde die Gellösung entgast. Die Polymerisierung benötigte wenigstens zwei Stunden. Danach wurde in der IEF-Kammer unten 10 mM H_3PO_4 und oben 20 mM NaOH (beide entgast) vorgelegt. Die Gele wurden gespült und mit je 10 µl Überschichtungspuffer (8M Harnstoff, 1% (v/v) Ampholin Pharmacia, pH 5 - 7, 5% NP-40, 10 mM DTT) überschichtet. Der Vorlauf erfolgte bei konstantem Strom von 0,33 mA/Gel, bis eine Spannung von 1200 V erreicht wurde. Dann wurden die Proben in zehnfachem Volumen Probenpuffer (9,8 M Harnstoff, 2% (v/v) Ampholin Pharmacia, pH 5 - 7, 4% NP-40, 100 mM DTT) aufgenomen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die so vorbereiteten Proben wurden auf die Zylindergele gegeben und mit 10 µl Überschichtungspuffer überschichtet. Der Lauf erfolgte bei 1200 V für 18 bis 20 Stunden. Durch Wasserdruck wurden die Gele dann aus den Zylindern gepreßt und 5 min in 4 ml Äquilibrierungspuffer (0,06 M Tris-HCI, 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 -8O° C aufbewahrt.

3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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.

Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,1% (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt, die Geloberfläche durch Tupfen mit Filterpapier getrocknet und das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation (10 min) wurden die Gele beladen. Proteinlösungen wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und 3 min bei 95°C inkubiert. Zylindergele aus der isoelektrischen Fokussierung wurden auf die Sammelgele gelegt und mit Agaroselösung (0,169M Tris/HCI, 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. Der Lauf der Gele erfolgte bei 80 bis 130 Volt für 12-20 Stunden. Bei radioaktiven Proben wurden die Gele amplifiziert (Amplify, Amersham), getrocknet und autoradiographiert.

3.3 Western Blot Analyse

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

3.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die behandelten oder unbehandelten Zellen in Lysepuffer resupendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C). Um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an Protein A-Sepharose bzw. anti-IgG1-Agarose binden, wurde das Lysat vorbehandelt (sogenannter „Preclear“): Das Lysat wurde zunächst zweimal mit Protein A-Sepharose, das zuvor 45 min mit NRS (Normal Rabbit Serum) oder Maus IgG behandelt wurde, bei Raumtemperatur für 60 bis 80 min inkubiert. Die eigentliche Immunpräzipitation, d.h. die Inkubation des Lysats mit an PA bzw. an anti-IgG1-Agarose gekoppelten Antikörpern, erfolgt bei 4°C für 2 bis 3 Stunden. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer wurden die Protein A-Sepharose- bzw. anti-IgG1-Agarose-Beads mit 50 µl RSB versetzt und auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.5 ELISA

Jeweils 100 µl einer Verdünnung der fünf C-terminalen FADD Peptide (10 µg/ml in 0,2 M Bicarbonatpuffer, pH 9,6) wurden bei 4°C für 16 h auf Mikrotiterplatten inkubiert. Die Platten wurden mit RPMI-Medium/10% FKS für 1 h bei RT geblockt und danach 3 x mit TPBS gewaschen. Der 1C4 Antikörper wurde in

einer Konzentration von 10 µg/ml in die erste Lochreihe (A1-12) gegeben und anschließend eine Verdünnungsreihe bis zur letzten Lochreihe (H1-12) jeweils im Verhältnis 1:1 angefertigt. Die Platte wurde für 1 h bei RT inkubiert, 3 x gewaschen und danach mit einem HRP-gekoppelten anti-IgG1 Sekundärantikörper (1:5000 in TPBS) für 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Platte 3 x gewaschen und mit o-Phenylendiamin (Sigma, 1 mg/ml in 0,1 M Natriumcitratpuffer pH 5) und 1 µl/ml Perhydrol (Merck, West Point, PA) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 N H_2SO_4 abgestoppt.

3.6 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

3.6.1 Induktion und Expression der GST-Fusionsproteine

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

3.6.2 Lyse der Bakterien und Extraktion von GST-Fusionsproteinen

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

3.6.3 Elution und Analyse von GST-Fusionsproteinen

Um gebundene GST-Fusionsproteine von Glutathion-Sepharose zu eluieren, wurde diese 30 Minuten bei 4°C im Überkopf-Schüttler mit 500 µl GSH-

Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM reduziertes Glutathion) inkubiert. Anschließend wurde das Eluat durch Zentrifugation (1 min 6000 rpm; RT; Eppendorf) von der Sepharose getrennt und der Überstand bei 4°C gelagert. Dieser Vorgang wurde bis zu dreimal wiederholt. Um die Reinheit und die Menge der Proteine zu bestimmen, wurden 10 µl jedes Eluats mit 3 µl 5x RSB vermischt, aufgekocht und zusammen mit jeweils 5 µl verschiedener BSA-Proteinstandards (0,25 µg/µl; 0,5 µg/µl; 1 µg/µl) auf einem SDS-PAGE (plus Coomassie-Färbung) analysiert.

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

3.7 DISC Analyse

Für die Analyse des DISC wurden jeweils zwei Ansätze verwendet. Für den stimulierten DISC wurden Zellen in der Regel für 5 min mit 2 µg/ml anti-APO-1 (anti-CD95 Antikörper) stimuliert und anschließend wie oben beschrieben lysiert. Der unstimulierte Ansatz wurde erst nach der Lyse mit 2 µg anti-APO-1 versetzt. Anschließend wurden beide Lysate identisch behandelt.

Die unspezifischen Bindungen wurden durch 10 µg FII23 mAk reduziert, der kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose CL-4B gekoppelt worden war (Pharmacia, Freiburg). Der an anti-APO-1 gebundene stimulierte oder unstimulierte CD95 Rezeptor wurde danach mit 30 µl Protein A-Sepharose (Sigma) für 1–2 h bei 4°C präzipitiert. Anschließend wurde die Matrix kurz abzentrifugiert, das Lysat entfernt und die Sepharosematrix mehrmals mit Lysepuffer gewaschen. Die Präzipitate wurden entweder eindimensional oder durch 2D-IEF-SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie oder Western Blot analysiert.

3.8 *In vitro* Kinase Test

Zur Untersuchung der Aktivität präzipitierter Kinasen wurde ein *in vitro* Kinase Test durchgeführt, bei dem radioaktiv markierte Phosphatgruppen von aktivierten Proteinkinasen auf deren Substrat übertragen werden. Dazu wurden Proteine entweder mit Hilfe von Antikörpern (z.B. anti-FADD, anti-AU-1) immunpräzipitiert oder die Kinase mit verschiedenen GST-C-FADD Fusionsproteinen ko-immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden 3–4 x mit Lysepuffer gewaschen und danach in Kinasepuffer (75 mM Tris/HCl pH 7,5, 1% Triton X-100, 10% Glycerin, 10 mM $MnCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 5–60 min bei Raumtemperatur oder auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem Lysepuffer abgestoppt und das Präzipitat bei 6000 rpm bzw. 9000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Produkte mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Autoradiographie analysiert.

4. Zellbiologische Methoden

4.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

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

RPMI-1640 Medium: BJAB, SKW6.4, H9, Jurkat
DMEM-Medium: 293T, 293, MCF-7
DMEM-F12: MCF-10A

Transfizierte Zellen wurden mit folgenden Zusätzen kultiviert:

BJAB C-FADD Transfektanten: 1 mg/ml G418
MCF-7-Fas-Vektor: 250 µg / ml G418, 150 µg/ml Hygromycin B

4.2 Aufreinigung von Maus-Splenocyten

Transgene Mäuse, die den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) auf der Zelloberfläche von T Zellen exprimierten, wurden mit CO_2 getötet, die Milz entfernt, in einem Zellhomogenisator in einem Volumen von 7,5 ml T Zell Medium aufgeschlossen und weitere 7,5 ml Medium hinzugegeben. Die Suspension wurde einmal kurz bei 500 rpm abzentrifugiert und die T Zellen im Überstand bei 1500 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Säulenpuffer (2% FKS in Calcium/Magnesium-freiem PBS) pro entfernter Milz resuspendiert und mit 10 µl Antikörpercocktail (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) pro 1 ml Säulenpuffer versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 15 min. Bei dieser negativen Selektion binden Antikörper außer gegen T Zellen gegen alle anderen Zelltypen (wie z.B. Thrombocyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, NK Zellen etc.), die ebenfalls in der Milz vorhanden sind. Der Ansatz wurde mit 10 ml Säulenpuffer gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet pro entnommener Milz in 1 ml Säulenpuffer und 100 µl einer anti-Biotin Tetramerlösung (Stem Cell Technologies) aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte pro Milz die Zugabe von 60 µl magnetischer Colloidbeads, gefolgt von 15 min Inkubation bei 4°C. Eine Säule wurde zwischen einen Magneten gespannt und die Lösung aufgetragen. Es folgten 3 Waschschritte mit Säulenpuffer. Der Durchfluss enthielt die von allen anderen Blutzellen abgetrennten T Zellen in einer Reinheit von ca. 95%. Die T Zellen

wurden pelletiert, in Medium aufgenommen, gezählt und standen somit für weitere Experimente bereit.

4.3 Transfektion von Zellen

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

Für die stabile Transfektion von BJAB Zellen wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dazu wurden 5 x 10^6 Zellen bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 300 µl Kulturmedium resuspendiert und in eine Elektroporations-Küvette überführt. Nach Zugabe von 20 µg Plasmid-DNA wurde kurz gemischt und mit 960 µF und 200 Volt elektroporiert. Anschließend wurde die Suspension in eine kleine Kulturflasche überführt, in der 10 ml warmes Kulturmedium vorgelegt waren. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen gezählt und zu je 0,1; 1; 10 und 100 Zellen in 200 µl Kulturmedium in die Vertiefung einer 96 Lochplatte verteilt. Zur Selektion exprimierender Klone wurde dem Medium 4 mg/ml G418 zugegeben. Erste Klonnester konnten bereits nach 2 Wochen beobachtet werden. Einzelne Klone wurden isoliert, weiter expandiert und schließlich auf Expression des transfizierten Proteins im Western Blot analysiert. Positive Klone wurden in Anwesenheit von 1 mg/ml G418 weiter herangezogen und in 10% DMSO in FKS bei –140°C tiefgefroren.

4.4 Subzelluläre Fraktionierung

6 x 10^7 Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde für die Präparation von Kernen bzw. Cytoplasma eingesetzt. Zur Präparation cytoplasmatischer Extrakte wurden die Zellen in Cyt-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol (DDT), 10 µM Cytochalasin B, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Ein Aliquot des Lysats wurde mit Trypanblau gefärbt, um den prozentualen Anteil der bereits aufgebrochenen Zellen zu bestimmen. Nachdem etwa >95% der Zellen aufgeschlossen waren, wurde das Lysat bei 14000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand wurde abgenommen und in *in vitro* Kinase Tests verwendet. Zur Darstellung von Kernen wurden die gewaschenen Zellen für 20 min auf Eis in Nuk-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DDT, 10 µM Cytochalasin B, 1 mM PMSF) inkubiert und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Wiederum wurde die Anzahl lysierter Zellen durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Nachdem ein Lysegrad von

mehr als 95% erreicht worden war, wurde die Salzkonzentration auf 150 mM eingestellt und die Suspension auf eine 30% Saccharose-Lösung vorsichtig aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 800g für 25-30 min wurde das Kernpellet in 500 µl Cyt-Puffer aufgenommen, 2 x für 30 Sekunden sonifiziert und die Membranfraktion danach bei 14000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Uberstand wurde, wie oben beschrieben, in *in vitro* Kinase Tests verwendet.

4.5 Radioaktive Markierung von Zellen

Für die Markierung neusynthetisierter Proteine durch die radioaktiven Aminosäuren [^{35}S]Methionin und Cystein wurden exponentiell wachsende Zellen 2 x mit PBS gewaschen und in Methionin/Cystein Mangelmedium aufgenommen. Nach einer Stunde bei 37°C wurde 0,5 mCi [^{35}S]Methionin/Cystein (Protein Labeling Mix, Amersham) pro 3 x 10^7 Zellen zugegeben und die Zellen für 18–24 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für Immunpräzipitationen verwendet.

Für die Markierung von *in vivo* phosphorylierten Proteinen wurden exponentiell wachsende Zellen 2 x mit TBS gewaschen und in phosphatfreiem Mangelmedium in einer Dichte von 5 x 10^6 / ml resuspendiert. Anschließend wurde das Medium mit 0,5 mCi [^{32}P]Orthophosphat pro 1,5 x 10^7 Zellen versetzt und die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Markierung wurde durch das Waschen in eiskaltem PBS (mit 1 mM PMSF, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM $Na_4P_2O_7$) beendet.

4.6 FACS Analyse von intrazellulär gefärbten Zellen/Saponin Färbung

Zur Quantifizierung intrazellulär exprimierter Proteine wurden 1 x 10^6 Zellen bei 2000 rpm (wie alle folgenden Zentrifugationsschritte) abzentrifugiert, 1x mit FACS-Puffer (4% BSA in PBS) gewaschen und anschließend bei RT für 10 min in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und 1x mit 200 µl einer 0,03% Saponinlösung (Sigma, St. Louis, MO; in FACS-Puffer) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl 0,3% Saponin/FACS-Puffer aufgenommen, jeweils 1 µg Primärantikörper zu 1 x 10^6 Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet wie zuvor in 200 µl 0,03% Saponin/FACS-Puffer aufgenommen und die Zellen in 200 µl eines 0,3% Saponin/FACS-Puffers resuspendiert, der einen 1:200 verdünnten FITC-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper enthielt. Das Zellen-Antikörpergemisch wurde für 30 min bei 4°C inkubiert, die Zellen nochmals mit 0,03% Saponin/FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 200 µl einer 4% Paraformaldehydlösung aufgenommen. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen konnten danach bei 4°C gelagert oder sofort im FACScan analysiert werden. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden dazu in das Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson) durch

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

4.7 Infektion von Zellen mit Adenoviren

MCF-7 und MCF-10A Zellen wurden einen Tag vor der Infektion mit Adenoviren in 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag 1x mit PBS gewaschen und in 3 ml des für jeden Zelltyp entsprechenden Mediums mit 2% FKS aufgenommen. Eine Zellkulturschale wurde verwendet, um die Gesamtzellzahl zu bestimmen. Schließlich wurden zu den Zellen 100 Viruspartikel (VP) pro MCF-7 oder MCF-10A Zelle gegeben und für 90 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Volumen wurde danach in den Kulturschalen durch Zugabe von 10 ml Vollmedium (10% FKS) erhöht und die Zellen über Nacht inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Vollmedium hinzugegeben. Die infizierten Zellen standen somit für nachfolgende Experimente bereit.

Frisch isolierte T Zellen wurden in einer Dichte von 1 x 10^7 Zellen/ml in 2% Mangelmedium aufgenommen und mit 1000 VP pro T Zelle für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 100 µl Aliquots zu jeweils 2,4 ml Vollmedium in 24 Lochplatten gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag geerntet, 3x mit PBS gewaschen, in Vollmedium aufgenommen und gezählt. Die infizierten T Zellen standen für weitere Experimente bereit.

4.8 Proliferationstest

Mit verschiedenen C-FADD Adenovirus-Konstrukten infizierte Maus T-Zellen wurden in Triplikaten zu jeweils 8 x 10^5 Zellen in 200 µl Medium in 96-Lochplatten ausplattiert. Die Platten waren zuvor mit 1 µg/ml anti-CD3/CD28 Antikörper für mindestens 2 h bei 37°C immobilisiert und danach 2x mit sterilem PBS von ungebundenen Antikörpern freigewaschen worden. Nach Zugabe von radioaktivem [^{3}H]Methyl-Thymidin (finale Konzentration 1 µCi/Loch) wurden die Zellen für 12 h bei 37°C inkubiert. Im Zuge von Kinetiken wurde dieser Prozess für die Dauer von 4 Tagen wiederholt. Die Schnelligkeit des Wachstums wurde durch Transferieren der Zell-DNA auf einen Glasfilter (Filtermate Harvester, Packard, Meriden/Connecticut) und anschließende Messung des eingebauten Tritiums in einem Szintillations Messgerät (TopCount Microplate Scintillation Counter, Packard) ermittelt.

4.9 Elutriation von BJAB Zellen

Mit Hilfe der zentrifugalen Gegenfluss-Elutriation können proliferierende Zellen entsprechend der Zellzyklusphase, in der sie sich gerade befinden, aufgetrennt werden. Dazu wurden 3 x 10^8 untransfizierte BJAB und BJAB C-FADD exprimierende Zellen abzentrifugiert, 1x mit PBS gewaschen und in 10 ml PBS/1% FCS/1 mM EDTA aufgenommen. Die Zellen wurden durch dreimaliges Durchziehen durch eine 18-gauge Nadel in Einzelzell-Suspension gebracht. Die Zellen wurden anschließend bei RT mit 1800 rpm und einem anfänglichen PBS Gegenstrom von 13 ml/min in die Elutriationskammer geladen. Die Zellen equilibrierten so lange, bis 150 ml PBS gesammelt worden waren. Die erste Fraktion (Volumen 150 ml) wurde durch Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit von 13 auf 18 ml/min gesammelt. Alle weiteren 150 ml Fraktionen wurden durch kontinuierliches Erhöhen des PBS Flusses um 3 ml/min geerntet, bis schließlich 56 ml/min erreicht worden waren (Fraktion 13). Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min pelletiert. 5 x 10^6 Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl Nicolettipuffer lysiert, die DNA dadurch mit Propidiumiodid gefärbt und konnte somit am nächsten Tag auf den DNA-Gehalt untersucht werden. Der Rest der Zellen wurde sofort mit 5x RSB versetzt, in 95°C für 3 min inkubiert und danach mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.10 Messung apoptotischer Zellen / Zellzyklus-Analyse nach Nicoletti

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

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

4.11 Zellzyklusarrest

BJAB Zellen wurden mit 4 mM Hydroxyharnstoff (Sigma, St. Louis, MO) oder 100 ng/ml Nocodazol (Sigma) für 20 h über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und danach mit Hilfe von Durchflusscytometrie (siehe auch Zellzyklusanalyse) und verschiedenen proteinchemischen Analysemethoden untersucht.

III. Ergebnisse

FADD bindet an den durch physiologischen Liganden oder durch agonistischen Antikörper oligomerisierten Rezeptor und dient als Adaptor für die Cysteinylprotease Caspase-8. Dies führt zur Aktivierung von Effektorcaspasen und letztlich zur Spaltung von Strukturproteinen und anderen Todessubstraten. Am Ende dieses Prozesses steht die Disintegration der Zelle in apoptotische Körperchen, die von Makrophagen und anderen Zellen phagocytiert werden. FADD spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und beim Wiedereintritt von ruhenden T Zellen in den Zellzyklus. Untersuchungen haben gezeigt, dass FADD an Serinresten phosphoryliert wird (Kischkel et al., 1995; Zhang und Winoto, 1996). Die Bedeutung der Phosphorylierung für die Apoptose-Signaltransduktion und Zellzyklusregulation ist jedoch unbekannt.

III-1.

FADD wird von einer ca. 70 kDa großen Zellzyklus-regulierten Kinase in G2/M an Serin 194 phosphoryliert

III-1.1 Bei CAP1 und CAP2 handelt es sich um unterschiedlich phosphorylierte FADD Formen

Kischkel et al. konnten zeigen, daß CD95 induzierte Apoptose zur Rekrutierung einer Reihe von Signalmolekülen (CAP1-6) an den Rezeptor führt, welche zusammen den DISC bilden (Kischkel et al., 1995 und Medema et al., 1997a). Diese Signalmoleküle können spezifisch mit dem aktivierten Rezeptor koimmunpräzipitiert und in einem zweidimensionalen Gel sichtbar gemacht werden (Abb. 6A, linke Seite). CAP1 und CAP2 konnten so mit Hilfe einer Western Blot Analyse als FADD identifiziert werden, wobei sich herausstellte, daß es sich bei CAP2 um das an einem Serinrest phosphorylierte CAP1 handelt. Dies wurde durch Immunpräzipitation mit einem anti-FADD Antikörper aus *in vivo* markierten BJAB Zellen bestätigt (Abb. 6B, linke Seite). Die spezifische Phosphorylierung wurde weiter durch Behandlung von Immunpräzipitaten mit einer Phosphatase bestätigt. Die Inkubation resultierte in einer Konversion von CAP2 zu CAP1 in einer zweidimensionalen Western Blot Analyse (Daten nicht gezeigt).

C-FADD ist eine Deletionsmutante von FADD, der die ersten 79 Aminosäuren fehlen. Da sich die DED von FADD in dieser Domäne befindet, ist C-FADD nicht mehr in der Lage, Caspase-8 in den DISC zu rekrutieren. Es kompetitiert mit endogenem FADD um die Bindungsstelle am CD95 Rezeptor und verhindert so

die Prozessierung von Caspase-8. Es war schon zuvor gezeigt worden, daß C-FADD transfizierte Zellen vor CD95 vermittelte Apoptose geschützt sind (Chinnaiyan et al., 1996b). Um zu testen, ob auch C-FADD spezifisch phosphoryliert wird, wurden stabil C-FADD transfizierte BJAB Zellen metabolisch mit [^{35}S]Methionin/Cystein markiert und der DISC immunpräzipitiert. Wie zuvor bei FADD konnten auch bei C-FADD hauptsächlich zwei Proteinpunkte in einer zweidimensionalen Analyse gefunden werden (Abb. 6A, ΔCAP1/2). Bei den weniger prominenten Proteinpunkten handelt es sich wahrscheinlich um unspezifischen Hintergrund, der auf die Überexpression zurückzuführen ist. Das Ergebnis deutete darauf hin, daß C-FADD genau wie Wildtyp-FADD phosphoryliert wird. Um dies zu bestätigen, wurden Vektor-transfizierte BJAB Zellen und BJAB C-FADD Transfektanten metabolisch mit [^{32}P]Orthophosphat markiert, das in phosphorylierte Proteine eingebaut wird und so deren Detektion nach Autoradiographie ermöglicht. Das Lysat dieser *in vivo* markierten Zellen wurde mit einem anti-FADD Antikörper immunpräzipitiert und durch Autoradiographie analysiert (Abb. 6B). In beiden Fällen konnte nur CAP2 bzw. ΔCAP2 detektiert werden, wodurch ΔCAP2 als phosphoryliertes C-FADD identifiziert werden konnte. DISC Analysen aus diesen Zellen zeigten ebenfalls, daß CAP2 und ΔCAP2 ^{32}P-markiert waren (Daten nicht gezeigt), was den Schluß zuläßt, daß Wildtyp und C-FADD in der gleichen Art und Weise phosphoryliert werden.

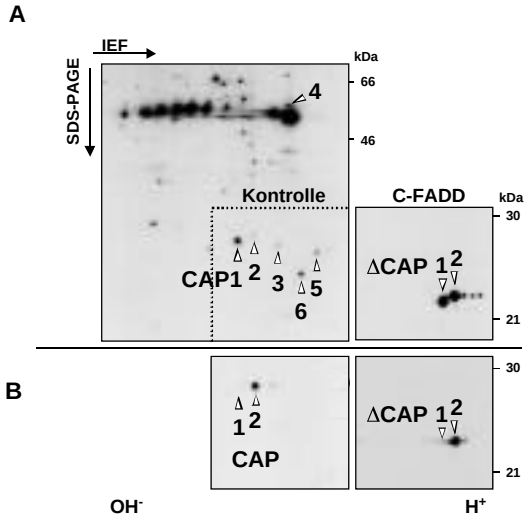


Abbildung 6: CAP1 und CAP2 repräsentieren unterschiedlich am C-Terminus phosphorylierte FADD-Formen. (A) Mit Kontrollvektor (linke Abbildung) oder einem C-FADD Expressionsplasmid (rechte Abbildung) stabil transfizierte BJAB Zellen wurden mit [^{35}S]Methionin/Cystein für 16 h markiert und mit 2 µg/ml anti-APO-1 Antikörper für 10 min stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und der CD95 DISC mittels Protein A-Sepharose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mit 2D-IEF-SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Laufpositionen der FADD-Formen CAP1 und CAP2, der Caspase-8-Formen CAP3-6, sowohl der zwei FADD-Deletionsmutanten (ΔCAP1 und ΔCAP2), denen die ersten 79 Aminosäuren fehlen, sind durch offene Pfeilspitzen angezeigt. Die gestrichelte Linie in der linken Abbildung markiert den Gelbereich, der sowohl auf der rechten Abbildung als auch in Abbildung B gezeigt ist. **(B)** Die in (A) beschriebenen Zellen wurden mit [^{32}P]Orthophosphat über Nacht markiert und FADD mit Hilfe eines an Protein A-Sepharose gekoppelten anti-FADD Antikörpers immunpräzipitiert und wie in Abbildung A analysiert.

III-1.2 Charakterisierung eines Phosphorylierungsstellen-spezifischen anti-FADD Antikörpers

Die Ergebnisse der *in vivo* Phosphorylierung deuteten darauf hin, daß FADD von einer Kinase am C-Terminus phosphoryliert wird. Allerdings wird nur ein Teil der Gesamtmenge von FADD so posttranslational modifiziert. CAP1 und ΔCAP1 konnten ebenso detektiert werden. Um gegebenenfalls die Domäne einzugrenzen, an der das FADD Molekül phosphoryliert wird, wurden die GST-Fusionsproteine FADD Wildtyp (WT), N-Terminus (N-FADD, N) und C-Terminus (C-FADD, C) hergestellt. Inkubation von zellulären Lysaten mit diesen Fusionsproteinen führte zur Assoziation einer Kinase, die GST-FADD und GST-C-FADD phosphorylierte (Abb. 7B, Bahnen 4 und 5). N-FADD wurde in diesem Versuchsansatz nicht phosphoryliert (Bahn 6). Diese Daten zeigten, daß die C-terminale Hälfte von FADD von einer Kinase

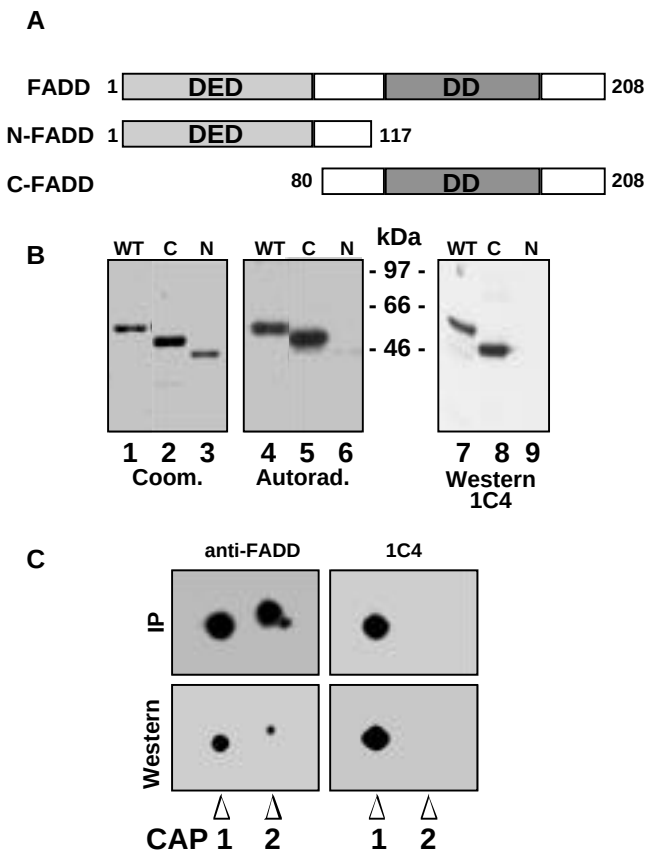


Abbildung 7: Charakterisierung des Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörpers 1C4. (**A**) Schematische Darstellung der in (B) verwendeten GST-FADD-Fusionsproteine. (**B**) 10 µg der angegebenen GST-Konstrukte wurden mit dem Lysat von 10^7 BJAB Zellen inkubiert und danach ein *in vitro* Kinase Test durchgeführt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassiefärbung (Bahnen 1-3) oder Autoradiographie (Bahnen 4-6) analysiert. 50 ng der angezeigten GST-Fusionsproteine wurden mit dem 1C4 Antikörper durch Western Blot analysiert (Bahnen 7-9). (**C**) BJAB Zellen wurden mit [^{35}S]Methionin/Cystein markiert und FADD entweder mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper (oben links) oder dem anti-FADD Antikörper 1C4 immunpräzipitiert (oben rechts). Die Analyse erfolgte mittels 2D-IEF-SDS-PAGE und Autoradiographie. Zusätzlich wurden zelluläre Lysate von 10^6 BJAB Zellen zweidimensional aufgetrennt und entweder mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper (unten links) oder dem anti-FADD Antikörper 1C4 (unten rechts) im Western Blot nachgewiesen. Die Pfeilspitzen markieren die Laufpositionen von CAP1 und CAP2.

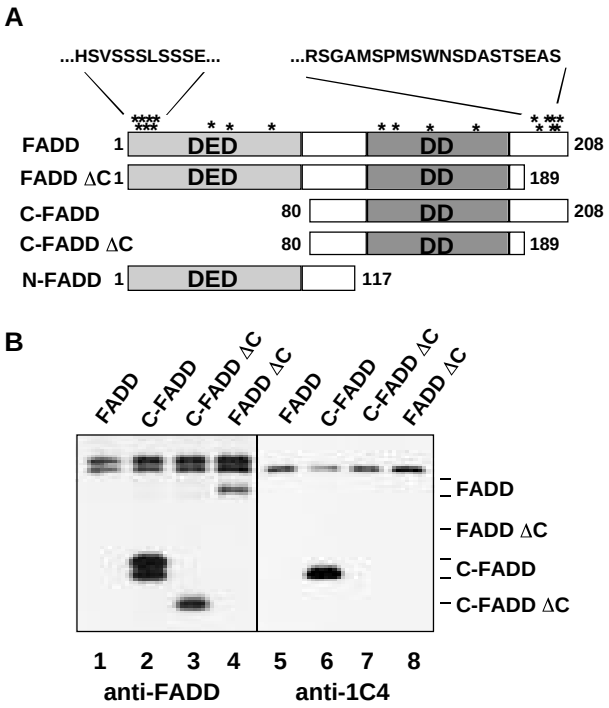


Abbildung 8: FADD wird an einer C-terminalen Serin reichen Region phosphoryliert. (**A**) Schematische Darstellung der erzeugten Deletionsmutanten von FADD. Sterne kennzeichnen die Positionen von Serinen innerhalb der FADD Aminosäuresequenz. Zahlen repräsentieren die Aminosäureposition. DED, Todeseffektordomäne; DD, Todesdomäne. (**B**) 293T Zellen wurden transient mit den in (A) gezeigten FADD-Konstrukten transfiziert und die Lysate in einem anti-FADD Western Blot entweder mit dem kommerziellen Antikörper (anti-FADD) oder dem 1C4 Antikörper analysiert.

phosphoryliert wurde, die mit FADD und C-FADD *in vitro* assoziiert. Um nun die Phosphorylierungsstelle näher zu charakterisieren, wurden eine Reihe von verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen dieses Protein hergestellt (Scaffidi et al., 2000).

Einer dieser Antikörper, 1C4 genannt, erkannte in Western Blot Analysen nur Wildtyp und C-FADD (Abb. 7B, Bahnen 7+8), aber nicht N-FADD (Bahn 9). Das Epitop dieses Antikörpers konnte dadurch auf die C-terminale Hälfte des Proteins eingegrenzt werden. Interessanterweise immunpräzipitierte der 1C4 Antikörper aus dem Lysat von radioaktiv-markierten BJAB Zellen nur CAP1 (Abb. 7C, rechts oben), während der kommerziell erhältliche anti-FADD Kontrollantikörper beide CAP Formen binden konnte (Abb. 7C, links oben). Das gleiche Ergebnis konnte bei einer zweidimensionalen Western Blot Analyse von BJAB Zellen beobachtet werden (Abb. 7C, unten). Dies ließ vermuten, daß der 1C4 Antikörper FADD nur im unphosphorylierten Zustand erkennt. Zumindest konnte die Aussage gemacht werden, daß der 1C4 Antikörper mit einem Epitop reagiert, das sich im C-Terminus von unphosphoryliertem FADD befindet.

III-1.3 Die Phosphorylierung von FADD findet an einem C-terminalen Serin Cluster statt

Kischkel et al. (1995) konnten zeigen, daß FADD an einem Serinrest phosphoryliert wird. FADD enthält aber zwei Serin-reiche Abschnitte, einen am N-Terminus und einen am C-Terminus. Um die Phosphorylierungsstelle näher einzugrenzen, wurden Deletionsmutanten von FADD und C-FADD hergestellt, denen

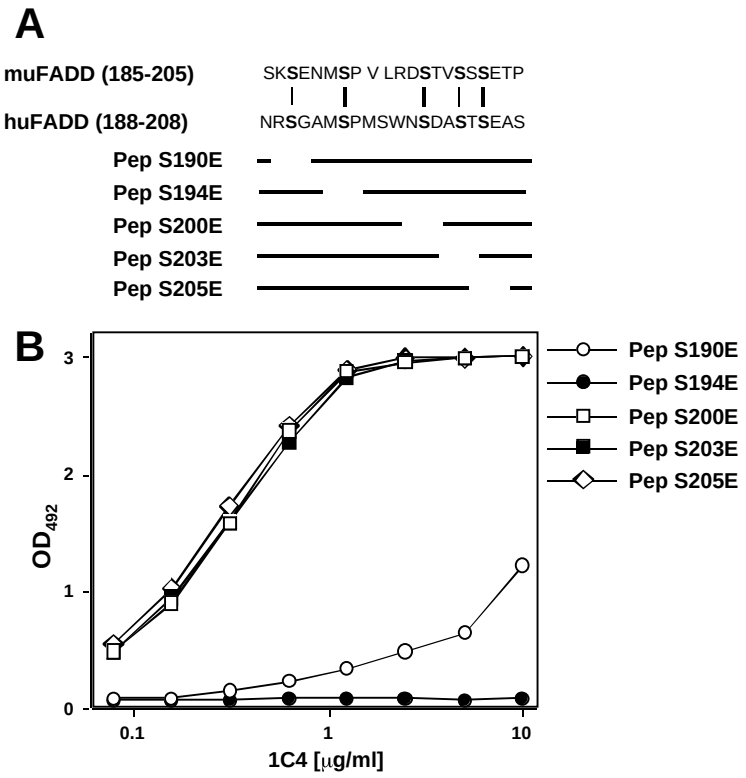


Abbildung 9: Der anti-FADD Antikörper 1C4 erkennt unphosphoryliertes Serin 194. (**A**) Sequenzvergleich der 21 C-terminalen Aminosäuren von humanem und murinem FADD. Es wurden fünf Peptide synthetisiert, in denen die konservierten Serine individuell durch Glutaminsäure ersetzt wurden. (**B**) ELISA Test der in (A) gezeigten Peptide von FADD-Punktmutanten mit dem anti-FADD Antikörper 1C4.

19 C-terminale Aminosäuren fehlen (genannt FADDΔC bzw. C-FADDΔC). Die Konstrukte wurden in 293T Zellen transfiziert und mit einem anti-FADD Western Blot analysiert (Abb. 8B).

Phosphoryliertes und unphosphoryliertes FADD können durch ihr unterschiedliches Laufverhalten im SDS-PAGE in zwei Banden aufgetrennt werden. Dies gilt sowohl für FADD als auch für C-FADD (Abb. 8B, Bahnen 1 und 2). Die C-terminalen Deletionsmutanten erschienen dabei nur als Einzelbanden (Abb. 8B, Bahnen 3 und 4). Dies deutete darauf hin, daß sie *in vivo* nicht mehr phosphoryliert wurden. Um dies zu bestätigen, wurden die gleichen Proben mit dem 1C4 Antikörper analysiert. Wie schon zuvor beobachtet, konnten endogenes FADD und C-FADD nur noch als Einzelbanden detektiert werden, während FADDΔC und C-FADDΔC gar nicht mehr erkannt wurden (Abb. 8B, Bahnen 5-8). Diese Experimente identifizierten den Serin-reichen Abschnitt am C-Terminus von FADD als Phosphorylierungsbereich und den Antikörper 1C4 als Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper.

III-1.4 Identifizierung der Phosphorylierungsstelle in FADD

Beide FADD Formen können im DISC von humanen und murinen Zellen gefunden werden (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997a). Ein Sequenzvergleich von humanem und murinem FADD zeigte, daß von den sieben Serinresten im humanen Protein fünf in der Maus konserviert waren (Abb. 9A). Daher wurden fünf Peptide synthetisiert, in denen jeweils einzelne Serinreste konservativ durch einen Glutaminsäurerest ausgetauscht waren. Ziel war es, sich die Eigenschaft des 1C4 Antikörpers, der nur den unphosphorylierten Serinrest von FADD erkennt, zu Nutze zu machen. Um die Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, wurden die Peptide in

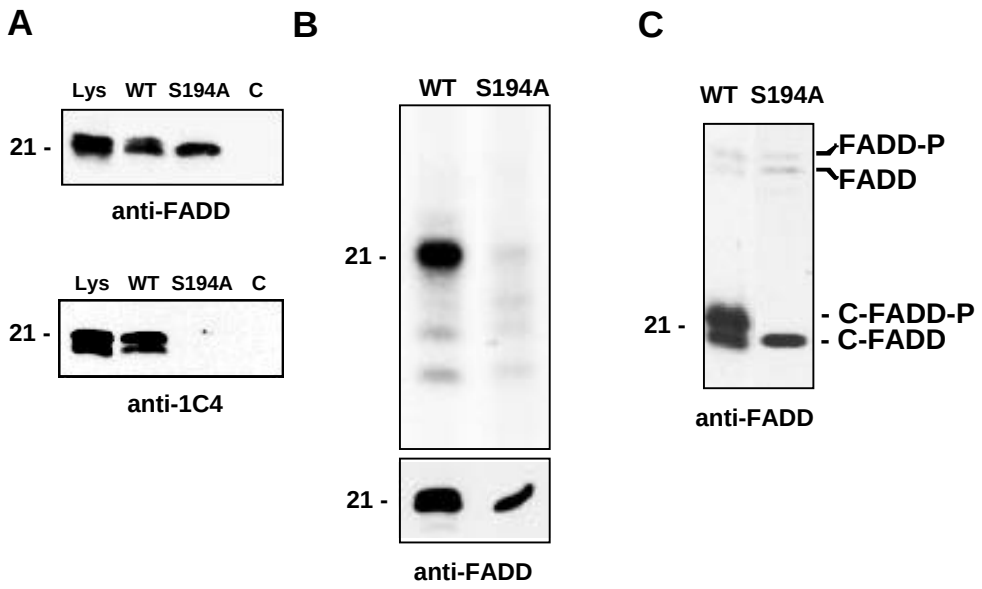


Abbildung 10: FADD wird *in vivo* und *in vitro* an Serin 194 phosphoryliert. (**A**) Western Blot Analyse von Ganzzellysaten aus stabil exprimierenden C-FADD Transfektanten (Lys) und transient exprimierenden 293T Zellen, die entweder mit C-FADD (WT), einer Punktmutante von C-FADD, bei der Serin 194 durch ein Alanin ersetzt wurde (S194A) oder mit einem Kontrollvektor (C) transfiziert worden waren. In der oberen Abbildung (anti-FADD) korrespondieren alle Banden mit wt C-FADD oder C-FADD S194A. Bei der Western Blot Analyse mit dem anti-FADD Antikörper 1C4 handelt es sich bei der unteren Bande um ein Degradationsprodukt. (**B**) *In vitro* Kinase Test. C-FADD (WT) und C-FADD S194A (S194A) wurden aus transient transfizierten 293T Zellen immunpräzipitiert und einem Kinase Test unterzogen. Ein anti-FADD Western Blot mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper zeigt gleiche Mengen an immunpräzipitiertem Protein. (C) Western Blot Analyse mit Ganzzellysaten von 10^6 stabil exprimierenden C-FADD (WT) bzw. C-FADD S194A (S194A) BJAB Zellen.

einem ELISA-Experiment mit dem 1C4 untersucht (Abb. 9B). Drei der Peptide (Pep S200E, Pep S203E und Pep S205E) wurden sehr stark, S190E nur schwach gebunden. S194E dagegen wurde vom 1C4 Antikörper gar nicht erkannt, was darauf hindeutete, daß die Phosphorylierung von FADD, bzw. die Veränderung des Serinrestes in einen Glutaminsäurerest, die Bindung des 1C4 an Serin 194

verhinderte. Um dies zu bestätigen, wurde der Serinrest in C-FADD durch "site-directed" Mutagenese zu Alanin verändert ("S194A"). Transfektion von C-FADD S194A in 293T Zellen und anschließende anti-FADD Western Blot Analysen zeigten, daß diese Punktmutante vom 1C4 Antikörper nicht mehr erkannt werden kann (Abb. 10A). Dies bestätigte das ELISA Ergebnis. Das mutierte C-FADD Molekül diente auch in einem *in vitro* Kinase Test nicht mehr als Substrat (Abb. 10B), was den Schluß zuläßt, daß es sich bei Serin 194 um die einzige Phosphorylierungsstelle im FADD Molekül handelt. Um den endgültigen Beweis zu erbringen, daß das Fehlen einer einzigen Hydroxylgruppe dazu führt, daß FADD *in vivo* nicht mehr phosphoryliert werden kann, wurden BJAB Zellen stabil mit dem C-FADD S194A Konstrukt transfiziert. Western Blot Analysen dieser Transfektanten mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper, der phosphoryliertes und unphosphoryliertes FADD erkennt, zeigten, daß C-FADD S194A die gleiche Laufposition aufweist, wie unphosphoryliertes C-FADD in C-FADD Transfektanten (Abb. 10C). Diese Ergebnisse bestätigen, daß FADD *in vivo* am Serinrest 194 phosphoryliert wird.

III-1.5 FADD wird von einer assoziierten, ca. 70 kDa großen Kinase phosphoryliert

Ein In-Gel Kinase Test hatte gezeigt, daß ein ca. 70 kDa großes Phosphoprotein an den C-Terminus bindet (Scaffidi et al., 2000). Die GST-Fusionsproteine GST-N-FADD, GST-C-FADD, GST-FADD oder GST alleine waren dazu mit dem Lysat von BJAB Zellen inkubiert und in einem SDS-PAGE aufgetrennt

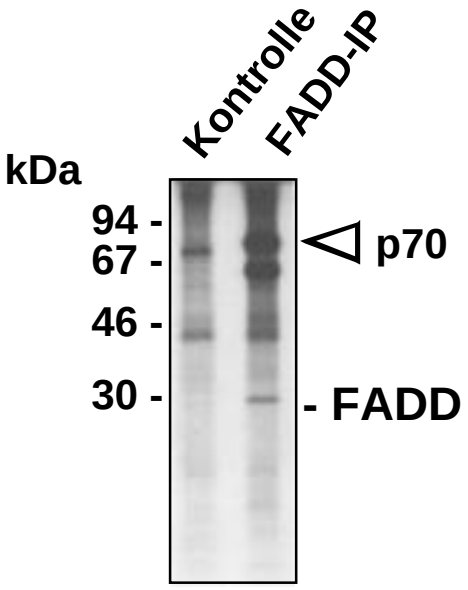


Abbildung 11: Eine 70 kDa Kinase bindet und phosphoryliert FADD. Jurkat Zellen wurden mit [^{32}P]Orthophosphat *in vivo* markiert, lysiert und FADD mit dem kommerziell erhältlichen anti-FADD Antikörper immunpräzipitiert. Die Pfeilspitze markiert ein 70 kDa großes Phosphoprotein, das spezifisch mit FADD immunpräzipitiert werden konnte. Zur Kontrolle wurde Caspase-8 mit einem anti-Caspase-8 Antikörper präzipitiert.

worden, das entweder ohne Substrat oder mit His-FADD kopolymerisiert worden war. Die Proteine wurden im Gel denaturiert und anschließend schrittweise renaturiert. Manche Serin/Threonin Kinasen können auf diese Weise zu aktiven Enzymen renaturieren. Dadurch ist eine grobe Schätzung des Molekulargewichts möglich. Mit Hilfe dieses Tests konnte eine Kinase von ca. 70 kDa nachgewiesen werden, die spezifisch mit Wildtyp FADD und C-FADD, aber nicht mit N-FADD assoziierte. Eine phosphorylierte Bande dieser Größe wurde auch in ^{32}P-markierten BJAB Zellen mit endogenem FADD assoziiert gefunden (Abb. 11). Dabei wurde das Lysat der Zellen entweder mit einem Kontrollantikörper oder einem anti-FADD Antikörper inkubiert und endogenes FADD immunpräzipitiert. Ein mit FADD assoziiertes Phosphoprotein von ca. 70 kDa konnte nach Autoradiographie detektiert werden. Somit war mit zwei unterschiedlichen Methoden die Assozation eines 70 kDa großen Phosphoproteins mit FADD nachgewiesen worden.

III-1.6 Die Phosphorylierung von FADD ist Zellzyklus-reguliert

Zusätzlich zu seiner Rolle als Adaptormolekül von Todesrezeptoren deuten einige Berichte darauf hin, daß FADD an der Regulation der Proliferation von T Zellen beteiligt ist (Zhang et al., 1998; Newton et al., 1998; Zörnig et al., 1998; Walsh et al., 1998). Der Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt. Interessanterweise konnte diese Eigenschaft von FADD in sich kontinuierlich teilenden Tumorzellen nicht gefunden werden (Newton et al., 1998). Diese Daten deuten darauf hin, daß FADD zusätzlich zu seiner Adaptorfunktion bei Apoptose eine wichtige Rolle beim Wiedereintritt von ruhenden T Zellen in den Zellzyklus spielt. Zusätzlich wurde gezeigt, daß für diese Inhibition funktionelles p53 benötigt wird (Zörnig et al., 1998). Diese Daten implizieren, daß FADD an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein könnte.

Aus diesem Grund untersuchten wir, ob die Phosphorylierung von FADD Zellzyklus-spezifisch reguliert ist. Dazu wurden BJAB Kontrolltransfektanten und stabil C-FADD transfizierte Zellen entweder mit Hydroxyharnstoff in G1/S oder mit Nocodazol in G2/M arretiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden behandelt und durch Zellzyklusanalyse im FACScan untersucht. Die Analyse ergab einen Arrest der Zellen in G1/S bzw. G2/M (Abb. 12A, oben). Eine anti-FADD Western Blot Analyse zeigte, daß Zellen in G1/S hauptsächlich unphosphoryliertes FADD bzw. C-FADD enthielten. G2/M arretierte Zellen dagegen wiesen fast nur phosphoryliertes FADD/C-FADD auf (Abb. 12A, unten). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Zellen erzielt, die durch einen Doppelthymidinblock (G1/S) und Taxol (G2/M) im Zellzyklus blockiert worden waren (Daten nicht gezeigt).

Diese Art des Zellzyklusarrest ist allerdings nicht physiologisch. Die Mitose-inhibierenden Reagenzien können in bestimmten Konzentrationen Apoptose auslösen. Daher wurde nach einer Methode gesucht, mit der eine asynchron wachsende

Population in die verschiedenen Zellzyklusphasen aufgeteilt werden kann. Bei einer Elutration, auch Gegenflußzentrifugation genannt, werden Zellen in eine Rotorkammer geladen und zentrifugiert. Ein Gegenstrom (z.B. PBS oder Medium) verhindert dabei das Sedimentieren. Die Zellen ordnen sich entsprechend ihrer Größe (und damit Zellzyklusstatus) an und können durch Erhöhung des Gegenstromes, d.h. bei gleich bleibender Rotordrehzahl, aus der Rotorkammer entfernt und gesammelt werden. BJAB Zellen wurden mit diesem Verfahren aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen durch Propidiumiodidfärbung im Zellzyklus untersucht (Abb. 12B, oben). Lysate dieser Fraktionen wurden durch einen anti-FADD Western Blot analysiert (Abb. 12B, unten). Die G2/M Fraktion (Bahn 5) zeigte eine quantitative Verschiebung zu phosphoryliertem FADD hin. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Phosphorylierung von FADD tatsächlich einer Zellzyklus-Regulation unterliegt.

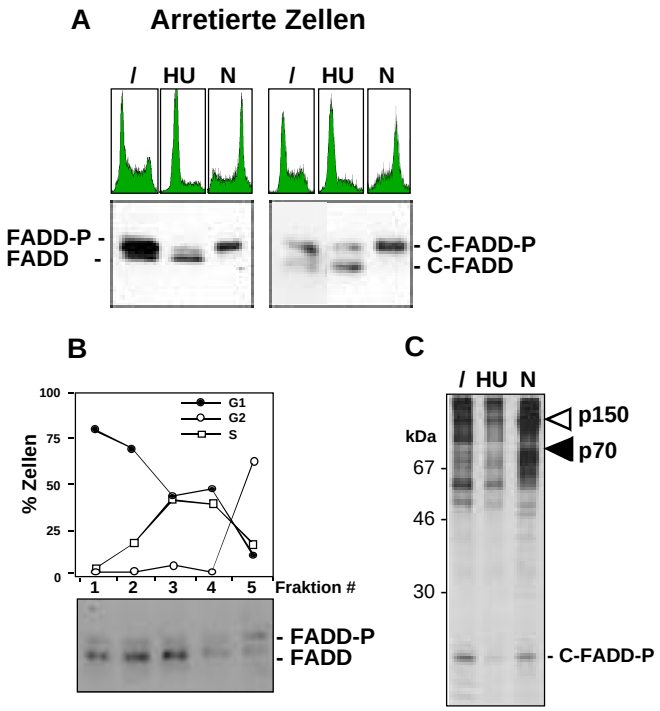


Abbildung 12: Die Phosphorylierung an Serin 194 ist Zellzyklus-reguliert. (**A**) Zellzyklusanalyse von Zellzyklus arretierten Zellen. Kontrolltransfektanten (links, CAP1 und CAP2) oder stabil exprimierende C-FADD BJAB Zellen (rechts, ΔCAP1 und ΔCAP2) blieben entweder unbehandelt (/), oder wurden mit Hydroxyharnstoff (HU) und Nocodazol (N) für 24 h behandelt. Die Ganzzellysate wurden anschließend einer Western Blot Analyse mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper unterzogen. (**B**) Elutration von untransfizierten BJAB Zellen. Fraktionen wurden gesammelt und der Zellzyklus-Zustand jeder Fraktion mittels FACS-Analyse nach der Nicoletti-Methode bestimmt (% Zellen in G1, S oder G2). Die Abbildung darunter zeigt die korrespondierende Western Blot Analyse mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper. (**C**) *In vitro* Kinase Test mit arretierten Zellysaten. 293T Zellen wurden mit C-FADD transient transfiziert, lysiert und C-FADD wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert. Anschließend wurde das Präzipitat in Detergenz-solubilisierten Extrakten von unbehandelten (/), Hydroxyharnstoff (HU) oder Nocodazol (N) behandelten BJAB Zellen inkubiert, gewaschen und einem Kinase Test unterzogen. Neben einem assoziierten Phosphoprotein von ca. 70 kDa (Pfeilspitze) wurde zusätzlich noch eine phosphorylierte Proteinbande bei ca. 150 kDa detektiert (offene Pfeilspitze).

Die bisherigen Experimente hatten gezeigt, daß FADD in G2/M phosphoryliert wird. Um zu testen, ob die Kinase in dieser Zellzyklus-Phase aktiviert vorliegt, wurde FADD aus transient transfizierten 293T Zellen immunpräzipitiert und mit dem Lysat von arretierten Zellen inkubiert (Abb. 12C). Die Präzipitate wurden anschließend einem *in vitro* Kinase Test unterzogen. Neben phosphoryliertem FADD fiel wieder ein ca. 70 kDa großes assoziiertes Phosphoprotein auf, welches in Hydroxyharnstoff arretierten Zellen fast nicht zu detektieren war. Damit war gezeigt worden, daß die Aktivität der FADD Kinase vom Zellzyklus geregelt wird.

Nachdem die Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von FADD etabliert worden war, sollte die Kinase selbst näher untersucht werden. Um die Frage zu beantworten, ob es sich dabei um ein Mitglied der klassischen cdc/cdk Familie handelt, wurden in Zusammenarbeit mit Ida Blomberg und Ingrid Hoffmann (DKFZ-Heidelberg) die rekombinanten Kinasenkomplexe cdc2/Cyclin A, cdk2/Cyclin A, cdc2/Cyclin B1 und cdk2/Cyclin E immunpräzipitiert und mit GST-FADD in *in vitro* Kinase Tests analysiert. Keine dieser Kinasen, die in G2/M aktiv sind, war in der Lage, das Substrat zu phosphorylieren (Daten nicht gezeigt). Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die putative Kinase, die in In-Gel Kinase- , *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierungstests gefunden worden war, eine Größe von 70 kDa aufwies. Alle oben genannten Zellzykluskinasen haben eine Größe von ca. 33-35 kDa. Auch die Behandlung von Zellen mit Wortmannin hatte keinen Effekt auf die Phosphorylierung von FADD, wodurch Phosphatidylinositol 3’-Kinase als Kandidat ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Protein Kinase C (PKC) konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da PMA keine Veränderungen in der Phosphorylierung bewirkte (Daten nicht gezeigt).

III-1.7 Der Phosphorylierungsstatus von FADD kann beeinflusst werden

Um zu testen, ob auch andere Reagenzien den Phosphorylierungsstatus von FADD verändern können, wurden Zellen mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Dabei zeigte sich, daß FADD und C-FADD in Zellen, die mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt worden waren, höher phosphoryliert vorlagen (Abb. 13A). Dies könnte damit erklärt werden, daß die FADD Kinase vor der proteolytischen Degradation durch das Proteasom geschützt war. Behandlung von BJAB Zellen mit dem Serin/Threonin spezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin führte zu einer Inhibition der FADD Kinase. Schon geringe Mengen bewirkten, daß FADD in den Zellen hauptsächlich unphosphoryliert vorlag (Abb. 13B). Diese Ergebnisse eröffnen Möglichkeiten, mit denen die Phosphorylierung von FADD gesteuert und damit deren Funktion getestet werden kann.

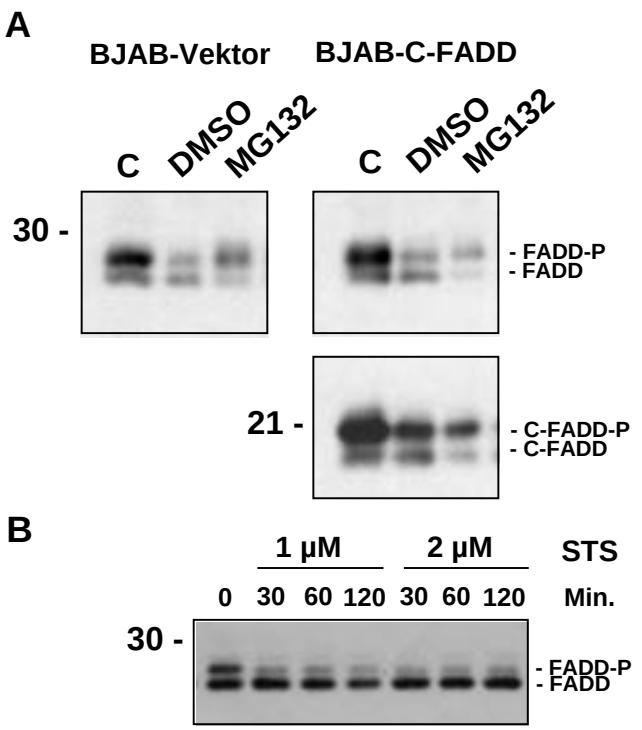


Abbildung 13: Der Phosphorylierungsstatus von FADD kann beeinflusst werden. (**A**) Kontrollzellen und C-FADD exprimierende BJAB Transfektanten wurden für 24 h mit DMSO (Lösungsmittel-Kontrolle) oder mit 5 µM des Proteasomeninhibitors MG132 inkubiert, die Zellen lysiert und in einem anti-FADD Western Blot analysiert. Die Laufpositionen von FADD und C-FADD sind angegeben. (**B**) BJAB Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 1 bzw. 2 µM des panspezifischen Kinaseninhibitors Staurosporin behandelt, lysiert und in einem anti-FADD Western Blot analysiert.

III-1.8 Die Phosphorylierung von FADD hat keinen Einfluß auf CD95 vermittelte Apoptose

FADD ist das Adaptorprotein, das Caspase-8 an den aktivierten Rezeptor rekrutiert und somit essentiell zur Induktion von Apoptose benötigt wird. Es war schon zuvor gezeigt worden, daß C-FADD durch kompetitive Bindung an den aktivierten CD95 Rezeptor endogenes FADD aus dem DISC verdrängt und dadurch Zellen vor CD95 vermittelter Apoptose schützt (Chinnaiyan et al., 1996b). Experimente, in denen getestet worden war, ob die Phosphorylierung von FADD eine Rolle bei der Signaltransduktion dieses Proteins spielt, hatten gezeigt, daß die stabile Expression sowohl von C-FADD als auch von C-FADDΔC (Aminosäuren 80-189) vor CD95 vermittelter Apoptose schützt (Scaffidi et al., 2000). Beide C-FADD Transfektanten waren in der Lage, die Zellen in ungefähr gleichem Maße vor Apoptose zu schützen. Es wurden auch Klone mit unterschiedlich hoher Expression getestet. Die Sensitivität der Transfektanten stand dabei immer in Korrelation mit der Menge an überexprimiertem C-FADD. Das ließ den Schluß zu, daß die Phosphorylierungsstelle und die C-terminale Domäne von FADD keine Rolle bei der Inhibition von CD95-vermittelter Apoptose spielen.

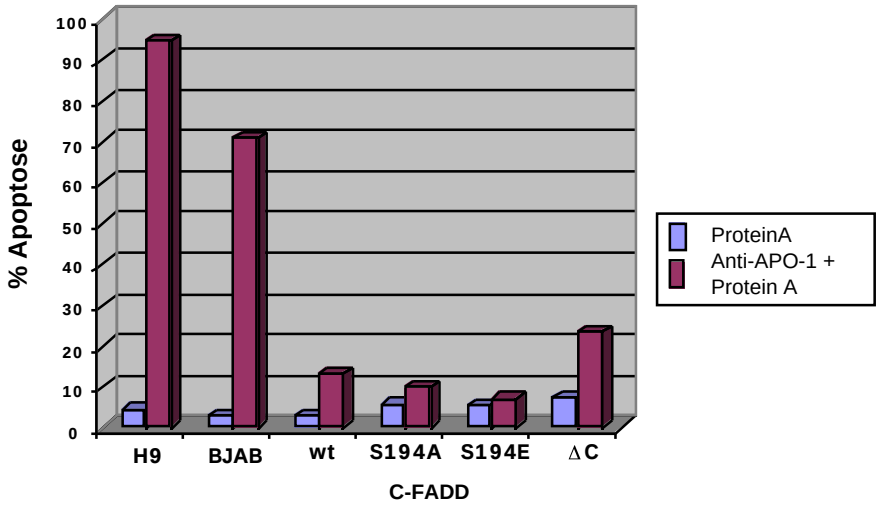


Abbildung 14: Einfluss von C-FADD Deletions- und Punktmutanten auf CD95 vermittelte Apoptose. H9 Kontrollzellen und BJAB Zellen, die stabil C-FADD wt, C-FADD S194A, C-FADD S194E oder C-FADDΔC exprimieren, wurden mit 1 ng/ml Protein A allein oder zusammen mit 1 µg/ml anti-APO-1 Antikörper für 16 h inkubiert. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde mit der Nicoletti-Methode ermittelt

FADD defiziente Jurkat Zellen, die mit FADD bzw. FADDΔC rekonstituiert worden waren, zeigten ebenfalls eine vergleichbare Sensitivität gegenüber CD95 vermittelter Apoptose (Scaffidi et al., 2000).

In diesen Versuchen wurden hauptsächlich FADD bzw. C-FADD Konstrukte verwendet, bei denen der gesamte C-Terminus, der die Phosphorylierungsstelle enthält, fehlte. Um zu testen, ob auch Serin 194 Punktmutanten von C-FADD vor CD95 vermittelter Apoptose schützen, wurden BJAB Zellen mit Wildtyp C-FADD, C-FADD Serin → Alanin (S194A), C-FADD Serin → Glutaminsäure (S194E) oder C-FADDΔC stabil transfiziert und Klone mit vergleichbarer Expression in einem Sensitivitätstest überprüft (Abb. 14). Während beide Kontrollzellen (H9 und BJAB mit leerem Vektor transfiziert) DNA Fragmentierung zeigten, waren alle Punktmutanten und Deletionsmutanten durch C-FADD geschützt. Insgesamt wurden jeweils zwei verschiedene Klone der Punktmutanten mit unterschiedlicher Expression getestet (Daten nicht gezeigt). Die Resistenz gegenüber CD95 vermittelter Apoptose korrelierte dabei jeweils mit dem Expressionsniveau von C-FADD. Eine weitere Punktmutante von C-FADD, C-FADD mt, war zuvor beschrieben worden (Chinnaiyan et al., 1995). Der Aminosäurenaustausch V121N in der Todesdomäne

bewirkt, daß dieses Protein nicht mehr an den CD95 Rezeptor binden kann. Auch nach wiederholtem Male war es allerdings nicht möglich, stabil transfizierte Klone herzustellen. Die jeweils getesteten Klone exprimierten maximal C-FADD mt Mengen, die mit endogenem FADD zu vergleichen waren. Die Proteinexpression war damit zu gering, um vor CD95 vermittelter Apoptose zu schützen. Insgesamt konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, daß die Phosphorylierungsstelle keinen Einfluß auf Induktion oder Inhibition von CD95 vermittelter Apoptose hat.

III-2.

Die Suche nach der FADD Kinase

III-2.1 HIP Kinasen sind nicht in der Lage, FADD zu phosphorylieren

Tschopp und Kollegen hatten berichtet, daß überexprimierte FIST/HIPK3 in transfizierten Zellen FADD Phosphorylierung bewirkt, wodurch die Interaktion von FIST/HIPK3 mit CD95 und FADD ermöglicht wird (Rochat-Steiner et al., 2000). Um dies zu testen, wurden in Zusammenarbeit mit Yongsok Kim (NIH, USA) verschiedene Experimente durchgeführt. Es sind drei Mitglieder dieser HIP Kinasen beschrieben worden: HIP1, HIP2 und HIP3 (Kim et al., 1998; Rochat-Steiner et al., 2000). Transfektion dieser mit dem *myc*-Peptid markierten Kinasen in 293T Zellen führte zur Expression des Proteins, wie mit einem anti-myc Western Blot gezeigt werden konnte (Abb. 15A). Dabei zeigte sich in unseren Händen keine Veränderung der FADD Phosphorylierung (anti-FADD). Auch *in vitro* Kinase Tests mit immunpräzipitierten oder rekombinanten HIPK1-3 führte nicht zur Phosphorylierung des Substrats GST-FADD (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, ob HIP Kinasen nach Transfektion in 293T Zellen mit endogenem FADD interagieren, wurden diese mit dem anti-myc Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 15B). Obwohl alle drei Kinasen exprimiert waren, konnte im anti-FADD Western Blot nur die leichte Kette des Antikörpers nachgewiesen werden. Es muß angemerkt werden, daß auch in diesem Experiment keine Zunahme der FADD Phosphorylierung zu beobachten war. HIP Kinasen wurden, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, als FADD Kinasen und Interaktionspartner ausgeschlossen.

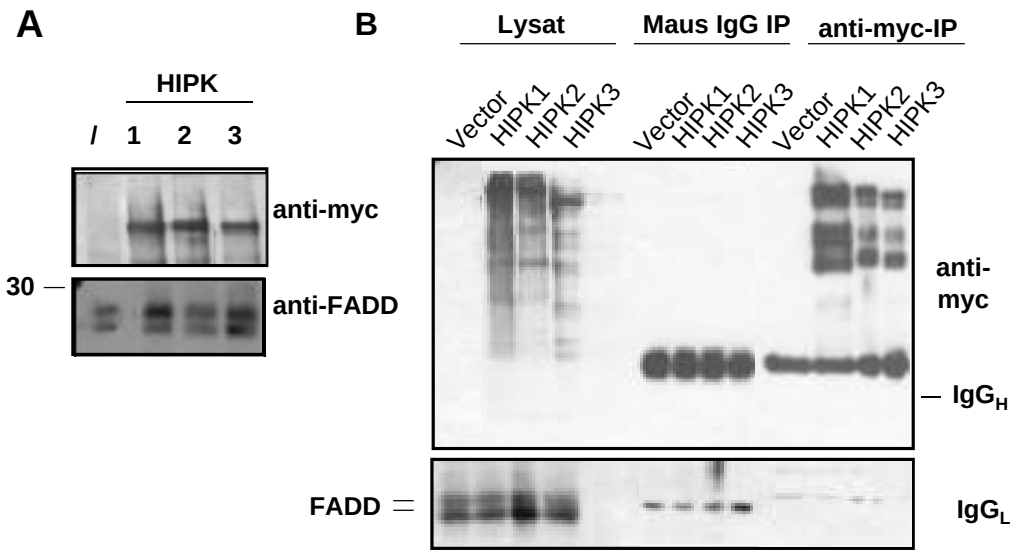


Abbildung 15: HIP-Kinasen sind nicht in der Lage, FADD zu phosphorylieren. (**A**) 293T Zellen wurden entweder mit 3 µg Kontrollplasmid (/) oder mit dem *myc*-Peptid markierte HIPK1, 2 und 3 transfiziert, lysiert und der Phosphorylierungszustand von FADD mittels Western Blot überprüft. Expression der HIPK Kinasen wurde mit dem gegen das Markerpeptid gerichteten anti-myc Antikörper analysiert. (**B**) 293T Zellen wurden mit jeweils 3 µg der HIPK1, 2 und 3 transient transfiziert, die Zellen 24 h später lysiert und die HIPK Kinasen mit einem an Protein G-Sepharose gekoppelten anti-myc Antikörper immunpräzipitiert. Als Isotypkontrolle diente Maus IgG1.

III-2.2 Jun NH_2-terminale Kinase (JNK) Aktivierung hat keinen Einfluß auf FADD Phosphorylierung

Anisomycin führt zur Aktivierung von JNK und im Anschluß dadurch zur Phosphorylierung verschiedener Substrate dieser Kinase, darunter p70/p85^{S6k}. Um zu testen, ob FADD nach Aktivierung dieser Streßkinase höher phosphoryliert vorliegt, wurden Zellen mit Anisomycin inkubiert und im Western Blot analysiert (Abb. 16). Während die Phosphorylierung von p85^{S6k} deutlich nachweisbar war, konnte bei FADD keine Veränderung festgestellt werden. Damit konnte eine Beteiligung von JNK bei der Phosphorylierung von FADD ausgeschlossen werden.

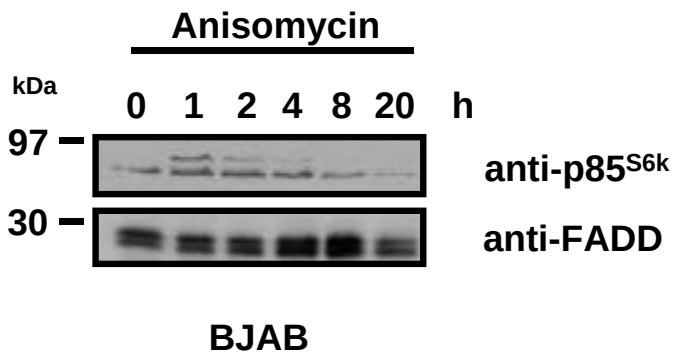


Abbildung 16: Aktivierung von JNK-Kinasen führt nicht zur Zunahme der Phosphorylierung von FADD. BJAB Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Anisomycin inkubiert, anschliessend lysiert und die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Aktivierung von JNK wurde indirekt durch Phosphorylierung von p70/p85^{S6k} mit einem anti-p70/p85^{S6k} Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Der anti-FADD Western Blot zeigte keine Veränderung in der FADD-Phosphorylierung.

III-2.3 Inhibierung von p70^{S6k} hat keinen Effekt auf die FADD Phosphorylierung

p70^{S6k} besitzt ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Damit hat dieses Phosphoprotein das Molekulargewicht der assoziierten Kinase und wurde als möglicher Kandidat für die FADD Kinase getestet. p70^{S6k} kann mit der Chemikalie

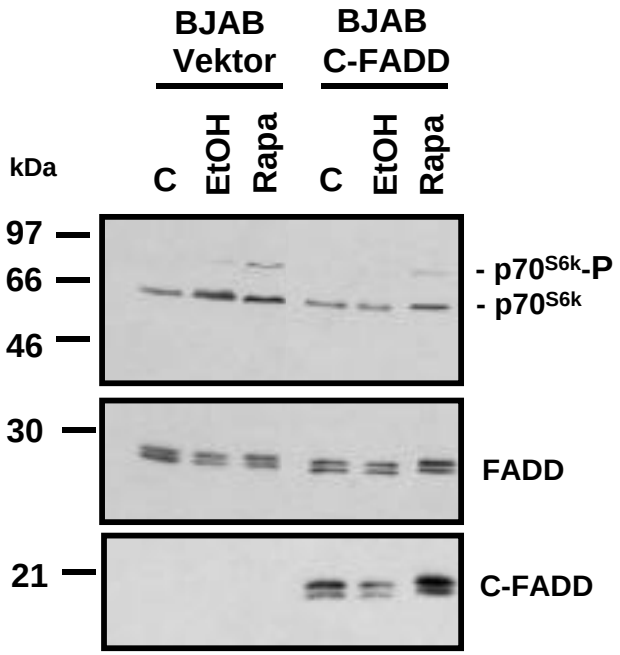


Abbildung 17: Inhibierung von p70/p85^{S6k} hat keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von FADD. Kontrolltransfektanten und C-FADD exprimierende BJAB Zellen blieben entweder unbehandelt (C) oder wurden mit Lösungsmittelkontrolle (EtOH) oder 100 nM Rapamycin (Rapa) für 24 h inkubiert, anschließend lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Laufpositionen von FADD, C-FADD und p70/p85^{S6k} sind angezeigt.

Rapamycin inaktiviert werden. Die phosphorylierte Form der $p70^{S6k}$ ($p70^{S6k}$ P) kann durch Gelelektrophorese von der unphosphorylierten separiert und anschließend im Western Blot nachgewiesen werden. Behandlung von BJAB Kontrolltransfektanten und stabil C-FADD exprimierenden BJAB Zellen mit Rapamycin führte demnach nicht zu einer Abnahme der Phosphorylierung (Abb. 17), da FADD und C-FADD im Vergleich mit der Kontrolle (C) keine Veränderung zeigten.

Da zwei Isoformen von $p70^{S6k}$ bekannt sind, wurden Expressionsplasmide für beide Konstrukte in 293T Zellen überexprimiert und die Lysate analysiert. Dabei konnte keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von FADD beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch Koimmunpräzipitationen aus wie oben transfizierten Zellen mit einem anti-FADD Antikörper oder mit GST-FADD Fusionsproteinen und anschließendem *in vitro* Kinase Test führte nicht zur Phosphorylierung von FADD. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß $p70^{S6k}$ nicht an der Phosphorylierung von FADD beteiligt ist.

III-2.4 FADD wird in $RIP^{-/-}$ Jurkat Zellen phosphoryliert

Bei RIP handelt es sich um eine 74 kDa Kinase, die an den cytoplasmatischen Teil von CD95 assoziiert. Die Kinasedomäne befindet sich am N-Terminus, der C-Terminus besteht aus einer Todesdomäne, wie sie auch im TNF-R1 und CD95 gefunden werden kann. Überexpression von RIP führt zu den für Apoptose typischen morphologischen Veränderungen. Da sowohl FADD als auch RIP an die cytoplasmatische Domäne des CD95 Rezeptor binden, wurde die Kinase auf die Fähigkeit überprüft, GST-C-FADD zu phosphorylieren. Dazu wurde das Lysat von J16, parentalen Jurkat Kontrollzellen und RIP defizienten Jurkatzellen entweder mit GST alleine, mit GST-C-FADD oder der Punktmutante S194A inkubiert und ein *in vitro* Kinase Test durchgeführt (Abb. 18). Das Ergebnis ließ klar erkennen, daß es sich bei der Kinase nicht um RIP handeln kann, da Wildtyp C-FADD die Kinase aus allen Lysaten immunpräzipitieren konnte.

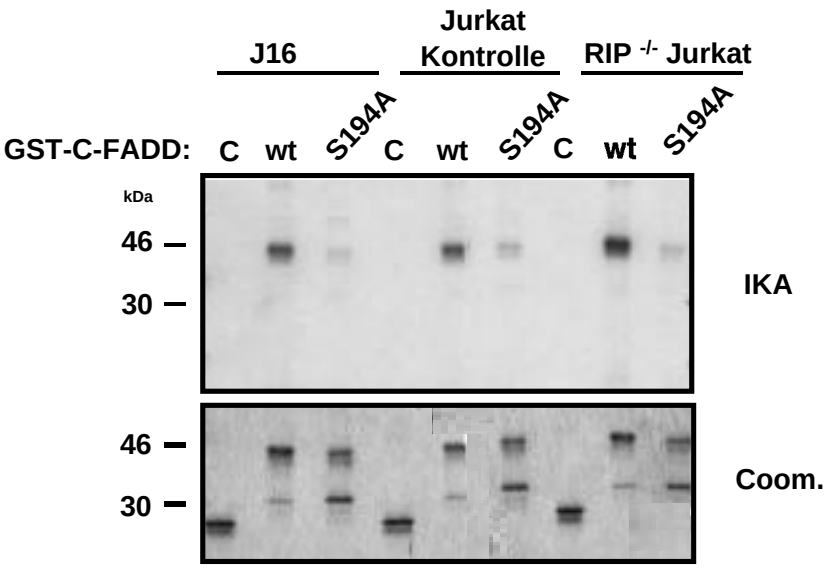


Abbildung 18: FADD wird in RIP$^{-/-}$ Zellen phosphoryliert. Das Lysat von 10^6 J16, parentalen Jurkat oder RIP$^{-/-}$ Zellen wurde jeweils mit GST alleine (C), GST-C-FADD (wt) oder GST-C-FADD S194A (S194A) für 2 h inkubiert, das Präzipitat gewaschen und ein *in vitro* Kinase Test durchgeführt. Die Produkte wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Eine Coomassiefärbung des Gels diente als Ladekontrolle für die GST-Fusionsproteine. IKA, *in vitro* Kinase Test.

III-2.5 Depletion und Überexpression von DRAK2 hat keinen Einfluß auf die FADD Phosphorylierung

Bei DRAK1 und DRAK2 handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen, die ausschließlich im Zellkern lokalisieren. Überexpression dieser Kinasen in NIH/3T3 Zellen führt zu morphologischen Veränderungen, die typisch für Apoptose sind. Dr. Steve Hedricks (Berkeley, USA) und Mitarbeiter haben kürzlich berichtet, daß DRAK2 mit FADD in "Yeast-two-Hybrid"-Studien interagiert (persönliche Mitteilung). Um zu testen, ob DRAK2 in der Lage ist, FADD zu phosphorylieren wurde das Lysat von RIP$^{-/-}$ Jurkat Zellen mit Hilfe eines anti-DRAK2 Antikörpers depletiert und anschließend mit GST-FADD Fusionsproteinen inkubiert (Abb. 19). Die anti-DRAK2 Western Blot Analyse zeigte eine vollständige Depletion nach drei Immunpräzipitationen (Abb. 19A). Der *in vitro* Kinase Test zeigte anschließend, daß GST-C-FADD auch nach Inkubation in von DRAK2 depletiertem Lysat phosphoryliert werden kann (Abb. 19B). Um dies zu überprüfen, wurde DRAK2 mit Hilfe von RT-PCR kloniert und in 293T Zellen überexprimiert. Auch dabei ließ sich weder eine Assoziation mit FADD noch eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus feststellen (Daten nicht gezeigt). Auch DRAK2 konnte somit als FADD Kinase ausgeschlossen werden.

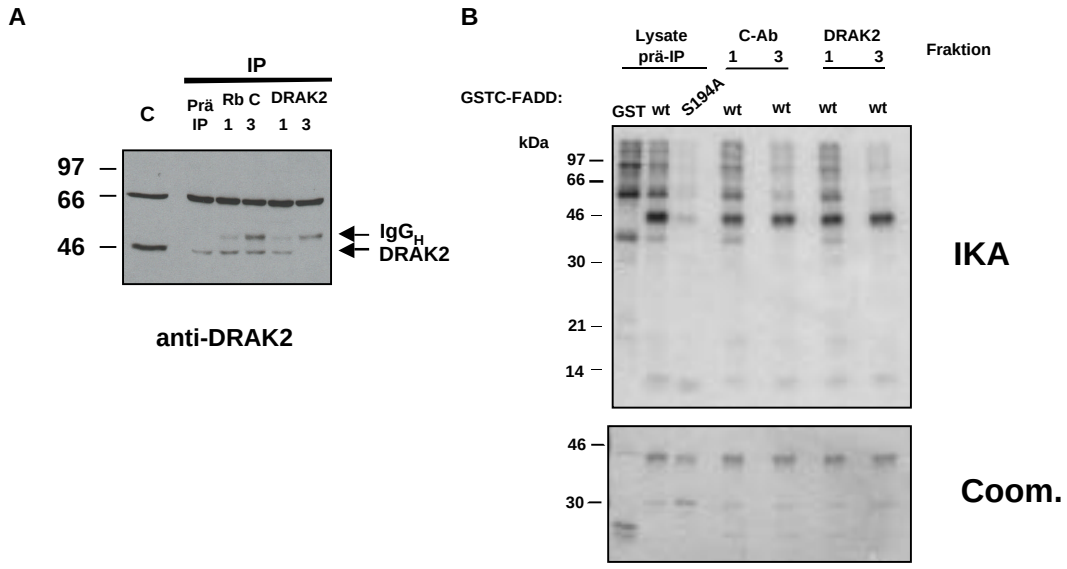


Abbildung 19: C-FADD wird nach Depletion der Kinase DRAK2 *in vitro* phosphoryliert. (**A**) 3 x 10^7 RIP$^{-/-}$ Zellen wurden lysiert und entweder mit einem an Protein A-Sepharose gebundenen Kaninchen-Kontrollantikörper (Rb C) oder dem anti-DRAK2 Antikörper (DRAK2) für 12 h (1) und weitere 24 h (3) inkubiert und ein Aliquot des Lysates mittels SDS-PAGE und einem anti-DRAK2 Western Blot analysiert. Eine unbehandelte Lysatkontrolle (C) aus 10^6 RIP$^{-/-}$ Zellen zeigt die Laufposition von DRAK2. Ein Lysat, das unbehandelt blieb (Prä IP), verdeutlicht, dass DRAK2 nach 36 h komplett aus dem Lysat entfernt worden war (DRAK2 IP, 3). Bei der oberen Bande handelt es sich um eine unspezifische Hintergrundbande. (**B**) Die in (A) beschriebenen Lysate (unbehandelt (Prä IP), immunpräzipitiert mit Kontrollantikörper (C-Ab) oder anti-DRAK2(DRAK2) wurden entweder zur Kontrolle mit GST alleine (GST), oder den GST-Fusionsproteinen GST-C-FADD wt (wt) und GST-C-FADD S194A (S194A) inkubiert, die Produkte gewaschen und ein *in vitro* Kinase Test durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE, die Analyse durch Coomassiefärbung und Autoradiographie des Gels.

III-3.

Die FADD Kinase lokalisiert im Nukleus und bindet an die C-terminale Hälfte der Todesdomäne von FADD

III-3.1 Die Aktivität der FADD Kinase lokalisiert im Kern

Um die FADD Kinase in *in vitro* Kinase Tests näher charakterisieren zu können, wurden GST-Fusionsproteine von C-FADD generiert und aus dem Lysat von Bakterien aufgereinigt (Abb. 20). Neben den schon zuvor benutzten GST-C-FADD Wildtyp, S194A und ΔC wurden vier weitere Konstrukte kloniert, die zur Identifizierung der Bindedomäne der Kinase von FADD führen sollten. Bei GST-C-FADD S194E und mt handelt es sich um Punktmutanten, Δ2 besitzt nur die Hälfte der Todesdomäne von FADD und den C-Terminus, Δ3 besteht nur aus dem C-terminalen Ende von FADD, welches hinter der Todesdomäne beginnt. Vor Beginn der Untersuchungen sollten verschiedene Kinierungsbedingungen untersucht werden, um mit den idealen Wasch-, Temperatur- und Salzbedingungen das effizienteste Signal mit dem niedrigsten Hintergrund an unspezifischer Phosphorylierung zu erzielen. Dabei zeigte sich, daß dreimaliges Waschen der Präzipitate mit einem 300 mM Salz enthaltenden Lysepuffer und 30 Minuten Inkubation auf Eis ausreichend waren, um ein spezifisches Signal zu erhalten. Ausserdem konnte gezeigt werden, daß die Kinase Mangan für ihre Aktivität benötigt (Daten nicht gezeigt).

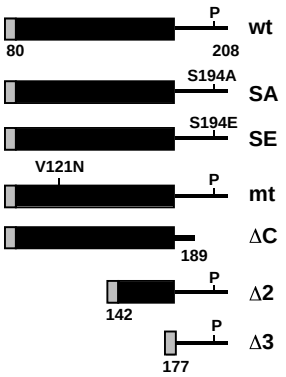


Abbildung 20: Schema der in den folgenden Abbildungen verwendeten GST-C-FADD Fusionsproteine. Zur weiteren Charakterisierung der Kinase, die an den C-Terminus von FADD bindet, wurden GST Fusionsproteine mit unterschiedlichen Punkt- und Deletionsmutationen hergestellt. Die grau schraffierte Box symbolisiert GST. Zahlen repräsentieren Aminosäurepositionen. S194A, S194E: Punktmutanten der Phosphorylierungsstelle; mt (V121N): Punktmutation in der Todesdomäne (DD), die die Bindung an weitere DDs verhindert. ΔC fehlen 19 Aminosäuren am C-Terminus. Δ2 besitzt nur noch die Hälfte der DD, Δ3 fehlt die DD komplett.

Um mehr über die Lokalisation der Kinase herauszufinden, wurden Zellen in eine Nukleus- oder Cytoplasmafraktion aufgetrennt und die Lysate mit dem Wildtyp und der S194A Punktmutante von GST-C-FADD inkubiert (Abb. 21). Der *in vitro* Kinase Test zeigte, daß die Aktivität der Kinase in der Nukleusfraktion detektiert wurde. Dies war nicht erwartet worden, da alle bisherigen Berichte FADD als cytoplasmatisches Protein beschrieben hatten.

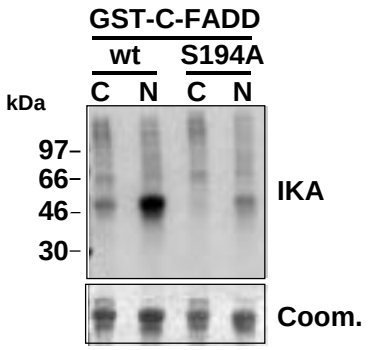


Abbildung 21: Die Aktivität der FADD Kinase befindet sich in der Nukleusfraktion. 2 x 10^7 BJAB Zellen wurden entweder in Cytoplasma (C) oder Nukleusfraktion (N) aufgetrennt (siehe Material und Methoden), für 2 h mit GST-C-FADD wt oder GST-C-FADD S194A inkubiert und danach einem *in vitro* Kinase Test (IKA) unterzogen. Die Produkte wurden mittels SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Autoradiographie analysiert.

Um dies zu überprüfen, wurden Jurkat Kontrollzellen und FADD defiziente Jurkat Zellen mit dem anti-FADD Antikörper 1C4, der nur unphosphoryliertes FADD erkennt, durch Immunfluoreszenz gefärbt (Abb. 22). Während Kontrollzellen und Kontrollantikörper nur Hintergrundfärbung zeigten, konnte FADD in den parentalen Jurkat Zellen deutlich im Cytoplasma detektiert werden. Dieses Ergebnis läßt zwei Deutungen zu. Entweder translozieren nur geringe Mengen an FADD in den Nukleus und werden dort in einem dynamischen Prozeß phosphoryliert, so daß nukleares FADD durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper 1C4 nicht nachgewiesen werden kann. Die andere Möglichkeit wäre, daß die Kinase aus dem Nukleus in das Cytoplasma transloziert und dort FADD phosphoryliert. Immunfluoreszenzfärbungen mit dem kommerziellen anti-FADD Antikörper, der beide FADD Formen erkennt, erbrachte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

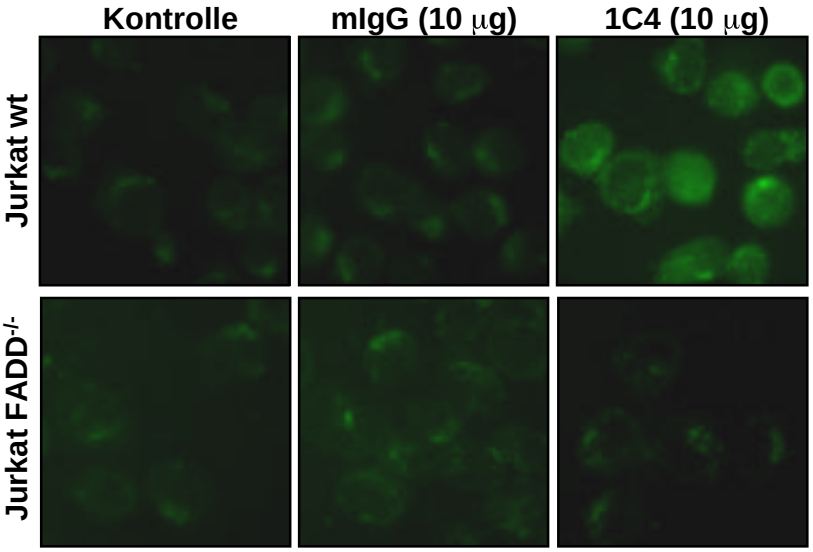


Abbildung 22: FADD ist im Cytoplasma lokalisiert. Immunfluoreszenzfärbung von parentalen Jurkat und $FADD^{-/-}$ Jurkat Zellen mit dem anti-FADD Antikörper 1C4. Jeweils 10^6 Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, die Zellmembran mit Saponin permeabilisiert und die Zellen entweder mit dem sekundären FITC gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper alleine (Kontrolle), zusammen mit unspezifischem Maus IgG (mIgG) oder dem anti-FADD Antikörper 1C4 inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop.

III-3.2 Die FADD Kinase benötigt einen Teil der Todesdomäne, um an FADD zu binden

Bisher war gezeigt worden, daß die FADD Kinase an FADD und an C-FADD assoziiert, nicht aber an die N-terminale Domäne von FADD. Um die C-terminale Bindungsdomäne der Kinase näher zu charakterisieren, wurden einige der GST-FADD Punkt- und Deletionsmutanten in *in vitro* Kinase Tests eingesetzt. Wie schon zuvor konnte gezeigt werden, daß C-FADD Wildtyp spezifisch phosphoryliert wird, während die Punktmutante S194A nicht länger als Substrat dient (Abb. 23). Auch die Punktmutante C-FADD mt, die durch einen Aminosäureaustausch in der Todesdomäne nicht länger in der Lage ist, an den CD95 Rezeptor zu binden, wurde radioaktiv markiert. Dies läßt den Schluß zu, daß die Kinase zumindest nicht von einer funktionellen Todesdomäne, wie sie der Rezeptor zur Interaktion benötigt, abhängig ist. Die Deletionsmutante Δ2 wurde in gleichem Maße wie der Wildtyp phosphoryliert, nicht aber Δ3. Untersuchungen mit Δ2 nach subzellulärer Fraktionierung von Zellen bestätigten, daß die Kinasenaktivität im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 23, rechts).

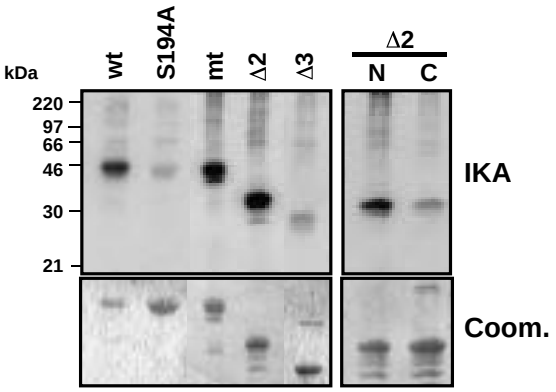


Abbildung 23: Die GST-C-FADD Deletionsmutante Δ2 wird von der FADD Kinase gebunden. Cytoplasma von 10^7 BJAB Zellen wurde mit verschiedenen GST-C-FADD Fusionsproteinen (siehe auch Abb. 15) für 2 h inkubiert, gewaschen und ein *in vitro* Kinase Test durchgeführt. C-FADDΔ2 wurde zudem mit subzellulär fraktioniertem Lysat (N, Nukleus; C, Cytoplasma) von 10^7 BJAB Zellen inkubiert. Die Produkte wurden mittels SDS-PAGE, Coomassie Färbung und Autoradiographie analysiert.

Um sicherstellen zu können, daß es sich bei der Phosphorylierung von GST-C-FADD Δ2 immer noch um eine spezifische Markierung an Serin 194 handelt, wurde in die Deletionsmutanten Δ2 und Δ3 die entsprechende S194A Mutation eingeführt. Die Konstrukte wurden in Ganzzellysaten von BJAB Zellen inkubiert und nach Kinierung durch Autoradiographie analysiert (Abb.24). Dabei konnte bestätigt werden, daß die Phosphorylierung von Δ2 spezifisch ist und Δ3 nicht in der Lage ist, mit der Kinase zu assoziieren.

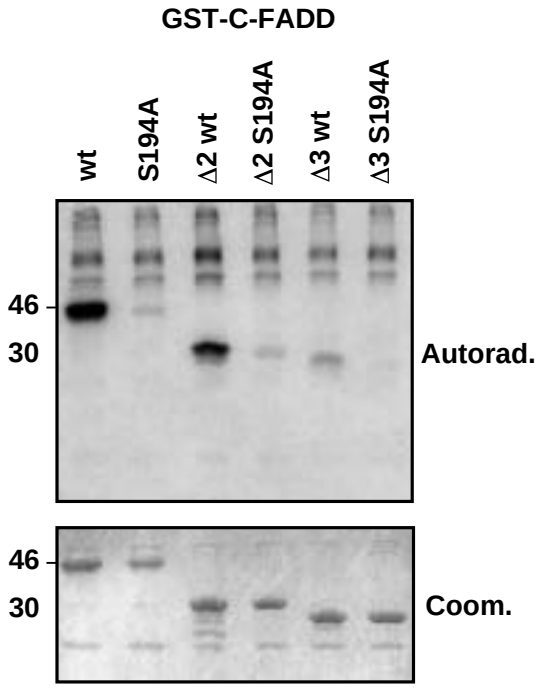


Abbildung 24: Die Phosphorylierung von GST-C-FADDΔ2 *in vitro* ist spezifisch für Serin 194. *In vitro* Kinase Test von GST-C-FADD wt, Δ2, Δ3 und den jeweils korrespondierenden Serin → Alanin Punktmutanten. Die Fusionsproteine wurden für 2 h im Ganzzellysat von 10^7 BJAB Zellen inkubiert, gewaschen und einem Kinase Test unterworfen.

Die FADD Kinase ist in der Lage, den GST-C-FADD Wildtyp zu binden und zu phosphorylieren. Um zu testen, ob die Kinase noch assoziiert, wenn der Serinrest zu einem Alanin verändert ist oder der gesamte C-Terminus von C-FADD fehlt, wurde eine Substrat Phosphorylierung durchgeführt (Abb. 25A). Das Lysat von BJAB Zellen wurde mit den drei genannten GST-Fusionsproteinen inkubiert, gewaschen und anschließend zu 50 µg eines Peptides gegeben, das entweder die C-terminale FADD Sequenz des Wildtyps oder die der Serin → Alanin Punktmutation enthielt (siehe Schaubild, Abb. 25B). Während der Wildtyp von GST-C-FADD jeweils phosphoryliert wurde, konnte bei den beiden Mutanten kein ^{32}P Signal detektiert werden. Dies war auch nicht erwartet worden, da beiden Proteinen das intakte Serin 194 fehlt. Interessanterweise wurde nur das Wildtyp Peptid in dem Reaktionsansatz phosphoryliert, bei dem die Kinase mit C-FADDΔC immunpräzipitiert worden war. Dies läßt den Schluß zu, daß die Kinase zwar mit ΔC immunpräzipitiert werden kann, aber die Affinität zu ΔC nicht so hoch ist wie zu Wildtyp und S194A. Dadurch konnte die Kinase wahrscheinlich an das Peptid assoziieren und radioaktives Phosphor übertragen. Im Falle der GST-C-FADD Punktmutante S194A ist die Affinität zum C-Terminus wahrscheinlich hoch. Die Kinase kann aber C-FADD nicht phosphorylieren und liegt somit durch die kompetitive Bindung immobilisiert vor. Das Schema in Abbildung 25B verdeutlicht nochmals die Region der minimalen Kinasebindedomäne in der FADD Sequenz.

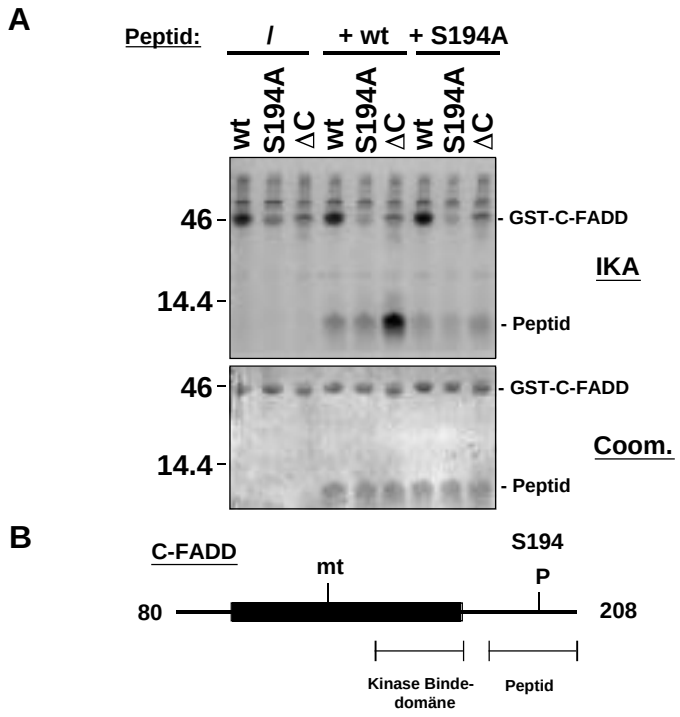


Abbildung 25: Die minimale Bindedomäne der FADD Kinase befindet sich in der C-terminalen Hälfte der Todesdomäne. (**A**) Substratphosphorylierung. Die FADD Kinase wurde mit den GST-C-FADD Fusionsproteinen wt, S194A und ΔC aus dem Lysat von je 10^6 SKW6.4 Zellen immunpräzipitiert. Nach 3 x Waschen wurden die Präzipitate in einem Kinasepuffer aufgenommen, der entweder kein Peptid (/) oder 50 µg eines dem C-Terminus von FADD entsprechenden Peptids enthielt, und eine Substratphosphorylierung durchgeführt. Das Peptid lag entweder als Wildtyp C-FADD Sequenz vor (wt) oder enthielt die Punktmutation Serin → Alanin. Die Produkte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit Coomassie gefärbt, getrocknet und einer Autographie unterzogen. (**B**) Schema der minimalen Bindedomäne der FADD Kinase.

III-4.

Die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 führt zum Wachstumsarrest in G2/M

III-4.1 MCF-10A Zellen: eine spontan immortalisierte Brustepithelzellinie

FADD defiziente T Zellen zeigten nach Stimulation mit CD3 oder Concanavalin A keine Aktivierungs-induzierte Proliferation. Gleiche Daten konnten in transgenen Mäusen mit der dominant negativen Deletionsmutante C-FADD beobachtet werden (Newton et al., 1998; Zörnig et al., 1998; Walsh et al., 1998). Der Effekt scheint sich aber nur auf nicht-Tumorzellen zu erstrecken, denn reguläre Tumorzellinien zeigen nach Überexpression von C-FADD keine Veränderung in ihrem Zellzyklus (Newton et al., 1998). Proliferationstests von stabil mit C-FADD Wildtyp und verschiedenen Punktmutanten transfizierten BJAB Zellen, die im Verlauf dieser Promotionsarbeit generiert worden waren, zeigten daher keine Unterschiede im Wachstumsverhalten auf (Daten nicht gezeigt).

MCF-10A Zellen sind spontan immortalisierte humane Brustepithelzellen, deren Wachstum von Hydrocortison und rekombinantem humanem epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) abhängt (Soule et al., 1990; Tait et al., 1990). Der Entzug von Serum führt bei diesen Zellen zu einem Arrest in G0 (Liberto et al., 2000). Um zu testen, ob C-FADD einen Effekt auf den Zellzyklus dieser nicht-Tumorzellen hat, sollten diese Zellen mit verschiedenen C-FADD Mutanten transfiziert werden. Hueber et al. (2000) hatten zuvor berichtet, daß Überexpression von C-FADD in der spontan immortalisierten Zellinie NIH/3T3 zu einem Zellzyklusarrest führt. Es sollte daher nach einer geeigneten Methode gesucht werden, mit der C-FADD in MCF-10A Zellen exprimiert werden kann.

Die Infektion von Zellen mit Adenoviruskonstrukten führt im allgemeinen zur hohen Expression des gewünschten Proteins. Um zu testen, ob MCF-10A Zellen mit Adenoviren infiziert werden können, wurde ein GFP Adenovirus verwendet, der uns freundlicherweise von Dr. Reinhard Marks (University of Chicago) zur Verfügung gestellt worden war. Die Infektion dieser Zellen führte zu einer fast 100%igen Expression des GFP Proteins (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von Dr. Marks und Candace Cham (beide im Labor von Professor Dr. Thomas Gajewski) wurden daraufhin Adenoviruskonstrukte zur Expression von C-FADD Wildtyp, S194A und S194E kloniert (siehe Material und Methoden). Die Viren wurden mit Hilfe von 293

Zellen im großen Maßstab amplifiziert und aufgereinigt. Die 293 Zellen sind stabil mit dem E1 Protein transfiziert, das den E1-defizienten Viren zur Replikation fehlt.

III-4.2 AdV-C-FADD Expression in MCF-10A Zellen

Um zu testen, welcher Titer notwendig ist, um eine ausreichende Expression von C-FADD in MCF-10A Zellen zu erhalten, wurden die Zellen zu Beginn mit 100 Viruspartikeln pro Zelle infiziert und die Zellen zwei Tage später für Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot Analyse geerntet (Abb. 26). Alle C-FADD Konstrukte enthielten zusätzlich am N-Terminus ein AU-1 Markerpeptid, das vom Epitop-spezifischen Antikörper anti-AU-1 erkannt wird. Die Immunfluoreszenzfärbung von permeabilisierten Zellen wies dieses Epitop in allen infizierten Zellen nach (Abb. 26A). Lysate von so infizierten MCF-10A Zellen wurden im anti-FADD Western Blot analysiert (Abb. 26B). Dabei konnte die ca. 30fache Proteinmenge von C-FADD im Vergleich zu endogenem FADD detektiert werden. Dies entspricht in etwa der Menge, die notwendig ist, um Zellen vor Rezeptor-vermittelter Apoptose zu schützen. Damit war gezeigt worden, daß die Infektion von MCF-10A Zellen durch C-FADD Adenoviruskonstrukte zu einer hohen Expression führt.

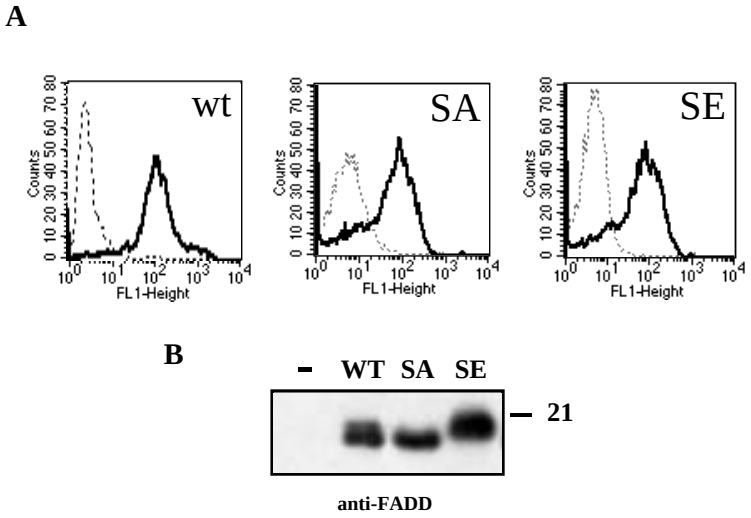
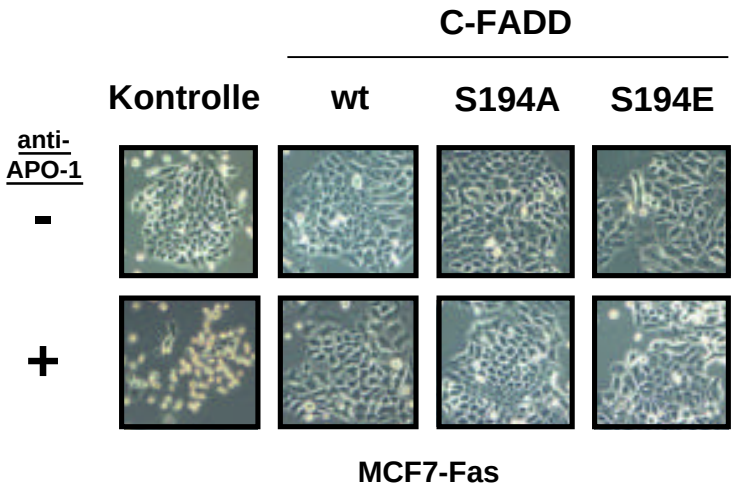


Abbildung 26: Expression aller AdV-C-FADD Konstrukte in MCF-10A Zellen. (**A**) FACS-Analyse von Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen. MCF-10A Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät, am nächsten Tag mit jeweils 100 VP / Zelle infiziert und für weitere zwei Tage kultiviert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, trypsiniert, fixiert und die Zellmembran mit Saponin permeabilisiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit einem monoklonalen Maus IgG1 Kontrollantikörper (gestrichelte Linie) oder dem anti-AU-1 Antikörper (schwarze Linie) mit einem Ziege anti-Maus FITC gekoppelten Zweitantikörper. (**B**) Anti-FADD Western Blot Analyse des Lysats von wie in (A) infizierten Zellen.

III-4.3 Die AdV-C-FADD Konstrukte schützen MCF-7-Fas Zellen vor CD95 vermittelter Apoptose

Zu Beginn sollten die Adenoviruskonstrukte in einem funktionellen Test überprüft werden. Dazu sollten Epithelzellen mit den C-FADD Viren infiziert und anschließend getestet werden, ob die dominant-negative Form des FADD Proteins diese Zellen vor CD95 vermittelter Apoptose schützen kann. MCF-10A Zellen zeigen allerdings keine Sensitivität gegenüber CD95 induzierter Apoptose (Daten nicht gezeigt). Die Brustkarzinomzellinie MCF-7 wurde stabil mit CD95 transfiziert und ist daher sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (sogenannte MCF-7-Fas Zellen). Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. M. Jäättelä (Danish Cancer Society, Kopenhagen) zur Verfügung gestellt.



% AU-1 positive Zellen	Kontrolle	wt	S194A	S194E
	1.05	50.82	56.45	71.70

Abbildung 27: Die AdV-C-FADD Konstrukte schützen vor CD95 vermittelter Apoptose. MCF-7 Fas Zellen, die stabil CD95 auf der Zelloberfläche exprimieren, wurden entweder mit Kontrollvirus oder den AdV-C-FADD Konstrukten wt, S194A und S194E transfiziert. Am nächsten Tag wurden eine Zellen geerntet und durch Immunfluoreszenz (anti-AU-1) auf C-FADD Expression überprüft (siehe Schaubild). Die andere Hälfte der Zellen wurde mit 1 µg / ml anti-APO-1 und 1 ng / ml Protein A für 16 h inkubiert oder blieben unbehandelt.

Es wurden MCF-7-Fas Zellen mit einem Kontrollvirus (Vektorkontrolle) oder AdV-C-FADD Wildtyp, S194A und S194E infiziert (Abb. 27). Die Zellen blieben am nächsten Tag entweder unbehandelt oder wurden für 16 Stunden mit 1 µg/ml anti-APO-1 inkubiert. Die Expression der C-FADD Proteine wurde durch eine

intrazelluläre anti-AU-1 Immunfluoreszenzfärbung im FACScan überprüft (Abb. 27, unten). MCF-7-Fas Zellen exprimieren keine Caspase-3, welche für die Aktivierung der Endonuklease CAD essentiell ist. Caspase-7 kann zwar den Inhibitor ICAD auch spalten und CAD freisetzen, aber mit einer weitaus geringeren Effizienz. Daher ist die Quantifizierung von Apoptose in MCF-7 Zellen mit Hilfe von DNA-Fragmentierung ineffizient. Apoptose kann aber auch durch andere morphologische Veränderungen determiniert werden. Adhärent wachsende Zellen runden nach Induktion von Apoptose ab und flotieren über den gesunden Zellen. Daher erfolgte die Auswertung im Lichtmikroskop (Abb. 27, oben). Es konnte dadurch gezeigt werden, daß Überexpression der adenoviralen C-FADD Konstrukte zur Inhibition CD95 vermittelter Apoptose führt.

III-4.4 Expression von AdV-C-FADD führt zur Anreicherung von MCF-10A Zellen in G2/M

Es war gezeigt worden, daß Überexpression von C-FADD, wie auch die Deletion des FADD-Gens, zur Inhibition der Aktivierungs-induzierten Proliferation von T Zellen führt (Zhang et al., 1998; Newton et al., 1998; Zörnig et al., 1998; Walsh et al., 1998). Dieser Effekt konnte in Tumorzellen nicht beobachtet werden (Newton et al., 1998). Um zu testen, welche Auswirkungen die Expression von C-FADD Wildtyp und den Punktmutanten der Phosphorylierungsstelle Serin 194 in MCF-10A Zellen hat, wurden diese zusammen mit der Tumorzellinie MCF-7 mit Adenoviren infiziert und über einen Zeitraum von 6 Tagen inkubiert (Abb. 28).

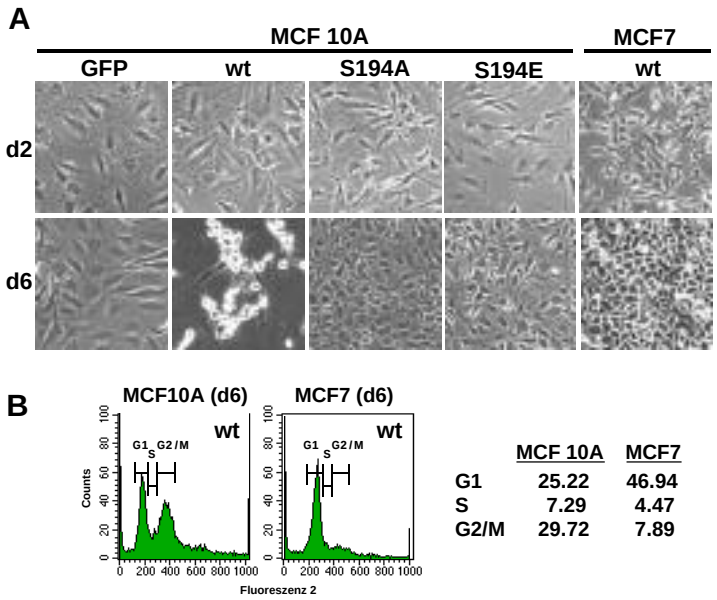


Abbildung 28: Die Phosphorylierungsstelle im C-FADD Molekül bewirkt Veränderungen im Zellzyklus von MCF-10A Zellen. (**A**) MCF-7 bzw. MCF-10A Zellen wurden mit den verschiedenen AdV-C-FADD Konstrukten (100 VP / Zelle) infiziert und über die Dauer von 6 Tagen (d2 = 2 Tage, d6 = 6 Tage nach Infektion) im Lichtmikroskop beobachtet. Die Zugabe eines AdV-GFP Konstrukts ergab eine 100% Infektionseffizienz. MCF-7 Zellen zeigten bei keiner Infektion morphologische Veränderungen auf. (**B**) Propidiumiodid Färbung der DNA von 6 Tage AdV-C-FADD wt infizierten MCF-7 und MCF-10A Zellen.

Um die Wirkung der Adenovirusinfektion alleine auf die Proliferation der Zellen zu überprüfen, wurde ein GFP Kontrollvirus verwendet. Es konnte beobachtet werden, daß MCF-10A Zellen, die mit Wildtyp C-FADD infiziert worden waren, nach etwa 3 Tagen anfingen sich abzurunden (Abb. 28A). Bis zum Tag 6 der Kinetik waren schließlich fast 100% der Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Dieser Effekt konnte weder in MCF-7 Zellen beobachtet werden, noch zeigten die anderen Adenoviruskonstrukte in MCF-7 oder MCF-10A Zellen eine Veränderung auf. Bei der anschließenden Zellzyklusuntersuchung dieser Zellen zeigte sich, daß C-FADD wt infizierte MCF-10A Zellen einen weitaus höheren Anteil an Zellen in G2/M aufwiesen, als dies bei MCF-7 Zellen der Fall war (Abb. 28B). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß C-FADD tatsächlich einen Einfluß auf die Proliferation von nicht-Tumorzellen haben und zu einem Arrest in G2/M führen kann.

III-4.5 Der Arrest von MCF-10A Zellen nach C-FADD Infektion in G2/M korreliert mit dem Phosphorylierungsstatus von FADD

Um genauer zu untersuchen, welche Zellzyklusveränderungen auftreten, wurden MCF-10A Zellen mit AdV-C-FADD wt infiziert und für die Dauer von 6 Tagen inkubiert (Abb. 29). Die Zellen wurden jeden Tag im Lichtmikroskop analysiert und Proben für eine Zellzyklusuntersuchung entnommen (Abb. 29A). Auch dabei zeigten sich drei Tage nach Infektion mit C-FADD die ersten Anzeichen der morphologischen Veränderungen, wie sie im vorherigen Experiment schon zu beobachten gewesen waren. Die Zellen begannen sich abzurunden und waren nach 6 Tagen nicht mehr adhärent (Abb. 29A). Die dazugehörige FACS-Analyse dokumentiert die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Dabei wurde eine deutliche Verschiebung des G1 zu G2/M-Verhältnisses an Tag 1 von 65% zu 21,2%, zu 33,6% G1 und 53,8% G2/M an Tag 6 gefunden.

Wir hatten schon zuvor gezeigt, daß die Phosphorylierung von FADD durch eine Zellzyklus-regulierte Kinase in G2/M stattfindet. Um zu testen, ob sich die Phosphorylierung von FADD über den Zeitraum von 6 Tagen verändert, wurden an jedem Tag Zellen lysiert und durch eine anti-FADD Western Blot Analyse überprüft (Abb. 29B). Dabei zeigte sich, daß der Status der Phosphorylierung von FADD mit der Zellzyklusanalyse korrelierte. Je mehr Zellen sich in G2/M befanden, umso mehr phosphoryliertes FADD konnte im Western Blot detektiert werden. Da keines der anderen Adenoviruskonstrukte diesen Effekt bewirkte, und sich die C-FADD Konstrukte nur in einer Aminosäurenposition unterscheiden, muß es die Phosphorylierung des C-FADD Wildtyp Proteins sein, die diesen Zellzyklusarrest in G2/M hervorruft. Auch C-FADD wt infizierte MCF-7 Zellen zeigten keinen Arrest, weswegen der Effekt von C-FADD nur auf Zellen beschränkt zu sein scheint, die einen aktiven Zellzyklus besitzen.

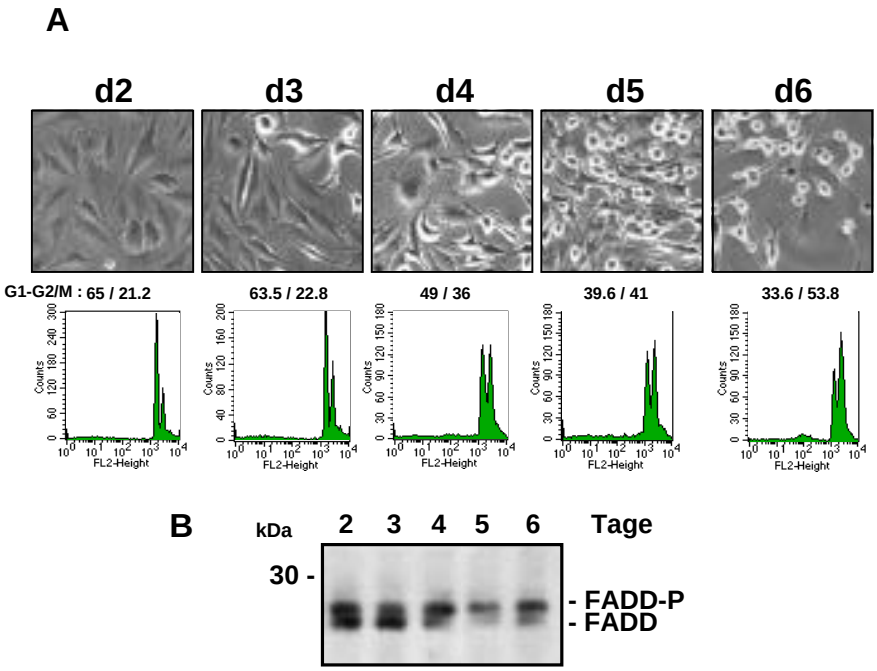


Abbildung 29: Die Anreicherung von MCF-10A Zellen in der G2 / M Phase des Zellzyklus korreliert mit dem Phosphorylierungsstatus von FADD. (**A**) MCF 10 A Zellen wurden mit 100 VP / Zelle infiziert, über einen Zeitraum von 6 Tagen im Lichtmikroskop beobachtet und die morphologischen Veränderungen im Bild festgehalten. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und trypsiniert. 3 x 10^5 Zellen wurden in Nicolettipuffer aufgenommen und der DNA Gehalt am nächsten Tag im FACS-Scan analysiert. Die Zahlen über der Zellzyklusauswertung repräsentieren das Verhältnis von G1 zu G2 / M. (**B**) 5 x 10^5 Zellen des in (A) beschriebenen Experimentes wurden lysiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-FADD Western Blot analysiert. FADD-P, phosphoryliertes FADD.

III-4.6 C-FADD wt moduliert die Proteinexpression von DRAK2 und Caspase-3

Es war beschrieben worden, daß DRAK2 mit FADD interagiert (Dr. Steve Hedricks, Berkeley, USA). Um zu testen, ob DRAK2 in MCF-10A Zellen nach C-FADD Expression aktiviert wird, wurden Lysate von C-FADD wt infizierten Zellen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot mit dem anti-DRAK2 Antikörper analysiert (Abb. 30). Dabei zeigte sich, daß die Kinase an Tag 3 nach Infektion hochreguliert wurde. Die Ladekontrolle (anti-Aktin) wies dabei ungefähr gleiche Mengen an Protein an Tag 2 und Tag 3 nach. Neben DRAK2 detektierte der polyklonale anti-DRAK2 Antikörper auch ein unbekanntes Protein von ca. 60 kDa (p60), das ebenfalls an Tag 3 hochreguliert worden war.

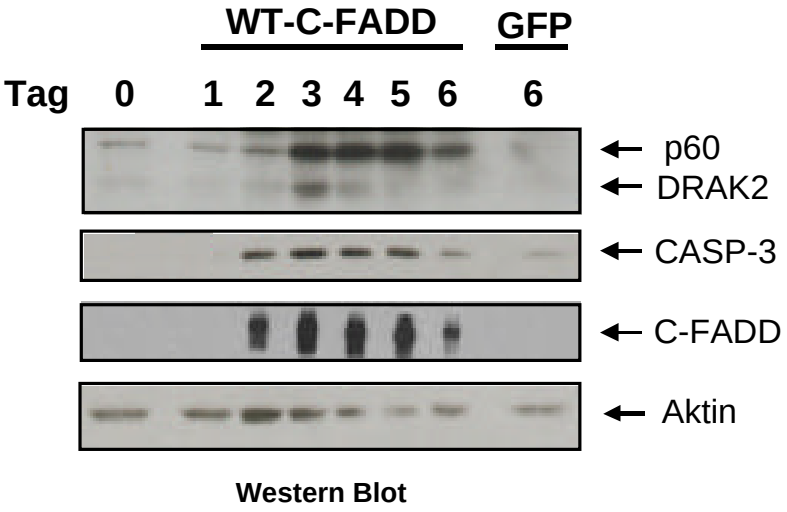


Abbildung 30: C-FADD wt moduliert Proteinexpression von DRAK2 und Caspase-3. MCF-10A Zellen wurden mit AdV-C-FADD oder einem GFP Kontrollvirus infiziert und für 0 bis 6 Tage kultiviert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, trypsiniert und aufgeschlossen. Die Lysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen DRAK2, Caspase-3 (Casp-3), FADD (C-FADD) und Aktin analysiert.

Da MCF-10A Zellen nach 6 Tagen abgerundet vorlagen, stellte sich die Frage, ob die Zellen apoptotisch wurden, d.h., ob Caspasen aktiviert worden waren. Der Western Blot wurde mit anti-Caspase-3, -8 und -9 Antikörpern untersucht. Dabei ließ sich eine Hochregulation von Caspase-3 an Tag 2 beobachten. Aktive Untereinheiten der Caspase konnten dabei allerdings nicht detektiert werden. Die beiden anderen Caspasen zeigten keine Veränderung auf. Damit war gezeigt worden, daß die Phosphorylierung von C-FADD die Expression von anderen Proteinen beeinflussen kann.

III-4.7 Das transgene CAR-T Zell Maussystem

Der anti-proliferative Effekt von C-FADD war in den naiven T Zellen von C-FADD transgenen Mäusen gefunden worden. Die bisherigen Experimente mit AdV-C-FADD deuteten darauf hin, daß dieser Effekt auch in MCF-10A Zellen beobachtet werden kann. Um C-FADD Wildtyp und die Punktmutanten S194A und S194E auf ihren Effekt bei der Mitogen-vermittelten Proliferation von T Zellen testen zu können, hätten drei verschiedene transgene Mäuse hergestellt werden müssen. Es ist auch noch nicht klar, ob die Proliferationsinhibition auf einen Defekt während der Entwicklung dieser Mäuse zurückzuführen ist. Es wurde daher nach einer alternativen Methode gesucht, mit Hilfe derer die Wirkung der C-FADD Mutanten auf die Proliferation von T Zellen untersucht werden können, die dem Transgen zuvor noch nicht ausgesetzt waren.

Adenoviren binden an einen Oberflächenrezeptor von Zellen, um in das Cytoplasma zu gelangen (Abb. 31). Das sogenannte CAR (Coxsackie-Adenovirus-

Rezeptor) Protein vermittelt erst die Bindung an, und später die Internalisierung in das Zellinnere. Naïve T Zellen sind aber resistent gegen Transfektionen und Adenovirus-Infektionen. Um dieses Problem zu lösen, wurden in der Gruppe um Dr. James DeGregori (University of Colorado) CAR transgene Mäuse hergestellt, die den Rezeptor auf naiven T Zellen exprimieren (Wan et al., 2000). Periphere T Zellen dieser Mäuse können mit Adenoviren infiziert und so der Effekt von C-FADD Punktmutanten unabhängig von der T Zellentwicklung überprüft werden.

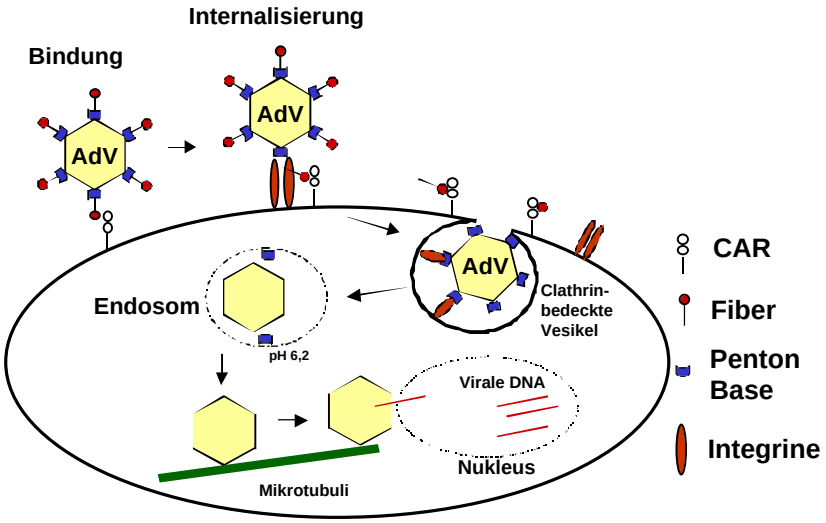


Abbildung 31: Der Internalisierungsmechanismus des CAR-Rezeptors. Schema der Rezeptoren und Viruskapsidproteine, die beim Andocken und der Internalisierung des Adenovirus beteiligt sind. Der Adenovirus bindet mit seinen Fibern an den CAR Rezeptor. Die Fibern untergehen eine Konformationsänderung und ermöglichen so die Assoziation von Integrinen mit dem RGD Motiv der Penton Basen. Der Adenovirus wird kurz darauf in Clathrin bedeckten Vesikeln internalisiert. Die Exposition des Virus im leicht sauren Milieu der frühen Endosomen führt zum Zerfall der Endosomen und dadurch zur Freisetzung von Viruspartikeln in das Cytoplasma. Diese assoziieren an Mikrotubuli und werden so zum Nukleus transportiert. Dort binden die Partikel an den nuklearen Porenkomplex und inserieren die Virus-DNA in den Kern. Nach Nemerow (2000).

In Zusammenarbeit mit Dr. Reinhard Marks wurden T Zellen aus CAR transgenen Mäusen aufgereinigt und mit den AdV-Konstrukten C-FADD wt, S194A und S194E infiziert (Abb. 32). Die Expression von C-FADD wurde nach Aktivierung der T Zellen durch Immunfluoreszenz von permeabilisierten Zellen mit dem anti-AU-1 Antikörper (Abb. 32B) im Vergleich zu stabil mit C-FADD transfizierten BJAB Zellen analysiert (Abb. 32A). Wie schon die FACScan Analyse mit dem anti-AU-1 Antikörper wies auch ein anti-FADD Western Blot von so infizierten Zellen eine fast so hohe Expression von C-FADD in T Zellen auf, wie es in C-FADD Transfektanten der Fall war (Abb. 32C). Damit war sichergestellt, daß in den T Zellen eine ausreichend hohe Menge an C-FADD exprimiert wird.

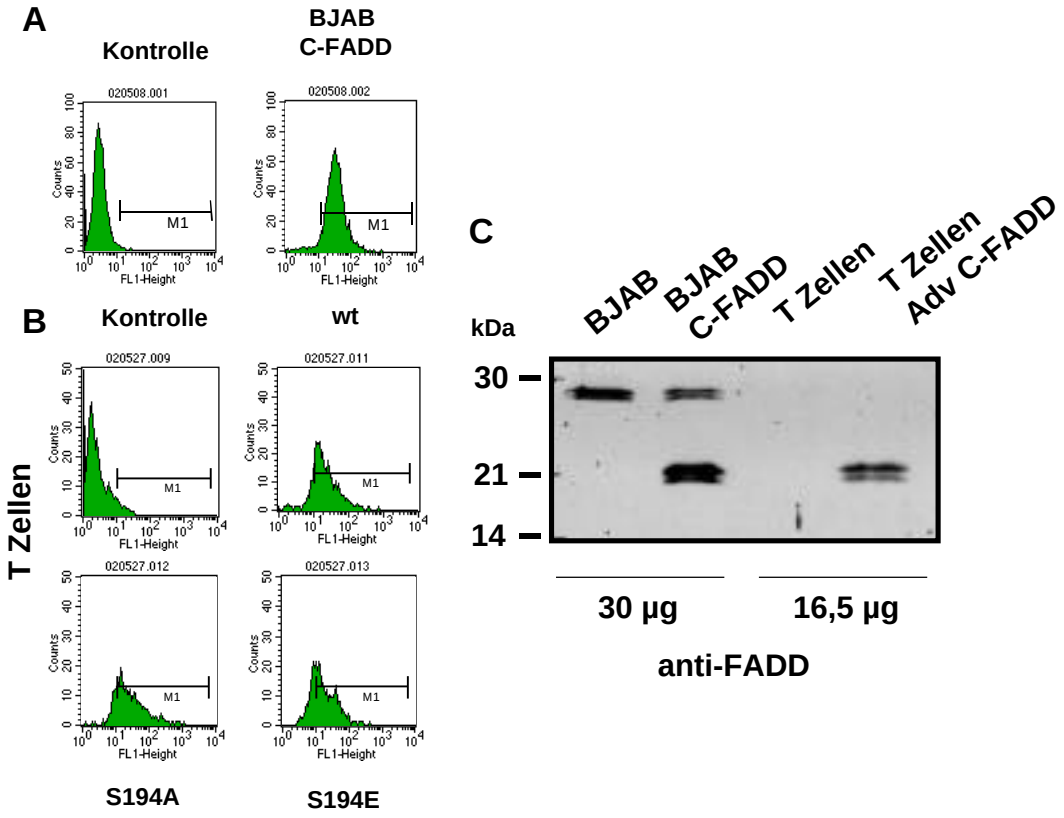


Abbildung 32: Expression von AdV-C-FADD in T Zellen aus CAR transgenen Mäusen. (**A**) Immunfluoreszenzfärbung von Kontrollzellen oder stabil exprimierenden BJAB C-FADD wt Zellen mit dem anti-AU-1 Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper. 10^6 Zellen wurden gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert, durch Saponin permeabilisiert, Immunfluoreszenz-gefärbt und im FACS-Scan analysiert. (**B**) T Zellen wurden mit 1000 VP / Zelle mit einem leeren AdV-Konstrukt (Kontrolle) oder den für C-FADD kodierenden AdV-Konstrukten wt, S194A und S194E infiziert, mit CD3 / CD28 Antikörper stimuliert und wie in (A) beschrieben analysiert. (**C**) Anti-C-FADD Western Blot Analyse von wie in (A) infizierten CAR T Zellen. Als Kontrolle wurden 10^6 BJAB Kontrolltransfektanten und stabil C-FADD exprimierende BJAB Zellen oder 3 x 10^6 mit Kontrollvirus-infizierte T Zellen aufgetragen.

III-4.8 Infektion von CAR transgenen T Zellen mit Wildtyp-C-FADD führt zur Inhibition der Proliferation

Nachdem etabliert worden war, daß T Zellen mit den C-FADD Adenoviruskonstrukten infiziert werden können und die Aktivierung der T Zellen zur Synthese des Proteins führt, wurde ein Proliferationsversuch durchgeführt (Abb. 33). Dazu wurden T Zellen aufgereinigt und blieben anschließend entweder unbehandelt, oder wurden für 16 Stunden mit einem leeren Kontrollvirus (AdV Kontrolle) oder AdV-C-FADD wt, AdV-C-FADD S194A und AdV-C-FADD S194E infiziert. Die Zellen wurden in CD3/CD28 beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert und über

einen Zeitraum von 4 Tagen inkubiert. Die unbehandelten und Kontrollvirus-infizierten Zellen zeigten dabei die höchsten Einbauraten von radioaktiv markiertem Thymidin. Die Punktmutanten S194A und S194E wiesen zwar niedrigere Werte auf, zeigten aber auch nach 4 Tagen noch ein stetiges Wachstum. Bei den Wildtyp infizierten Zellen dagegen konnte eine Stagnation der Proliferation beobachtet werden. Die Expression der C-FADD Konstrukte wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-AU-1 Antikörper überprüft (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigte Daten aus C-FADD transgenen Mäusen, in denen eine Inhibition der Aktivierungs-induzierten Proliferation gefunden worden war. Der Effekt scheint dabei von der Phosphorylierung von FADD abhängig zu sein.

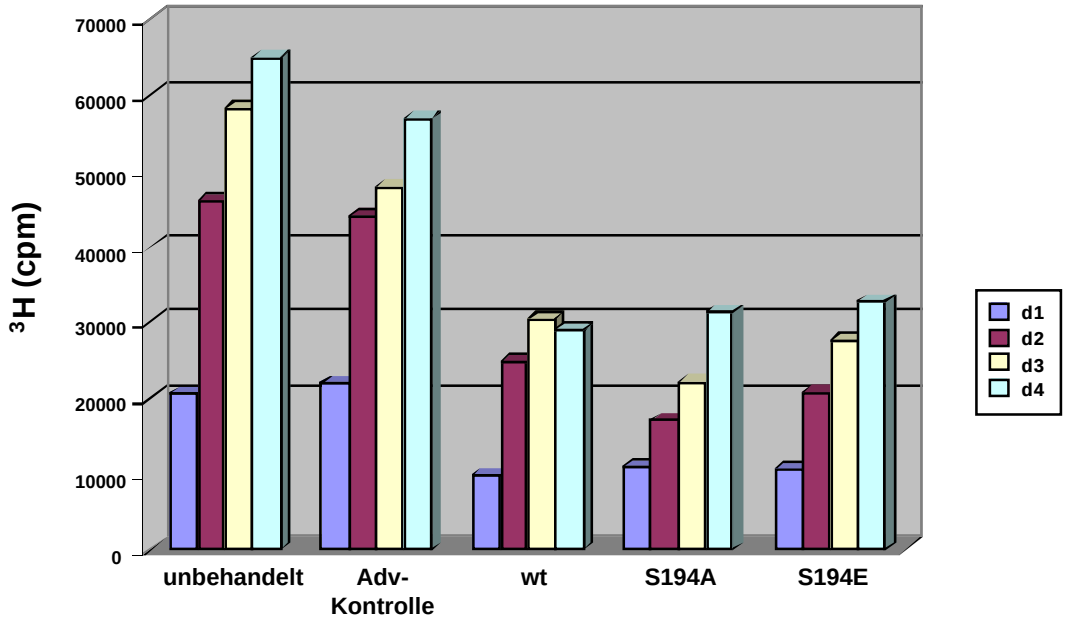


Abbildung 33: AdV-C-FADD wt bewirkt einen Wachstumsstop in CAR transgenen T Zellen. Proliferationstest von Adenovirus-infizierten T Zellen nach Stimulation mit CD3 / CD28. T Zellen wurden aufgereinigt und blieben entweder unbehandelt oder wurden mit den AdV-C-FADD Konstrukten wt, S194A, S194E oder einer Adv-Vektorkontrolle (alle im Verhältnis: 1000 VP / Zelle) infiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gezählt und 8 x 10^5 Zellen in Triplikaten in mit CD3 und CD28 vorbereiteten 96 Loch Platten ausplattiert. Die Zellen wurden 4 Tage lang für jeweils 12 h mit [^{3}H]Methylthymidin inkubiert, auf eine Membran übertragen und der Einbau des Radioisotops in einem Szintillationsgerät gemessen. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

III-5.

Die Rolle von Aktin bei CD95 vermittelter Apoptose

Daten aus unserem Labor haben vor kurzem gezeigt, daß CD95-vermittelte Apoptose von einem intakten Aktin Cytoskelett abhängig ist (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Präliminäre Daten zeigten außerdem, daß DISC-Formation und Internalisierung von CD95, welche von Aktin abhängig sind, nur in Typ I Zellen gefunden werden können (Alicia Algeciras-Schimnich, Manuskript in Vorbereitung). Typ II Zellen, die kaum einen DISC bilden, benötigen Aktin für die CD95-Signalkaskade nicht.

Es ist nicht möglich, stabil FADD exprimierende Transfektanten herzustellen, da FADD durch die N-terminale DED cytotoxisch wirkt und durch unphysiologische Assoziation Apoptose in den Zellen auslöst. Daher waren C-FADD Transfektanten von BJAB Zellen hergestellt worden, die entweder den Wildtyp (WT), oder die Punktmutanten S194A (SA) oder S194E (SE) stabil exprimieren. Während C-FADD WT zwei Banden im Western Blot aufzeigte, konnten bei den Punktmutanten jeweils nur eine Bande detektiert werden. Dabei zeigte sich, daß das Laufverhalten von SA wie das von unphosphoryliertem C-FADD war, während SE (welches potentiell die negative Ladung imitieren kann) auf Höhe des phosphorylierten FADD zu detektieren war.

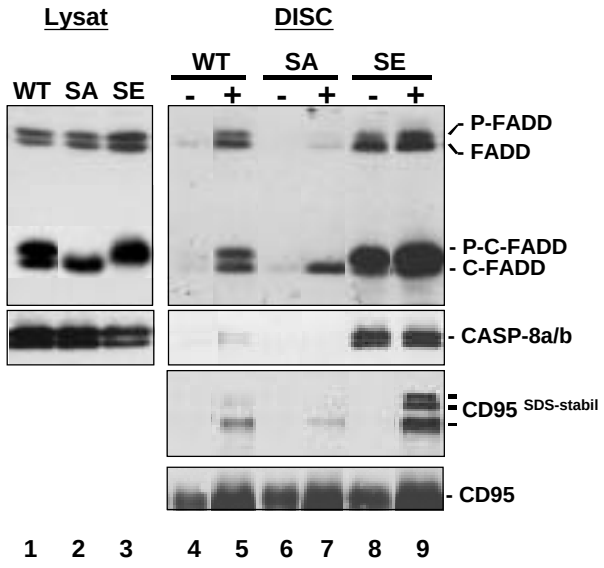


Abbildung 34: DISC-Präzipitation aus BJAB C-FADD S194E Transfektanten zeigt eine konstitutive Bindung von Caspase-8 an den CD95 Rezeptor. 5 x 10^7 BJAB C-FADD Transfektanten (wt, Wildtyp C-FADD; S194A und S194E, Punktmutanten der Phosphorylierungsstelle in C-FADD) blieben entweder unbehandelt (-) oder wurden mit 2 µg / ml anti-APO-1 Antikörper (+) für 10 min. stimuliert und der Rezeptor durch Zugabe von Protein A-Sepharose immunpräzipitiert (Bahnen 4 – 9). Die Präzipitate wurden 3 x gewaschen und mit den Antikörpern anti-Caspase-8, anti-CD95 und anti-FADD im Western Blot überprüft. Die Bahnen 1 – 3 repräsentieren Lysat von 5 x 10^5 Zellen der oben beschriebenen Transfektanten in einer anti-FADD Western Blot Analyse.

Es ist gezeigt worden, daß diese Deletionsmutante effizient mit dem aktivierten Rezeptor assoziiert (Chinnaiyan et al., 1996b). Um zu testen, ob die Punktmutanten in der Lage sind, an den stimulierten Rezeptor zu binden, wurde eine DISC-Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß der WT Stimulations-abhängig immunpräzipitiert werden kann (Abb. 34, Bahn 5). Im Gegensatz dazu war die Rekrutierung von C-FADD S194A signifikant reduziert, obwohl die Zellen eher mehr C-FADD Protein exprimierten als der Wildtyp (siehe Lysate Abb. 34, Bahn 1+2). Am auffälligsten war jedoch, daß die Rekrutierung von endogenem FADD deutlich reduziert war. Bindung von S194E an CD95 geschah noch effizienter als bei WT und auch die Rekrutierung von endogenem FADD war deutlich höher. Diese Rekrutierung war Stimulations-unabhängig. Überraschenderweise wurde auch Caspase-8 in den DISC rekrutiert, was wahrscheinlich durch Bindung an die DED von endogenem FADD zurückzuführen ist. Genau wie endogenes FADD band Caspase-8 auch an den unstimulierten CD95 Rezeptor.

Die Bindung des Liganden CD95L, bzw. des agonistisch wirkenden Antikörpers anti-APO-1 führt zur Stimulation des Rezeptors und zur Assoziation der Signalmoleküle FADD und Caspase-8. Ein weiteres Kennzeichen des aktivierten CD95 Rezeptors ist die Bildung von SDS-stabilen Aggregaten. Die anti-CD95 Western Blot Analyse zeigte auch hier eine höhere Aktivität der SE Mutante (Abb. 34). Während die Aggregate bei allen getesteten Zellinien zu erkennen waren, war die Effizienz von SE, diese Aggregate zu bilden, um ein wesentliches höher als bei den anderen Transfektanten.

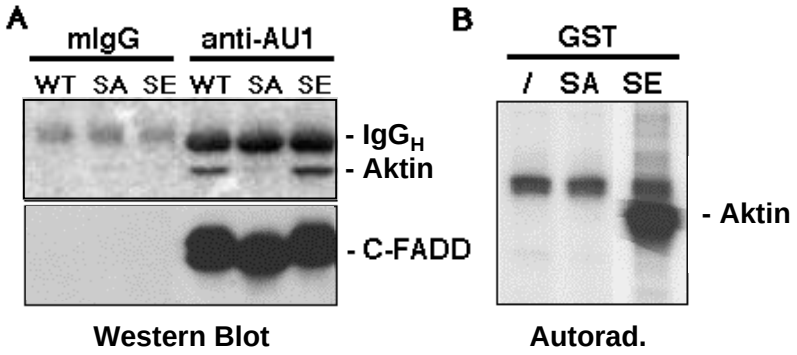


Abbildung 35: Aktin ko-immunpräzipitiert mit C-FADD wt und der Punktmutante S194E, aber nicht mit S194A. (**A**) 10^7 C-FADD Transfektanten wurden lysiert und mit einem an Protein A-Sepharose gekoppelten anti-Maus IgG (mIgG) für 2 h vorinkubiert. Das Lysat wurde kurz bei 6000 rpm abzentrifugiert, der Überstand zu dem an Protein A-Sepharose gebundenen anti-AU-1 Antikörper gegeben und C-FADD für weitere 2 h bei 4˚C immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen, mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-Aktin und anti-FADD Western Blot analysiert. IgG$_H$, Schwere Kette der Mausantikörper. (**B**) 3 x 10^7 BJAB Zellen wurden mit [^{35}S]Methionin über Nacht markiert, lysiert und, nach 2 x 60 min. Vorinkubation mit GST alleine (Daten nicht gezeigt), hintereinander für 60 min. mit GST (/), GST-C-FADD S194A (SA) und S194E (SE) inkubiert. Die Präzipitate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert

Der Phänotyp der SA transfizierten Zellen ähnelte dem von Typ II Zellen, wo FADD Rekrutierung gestört und von Aktin unabhängig ist. Es wurde daher untersucht, ob Aktin an FADD binden kann und ob diese Bindung von der FADD-Phosphorylierung an Serin 194 anhängig ist. Die mit dem AU-1 Markerpeptid versehenen C-FADD Konstrukte wurden daher mit einem anti-AU-1 Antikörper immunpräzipitiert und das Gel nach SDS-PAGE durch Western Blot Analyse auf assoziiertes Aktin überprüft (Abb. 35). Es zeigte sich dabei, daß Aktin mit dem Wildtyp koimmunpräzipitiert worden war. Die Bindung von SE erwies sich als deutlich stärker, während bei SA keine Assoziation festzustellen war. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurden BJAB Zellen metabolisch mit [^{35}S]Methionin/Cystein markiert, um Aktin mit den Fusionproteinen GST-C-FADD S194A und S194E immunzupräzipitieren (Abb. 35B). Eine große Menge Aktin konnte dabei an SE assoziiert gefunden werden, während SA nicht an Aktin band. GST-C-FADD S194E koimmunpräzipitierte außerdem ein ca. 200 kDa großes Protein, das bei SA kaum zu detektieren war. Dabei könnte es sich um ein Effektorprotein handeln, das an phosphoryliertes FADD bindet, oder um ein Aktin-bindendes Protein, das die Bindung von FADD an Aktin vermittelt, oder um ein Protein, das mit FADD gebundenem Aktin assoziiert.

Wie zuvor gezeigt, verhindert Inkubation von Zellen mit dem Breitband Serin/Threonin Kinaseninhibitor Staurosporin (STS) die Phosphorylierung von FADD. Um die Rolle von unphosphoryliertem endogenem FADD bei der DISC Bildung näher zu untersuchen, wurde die Typ I Zellinie SKW6.4 mit STS behandelt (Abb. 36). Dabei konnten wir nur unphosphoryliertes FADD detektieren. Interessanterweise wurde dabei, wie auch in Typ II Zellen, kein DISC gebildet. Basierend auf diesen Daten vermuten wir, daß die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 dessen direkte oder indirekte Bindung an Aktin vermittelt.

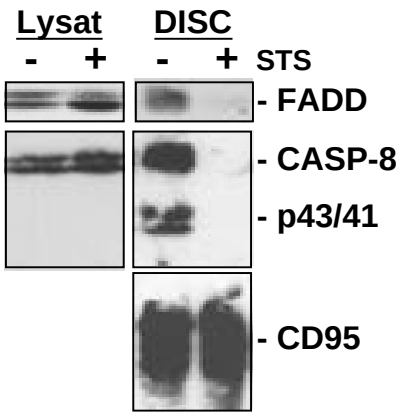


Abbildung 36: Staurosporin verhindert die Bildung des DISC. 3 x 10^7 SKW6.4 Zellen blieben entweder unbehandelt (-) oder wurden für 2 h mit 500 nM Staurosporin behandelt (+). Die Zellen wurden gewaschen und danach für 10 min. mit 2 µg / ml anti-APO-1 stimuliert. Die linke Abbildung zeigt das Lysat der Zellen vor Apoptose-Induktion. Der DISC wurde präzipitiert, die Produkte gewaschen und mit SDS-PAGE und Western Blot Analyse untersucht. CASP-8, Caspase-8; p43/41, Spaltprodukte von Caspase-8.

IV. Diskussion

FADD ist eines der Schlüsselmoleküle, das das apoptotische Signal der Todesrezeptoren CD95, TNF-RI, DR3, DR4 und DR5 in das Zellinnere überträgt. Da diese Rezeptoren selbst keinerlei enzymatische Aktivität besitzen, sind sie auf die Assoziation von Signalmolekülen an die intrazelluläre Todesdomäne angewiesen. FADD erfüllt diese Aufgabe als Adaptorprotein für die Cysteinylprotease Caspase-8. Daten von FADD defizienten Mäusen haben gezeigt, daß das Protein ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Ontogenese des Organismus spielt (Yeh et al., 1998; Zhang et al., 1998). Außerdem konnte durch transgene Expression der Deletionsmutante C-FADD in peripheren T Zellen gezeigt werden, daß FADD eine essentielle Rolle bei der Mitogen-induzierten Proliferation von T Zellen spielt (Newton et al., 1998). Dieser Effekt konnte auch in FADD defizienten T Zellen beobachtet werden (Zhang et al., 1998). Genauere Analysen wiesen die Dysregulation einer Reihe von Zellzyklusproteinen nach (Zhang et al., 2001). FADD wird außerdem von einer noch unbekannten Serin/Threoninkinase an Serinresten phosphoryliert (Kischkel et al., 1995; Zhang und Winoto, 1996). Die Bedeutung dieser Phosphorylierung war zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt. Da FADD offensichtlich in einer Mehrzahl von Signalwegen involviert ist, wurde zuerst die Phosphorylierungsstelle näher charakterisiert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und den verschiedenen Funktionen des Proteins in Apoptose und Zellzyklus herstellen zu können.

Die Phosphorylierung von FADD erfolgt *in vivo* ausschließlich an Serin 194

FADD enthält zwei Serincluster in seiner Aminosäuresequenz, eines am N-Terminus und ein weiteres am C-Terminus. Daher war die Phosphorylierungsstelle durch die Anwendung von Deletionsmutanten zuerst auf den C-Terminus eingegrenzt worden. Sequenzvergleiche zwischen dem humanen und dem murinen C-Terminus von FADD hatten ergeben, daß fünf Serinreste zwischen beiden Spezies konserviert sind. Mit Hilfe des Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörpers 1C4 (Scaffidi et al., 2000) konnte schließlich Serin 194 als Phosphorylierungsstelle von FADD identifiziert werden. Sie ist Teil eines MSP-Motifs, das gleichzeitig die zwischen Maus und Mensch am stärksten konservierte Region am C-Terminus von FADD darstellt. FADD wird in beiden Spezies an einem einzigen Serinrest spezifisch phosphoryliert (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997a; Zhang et al., 1998). Die Tatsache, daß mehrere phosphorylierte C-FADD Spezies nach Überexpression detektiert werden konnten, ist daher wahrscheinlich auf die unspezifische

Phosphorylierung der anderen Serinreste innerhalb des C-terminalen Serinclusters zurückzuführen.

Eine etablierte Methode für den Nachweis der Lokalisation und der Funktion einer Phosphorylierungsstelle ist der konservative Austausch eines Serinrestes durch einen Alaninrest. Bei Bcl-2 wurden z.B. sieben Serinreste durch Alanin ersetzt und die für die antiapoptotische Funktion des Proteins essentielle Stelle Serin 70 dadurch identifiziert (Ito et al., 1997). Auch das proapoptotische Molekül Bad konnte nach einer solchen Punktmutation an Serin 170 näher untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß die Phosphorylierung an dieser Stelle ein kritisches Ereignis ist, um die proapoptotische Aktivität von Bad zu inhibieren (Dramsi et al., 2002). Allerdings können nicht nur Kinasensubstrate durch eine solche Aminosäurenmutation verändert werden. Kinasen phosphorylieren sich oftmals selbst und werden dadurch aktiviert. Daher können Alaninsubstitutionen auch bei Kinasen helfen, die essentiellen Aminosäurereste zu identifizieren. Während Phosphorylierungsstellen mit einem Alaninrest inaktiviert werden können, besteht manchmal die Möglichkeit, durch die Mutation der Aminosäure einer Phosphorylierungsstelle zu Asparagin- bzw. Glutaminsäureresten, und damit durch das Einbringen einer negativen Ladung, eine Phosphorylierung zu imitieren (z.B. Ito et al., 1997; Weng et al., 1998; Dimmeler et al., 1999; Dramsi et al., 2002).

Nach Mutation von Serin 194 zu Alanin (S194A) konnte C-FADD sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* nur noch in der unphosphorylierten Form detektiert werden. Dies unterstreicht die Spezifität dieser Phosphorylierungsstelle. Es muß angemerkt werden, daß sich die Phosphorylierung von FADD nach Aktivierung des CD95 Rezeptors nicht änderte. Unbehandelte Zellen zeigten die gleiche Verteilung von unphosphoryliertem und phosphoryliertem Protein, wie mit dem anti-CD95 Antikörper anti-APO-1 unterschiedlich lange stimulierte Zellen. Die Phosphorylierung von FADD beeinflußte dabei nicht die Aktivität der Todesdomäne, die sich am C-Terminus von FADD befindet. Zusätzlich schien die Phosphorylierung die Funktion von FADD während CD95 vermittelter Apoptose nicht zu beeinflussen. Die Rekonstitution von FADD defizienten Jurkat Zellen (Typ II Zellen) mit FADD oder der C-terminalen Deletionsmutante FADDΔC ergab in beiden Fällen die gleiche Sensitivität gegenüber CD95 vermittelter Apoptose (Scaffidi et al., 2000). Auch die mit C-FADD Wildtyp oder verschiedenen Deletions- und Punktmutanten von C-FADD im Laufe dieser Arbeit stabil transfizierten BJAB Zellen zeigten nach Induktion von Apoptose durch den CD95 Rezeptor keine Unterschiede in ihrer Resistenz gegenüber CD95 vermittelter Apoptose. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, daß die Phosphorylierung keine Rolle bei der Bindung von FADD an den CD95 Rezeptor spielt.

FADD ist aber nicht nur das Adaptormolekül für den CD95 Rezeptor, sondern auch für TNF-RI, DR3, DR4 und DR5 (Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996a; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000; Bodmer et al., 2000). Die Daten können daher nicht ausschließen, daß die Phosphorylierung von FADD wichtig für die Signaltransduktion der anderen Todesrezeptoren ist. Der Signalapparat kann zwar in

allen Fällen ähnlich sein, muss aber nicht identisch funktionieren. Bei TNF-RI ist z.B. noch keine direkte Interaktion von FADD mit dem Adaptormolekül TRADD oder TNF-RI selbst gezeigt worden (Shu et al., 1997). Der Mechanismus, wie FADD das TNF-RI vermittelte Signal übermittelt, scheint daher unterschiedlich zu sein und könnte die Phosphorylierung von FADD benötigen.

Die Suche nach der FADD Kinase

Es war gezeigt worden, daß FADD an der Zellzyklusregulation von T Zellen beteiligt ist (Newton et al., 1998; Zhang et al., 1998). Um zu testen, ob die Phosphorylierung von FADD der Zellzykluskontrolle unterliegt, waren Zellen entweder in G1/S oder G2/M arretiert und der Phosphorylierungsstatus von FADD im Western Blot analysiert worden. Dabei zeigte sich, daß FADD in G2/M phosphoryliert vorlag, während in der G1/S Phase nur unphosphoryliertes FADD detektiert werden konnte. Diese Entdeckung stellte den ersten konkreten Zusammenhang zwischen FADD und dem Zellzyklus her. Der Effekt konnte im Folgenden nicht nur mit Hydroxyharnstoff oder Nocodazol beobachtet werden. Ein Doppelthymidinblock, die Behandlung von Zellen mit Taxol und die Auftrennung von asynchron wachsenden Zellen mittels Elutration erbrachten das gleiche Ergebnis.

Auch das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wird im Verlauf des Zellzyklus an Serin- und Threoninresten phosphoryliert (Huang et al., 1997; Ito et al., 1997; Scatena et al., 1998; Ling et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Thomas et al., 2000; Furukawa et al., 2000). Es konnte dabei gezeigt werden, daß die Phosphorylierung sowohl pro-apoptotisch, als auch Zellzyklus-inhibitorisch in G2/M wirken kann. Der Zellzyklus-arretierende Effekt kann dabei von der anti-apoptotischen Funktion des Proteins getrennt werden (Huang et al., 1997; Furukawa et al., 2000). Bcl-2 verhinderte so den Wiedereintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus oder beschleunigte den Austritt proliferierender Zellen aus dem Zellzyklus nach G0. Dies verdeutlicht den Einfluss, den die Phosphorylierung eines einzelnen Proteins auf die gesamte Zelle haben kann. Viele verschiedene Kinasen sollen an der Phosphorylierung von Bcl-2 beteiligt sein: JNK/SAPK, MAPK, Raf-1, p54-SAPKβ, die cAMP-abhängige Kinase, cdc2/CyclinB und v-Cyclin-CD6. Bcl-2 wird dabei an mindestens vier verschiedenen Stellen phosphoryliert, wobei den einzelnen Phosphorylierungsstellen separate Aufgaben zukommen. Bei FADD konnte dagegen nach Punktmutation von Serin 194 zu Alanin nur noch eine Isoform, nämlich das unphosphorylierte FADD Protein, detektiert werden. Allerdings gestaltet sich die Suche nach der Kinase, die FADD phosphoryliert, ähnlich schwierig wie bei Bcl-2.

In Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß FADD mit einer ca. 70 kDa großen Kinase assoziiert. Dieses Molekulargewicht konnte mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen offenbarten, daß die Phosphorylierung von FADD durch den Zellzyklus reguliert wird. Die Kinasenaktivität war dabei in der G2/M Phase am höchsten, wodurch die

Phosphorylierung von FADD in diesem Zellzyklusabschnitt erklärt werden kann. Dabei ist noch ungeklärt, ob die Kinase in G2/M aktiviert vorliegt, oder ob nur in diesem Zellzyklusabschnitt die Möglichkeit für die Kinase besteht, räumlich mit ihrem Substrat zu interagieren.

Viele Zellzyklus-regulierte Kinasen phosphorylieren Prolin-gerichtet (Hall et al., 1991). Da im humanen und murinen FADD ein Prolin in einem MSP-Motif konserviert vorlag, wurden verschiedene rekombinante Kinasenkomplexe, die in der G2/M Phase des Zellzyklus aktiv sind, auf ihre Fähigkeit untersucht, FADD phosphorylieren zu können. Allerdings sind klassische Zellzykluskinasen wie cdc2 und cdk2 wesentlich kleiner (ca. 33 kDa). Die getesteten cdc2/cdk2/Cyclinkomplexe waren daher nicht in der Lage, FADD als Substrat zu phosphorylieren (Daten nicht gezeigt). Polokinasen stellen eine weitere Familie von Zellzykluskinasen dar, von denen einige in der G2/M Phase des Zellzyklus aktiv sind. Die getesteten Familienmitglieder Snk, Plk und Prk haben zwar in etwa das erwartete Molekulargewicht, konnten jedoch ebenfalls nicht mit FADD assoziiert gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

HIP-Kinasen und die Phosphorylierung von FADD

Bei HIP-Kinasen ("Homeo-domain interacting kinase") handelt es sich um Kofaktoren, die mit Homeoproteinen interagieren und die Repressoraktivität von NK-Homeoproteinen potenzieren. Insgesamt sind drei Kinasen dieser Familie bekannt: HIPK1, HIPK2 und HIPK3 (Kim et al., 1998). Sie lokalisieren zum Großteil in nuklearen Strukturen (PML und nukleare Domäne), zeigen aber auch eine diffuse cytoplasmatische Verteilung in Immunfluoreszenzfärbungen. FIST/HIPK3 wurden über "yeast-two-hybrid" Studien identifiziert, in denen die cytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 183-306) von murinem CD95 als Köder verwendet worden war (Rochat-Steiner et al., 2000). Rochat-Steiner und Kollegen hatten berichtet, daß Überexpression dieser Kinase zur Phosphorylierung von FADD führt, und daß die Phosphorylierung an oder nahe bei Serin 194 stattfindet, da eine C-terminale Deletionsmutante von FADD (Δ191-208) nicht mehr phosphoryliert vorlag. Obwohl alle HIP-Kinasen in 293T Zellen exprimiert vorlagen, konnte in unseren Experimenten keine erhöhte FADD Phosphorylierung detektiert werden. In *in vitro* Kinase Tests mit FIST/HIPK3 und GST-FADD wurde zumindest eine schwache Phosphorylierung von FADD beobachtet (Rochat-Steiner et al., 2000). In Zusammenarbeit mit Yongsok Kim (NIH, USA) wurden daher *in vitro* Kinase Tests mit rekombinanten HIP-Kinasen und GST-C-FADD Wildtyp bzw. verschiedenen Punkt-oder Deletionsmutanten von GST-C-FADD als Substrat durchgeführt. Dabei konnte keine Phosphorylierung von FADD beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine direkte Assoziation von FADD mit HIPK3 konnte in Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden. Die Autoren erwägen allerdings, daß es sich um eine unbekannte Kinase handeln könnte, die erst von FIST/HIPK3 aktiviert wird und anschließend in der Lage ist FADD zu phosphorylieren. Es bleibt

daher abzuwarten, ob FIST/HIPK3 tatsächlich an der Phosphorylierung von FADD beteiligt ist.

JNK/SAPK

Viele Phosphorylierungen in der Zelle sind auf Stressfaktoren zurückzuführen. Von der Stress-aktivierten Kinasenfamilie sind drei Mitglieder identifiziert worden: JNK1/SAPKγ, JNK2/SAPKα und JNK3/SAPKβ (Kyriakis et al., 1994; Derijard et al., 1994). Sie besitzen je nach Splicevariante ein Molekulargewicht zwischen 46 und 54 kDa, sind in der katalytischen Domäne zu 85 % identisch und werden durch Cytokine, verschiedene Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Reagenzien, die mit DNA- und Proteinsynthese interferieren und Wachstumsfaktoren aktiviert. Um zu testen, ob Stressfaktoren die Phosphorylierung von FADD beeinträchtigen können, war diese Kinase auf ihre Fähigkeit untersucht worden, FADD zu phosphorylieren oder den Signalweg für die Phosphorylierung von FADD zu aktivieren. Die Behandlung von Zellen mit Anisomycin, einem klassischen Aktivator von SAP Kinasen, bewirkte trotz Aktivierung von JNK/SAPK keine Veränderung im Phosphorylierungsstatus von FADD. Da die Kinasen ein kleineres Molekulargewicht besitzen als das in verschiedenen Experimenten assoziiert gefundene Phosphoprotein, und durchweg im Zellzyklus aktiv vorliegen, konnte diese Gruppe als potentielle FADD Kinase ausgeschlossen werden.

Proteinkinase C (PKC)

Bei diesen Proteinkinasen handelt es sich um eine Gruppe von Isozymen, die durch Ca^{2+}, Diacylglycerol (DAG), verschiedene Lipide wie z.B. Phosphatidylserin und PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat) aktiviert werden (Liu und Heckman, 1998). Sie lokalisieren im Cytoplasma und können in drei Gruppen unterteilt werden: in konventionelle, nicht-konventionelle und atypische PKCs. Sie phosphorylieren Serin/Threoninreste z.B. von Lamin A, B und C und spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und im Zellzyklus. Die Aktivierung von PKC durch PMA inhibiert CD95 vermittelte Apoptose (Copeland et al., 1994; Clement und Stamenkovic, 1996; Rudert et al., 1997; Cuvillier et al., 1998). Eine Studie zeigte, daß dieser Effekt auf die Inhibition der Rekrutierung von FADD an den CD95 Rezeptor von Typ I und Typ II Zellen zurückzuführen ist (Gomez-Angelats und Cidlowski, 2001). Die Inhibition von cPKC's führte zu einer schnellen Zunahme von FADD im DISC, weswegen PKC nach diesem Modell die DISC Bildung des CD95 Rezeptors modulieren soll. Andere Gruppen konnten einen generellen Effekt in Typ I und Typ II Zellen allerdings nicht bestätigen und zeigten, daß die Aktivierung von PKC zu einer verminderten FADD Bindung an den CD95 Rezeptor (Meng et al., 2002), bzw. zu einer reduzierten Prozessierung von BID führt (Scaffidi et al., 1999a), wobei

Apoptose aber nur in Typ II Zellen inhibiert ist. Obwohl das Molekulargewicht von 74-76 kDa der Größe der gefundenen FADD Kinase ungefähr entspricht, ist eine Beteiligung von PKC an der Phosphorylierung von FADD unwahrscheinlich. Die Aktivierung der PKC durch PMA in Jurkat Zellen bewirkte keine Veränderung der Phosphorylierung von FADD (Scaffidi et al., 2000 und Elizabeth Alappat, persönliche Mitteilung). Auch die Aktivierung von ruhenden T Zellen mit PMA und dem Calciumionophor Ionomycin hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)

PI3K ist ein Schlüsselbestandteil des Insulin-Signalwegs (Cheatham und Kahn, 1995; Shepherd et al., 1998). Die Lipidkinase wird aktiviert, wenn SH2 Domänen ihrer p85 regulatorischen Untereinheit an spezifische Tyrosin-phosphorylierte Reste des Insulinrezeptor Substrats (IRS) binden. PI3K phosphoryliert die D3 Position des Inositolrings der Phosphoinositide, wodurch potentielle sekundäre Botenstoffe gebildet werden, die wiederum an der Aktivierung der Proteinkinase B und $p70^{S6k}$ beteiligt sind (Marte und Downward, 1997; Pullen et al., 1998). Der PI3K Signalweg ist beteiligt an der Glucoseaufnahme, der Aktivierung der Glykogensynthese, der Inhibition der Lipolyse, der Kontrolle der Proteinsynthese und an der Inhibition von Apoptose (Cheatham und Kahn, 1995; Shepherd et al., 1998). Untersuchungen mit dem PI3K Inhibitor Wortmannin ergaben ebenfalls keine Veränderung im Phosphorylierungsstatus von FADD (Scaffidi et al., 2000).

RIP

Die Serin/Threonin Proteinkinase RIP (für “Receptor-interacting Protein”) wurde, wie schon FADD (Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995) mittels des "yeast-two-hybrid Systems" als CD95 bindendes Protein identifiziert (Stanger et al., 1995). Überexpression dieser Proteine führt wahrscheinlich durch unphysiologische Assoziation zu Apoptose. Außer *rip* wurden noch zwei weitere Gene mit Homologien identifiziert, welche folglich *rip2* (McCarthy et al., 1998) und *rip3* (Sun et al., 1999) genannt wurden. RIP hat ein Molekulargewicht von ca. 74 kDa und lokalisiert wie RIP2 im Cytoplasma, RIP3 dagegen in den Mitochondrien. Alle RIP Familienmitglieder besitzen eine N-terminale Kinasendomäne, die Serin/Threoninreste phosphorylieren kann, und entweder eine C-terminale DD (RIP), eine CARD (für “Caspase activation and recruitment domain”) (RIP2), oder eine Domäne für die Interaktion mit RIP (RIP3). Da FADD und RIP an den CD95 Rezeptor binden können, RIP das erwartete Molekulargewicht besitzt und eine Serin/Threonin Kinasenaktivität besitzt, wurde diese Proteinkinase auf ihre Fähigkeit untersucht, FADD zu phosphorylieren. Da in RIP defizienten Jurkat Zellen (Holler et al., 2000) phosphoryliertes FADD in Western Blot Analysen von Zellysaten

nachgewiesen werden konnte, und GST-C-FADD in *in vitro* Kinase Tests als Substrat phosphoryliert vorlag, konnte RIP jedoch als FADD Kinase ausgeschlossen werden.

$p70^{S6k}/p85^{S6k}$

$p70/p85^{S6k}$ ist ein kritisches Enzym für die Zellzyklusprogression durch die G1-Phase des Zellzyklus (Lane et al., 1993; Reinhard et al., 1994). Je nach Spliceform besitzt sie ein Molekulargewicht von 70 bzw. 85 kDa. Die p70 Spliceform lokalisiert hauptsächlich im Cytoplasma, wohingegen $p85^{S6k}$ eine NLS besitzt und damit hauptsächlich nuklear vorzufinden ist (Reinhard et al., 1994; Coffer et al., 1994). Damit stellte sie eine potentielle Kinase für die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 dar. Es handelt sich um eine Insulin/Mitogen aktivierte Serin/Threonin Proteinkinase, deren Hauptsubstrat das 40S ribosomale Protein S6 ist. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Translation einer Subklasse von mRNAs, die eine kurze Oligopyrimidinsequenz direkt hinter der Transkriptionsstartseite enthalten. Sie wird nach verschiedenen Stimuli an mehr als zehn Phosphorylierungsstellen durch verschiedene Kinasen aktiviert. Rapamycin inhibierte zwar die Aktivität von $p70^{S6k}$, hatte jedoch keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von FADD. Da auch Überexpression von p70 in 293T Zellen nicht zu einem Anstieg der Phosphorylierung führte, und keine Assoziation mit FADD nachgewiesen wurde, konnte auch diese Kinase als FADD Kinase ausgeschlossen werden.

DRAK2

Steve Hedricks (Berkeley, USA) hatte vor kurzem berichtet, daß DRAK2 (für "DAP Kinase related apoptosis inducing protein kinase 2") in "yeast-two-hybrid" Studien mit FADD interagiert (persönliche Mitteilung). DRAK2 war daher als mögliche FADD Kinase in unserem System getestet worden. DRAK2 ist verwandt mit DAP Kinasen ("Death associated protein kinases") und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Eine andere Studie hatte zuvor in Immunpräzipitationen aus EL-4 und P815 Mauszellysaten mit Hilfe eines GST-Konstrukts des CD95 Rezeptors eine ca. 43 kDa großen Kinase nachgewiesen, die in der Lage war, FADD zu phosphorylieren (Kennedy und Budd, 1998). Bei DRAK2 handelt es sich weiter um eine Serin/Threonin Kinase, die hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist. Überexpression von DRAK2 in NIH/3T3 Zellen führte zu morphologischen Veränderungen, die für Apoptose typisch sind (Sanjo et al., 1998). Allerdings konnte diese Kinase in Immunpräzipitationen nicht mit FADD assoziiert gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Selbst nach Überexpression der von uns klonierten DRAK2 in 293T Zellen war keine Zunahme bei der Phosphorylierung von FADD erkennbar (Daten nicht gezeigt). Auch die Depletion von DRAK2 aus Zellysaten führte immer noch zur Phosphorylierung von GST-C-FADD. Es wäre zwar möglich, daß kleinste Mengen an DRAK2 noch ausreichten, um GST-C-FADD

zu phosphorylieren. Da die FADD Kinase jedoch an C-FADD bindet und DRAK2 nicht einmal nach Überexpression mit C-FADD assoziiert war, sprechen die Daten gegen DRAK2 als FADD Kinase.

Zur Zeit werden daher Anstrengungen in unserem Labor unternommen, um die Kinase mit Hilfe von Affinitätssäulen anzureichern und schließlich zu identifizieren. Durch die im Laufe dieser Arbeit hergestellten GST-Fusionsproteine und die über die Bindungsdomäne gewonnenen Erkenntnisse sind die Voraussetzungen geschaffen worden, um spezifisch an den C-Terminus von FADD bindende Kinasen zu isolieren.

FADD wird in den Nukleus transportiert – oder transloziert die Kinase in das Cytoplasma ?

Experimente, in denen Zellen subzellulär fraktioniert worden waren, zeigten, daß die Hauptaktivität der FADD Kinase im Nukleus lokalisiert. FADD ist bisher jedoch nur als cytoplasmatisches Protein beschrieben worden. Die Frage, die sich folglich stellt ist, wo FADD phosphoryliert wird. Zwei Szenarien sind dabei denkbar. FADD könnte in der Lage sein, durch aktiven oder passiven Kerntransport in den Nukleus zu gelangen, um dort phosphoryliert zu werden. Es ist z.B. bekannt, daß Proteine mit einem Molekulargewicht unter 60 kDa passiv durch den nuklearen Porenkomplex diffundieren können. Immunfluoreszenzfärbungen mit dem 1C4 Antikörper (Scaffidi et al., 2000), der nur unphosphoryliertes FADD erkennt, deuteten auf eine rein cytoplasmatische Lokalisation hin. Das gleiche Ergebnis wurde mit dem kommerziell erhältlichen anti-FADD Antikörper erzielt, der beide FADD Formen unabhängig vom Phosphorylierungszustand erkennt (Daten nicht gezeigt). Allerdings könnte es sein, daß es sich bei dem Vorgang um einen sehr dynamischen Prozeß handelt, so daß die Menge an nuklearem phosphoryliertem FADD unterhalb der Detektionsgrenze dieser Methode liegt und somit nicht nachgewiesen werden kann. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung gestützt, wonach FADD eine nukleare Lokalisierungssequenz (NLS) in der DED besitzen soll (M. Gomez-Angelats, NIH, persönliche Mitteilung). Dabei handelt es sich um eine Reihe basischer Aminosäuren, die den Transport von FADD in den Nukleus bewirken könnten. Auch eine andere Gruppe hat Anzeichen dafür gefunden, daß sich FADD im Nukleus befindet und dort phosphoryliert vorliegt. Nach diesen Erkenntnissen interagiert FADD mit Exportin-5, einem mit CRM1 verwandten Transportrezeptor, der für den Export von Proteinen aus dem Nukleus in das Cytoplasma zuständig ist (Steven Frisch, Burnham Institute, persönliche Mitteilung). Ein Teil dieser Daten wurde allerdings mit einem für FADD Serin 194 Phospho-spezifischen Antikörper erhalten. Dieser Antikörper wurde schon während der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenzfärbungen in FADD defizienten Jurkat Zellen auf seine Spezifität hin untersucht. Dabei zeigte sich, daß der Antikörper unspezifisch an ein nukleares

Protein binden muss, da zwischen FADD exprimierenden und FADD defizienten Zellen kein Unterschied in der Immunfärbung zu erkennen war (Daten nicht gezeigt).

Überraschenderweise wurde das Adaptorprotein TRADD vor kurzem im Nukleus gefunden (Morgan et al., 2002). TRADD spielt eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Signalmolekülen an den DISC des aktivierten TNF-RI. Die Untersuchungen ergaben, daß TRADD nukleare Import- und Exportsequenzen enthält, die es dem Protein ermöglichen, zwischen Cytoplasma und Nukleus hin und her zu wechseln. Der Export scheint CRM1-abhängig zu sein. Die Behandlung von Zellen mit Leptomycin B bewirkte eine Akkumulation von TRADD in PML-ähnlichen (für "promyelocytic leukemia protein") Strukturen im Nukleus. Im Laufe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nukleares TRADD einen Apoptosesignalweg initiieren kann, der sich von dem unterscheidet, an dem cytoplasmatisches TRADD beteiligt ist. Es bleibt daher abzuwarten, ob FADD in den Nukleus translozieren kann, um dort an alternativen Signalwegen teilzunehmen.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Kinase aus dem Nukleus in das Cytoplasma transloziert und dort FADD bindet und phosphoryliert. GST-C-FADD wurde z.B nach Inkubation in post-nuklearem Zellysat von BJAB Zellen in *in vitro* Kinase Tests phosphoryliert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist, daß die Kinase zumindest in geringen Mengen im Cytoplasma vorhanden ist.

Für die Interaktion zwischen FADD und der Kinase wird keine funktionelle Todesdomäne benötigt

Immunpräzipitationen aus Zellysaten mit verschiedenen Deletionsmutanten von C-FADD hatten ergeben, daß die Bindedomäne der Kinase im Bereich der Aminosäuren 142-189 der C-terminalen Hälfte der DD von C-FADD liegt. Damit schied der gesamte N-Terminus, der die DED von FADD enthält, gänzlich als essentielle Protein-Protein-Interaktionsdomäne für die Kinase aus. Um zu testen, ob es sich für die Interaktion der Kinase mit C-FADD an der C-terminalen DD um eine funktionelle Todesdomäne handeln muss, wurde die Punktmutante C-FADD mt verwendet. Bei dieser Punktmutation ist die Schlüsselaminosäure Valin 121 mutiert, wodurch FADD nicht mehr in der Lage ist, an den CD95 Rezeptor zu binden (Jeong et al., 1999). Die Kinase konnte jedoch mit dieser C-FADD Mutante assoziieren und phosphorylierte GST-C-FADD mt in *in vitro* Kinase Tests. Obwohl es sich bei Valin 121 um eine essentielle Aminosäure in der DD handelt, kann damit noch nicht ausgeschlossen werden, daß die Kinase selbst keine funktionelle DD besitzt, die für die Bindung an FADD benötigt wird. Es wäre denkbar, daß die Kinase noch unbekannte Schlüsselaminosäuren in der FADD-Sequenz der DD vorfinden muss, um mit FADD interagieren zu können. Interessant ist die Tatsache, daß die Phosphorylierungsstelle selbst für die Assoziation zwischen Kinase und FADD nicht vorhanden sein muss. Immunpräzipitationen mit C-FADD ΔC verdeutlichten, daß die Kinase nur den C-terminalen Bereich der DD benötigt. Diese Erkenntnis ist für die

Aufreinung der Kinase durch Affinitätssäulen von großer Wichtigkeit, da nun ein sehr kurzes Peptid für die Affinitätsaufreinigung der Kinase benutzt werden kann. Dies sollte die unspezifische Bindung von Kinasen und anderen Proteinen an die FADD-Sequenz verringern und somit zu einer schnelleren Anreicherung der Kinase führen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit gemachte Beobachtung, daß die Kinase in der G2/M-Phase des Zellzyklus aktiv vorliegt und vorrangig im Nukleus lokalisiert, wird helfen, die Identität der Kinase schneller offenzulegen.

Die Bedeutung der Phosphorylierung von C-FADD an Serin 194

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Überexpression von C-FADD in der epithelialen nicht-Tumorzellinie MCF-10A zu einem Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus führt. Auch in spontan immortalisierten murinen Fibroblasten wie NIH/3T3 war ein wesentlich verlangsamtes Zellwachstum nach Expression von C-FADD detektiert worden (Hueber et al., 2000). Vergleiche mit der epithelialen Tumorzellinie MCF-7 bestätigten frühere Vermutungen, wonach der Zellzyklus-inhibitorische Effekt von C-FADD nur in nicht-Tumorzellen beobachtet werden kann (Newton et al., 1998). Dies wird weiterhin durch die Beobachung gestützt, daß stabil C-FADD exprimierende BJAB Zellen keine Veränderung in ihrer Proliferation zeigten (Daten nicht gezeigt). Dabei machte es keinen Unterschied, ob es sich bei dem Transgen um das C-FADD Wildtyp Protein oder die S194A, S194E oder ΔC Mutante handelte. Zusammen mit den Erkenntnissen von T Zell Experimenten aus C-FADD transgenen und FADD defizienten Mäusen ergibt sich daher eine zentrale Rolle für das FADD Molekül in der Zellzyklusregulation (Newton et al., 1998; Zörnig et al., 1998; Walsh et al., 1998; Zhang et al., 1998; Zhang et al., 2001).

Die Synchronisation von MCF-10A Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus ist auf die Phosphorylierung des C-FADD Proteins zurückzuführen (Abb. 29). Je mehr Zellen sich in der G2/M Phase befanden, um so mehr phosphoryliertes FADD konnte mittels anti-FADD Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Fund, daß FADD in G2/M zyklierenden Zellen phosphoryliert vorliegt und die Kinase in diesem Zellzyklusabschnitt aktiv ist. Da die Punktmutanten S194A und S194E den Arrest nicht induzieren konnten, muss es die Phosphorylierung des intakten Serinrestes im C-FADD Wildtyp Molekül sein, die das Abrunden der MCF-10A Zellen hervorruft. Es gibt daher eine direkte Verbindung zwischen der Phosphorylierungsstelle von C-FADD und dem Zellzyklusarrest. Interessant ist die Tatsache, daß die S194E Mutante keinen Einfluß auf den Zellzyklus zeigte, denn in manchen Fällen kann die Punktmutation einer Phosphorylierungsstelle zu einem Glutaminsäurerest oder Aspartatrest eine Phosphorylierung imitieren und dadurch zu einem konstitutiv aktiven Protein führen (siehe oben). Da C-FADD S194E exprimierende Zellen weiter proliferierten, scheint eine negative Ladung an dieser Aminosäurenposition allein nicht auszureichen, um den Proliferationsstop zu bewirken. Es ist wahrscheinlich, daß FADD nach

Phosphorylierung an Serin 194 mit anderen Proteinen interagieren muss, um eine Signalkaskade zu starten, wodurch der Zellzyklusarrest ausgelöst wird. Es ist auch noch anzumerken, daß alle C-FADD Konstrukte in gleichem Maße in MCF-10A und MCF-7 Zellen exprimiert vorlagen (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede sind folglich nicht auf eine unterschiedliche Proteinexpression zurückzuführen.

Der Phänotyp der drei bis sechs Tage transduzierten Zellen, nämlich das Abrunden der C-FADD exprimierenden MCF-10A Zellen, könnte als Vorstufe zu Apoptose oder Anoikis gedeutet werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Während jedoch immer mehr Zellen im Verlauf der Kinetik eine Zunahme in ihrem G2/M Profil zeigten, konnte keine Veränderung in der subdiploiden Fraktion, die durch Endonukleasen degradierte DNA repräsentiert, gefunden werden. Immunfluoreszenzfärbungen und die mikroskopische Betrachtung von C-FADD transduzierten Zellen zeigte ebenfalls keine Chromatinkondensation auf (Daten nicht gezeigt). Da in Western Blot Analysen auch keine aktiven Caspasen Untereinheiten nachgewiesen werden konnten, und C-FADD die Signaltransduktion aller bekannten Todesrezeptoren, und damit die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 inhibiert, können die typischen Apoptosesignalwege der Todesrezeptoren als Ursache für die morphologische Veränderung ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu ist berichtet worden, daß C-FADD in nicht-tumoralen Prostataepithelzellen Caspasenaktivität und Apoptose induzieren kann (Morgan et al., 2001). Dabei kontraktierten die Zellen, rundeten sich ab, zeigten Chromatinkondensation, Phosphatidylserinwechsel auf die extrazelluläre Matrixseite und Membran “Blebbing”. Diese Effekte konnten in nicht-Epithelzellen und Prostatatumorzellen nicht beobachtet werden. Bei Anoikis dagegen handelt es sich um eine spezielle Form der Apoptose, die durch inadequate oder fehlende Zell-Matrix Interaktionen induziert wird. Auch diese Art von Zelltod kann durch C-FADD inhibiert werden (Frisch et al., 1999; Rytomaa et al., 1999), was zumindest auf die Beteiligung von Todesrezeptoren oder von Proteinen mit funktionellen DD’s schließen läßt (Frisch und Screaton, 2001).

Obwohl keine aktiven Caspasenuntereinheiten detektiert werden konnten, wurde Caspase-3 nach Transduktion von MCF-10A Zellen mit AdV-C-FADD höher exprimiert vorgefunden. Da es sich dabei um das Zymogen der Protease handelte, stellt sich die Frage nach der Funktion von Caspase-3 in den Signalwegen, die schließlich zu einem Proliferationsstop führen. Es ist anzumerken, daß MCF-7 Zellen, die keine Veränderungen nach C-FADD Expression zeigten, aufgrund einer Gendeletion keine Caspase-3 besitzen (Jänicke et al., 1998). Da der Proliferationsarrest aber auch in anderen Tumorzellinien, die Caspase-3 exprimieren, nicht zu beobachten war, kann der Effekt zumindest nicht komplett auf das Fehlen von Caspase-3 zurückgeführt werden. Außerdem kann Caspase-7 in vielen Fällen für fehlende Caspase-3 kompensieren.

Auch die Hochregulation von DRAK2 war nicht erwartet worden. Die Proteinkinase war mittels “yeast-two-hybrid” Studien identifiziert und kloniert worden. Zusätzlich gibt es Daten, wonach DRAK2 mit FADD interagieren soll (Steve

Hedricks, Berkeley, persönliche Mitteilung). Dies würde eine Interaktion oder Regulation zwischen FADD und DRAK2 erklären. FADD besitzt jedoch keine bekannte Funktion als Regulator für die Transkription oder Translation von Proteinen. Vielleicht interagiert FADD unter bestimmten Voraussetzungen mit DRAK2 und stabilisiert dadurch das Protein oder schützt es vor der Proteolyse durch das Proteasom. Möglich wäre auch, daß FADD im Nukleus phosphoryliert vorliegt und mit anderen Proteinen interagiert, die wiederum als Transkriptions- oder Translationsfaktoren agieren. Es müssen daher noch weitere Experimente in anderen nicht-Tumorzellinien durchgeführt werden, um die Relevanz der Hochregulation dieser zwei Proteine zu klären.

Die Inhibition der Proliferation von C-FADD transduzierten T Zellen beruht auf der Phosphorylierung an Serin 194

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß adenoviral transduziertes C-FADD nicht nur in MCF-10A Zellen anti-proliferativ wirken kann, sondern auch in aufgereinigten $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen. Diese T Zellen stammten aus Mäusen, die nicht mit dem C-FADD Transgen verändert worden waren. Dies war wichtig, da gezeigt worden ist, daß die Signaltransduktion durch FADD essentiell für die Regulation der Apoptose in Vorläuferzellen von T Zellen in der prä-T-Zellrezeptor Entwicklungsstufe ist (Newton et al., 2000). Auch die Thymocytenentwicklung ist verlangsamt und es fehlen normale T Zell Populationen (Walsh et al., 1998). C-FADD verstärkte außerdem die negative Selektion von autoreaktiven Lymphknotenzellen durch erhöhte Apoptose (Newton et al., 1998).

Ruhende B und T Zellen lassen sich generell nur sehr uneffizient transfizieren. Um daher die Prozesse näher charakterisieren zu können, die z.B. für Proliferation, Differenzierung oder Zelltod verantwortlich sind, mussten Methoden entwickelt werden, mit denen Gene auch in solche Zellen transferiert werden können. Retroviren sind zwar in der Lage, den Transfer von Genen in vielen verschiedenen Zelltypen zu bewirken. Allerdings funktioniert diese Art der Transduktion nur bei proliferierenden T Zellen. Adenoviren können ebenfalls eine Reihe von verschiedenen Zellinien infizieren, wobei gewöhnlich die ganze Zellpopulation das Transgen aufnimmt und die Expression des Proteins oft schon nach 5 Stunden nachgewiesen werden kann. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Zellen ruhen oder zyklieren. Lymphocyten sind leider gerade dafür kaum empfänglich, da ihnen der für die Bindung des Adenovirus an die Zellmatrix notwendige Rezeptor fehlt oder nur in geringen Mengen exprimiert wird (Chu et al., 1992; Neering et al., 1996; DeMatteo et al., 1997). Versuche mit dem sogenannte Coxsackie und Adenovirus Rezeptor (CAR) hatten gezeigt, daß die ektope Expression von CAR auf Lymphocyten und anschließende Infektion mit rekombinanten Adenoviren zur effizienten Transduktion der Zellen führt (Leon et al., 1998; siehe auch Abb. 31). Die Gruppe um James DeGregori (University of Colorado, USA) erzeugte deshalb CAR transgene Mäuse, in denen CAR ausschließlich im T Zellkompartiment exprimiert wird (Wan et al., 2000). Dadurch

gelang es ihnen, verschiedene Gene in naïve T Zellen zu transduzieren und deren Wirkung auf die Proliferation der CAR transgenen T Zellen zu beobachten. Da C-FADD anti-proliferativ wirkt und dabei den Übergang von G0 zu G1 im Zellzyklus inhibieren soll (Zörnig et al., 1998; Walsh et al., 1998; Newton et al., 1998; Hueber et al., 2000), waren diese T Zellen als Modell für unsere Untersuchungen gewählt worden.

Die aus CAR transgenen Mäusen isolierten T Zellen waren über die Dauer von 4 Tagen mit CD3/CD28 stimuliert und das Wachstum mit Hilfe von [^{3}H]Thymidin untersucht worden. Alle C-FADD transduzierten Zellen (Wildtyp, S194A und S194E) hatten dabei deutlich niedrigere Werte erreicht als unbehandelte und mit Kontrollvirus infizierten T Zellen. Während C-FADD S194A und S194E exprimierende Zellen immer noch ein stetiges Wachstum anzeigten, hatten die Wildtyp Zellen in der Proliferation stagniert. Dieses Ergebnis war identisch in zwei unabhängigen Experimenten, so daß der Phosphorylierung von C-FADD wiederum die Funktion des Zellzyklusarrests zugeschrieben werden kann. Die übrigen Domänen von C-FADD bewirken aber zumindest eine Verlangsamung der Proliferation in T Zellen. Es waren auch hier keine Unterschiede in der Expression zwischen den verschiedenen adenoviralen C-FADD Konstrukten festgestellt worden. Es müssten allerdings noch längere Kinetiken durchgeführt werden, um zu sehen, wie sich die S194A und S194E exprimierenden T Zellen nach Tag 4 im Wachstum verhalten und ob die Wildtyp C-FADD transgenen Zellen in diesem Zustand stagnieren oder für Apoptose bzw. andere Zelltodformen typische morphologische Veränderungen aufzeigen.

Mehrere Gruppen konnten bisher einen Zellzyklus-inhibierenden Effekt von C-FADD in T Zellen beobachten (Zörnig et al., 1998; Walsh et al., 1998; Newton et al., 1998; Hueber et al., 2000). Es wurde dabei gezeigt, daß C-FADD transgene T Zellen nach Stimulierung mit verschiedenen Mitogenen ein wesentlich reduziertes Wachstum aufweisen. Manche Gruppen berichteten, daß T Zellen dieser Mäuse nach Behandlung mit CD3, CD28, PMA und Ionomycin kaum proliferierten (Newton et al., 1998; Hueber et al., 2000; Newton et al., 2001). Walsh und Kollegen sahen dagegen Unterschiede, je nachdem welche T Zell Population mit welchem Mitogen stimuliert wurde (Walsh et al., 1998). Thymocyten zeigten einen Defekt nach CD3, CD28 und PMA alleine, proliferierten jedoch nach PMA/Ionomycin Behandlung so schnell wie Kontroll T Zellen. Periphere T Zellen schienen keine Benachteiligung nach CD3/CD28 Stimulation zu erfahren. Während Lymphknotenzellen mit PMA alleine normal proliferierten, zeigten CD3 oder PMA/Ionomycin behandelte T Zellen eine wesentlich reduzierte Proliferation. Auch die Restimulation von C-FADD transgenen zyklierenden T Zellen erbrachte keine erhöhte Proliferationsrate (Hueber et al., 2000). All diese Daten deuteten darauf hin, daß T Zellen aus C-FADD transgenen Mäusen im Übergang von G0 zu G1 und auch später im Zellzyklus inhibiert sind, und ließ vermuten, daß FADD durch Bindung an Zellzyklus-regulierende Proteine für die Progression in den Zellzyklus sorgt.

Verschiedene Gruppen haben sich zudem mit FADD und der Verbindung zu Zellzyklus-regulierenden Proteinen beschäftigt. Während p21, ERK1 und ERK2, JNK, p38, p42 und p44 MAPK, PKB und Rb in C-FADD transgenen T Zellen unverändert vorlagen (Hueber et al., 2000; Newton et al., 2001), konnten p21, CyclinA und CyclinE, cdc2, cdk2 und cdk6 in FADD defizienten T Zellen höherreguliert vorgefunden werden (Zhang et al., 2001).

Um die Rolle der Phosphorylierung von FADD im Zellzyklus von T Zellen und der Entwicklung des gesamten Organismus eindeutig klären zu können, müssten allerdings sogenannte “knock-in” Mäuse hergestellt werden, in denen das gesamte FADD Molekül als S194A bzw. S194E Mutante exprimiert wird. Erst so könnten Entwicklungsdefekte und Zellzyklus-Abnomalien mit Sicherheit auf die Phosphorylierungsstelle zurückgeführt werden.

FADD und Aktin regulieren die Bildung des CD95 DISC

Die Untersuchung von stabil C-FADD Wildtyp und Punktmutanten exprimierenden BJAB Zellen im Laufe dieser Arbeit hat gezeigt, daß die Phosphorylierung von FADD wichtig für die Bildung des DISC, und damit für die Signaltransduktion des CD95 Rezeptors in Typ I Zellen ist. Die C-FADD S194E Mutante (SE) erzeugte dabei wesentlich mehr stabile SDS Aggregate nach CD95 induzierter Apoptose und führte schon im unstimulierten Fall zur Assoziation großer Mengen der Signalmoleküle FADD und Caspase-8 an den CD95 Rezeptor. Bisher war angenommen worden, daß die Bildung der SDS stabilen Aggregate allein auf die Bindung des CD95 Liganden an den Rezeptor zurückzuführen ist (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Die Inhibition sowohl der Caspasenaktivität, als auch der Aktinpolymerisierung mit spezifischen Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die Bildung der SDS Aggregate gezeigt. Die C-FADD exprimierenden BJAB Zellen zeigten nach Inkubation mit CD95L keine Clusterbildung, was bedeutet, daß die Caspasenaktivität zumindest für diesen Schritt benötigt wird. Die Beobachtung, daß SE eine verstärkte SDS Aggregatebildung bewirkte, läßt daher den Schluß zu, daß die negative Ladung der Phosphorylierung von FADD an Serin 194 zur Bildung dieser Aggregate und des DISC beiträgt. Diese Aussage wird zusätzlich verstärkt durch die Feststellung, daß die Behandlung der Typ I Zellinie SKW6.4 mit dem Serin/Threonin-Kinaseninhibitor Staurosporin (STS) wie bei Typ II Zellen nicht länger zur Bildung eines funktionellen DISC führte, da weder FADD noch Caspase-8 an den Rezeptor gebunden vorlagen. Die C-FADD S194A Mutante (SA) dagegen rekrutierte kaum endogenes FADD und keine Caspase-8, während Wildtyp C-FADD (WT) endogenes FADD und nur eine geringe Menge Caspase-8 in den DISC rekrutierte.

C-FADD WT und SE zeigten in Immunpräzipitationsstudien eine Wechselwirkung mit Aktin auf, während die SA Mutante Aktin nicht koimmunpräzipitierte. Dies deutet darauf hin, daß die Phosphorylierung von Serin

194 die Interaktion mit Aktin vermittelt. Aktin spielt eine essentielle Rolle bei der Induktion CD95 vermittelter Apoptose in Typ I Zellen (Algeciras-Schimnich et al., 2002). So wird Aktin bei diesen Zellen für die DISC Bildung und den Internalisierungsschritt benötigt. Die Behandlung von Zellen mit Latrunkulin (LtnA), einem Inhibitor des Aktin-Mikrofilamentsystems, verhindert demnach die Rekrutierung von FADD und Caspase-8, wodurch weniger Caspase-8 aktiviert wird und Apoptose um bis zu 50 % reduziert werden kann (Algeciras-Schimnich et al., 2002). In Typ II Zellen spielt Aktin keine Rolle bei der DISC Bildung. Sie bilden im Vergleich zu Typ I Zellen kaum einen DISC, weswegen LtnA in diesen Zellen keine Auswirkung auf die Prozessierung von Caspase-8 in die aktiven Untereinheiten hat. Zudem wird der aktivierte CD95 Signalkomplex von Typ II Zellen nicht internalisiert (Algeciras-Schimnich, Marcus Peter, unpublizierte Daten). Untersuchungen in unserem Labor konnten nun zusätzlich zeigen, daß Typ I und Typ II Zellen unterschiedliche intrazelluläre Mengen an F und G Aktin aufweisen. Während Typ I Zellen deutlich mehr F-Aktin haben, besitzen Typ II Zellen F- und G-Aktin im gleichen Verhältnis (Algeciras-Schimnich und Elizabeth Alappat, persönliche Mitteilung). Bei dem ca. 200 kDa großen Protein, das detektiert worden war, könnte es sich um ein Effektorprotein oder ein die Bindung von Aktin an phosphoryliertes FADD vermittelndes Protein handeln.

Ein Modell für die Funktionen von FADD

FADD spielt eine essentielle Rolle bei der Übermittlung des apoptotischen Signals in die Zelle. Es rekrutiert die Procaspasen-8 und –10 an den aktivierten Rezeptor und führt so zur Induktion CD95 vermittelter Apoptose. Weiter ergibt sich folgendes Modell: Typ I Zellen haben eine andere Aktin Zusammensetzung als Typ II Zellen. Aktin ist dabei essentiell für die Bildung des DISC und die Internalisierung des aktivierten Signalkomplexes. Phosphoryliertes FADD vermittelt entweder direkt oder mit Hilfe eines weiteren Bindungsproteins, hier FACP (für “FADD-Aktin Connecting Protein”, Abb. 37) genannt, die Bindung an F-Aktin, wodurch der DISC assembliert werden kann. Wenn FADD nicht phosphoryliert vorliegt, z.B. nach Behandlung mit STS, kann der DISC nicht gebildet werden und es kommt, wie auch nach Behandlung mit LtnA, zu einer Störung im CD95 Signalweg. Typ II Zellen besitzen gleich viel F- und G-Aktin und bilden kaum DISC. Daher hat LtnA keine Auswirkung auf die DISC Bildung, und die Behandlung von Typ I Zellen (z.B. SKW6.4) mit STS führt zu einer Situation, wie sie für Typ II Zellen typisch ist: Caspase-8 und FADD werden nicht an den CD95 Rezeptor rekrutiert. Damit ist der Phosphorylierung von FADD eine essentielle Funktion bei der Signaltransduktion des CD95 Rezeptors zuzuschreiben.

Wie im Laufe dieser Arbeit gezeigt wurde, ist es die Phosphorylierung von C-FADD an Serin 194, die T Zellen und nicht-Tumorzellen wie z.B. MCF-10A in der Proliferation inhibiert. Die Mutation dieses Serinrests zu einem Alaninrest hatte keine Auswirkungen mehr auf den Zellzyklus, die Zellen proliferierten weiter. Um die Funktionsweise dieses Mechanismus klären zu können, müsste daher mehr über die

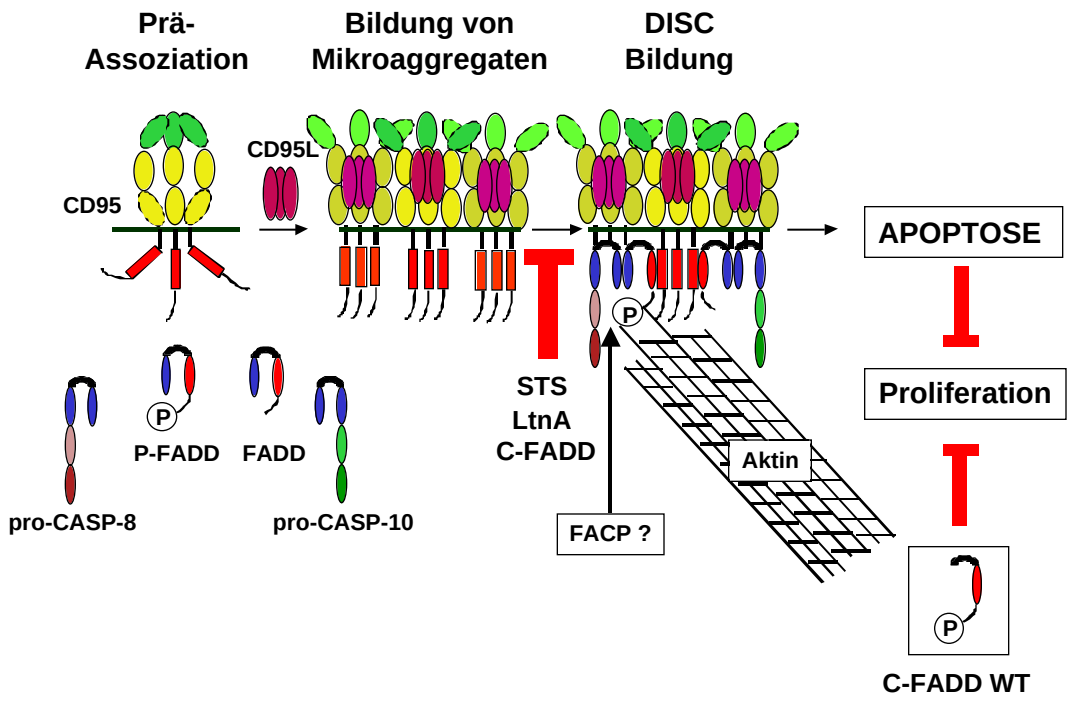


Abbildung 37: Ein Modell für die Funktion der FADD Phosphorylierung. FADD rekrutiert Procaspase-8 (pro-CASP-8) und Procaspase-10 (pro-CASP-10) an den aktivierten CD95 Rezeptor. Die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 führt dabei entweder direkt oder mit Hilfe von weiteren Proteinen (FACP) in Typ I Zellen zur Bindung an Aktin, wodurch der DISC assembliert werden kann. Die phosphorylierte Form des C-FADD Moleküls inhibiert das Zellwachstum und führt zu einem Arrest in der G2/M des Zellzyklus. FACP = FADD-Aktin Connecting Proteins; WT, Wildtyp; STS, Staurosporin; LtnA, Latrunkulin.

FADD Kinase herausgefunden werden. Die Identifizierung der Kinase würde daher wesentlich dazu beitragen, die Verbindung zwischen der Phosphorylierung von FADD und dem Zellzyklus offenzulegen und die Signalwege, die dabei involviert sind, aufzuklären.

V. Zusammenfassung

Das Adaptormolekül FADD/MORT1 ist essentiell für die Signaltransduktion der Todesrezeptoren CD95, TNF-RI, DR3, DR4 und DR5. Es rekrutiert Procaspase-8 an den aktivierten Rezeptor und initiiert so die Prozessierung der Protease in die aktiven Untereinheiten. FADD spielt auch eine wichtige Rolle beim Wiedereintritt von ruhenden T Zellen in den Zellzyklus und wird an Serinresten phosphoryliert. In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher die Phosphorylierungsstelle von FADD identifiziert und die Rolle der Phosphorylierung in Apoptose und Proliferation näher charakterisiert werden.

Durch Untersuchungen mit dem Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper 1C4 konnte Serin 194 als einzige Phosphorylierungsstelle im FADD Molekül identifiziert werden. Dieser Serinrest ist Teil eines Met-Ser-Pro-Motifs, das zwischen Maus und Mensch konserviert ist. Experimente mit Punktmutanten der Phosphorylierungsstelle im C-FADD Molekül zeigten, daß die Phosphorylierung keinen Einfluß auf die Resistenzfunktion gegenüber CD95 vermittelter Apoptose hat. Der Zellzyklusarrest und die Analyse von Zellen durch Elutration ergaben, daß die Phosphorylierung Zellzyklus-abhängig in G2/M erfolgt. *In vitro* Kinase Tests und Immunpräzipitationen aus dem Lysat von radioaktiv markierten Zellen führten zur Detektion einer ca. 70 kDa großen Kinase, die mit dem C-Terminus von FADD assoziiert. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte die C-terminale Hälfte der DED von FADD als minimale Kinasebindedomäne identifiziert werden. Die subzelluläre Fraktionierung von Zellen zeigte, daß die Kinase in der Nukleusfraktion lokalisiert. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um den Mechanismus der Phosphorylierung und die Identität der Kinase aufzudecken. Mit den im Laufe dieser Arbeit hergestellten Reagenzien sind die Grundlagen dafür allerdings geschaffen worden.

Experimente mit T Zellen aus C-FADD transgenen Mäusen und C-FADD stabil exprimierenden Fibroblasten hatten gezeigt, daß diese Deletionsmutante die Proliferation von Zellen inhibieren kann. Dieser Effekt war nur in nicht-Tumorzellen beobachtet worden. Um zu testen, ob die Phosphorylierung von C-FADD diesen Zellzyklusarrest bewirkt, wurden die Brustkarzinomzellinie MCF-7 und die spontan immortalisierte epitheliale Brustzellinie MCF-10A mit den adenoviralen Vektoren AdV-C-FADD Wildtyp, AdV-C-FADD S194A und AdV-C-FADD S194E infiziert. Dabei führte die Expression des Wildtyps in der Zellinie MCF-10A zu einem Zellzyklusarrest in G2/M, was mit der Phosphorylierung von FADD in G2/M korrelierte. Western Blot Analysen zeigten, daß dabei Caspase-3 und DRAK2 auf Proteinebene hochreguliert wurden. Auch die adenovirale Transduktion von naiven CAR transgenen T Zellen mit FADD Wildtyp und Punktmutanten ergab, daß der Proliferationsarrest von der Phosphorylierung des Wildtyp Proteins abhängig ist. Die

Punktmutanten S194A und S194E zeigten, wie schon bei MCF-10A Zellen, keinen Effekt.

Um die Rolle von FADD in der DISC Bildung von CD95 Typ I Zellen zu untersuchen, wurde in BJAB C-FADD Transfektanten Apoptose mittels CD95 induziert. Während im "Death-inducing Signaling Complex" (DISC) von C-FADD S194A Transfektanten nach Stimulation von CD95 kaum endogenes FADD und keine Caspase-8 gefunden werden konnte, waren bei C-FADD S194E endogenes FADD und Caspase-8 schon mit dem unstimulierten Rezeptor assoziiert. Zusätzlich konnte bei S194E ein stärkeres Signal der SDS-stabilen Aggregate von CD95 detektiert werden. Typ I Zellen benötigen Aktin zur Signaltransduktion des CD95 Rezeptors. Untersuchungen mit den Transfektanten zeigten, daß C-FADD Wildtyp und S194E in der Lage sind, mit Aktin zu assoziieren. Die Behandlung von Zellen mit dem Kinaseninhibitor Staurosporin verhinderte die Bildung des DISC gänzlich und reduzierte die Phosphorylierung von FADD, was darauf hindeutet, daß die Phosphorylierung von FADD für die Signaltransduktion des CD95 Rezeptors in Typ I Zellen notwendig ist.

Zusammengefaßt konnte in der hier vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung von Serin 194 mit dem Zellzykluseffekt von FADD in Verbindung gebracht werden. Die Phosphorylierung von C-FADD bewirkte dabei den Zellzyklusarrest in T Zellen und Epithelzellen. Es wurde eine ca. 70 kDa große und Zellzyklus regulierte Kinase identifiziert, die spezifisch mit der C-terminalen Hälfte der "Death Domain" von FADD assoziiert. Zusätzlich konnte mit Aktin ein Interaktionspartner von FADD identifiziert werden, der für die Induktion von CD95 vermittelter Apoptose in Typ I Zellen notwendig ist.

VI. Literaturverzeichnis

Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90:1756-60.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998; 281:1322-6.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. J Exp Med. 1995; 181:71-7.

Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. Mol Cell Biol. 2002; 22:207-20.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell. 1996; 87:171.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998; 281:1305-8.

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell. 1985; 41:899-906.

Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. Biotechnology (NY). 1994; 12:487-93.

Berglund H, Olerenshaw D, Sankar A, Federwisch M, McDonald NQ, Driscoll PC. The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. J Mol Biol. 2000; 302:171-88.

Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. J Bioenerg Biomembr. 1994; 26:509-17.

Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grutter MG. The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. Structure Fold Des. 1999; 7:1125-33.

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

Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. Nat Cell Biol. 2000; 2:241-3.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH und Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J. Biol. Chem. 1995; 270:7795-7798.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV und Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell. 1996; 85:803-815.

Brown SB, Bailey K, Savill J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. Biochem J. 1997; 323: 233-7.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF und Green DR . Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. Nature. 1995; 373: 441-444.

Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. Ann Rev Immunol. 1996; 14:259-74.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. Immunity. 1997; 7:821-30.

Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. Endocr Rev. 1995; 16:117-42.

Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T. Activation of actin-cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. Cancer Res. 1996; 56:5224-9.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science. 1994; 263:1759-62.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M und Dixit, VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell. 1995; 81:505.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J und Dixit VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. Science. 1996a; 274: 990.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME und Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 1996b; 271: 4961-4965.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. Science. 1997; 275:1122-6.

Chu Y, Sperber K, Mayer L, Hsu MT. Persistent infection of human adenovirus type 5 in human monocyte cell lines. Virology. 1992; 188:793-800.

Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. Cell. 1986; 47:19-28.

Clement MV, Stamenkovic I. Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death. EMBO J. 1996; 15:216-25.

Coffer PJ, Woodgett JR. Differential subcellular localisation of two isoforms of p70 S6 protein kinase. Biochem Biophys Res Commun. 1994; 198:780-6.

Conradt B and Horvitz HR. The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. Cell. 1998; 93:519-529.

Copeland KF, Haaksma AG, Goudsmit J, Krammer PH, Heeney JL. Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax. AIDS Res Hum Retroviruses. 1994; 10:1259-68.

Craxton A, Otipoby KL, Jiang A, Clark EA. Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes. Adv Immunol. 1999; 73:79-152.

Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Ceramide enables fas to cap and kill. J Biol Chem. 2001; 276:23954-61.

Cuvillier O, Rosenthal DS, Smulson ME, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. J Biol Chem. 1998; 273:2910-6.

Davis SJ, Ikemizu S, Wild MK, van der Merwe PA. CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition. Immunol Rev. 1998; 163:217-36.

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. J Exp Med. 1997; 186:1165-1170.

DeMatteo RP, Raper SE, Ahn M, Fisher KJ, Burke C, Radu A, Widera G, Claytor BR, Barker CF, Markmann JF. Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus. Ann Surg. 1995; 222:229-39; discussion 239-42.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell. 1994; 76:1025-37.

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. J Cell Biol. 1999; 144:891-901.

Dhein J, Walczak H, Bäumler C, Debatin KM und Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1 (Fas/CD95). Nature. 1995; 373**:** 438.

Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. J Exp Med. 1999; 189:1815-22.

Dita M. Rasper, John P. Vaillancourt, Shinji Hadano, Vicky M Houtzager, Isolde Seiden, Sabina L.C. Keen, Paul Tawa, Steve Xanthoudakis, Jamal Nasir, Duane Martindale, Ben F. Koop, Erin P Peterson, Nancy A. Thornberry, JingQi Huang, David P. MacPherson, Shawn C. Black, Felicita Hornung, Michael J. Lenardo, Michael R. Hayden, Sophie Roy & Donald W. Nicholson, April 1998, Volume 5, Issue 4, Pages 271 – 288.

Dramsi S, Scheid MP, Maiti A, Hojabrpour P, Chen X, Schubert K, Goodlett DR, Aebersold R, Duronio V. Identification of a novel phosphorylation site, Ser-170, as a regulator of bad pro-apoptotic activity. J Biol Chem. 2002; 277:6399-405.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res. 1997; 57:1835-1840.

Enari M, Hase A, Nagata S. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. EMBO J. 1995; 14:5201-8.

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

Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell. 1995; 81:935-946.

Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J Clin Invest. 2002; 109:295-9.

Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. Curr Opin Cell Biol. 2001; 13:555-62.

Frisch SM. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. Curr Biol. 1999; 9:1047-9.

Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Terui Y, Nakamura M, Yamada H, Kano Y, Matsuda M. Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. J Biol Chem. 2000; 275:21661-7.

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

Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. J Biol Chem. 1997; 272:19641-19644.

Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. J Biol Chem. 2001; 276:44944-52.

Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. J Biol Chem. 2001; 276:20589-96.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998; 281:1309-12.

Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X_L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J Biol Chem. 1999; 274:1156-63.

Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. Curr Biol. 1998; 8:537-40.

Hall FL, Vulliet PR. Proline-directed protein phosphorylation and cell cycle regulation. Curr Opin Cell Biol. 1991; 3:176-84.

Hengartner MO, Horvitz HR. Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. Curr Opin Genet Dev. 1994a; 4:581-6.

Hengartner MO, Horvitz HR. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. Cell. 1994; 76:665-76.

Hiromatsu K, Aoki Y, Makino M, Matsumoto Y, Mizuochi T, Gotoh Y, Nomoto K, Ogasawara J, Nagata S, Yoshikai Y. Increased Fas antigen expression in murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, MAIDS. Eur J Immunol. 1994; 24:2446-51.

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

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. Cell. 1996; 84:299-308.

Huang DC, Adams JM, Cory S. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. EMBO J. 1998; 17:1029-39.

Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, Cory S. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. EMBO J. 1997; 16:4628-38.

Hueber AO, Zörnig M, Bernard AM, Chautan M, Evan G. A dominant negative Fas-associated death domain protein mutant inhibits proliferation and leads to impaired calcium mobilization in both T-cells and fibroblasts. J Biol Chem. 2000; 275:10453-62.

Hutchcroft JE, Bierer BE. Signaling through CD28/CTLA-4 family receptors: puzzling participation of phosphatidylinositol-3 kinase. J Immunol. 1996; 156:4071-4.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. J Biol Chem. 1999; 274:14560-7.

Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature. 1997; 388:190-195.

Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. J Biol Chem. 1997; 272:11671-3.

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

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

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. Cell. 1997; 88:347-54.

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem. 1998. 273:9357-9360.

Jeong EJ, Bang S, Lee TH, Park YI, Sim WS, Kim KS. The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. J Biol Chem. 1999; 274:16337-42.

Jones LJ, Carballido-Lopez R, Errington J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in Bacillus subtilis. Cell. 2001; 104:913-22.

Ju, S-T, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ und Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature. 1995; 373, 444-448.

June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. Immunol Today. 1990; 11:211-6.

Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:4997-5002.

Kabra NH, Kang C, Hsing LC, Zhang J, Winoto A. T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98:6307-12.

Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ET. Activation-induced aggregation and processing of the human Fas antigen. Detection with cytoplasmic domain-specific antibodies. J Biol Chem. 1997; 272:22307-14.

Kane LP, Andres PG, Howland KC, Abbas AK, Weiss A. Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. Nat Immunol. 2001; 2:37-44.

Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:2234-8.

Kelleher JF, Atkinson SJ, Pollard TD. Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba. J Cell Biol. 1995; 131:385-97

Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. Immunity. 1998; 8:297-303.

Kennedy NJ, Budd RC. Phosphorylation of FADD/MORT1 and Fas by kinases that associate with the membrane-proximal cytoplasmic domain of Fas. J Immunol. 1998; 160:4881-8.

Kerr JF, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26:239-57.

Kim PK, Dutra AS, Chandrasekharappa SC, Puck JM. Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. J Immunol 1996; 157:5461-6.

Kim YH, Choi CY, Lee SJ, Conti MA, Kim Y. Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. J Biol Chem. 1998; 273:25875-9.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH und Peter ME Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 1995; 14:5579-5588.

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. Immunity. 2000; 12:611-20.

Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R und Farrow SN. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. Nature. 1996; 384:372.

Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. Adv Immunol. 1999; 71:163-210.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. Nature. 2000; 407:789-95.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. Nat Med. 1997; 3:614-20.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature. 1996; 384:368-72.

Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. J Biol Chem. 1998; 273:16589-16594.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. Nature. 1994; 369:156-60.

Lane HA, Fernandez A, Lamb NJ, Thomas G. p70s6k function is essential for G1 progression. Nature. 1993; 363:170-2.

Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. Immunity. 1997; 7:703-713.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med. 1997; 185:1481-6.

Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P. 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. 1993; 69:415-29.

Leon RP, Hedlund T, Meech SJ, Li S, Schaack J, Hunger SP, Duke RC, DeGregori J. Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:13159-64.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell. 1998; 94:491-501.

Li L, Yee C, Beavo JA. CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. Science. 1999; 283:848-51.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997; 91:479-489.

Liberto M, Cobrinik D. Growth factor-dependent induction of p21(CIP1) by the green tea polyphenol, epigallocatechin gallate. Cancer Lett. 2000; 154:151-61.

Ling YH, Tornos C, Perez-Soler R. Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. J Biol Chem. 1998; 273:18984-91.

Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. Cell Signal. 1998; 10:529-42.

Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer PH, Fiers W, Schulze Osthoff K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. Nature. 1995; 375:81-83.

Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. Immunity. 1999; 10:629-39.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell. 1998; 94:481-90.

Ma L, Rohatgi R, Kirschner MW. The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:15362-7.

Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. J Cell Biol. 1994; 127:107-15.

Mariani SM, Matiba B, Bäumler C und Krammer PH. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloprotease. Eur. J. Immunol. 1995; 25:2303-2307.

Marsters SA, Sheridan JP, Donahue CJ, Pitti RM, Gray CL, Goddard AD, Bauer KD, Ashkenazi A. 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. 1996; 6:1669-1676.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor apo3. Curr Biol. 1998; 8:525-528.

Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. Trends Biochem Sci. 1997; 22:355-8.

Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? Cell. 1995; 82:349-52.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. J Biol Chem. 1998; 273:4345-4349.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science. 1998; 281:2027-31.

Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, Tsuruo T. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 217:1185-92.

Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. Oncogene. 1997; 14:1007-12.

Mashima T, Naito M, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. Oncogene. 1999; 18:2423-30.

Matsuzawa A, Moriyama T, Kaneko T, Tanaka M, Kimura M, Ikeda H, Katagiri T. A new allele of the lpr locus, lprcg, that complements the gld gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. J Exp Med. 1990; 171:519-31.

McCarthy JV, Ni J, Dixit VM. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. J Biol Chem. 1998; 273:16968-75.

McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Nature Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). 1991; 349:254-6.

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). EMBO J. 1997a; 16:2794-804.

Medema JP, Toes RE, Scaffidi C, Zheng TS, Flavell RA, Melief CJ, Peter ME, Offringa R, Krammer PH. Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. Eur J Immunol. 1997b; 27:3492-8.

Meng XW, Heldebrant MP, Kaufmann SH. Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells by disrupting recruitment of Fas-associated polypeptide with death domain. J Biol Chem. 2002; 277:3776-83.

Mittl PR, Di Marco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ, Grutter MG. Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethylketone. J Biol Chem. 1997; 272:6539-47.

Miura M, Friedlander RM, Yuan J. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:8318-8322.

Morgan M, Thorburn J, Pandolfi PP, Thorburn A. Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. J Cell Biol. 2002; 157:975-84.

Morgan MJ, Thorburn J, Thomas L, Maxwell T, Brothman AR, Thorburn A. An apoptosis signaling pathway induced by the death domain of FADD selectively kills normal but not cancerous prostate epithelial cells. Cell Death Differ. 2001; 8:696-705.

Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. Nature. 1996; 381:335-341.

Mueller DL. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. Curr Biol. 2000; 10:R227-30.

Mullins RD, Pollard TD. Rho-family GTPases require the Arp2/3 complex to stimulate actin polymerization in Acanthamoeba extracts. Curr Biol. 1999; 9:405-15.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Scaffidi C, Zhang M, Ni J, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME und Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex (DISC). Cell. 1996; 85**:**817.

Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997; 88:355-65.

Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:14681-6.

Neering SJ, Hardy SF, Minamoto D, Spratt SK, Jordan CT. Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors. Blood. 1996; 88:1147-55.

Nemerow GR. Cell receptors involved in adenovirus entry. Virology. 2000; 274:1-4.

Newton K, Kurts C, Harris AW, Strasser A. Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells. Curr Biol. 2001; 11:273-6.

Newton K, Harris AW, Strasser A. FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. EMBO J. 2000; 19:931-41.

Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KGC, Strasser AA. dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. EMBO J. 1998; 17:706-718.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ. 1999; 6:1028-42.

Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. Nature. 2000; 407:810-6.

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

Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J. 1993; 12:3679-84.

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

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993; 74:609-19.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science. 1997a; 276:111-113.

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science. 1997b; 277:815-818.

Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. J Biol Chem. 1999; 274:38241-50.

Parlato S, Giammarioli AM, Logozzi M, Lozupone F, Matarrese P, Luciani F, Falchi M, Malorni W, Fais S. CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. EMBO J. 2000; 19:5123-34.

Parry RV, Reif K, Smith G, Sansom DM, Hemmings BA, Ward SG. Ligation of the T cell co-stimulatory receptor CD28 activates the serine-threonine protein kinase protein kinase B. Eur J Immunol. 1997; 27:2495-501.

Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL, Marcineviciute A. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transitionpore. J Biol Chem. 1999; 274:31734-9.

Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. Nature. 1998; 396:699-703.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2000; 29:545-76.

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. Science. 1998; 279:707-10.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol. 2002; 192:131-7.

Reif K, Cantrell DA. Networking Rho family GTPases in lymphocytes. Immunity. 1998; 8:395-401.

Reinhard C, Fernandez A, Lamb NJ, Thomas G. Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase. EMBO J. 1994; 13:1557-65.

Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. J Exp Med. 2000; 192:1165-74.

Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. Cell. 1999; 97:221-31.

Rudert F, Wang Y, Lindridge E, Watson J. Apoptosis through CD95 (Fas/APO-1), but not a CD40/CD95 chimeric receptor, is inhibited by phorbol-12-myristate-13-acetate. DNA Cell Biol. 1997; 16:197-205.

Rytomaa M, Martins LM, Downward J. Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. Curr Biol 1999; 9:1043-6.

Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. Nature. 1999; 401:168-73.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature. 1998; 391:96-9.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. Cell. 1997; 91:443-6.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:10964-7.

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000; 3:401-10.

Sanjo H, Kawai T, Akira S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. J Biol Chem. 1998; 273:29066-71.

Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. Science. 1997; 275:983-6.

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature. 2000; 407:784-8.

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. J Biol Chem. 1999a; 274:22532-8.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. J Biol Chem. 1999b; 274:1541-8.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. 1998; 17:1675-87.

Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. J Biol Chem. 1997; 272:26953-8.

Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, Tang LJ, Keefer CJ, Leach SD, Pietenpol JA. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. J Biol Chem. 1998; 273:30777-84.

Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. FEBS Lett. 1997; 416:329-334.

Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. J Exp Med. 1998; 187:1205-1213.

Screaton GR, Xu XN, Olsen AL, Cowper AE, Tan R, McMichael AJ und Bell JI. LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:4615-4619.

Seshagiri S, Miller LK. Caenorhabditis elegans CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. Curr Biol. 1997; 7:455-60.

Shaw AS, Dustin ML. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. Immunity. 1997; 6:361-9.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. Biochem J. 1998; 333:471-90.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science. 1997; 277:818-821.

Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 complex. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:13973-13978.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. Science. 2000; 288:2354-7.

Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. Immunity. 1994; 1:365-71.

Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D, Lavin MF. Resistance of actin to cleavage during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:157-62.

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. Cancer Res. 1990; 50:6075-86.

Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. Science. 1983; 219:493-5.

Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity. 2000; 12:599-609.

Srinivasula SM, Ahmad M, Ottilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC und Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. J Biol Chem. 1997; 272:18542-18545.

Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. Cell. 1995; 81:513-23.

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

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science. 1995; 267:1445-9.

Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. J Biol Chem. 1998; 273:27084-90.

Strasser A, Newton K. FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth. Int J Biochem Cell Biol 1999; 31:533-7.

Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88:8661-5.

Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. Nature. 1990; 348:331-3.

Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. Gastroenterology. 2000; 119:446-60.

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

Suda TH, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T und Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes and soluble Fas ligand blocks the killing. J. Exp. Med. 1997; 186:2045-2050.

Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, Dixit VM. RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. J Biol Chem. 1999; 274:16871-5.

Tait L, Soule HD, Russo J. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. Cancer Res. 1990; 50:6087-94.

Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. Cell. 1994; 76:969-76.

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

Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. Cell. 1994; 76:969-76.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell. 1993; 74:845-53.

Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. J Biol Chem. 1995; 270:3255-60.

Thomas A, Giesler T, White E. p53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. Oncogene. 2000; 19:5259-69.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995; 267:1456-62.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science. 1998; 281:1312-6.

Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL, Colle CF, Tripp RA, Dimitrov T, Toth K, Wells CE, Doherty PC, Wold WS. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. Nature. 1998; 392:726-30.

Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin K-M und Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science. 1989; 245:301.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science. 1984; 226:1097-9.

van den Ent F, Amos LA, Lowe J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. Nature. 2001; 413:39-44.

Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. Immunity. 1998; 9:267-76.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. Nature. 1988; 335:440-2.

Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2. Science. 1992; 258:1955-7.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. Cell. 1999; 96:245-54.

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

Wajant H, Johannes FJ, Haas E, Siemienski K, Schwenzer R, Schubert G, Weiss T, Grell M, Scheurich P. Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and TRAIL-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction. Curr Biol. 1998; 8:113-6.

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J. 1997; 16:5386-5397.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. Cell. 1994; 78:343-52.

Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. Curr Opin Immunol. 1998; 10:279-88.

Walsh CM, Wen BG, Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Dixit VM, Hedrick SM. A role for FADD in T cell activation and development. Immunity. 1998; 8:439-449.

Wan YY, Leon RP, Marks R, Cham CM, Schaack J, Gajewski TF, DeGregori J. Transgenic expression of the coxsackie/adenovirus receptor enables adenoviral-mediated gene delivery in naive T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:13784-9.

Wang X, Zeng W, Murakawa M, Freeman MW, Seed B. Episomal segregation of the adenovirus enhancer sequence by conditional genome rearrangement abrogates late viral gene expression. J Virol. 2000; 74:11296-303.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature. 1992; 356:314-7.

Watanabe H, Kanbe K, Shinozaki T, Hoshino H, Chigira M. Apoptosis of a fibrosarcoma induced by protein-free culture involves DNA cleavage to large fragments but not internucleosomal fragmentation. Int J Cancer 1995; 62:191-8.

Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD. The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. Structure Fold Des. 1999; 7:1135-43.

Watts TH, DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. Curr Opin Immunol 1999; 11:286-93.

Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. Cell 1993 Apr 23;73(2):209-12

Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002; 18:247-88.

Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. J Biol Chem. 1998; 273:16621-9.

Whitmire JK, Ahmed R. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. Curr Opin Immunol. 2000; 12:448-55.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity. 1995; 3:673-82.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. Nature. 1994; 370:270-5.

Wu D, Wallen HD, Inohara N, Nunez G. Interaction and regulation of the Caenorhabditis elegans death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. J Biol Chem. 1997a; 272:21449-54.

Wu D, Wallen HD, Nunez G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. Science. 1997b; 275:1126-9.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature. 1980; 284:555-6.

Xue D, Horvitz HR. Inhibition of the Caenorhabditis elegans cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. Nature. 1995; 377:248-251.

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Mol Cell Biol. 1999; 19:8469-78.

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. Blood. 1996; 88:386-401.

Yang Xiaolu, Howard Y. Chang1, David Baltimore. Autoproteolytic Activation of Pro-Caspases by Oligomerization. Molecular Cell. 1998. Vol. 1, 319-325.

Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Mak TW. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. Immunity. 1997; 7:715-25.

Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. Science. 1998; 279:1954-1958.

Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. Oncogene. 1998; 16:2265-2282.

Zhang J, Winoto A. A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas- induced apoptosis. Mol Cell Biol. 1996; 16:2756-63.

Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. Nature. 1998; 392:296-300.

Zhang J, Kabra NH, Cado D, Kang C, Winoto A. FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery. J Biol Chem. 2001; 276:29815-8.

Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Flavell RA. Caspase knockouts: matters of life and death. Cell Death Differ. 1999; 6:1043-53.

Zörnig M, Hueber AO, Evan G. p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. Curr Biol. 1998; 8:467-470.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell. 1997; 90:405-413.

VII. Publikationen

Scaffidi C*, **Volkland J***, Blomberg I, Hoffmann I, Krammer PH, Peter ME. Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. J Immunol. 2000; 164:1236-42.

Stegh AH*, Barnhart BC*, **Volkland J**, Algeciras-Schimnich A, Ke N, Reed JC, Peter ME. Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. J Biol Chem. 2002; 277:4351-60.

Volkland J, Alappat E, Marks R, Gajewski TF, Peter ME. A role for FADD phosphorylation in the regulation of the cell cycle and CD95 mediated apoptosis. Manuskript in Vorbereitung.

* beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen