INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Alexander Golks

aus Neumünster

Tag der mündlichen Prüfung:

Zelluläre Regulation von Leben und Tod durch Todeseffektordomänen (DED)-enthaltende Proteine: CAP3, c-FLIP_R und p22-FLIP

Gutachter:Prof. Dr. Peter H. Krammer
(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)Prof. Dr. Michael Brunner
(Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg)

Aerial view of life unfolding

"Life can only be understood backwards; But it must be lived forwards"

SÖREN KIERKEGAARD

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Peter H. Krammer für die Themenstellung und Betreuung dieser Arbeit. Dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Brunner für die unkomplizierte Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Universität Heidelberg.

Besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Dr. Inna Lavrik, die durch ihre ständige Gesprächsbereitschaft und hohe Motivation sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Großer Dank gebührt auch Dirk Brenner, durch dessen enge Zusammenarbeit und Freundschaft diese Arbeit sehr vorangebracht wurde. Seine Motivation, gute Laune und sein Tatendrang wirkten immer wieder ansteckend und aufmunternd, insbesondere in schwierigeren Phasen.

Ferner möchte ich mich beim gesamten Labor Krammer und insbesondere der T-Zell-Gruppe für die einmalige Arbeitsatmosphäre bedanken. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich besonders bei Dr. Karsten Gülow für unzählige Hilfestellungen und interessante Diskussionen ebenso wie bei Dagmar Riess und Cornelius Fritsch für ihre Unterstützung.

Schließlich möchte ich Gerlinde Pappa danken, die mich schon während des gesamten Studiums durch alle Hochs und Tiefs begleitet hat und mir immer unterstützend zur Seite stand. Auch meinen Großmüttern, meinem Vater und der ganzen Familie Pappa danke ich für ihre Unterstützung.

Zusammenfassung

Die Apoptose als programmierter Zelltod spielt eine bedeutende Rolle bei der Ontogenese und Homöostase von mehrzelligen Organismen. CD95 (Fas, APO-1) ist einer von acht bislang identifizierten Rezeptoren, die direkt Apoptose auslösen können und als Todesrezeptoren (engl.: death receptor, DR) bezeichnet werden. CD95-vermittelte Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für die Homöostase des Immunsystems. Fehlregulationen im CD95-System tragen außerdem zur Entstehung von Krankheiten wie Autoimmunität, Krebs oder AIDS bei.

Bei der initialen Regulation Todesrezeptor-vermittelter Apoptose spielen vor allem Proteine eine Rolle, die sich durch das Vorhandensein von Todeseffektordomänen (DEDs) auszeichnen. Es sind sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische DED-enthaltende Proteine bekannt. Zu den pro-apoptotischen DED-enthaltenden Proteinen gehören u.a. Procaspase-8 und -10, während die c-FLIPs (engl.: cellular FLICE inhibitory proteins) zu den wichtigsten anti-apoptotischen DED-enthaltenen Proteinen gehören.

Das CD95-vermittelte Todessignal wird nach Aktivierung des Rezeptors durch Anlagerung von cytosolischen Signalmolekülen mit DED-Domänen übertragen. Durch Bindung des CD95-Liganden wird CD95 oligomerisiert, und es bildet sich ein Tod-induzierender Signal-komplex (engl.: death-inducing signaling complex, DISC). In den CD95-DISC werden sowohl die pro-apoptotischen DED-Proteine wie Procaspase-8 als auch die anti-apoptotischen DED-Proteine wie c-FLIPs rekrutiert und abhängig von ihrem Mengenverhältnis zueinander wird der Prozess der Apoptose initiiert oder blockiert.

Nicht nur in CD95-vermittelter Apoptose spielen DED-enthaltende Proteine eine Rolle. Es spricht immer mehr dafür, dass DED-Proteine zusätzliche Funktionen bei der Kontrolle zellulärer Aktivierung sowie Proliferation innehaben. Somit charakterisiert die DED-Domäne eine Familie von Proteinen, die wichtig für die Regulation zellulärer Homöostase sind und Proliferation und Apoptose zugleich regulieren können.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das bislang nicht identifizierte DED-enthaltende Protein CAP3 (engl.: cytotoxicity-dependent APO-1 associated protein 3) während der Prozessierung von Procaspase-8 im DISC gebildet wird. Dabei scheint Procaspase-8-Aktivität eine wichtige Rolle zu spielen. Wenn Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8 prozessiert wird, findet eine Weiterspaltung von CAP3 in die bekannte Prodomäne von Procaspase-8 statt. Damit wurden neue Erkenntnisse zum entscheidenden Prozess der Aktivierung von Procaspase-8 und damit zu initialen Ereignissen bei der Induktion Todesrezeptor-vermittelter Apoptose gewonnen.

Zudem wurde nach weiteren DED-enthaltenden Regulatoren zellulärer Homöostase gesucht und dabei zwei neue c-FLIP-Proteine gefunden: c-FLIP_R und p22-FLIP. C-FLIP_R wurde als eine neue kurze c-FLIP-Spleißvariante identifiziert, während p22-FLIP ein bisher unbekanntes Spaltprodukt von c-FLIP darstellt.

C-FLIP_R ist in verschiedenen T- und B-Zelllinien sowie in primären humanen T-Zellen vorhanden. Es enthält ebenso wie die bekannte Spleißvariante c-FLIP_S Tandem-DEDs als N-Terminus und einen kurzen C-Terminus. C-FLIP_R kann an den CD95-DISC rekrutiert werden und zeigt inhibitorische Funktion bezüglich Todesrezeptor-induzierter Apoptose. Wie c-FLIP_S zeichnet es sich durch eine kurze Halbwertszeit und ein ähnliches Expressionsprofil nach Aktivierung und T-Zell-Rezeptor-Restimulation in primären humanen T-Zellen aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres c-FLIP-Protein entdeckt, p22-FLIP. Nach der Identifizierung von p22-FLIP als Spaltprodukt und N-Terminus von c-FLIP-Proteinen wurde p22-FLIP in funktioneller wie mechanistischer Weise charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass p22-FLIP durch die Aktivität von Procaspase-8 im Cytosol unter nicht-apoptotischen Bedingungen geschnitten wird. Außerdem wurde gezeigt, dass p22-FLIP eine inhibitorische Funktion bei Todesrezeptor-vermittelter Apoptose innehat und gleichzeitig sehr effizient die Aktivität des nukleären Faktors κ B (NF κ B) und damit Überlebens-Signalleitung induzieren kann.

Damit konnte p22-FLIP als ein wichtiger Parameter für zelluläre Homöostase identifiziert werden, der ähnlich wie virale FLIPs wichtige Prozesse wie Proliferation und Apoptose regulieren kann. Die Fehlregulation von Proliferation und Apoptose ist wahrscheinlich eine entscheidende Voraussetzung für Tumorentstehung und -progression.

Stichworte: Apoptose/CD95/Signaltransduktion/Procaspase-8/c-FLIP

Abstract

Apoptosis, programmed cell death, plays an important role in oncogenesis and tissue homeostasis of multicellular organisms. CD95 (Fas/APO-1) is a member of a family containing eight receptors capable of directly inducing apoptosis, the so-called death receptors. CD95-mediated apoptosis is critical for homeostasis of the immune system. Dysregulation of CD95-mediated apoptosis contributes to the pathophysiology of several diseases, such as autoimmune syndromes, cancer, or AIDS.

The death effector domain (DED) occurs in proteins that are involved in the regulation of the initial events in death receptor-mediated apoptosis. Both pro- and anti-apoptotic proteins containing DEDs have been identified. Procaspases-8 and -10 are known as pro-apoptotic DED-containing proteins, whereas cellular FLICE-inhibitory proteins (c-FLIPs) are important anti-apoptotic DED-containing proteins.

The CD95-induced death signal is transduced by recruitment of cytosolic DED-containing proteins. Binding of the CD95 ligand to CD95 leads to the formation of the death-inducing signaling complex (DISC). Pro-apoptotic DED-containing proteins such as procaspase-8 as well as anti-apoptotic DED-containing proteins such as c-FLIPs are recruited to the DISC and the ratio of pro-apoptotic to anti-apoptotic proteins is decisive for induction or inhibition of apoptosis.

Accumulating evidence now suggests that DED-containing proteins have additional roles in controlling pathways of cellular activation and proliferation. Thus, the DED domain defines a family of proteins that may be pivotal to cellular homeostasis by coregulating proliferation and apoptosis in parallel.

In this thesis it has been demonstrated that the so far unidentified DED-containing protein CAP3 is an intermediate of procaspase-8 processing in the CD95 DISC. Procaspase-8 activity is needed for the generation of CAP3 and it was shown that CAP3 is subsequently processed into the known prodoma in of procaspase-8 by the activity of mature caspase-8. These findings lead to new insights into the mechanism of procaspase-8 processing and apoptosis initiation.

In addition, this study reveals the existence of two novel c-FLIP proteins, c-FLIP_R and p22-FLIP. C-FLIP_R was identified as a new short c-FLIP splice variant whereas p22-FLIP turned out to be a novel cleavage product of c-FLIP.

In addition, this study demonstrates the presence of c-FLIP_R in a number of T and B cell lines as well as in primary human T cells. Like c-FLIP_s, it contains N-terminal Tandem-DEDs and a short C-Terminus. C-FLIP_R is recruited to the CD95-DISC upon CD95 stimulation where it can act as an inhibitor of death receptor-mediated apoptosis. Several properties of c-FLIP_R are similar to c-FLIP_S: both isoforms have a short half-life, a similar pattern of expression during activation of primary human T cells, and are strongly induced in T cells upon T cell receptor restimulation.

In this study, another c-FLIP protein was found, p22-FLIP. P22-FLIP was identified as an Nterminal cleavage product of c-FLIP proteins. In addition, this new cleavage product was characterized both, in functional and mechanistical terms. It was shown that generation of p22-FLIP is mediated by procaspase-8 activity and occurs under non-apoptotic conditions in the cytosol. An inhibitory function of p22-FLIP in death receptor-mediated apoptosis was observed as well as the property to induce NF κ B activity with high efficiency and thereby pro-survival signaling. The induction of NF κ B activity is mediated by direct binding to the IKK complex.

Taken together, p22-FLIP was identified as an important regulator of proliferation and apoptosis, and thus, cellular homeostasis. Its deregulation might contribute to processes such as tumor development and tumor progression.

Key words: apoptosis/CD95/signal transduction/procaspase-8/c-FLIP

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	
Abstract	7
Inhaltsverzeichnis	9
I. Einleitung	11
1. Apoptose - Der programmierte Zelltod	11
2. Todesrezeptoren	
3. Die Signaltransduktion von CD95	14
3.1 Rezeptoraggregation als Stimulus3.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex	
3.3 Zwei CD95-Signalwege der Apoptose 3.4 Die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren	
4. Todeseffektordomänen (DED)-enthaltende Proteine	24
5. Caspase-8	
5.1 Caspase-8: Expression und Funktion	
5.3 Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-8 am DISC	
6. FLICE-inhibitorische Proteine (FLIPs)	
6.1 Virale FLIPs (v-FLIPs) 6.2 Zelluläre FLIPs (c-FLIPs)	
6.3 Regulation der Expression von c-FLIP	
6.4 Die Rolle von c-FLIP im Immunsystem	
6.5 C-FLIP und NFκB-Signalleitung	
7. Aufgabenstellung	
II. Material und Methoden	44
1. Material	44
1.1 Chemikalien	44
1.2 Häufig verwendete Puffer	

	1.2 Haung verwendete Funet	44
	1.3 Biologisches Material	46
	1.4 Nährmedien	47
	1.5 Antikörper	47
	1.6 Apoptosestimuli und - inhibitoren	48
	1.7 Molekularbiologische Materialien	49
	1.8 Geräte	50
	1.9 Software	51
2.	Methoden	52
	2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	52
	2.2 Molekularbiologische Methoden	52
	-	

2.3 Zellbiologische Methoden	56
2.4 Proteinchemische Methoden	

III. Ergebnisse			
1. Die Rolle von CAP3 in der CD95-Signalleitung	65		
 1.1 CAP3 kann in CD95-DISCs verschiedener Zelllinien detektiert werden 1.2 Identifizierung von CAP3 als verlängerte Prodomäne von Procaspase-8/a 1.3 Kinetik der CAP3-Generierung und -prozessierung am DISC 1.4 CAP3 wird am DISC in Gegenwart des Caspase-Inhibitors zVAD- fmk generiert. 1.5 CAP3 wird aus Procaspase-8/a am CD95-DISC generiert 1.6 CAP3 wird am CD95-DISC zu p26 weiterprozessiert 	65 67 69 70 72 74		
2. C-FLIP _R , ein neuer Regulator Todesrezeptor-induzierter Apoptose	77		
 2.1 Detektion einer weiteren c-FLIP-Bande mittels Western Blot 2.2 Identifizierung der neuen c-FLIP-Bande als c-FLIP_R 2.3 c-FLIP_R wird an den CD95-DISC rekrutiert und weist ähnliche anti-apoptotische 	77 78		
Eigenschaften wie c-FLIP _S auf 2.4 C-FLIP _R und c-FLIP _S haben ähnliche Halbwertszeiten 2.5 C-FLIP _R in primären humanen T-Zellen	80 82 84		
3. p22-FLIP aktiviert NFkB und inhibiert CD95-Signalleitung	86		
 3.1 Detektion von p22-FLIP 3.2 Identifizierung von p22-FLIP als c-FLIP-Spaltprodukt 3.3 P22-FLIP wird durch die Aktivität von Procaspase-8 generiert	86 88 89 91 94 96		
IV. Diskussion	98		
1. Die Rolle von CAP3 in der CD95-Signalleitung	98		
2. c-FLIP _R , ein neuer Regulator Todesrezeptor-induzierter Apoptose	.102		
3. p22-FLIP aktiviert NFkB und inhibiert CD95-Signalleitung	.103		
4. DED-enthaltende Proteine regulieren Leben und Tod	.106		
V Anhang	108		

V. Anhang	
1. Literatur	
2. Abkürzungen	
3. Publikationsverzeichnis	
4. Erklärung	

I. Einleitung

1. Apoptose - Der programmierte Zelltod

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

Schon bald wurde erkannt, dass Apoptose nicht nur in der Entwicklung vielzelliger Organismen von Bedeutung ist (Los *et al.*, 1999; Vaux und Korsmeyer, 1999), sondern auch eine besondere Rolle bei der Erhaltung der Gewebshomöostase spielt (Danial und Korsmeyer, 2004; Krammer, 2000). Zudem werden durch virale Infektion oder genomische Mutation geschädigte Zellen mittels Apoptose entfernt (Thompson, 1995).

Eine weitere Form des Zelltods bezeichnet man als Nekrose. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose durch die Aktivierung regulierter katabolischer Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen, charakterisiert. Apoptose ist u.a. durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen definiert. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, welches im Bereich der nukleären Peripherie aggregiert. Bei den meisten Formen von Apoptose wird in den kondensierten Chromosomen die Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch spezielle Endonukleasen abgebaut, sodass sich nach Elektrophorese eine charakteristische "DNA-Leiter" bildet (Wyllie et al., 1980). Diese entsteht durch die internukleosomale Spaltung von DNA, die zur Entstehung von DNA-Stücken mit einer Länge von etwa 200 Basenpaaren und ganzzahligen Vielfachen davon führt. Ein Verlust der Membranstabilität führt zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose). Dies mündet schließlich im Abschnüren membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Parallel dazu wird ein Verlust der Membranasymmetrie beobachtet, der zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Über dieses Merkmal werden die apoptotischen Körperchen von Makrophagen oder anderen benachbarten Zellen erkannt, aufgenommen und abgebaut (Savill

et al., 1993). Im Gegensatz dazu ist die Nekrose keinem geregelten Mechanismus zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren unterworfen. Nekrose ist durch ein Anschwellen der Zelle (Oncose) charakterisiert, was zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Cytosols sowie von Zellorganellen in den interzellularen Raum führt. Eine inflammatorische Reaktion mit Gewebsschädigungen ist die Folge. Trotz der gegensätzlichen Charakteristika von Nekrose und Apoptose gibt es Hinweise dafür, dass beide Prozesse miteinander gekoppelt sein können. So kann die Blockade eines apoptotischen Signalweges zum Zelltod über einen nekrotischen Weg führen (Vercammen *et al.*, 1998).

2. Todesrezeptoren

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

Eine Subfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren, die sich durch die gemeinsame Eigenschaft auszeichnen, Apoptose auslösen zu können (Bhardwaj und Aggarwal, 2003; Peter et al., 1998). Derzeit sind acht Todesrezeptoren bekannt: TNF-R1 (CD120a), CD95 (APO-1/Fas), DR3 (APO-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (APO-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2), DR6, Ectodysplasin А (EDAR) Rezeptor und der Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (NGFR) (French und Tschopp, 2003; Wajant, 2003). Strukturell zeichnen sie sich durch eine ungefähr 80 Aminosäuren (AS) lange, homologe intrazelluläre Domäne aus, die als Todesdomäne (engl.: death domain, DD) bezeichnet wird und für die Apoptoseinduktion essentiell ist (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993).

Todesrezeptoren wie CD95 und TNF-R1 können durch agonistische Antikörper (Ak) aktiviert werden (Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.*, 1989). Unter physiologischen Bedingungen vollzieht sich die Aktivierung der Rezeptoren der NGF-/TNF-Rezeptorfamilie durch die

Bindung spezifischer Liganden. Wie die Rezeptoren gehören auch die Liganden mit Ausnahme von NGF zu einer Familie, der TNF-Familie. Der Ligand von CD95, CD95L (CD178/APO-1L/FasL), ist ein glykosyliertes Typ II-Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 40 kD (Suda *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu CD95 ist die Expression von CD95L auf aktivierte T-, B- und NK-Zellen sowie auf einige nicht-lymphoide Organe, wie die Hoden (Yu *et al.*, 1999) und die vordere Augenkammer, beschränkt (Griffith *et al.*, 1995). Ferner wurde die Expression in verschiedenen neoplastischen Zellen gezeigt (Hahne *et al.*, 1996; Hymowitz *et al.*, 2000; Strand *et al.*, 1996). Neben der membranständigen wurde auch eine lösliche Form von CD95L beschrieben, die durch Spaltung durch eine Metalloprotease erzeugt wird (Kayagaki *et al.*, 1995; Mariani *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998).



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

Die Interaktionen zwischen den Mitgliedern der TNF-/NGF-Rezeptorfamilie und ihren Liganden sind partiell redundant. Beispielsweise bindet der Ligand TRAIL an fünf verschiedene Rezeptoren, während der TNF-Rezeptor 1 nicht nur TNF α , sondern auch den LT α/β -Komplex bindet. Diese Überlappung (siehe Abbildung I.1) stellt ein wesentliches Problem für das Verständnis der wachsenden NGF-/TNF-Rezeptorfamilie dar.

3. Die Signaltransduktion von CD95

3.1 Rezeptoraggregation als Stimulus

Mit der Entdeckung von spezifischen Rezeptoren, die Apoptose auslösen können, war eine Grundlage geschaffen, um die zur Apoptose führenden Signalwege zu studieren. Erste Hinweise auf den Ursprung des Signals lieferte die Strukturanalyse des TNF-R1 im Komplex mit LTα. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nach Bindung des Liganden eine trimere Konformation annimmt (Banner *et al.*, 1993; Holler *et al.*, 2003) und daraufhin das Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet wird. Vergleichende Modellstudien ergaben, dass für die Signalleitung von CD95 und andere Familienmitgliedern zumindest eine Dreierkonformation notwendig ist (Barnhart *et al.*, 2004; Peitsch und Tschopp, 1995).

Es wurde funktionell gezeigt, dass ein CD95-Dimer keine Apoptose auslösen kann, wohingegen ein multimerisierter Rezeptor in der Lage ist, das apoptotische Signal in die Zelle weiterzuleiten (Dhein *et al.*, 1992). Daraus resultiert, dass eine Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors das initiale Signal zur Apoptoseinduktion durch CD95 darstellt. Zudem wurde eine Region in der äußersten cysteinreichen Domäne verschiedener Todesrezeptoren, u.a. CD95, beschrieben, über welche die Rezeptoren bereits vor Stimulation interagieren und Trimere bilden (Chan *et al.*, 2000; Papoff *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2000). Diese Domäne wird PLAD (engl.: pre-ligand binding assembly domain) genannt.

Die Bindung des Todesliganden an den Rezeptor könnte dann entweder eine Konformationsänderung des präexistierenden Trimers mit Aggregation der intrazellulären Todesdomänen induzieren oder Trimere zu Multimeren vernetzen.

3.2 Der Tod-induzierende Signalkomplex

Nach Stimulation von CD95 durch Trimerisierung oder Multimerisierung bildet sich innerhalb von Sekunden ein Proteinkomplex, der Tod-induzierende Signalkomplex (engl.: death-inducing signaling complex, DISC) (Abbildung I.2) (Kischkel *et al.*, 1995; Peter und Krammer, 2003).



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

CD95 verfügt im cytoplasmatischen Teil über die in allen Todesrezeptoren vorkommende Todesdomäne (DD). Diese stellt eine aus sechs α -Helices bestehende Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar (Aravind *et al.*, 1999; Ehret *et al.*, 2001). Im DISC bindet FADD (engl.: Fas-associated death domain containing protein) über homophile Interaktion mit seiner DD an die DD von CD95 (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995). FADD besitzt zusätzlich zu seiner DD noch eine weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne im N-Terminus, die strukturelle Ähnlichkeiten zur DD aufweist und DED genannt wird. Diese Domäne ist notwendig für die Rekrutierung von Procaspasen (s.u.), die ebenfalls DEDs enthalten, an den DISC. Procaspase-8 ist die am besten charakterisierte und neben Procaspase-10 eine von zwei DED-enthaltenden Procaspasen. (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996b). Caspasen sind Cystein-Proteasen, die hinter einer wenig spezifischen Sequenz von vier Aminosäuren spalten (Thornberry und Lazebnik, 1998). Diese muss jedoch unbedingt ein Aspartat (Asp) in der Position P1 aufweisen (Earnshaw *et al.*, 1999).

Caspasen sind entscheidend für die Ausführung der Apoptose. Sie werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert. Die Aktivierung der Caspasen geschieht durch proteolytische Spaltung nach definierten Aspartatresten, was zur Freisetzung einer großen und einer kleinen Untereinheit führt. Die große Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum. Analysen der Kristallstruktur von Caspase-1, -3 und -8 ergaben, dass das aktive Enzym aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten in Form eines $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers aufgebaut ist (Blanchard *et al.*, 1999; Mittl *et al.*, 1997; Rotonda *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1994; Watt *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1994). Verschiedene Caspasen erfüllen unterschiedliche Rollen bei der Initiation oder der Exekution der Apoptose. Die sogenannten Effektor-Caspasen, zu denen Caspase-3, -6 und -7 gehören, spalten den Großteil der an der Apoptose beteiligten Proteine, u.a. auch diejenigen, deren Spaltung die charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen auslöst (Earnshaw *et al.*, 1999; Slee *et al.*, 1999a). Die Initiator-Caspasen, zu denen Caspase-8, -9 und -10 gehören, übermitteln frühe apoptotische Signale, indem sie die Effektor-Caspasen aktivieren

Caspase-8 wird auf Proteinebene in zwei Spleißvarianten exprimiert, Caspase-8/a und Caspase-8/b. Beide Spleißvarianten werden nach Stimulation an den CD95-Rezeptor rekrutiert (Scaffidi *et al.*, 1997). FADD und Caspase-8 sind die zentralen Bestandteile des CD95-DISC. Procaspase-8 besitzt zwei aufeinanderfolgende DEDs (Tandem-DED), über die sie durch Bindung an die DED von FADD an den DISC rekrutiert wird. Sobald Procaspase-8 mit dem DISC assoziiert ist, setzt die autoproteolytische Prozessierung ein, welche zur Aktivierung der Caspase-8 führt (Medema *et al.*, 1997a; Muzio *et al.*, 1998; Salvesen und Dixit, 1999). Nach autoproteolytischer Prozessierung verlässt das aktive Caspase-8-Heterotetramer, bestehend aus je zwei p18- und p10-Untereinheiten, den DISC. Es konnte gezeigt werden, dass auch die beiden prozessierten Caspase-8-Untereinheiten am DISC detektiert werden können (Lavrik *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass das aktive Heterotetramer direkt am DISC gebildet wird und erst anschließend ins Cytosol freigesetzt wird.

Neben Procaspase-8 wird auch Procaspase-10 über homotypische Interaktionen mit der DED von FADD an den DISC rekrutiert (Kischkel *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Procaspase-10 ist homolog zu Procaspase-8 und enthält ebenfalls Tandem-DEDs (Fernandes-Alnemri *et al.*,

17

1996; Vincenz und Dixit, 1997). Sie wird ebenso wie Procaspase-8 am DISC prozessiert (Kischkel *et al.*, 2001; Sprick *et al.*, 2002). Allerdings ist ihre Funktion bislang weitgehend unklar. Möglicherweise trägt eine unterschiedliche Substratspezifität zu einer von Caspase-8 abweichenden Funktion bei (Wang *et al.*, 2001). Eine Mutation im Caspase-10-Gen, die zum Verlust des aktiven Enzyms führt, spielt nöglicherweise eine Rolle in der Pathogenese des Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) Typ II (Wang *et al.*, 1999). Das Fehlen eines Caspase-10 Orthologen in der Maus erschwert die funktionelle Analyse dieser Caspase beträchtlich. Ein weiteres an den DISC rekrutiertes Protein ist c-FLIP (Krueger *et al.*, 2001a; Scaffidi *et al.*, 1999). C-FLIP besitzt ebenso wie die Procaspasen-8 und -10 N-terminal Tandem-DEDs und ist am im Gegensatz zu den beiden Caspasen katalytisch inaktiv (Lavrik *et al.*, 2005; Peter und Krammer, 2003). Daher wirkt es als Inhibitor, welcher die Prozessierung der beiden Procaspase-8 und -10 am DISC verhindert (Krueger *et al.*, 2001b). Neben FADD, Caspase-8, -10 und c-FLIP wurden noch eine Reihe weiterer Proteine als

DISC-Komponenten oder CD95-assoziierte Moleküle beschrieben (Tabelle I.1). Deren Rolle ist allerdings noch weitgehend unklar (Lavrik *et al.*, 2005; Peter und Krammer, 2003). So wurde RIP mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als CD95-interagierendes Protein identifiziert (Stanger *et al.*, 1995). Untersuchungen an RIP-defizienten Zellen zeigten jedoch, dass RIP keine Rolle bei CD95- vermittelter Apoptose spielt (Kelliher *et al.*, 1998; Ting *et al.*, 1996). Eine neuere Studie schreibt RIP eine Rolle in einem Caspase-8-unabhängigen Signalweg zu, der nach Stimulation von CD95 zu nekrotischem Zelltod führt (Holler *et al.*, 2000). Ein solcher Signalweg wurde für den Aktiverungs-induzierten Zelltod von T-Zellen vorgeschlagen, wenn Caspasen inhibiert sind.

Ebenfalls über das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde DAXX als ein mit CD95-interagierendes Protein kloniert (Yang *et al.*, 1997). DAXX soll über ASK1 c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) aktivieren und Apoptose auslösen (Chang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997). Jedoch ist CD95vermittelte Apoptose in DAXX-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt (Michaelson, 2000; Michaelson *et al.*, 1999). In der Tat konnte endogenes DAXX nie im CD95-DISC nachgewiesen werden, vielmehr ist das Protein im Kern lokalisiert (Michaelson *et al.*, 1999; Pluta *et al.*, 1998; Torii *et al.*, 1999). Weitere Studien weisen darauf hin, dass DAXX im Zellkern an der Regulation der Transkription während der Apoptose beteiligt ist (Li *et al.*, 2000; Torii *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000).

Ein weiteres, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziertes Protein, das mit dem CD95-DISC interagieren soll, ist FLASH (Imai *et al.*, 1999). FLASH soll die Rekrutierung und Prozessierung von Caspase-8 verstärken, diese Ergebnisse bedürfen aber noch der

Bestätigung mit Experimenten anderer Forschungsgruppen. Es wurde gezeigt, dass Todesrezeptoren ein konserviertes Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv innerhalb der DD besitzen. Dieses ist verantwortlich für die Bindung an die Src-Homologie (SH)-2-Domänen von SHP-1, SHP-2 und SHIP, die nach ihrer Bindung inhibitorisch waren (Daigle *et al.*, 2002).

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

Tabelle I.1: CD95-assoziierte Proteine.

Aggregation von CD95 und damit einhergehende DISC-Bildung stellen die ersten Schritte der CD95-Signaltransduktion dar. Die DISC-Bildung scheint von einem funktionellen Aktin-Cytoskelett abhängig zu sein (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002; Parlato *et al.*, 2000). Zur initialen Phase der CD95-Signaltransduktion gehören ferner als dritter Schritt die Caspase-8-abhängige Bildung großer CD95-Cluster auf der Zelloberfläche und viertens die Aktin-abhängige Internalisierung des DISC über einen endosomalen Weg (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002; Eramo *et al.*, 2004; Siegel *et al.*, 2004). Die Regulation von CD95 ist auch abhängig von bestimmten Tyrosinresten, deren Phosphorylierungen die DISC-Bildung verhindern (Reinehr und Haussinger, 2004). Die hier beschriebene Komplexität eröffnet viele Möglichkeiten, über die Apoptosesensitivität reguliert werden kann. Eine Zusammenfassung der mit CD95 interagierenden Proteine mit Ausnahme der zentralen DISC-Komponenten findet sich in Tabelle I.1.

3.3 Zwei CD95-Signalwege der Apoptose

Es zeigte sich schon bald nach der Identifizierung des CD95-DISC, dass nicht alle Zellen eine identische Signalleitung unterhalb dieses Todesrezeptor aufweisen, sondern dass die jeweils unterschiedlichen Zelltypen in zwei Gruppen aufgeteilt werden können. So werden Typ I- und Typ II-Zelllinien aufgrund der Menge der DISC-Bildung unterscheiden (Lavrik *et al.*, 2005; Scaffidi *et al.*, 1998). Die jeweils ablaufenden Signalwege nach Stimulation des CD95-Rezeptors sind in Abbildung I.4 aufgezeigt.



Abb. I.3: Übersicht über die Bcl2-Familie. Die pro-apoptotische Familienmitglieder enthalten alle 2-4 BH-Domänen. Die pro-apoptotische Bcl-2 Proteine können unterteilt werden in die Bax/Bak-ähnlichen Mitglieder, welche alle 2 oder 3 BH-Domänen besitzen, und in die BH3-Familienmitglieder, die nur die BH3-Domäne enthalten (nach Strasser *et al.*, 2005).

Eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose und zur Unterscheidung von Typ Ivon Typ II-Zelllinien spielen die Proteine der Bcl-2-Familie (Abbildung I.3). Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine umfasst anti-apoptotische Moleküle (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, BOO/DIVA, NR-13) und Moleküle, die Apoptose auslösen oder verstärken können (Bax, Bak, Bok/MTD, Bcl-x_S, Bad, Bid, Bik/NBK, Blk, Hrk/DP5, Bim/Bod, NIP3, NIX, NOXA, PUMA, Bmf) (Gross *et al.*, 1999a; Vander Heiden und Thompson, 1999) (Abbildung I.3). In Typ II-Zellen führt eine geringe DISC-Bildung zu einer geringen Menge aktiver Caspase-8. Diese spaltet das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid, wodurch ein 15 kD großes Spaltprodukt entsteht (tBID), welches myristoyliert wird, in die Mitochondrien transloziert und dort die Freisetzung von Cytochrom c auslöst (Gross *et al.*, 1999b; Han *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2000; Zha *et al.*, 2000). Dies führt zur Aktivierung eines mitochondrienabhängigen Signalweges, der durch Bcl-2 oder Bcl-x_L inhibiert werden kann (Willis *et al.*, 2003). Wie das *C. elegans* Homolog EGL-1 initiiert Bid die evolutionär konservierte Apoptosemaschinerie.

In Typ I-Zellen führt eine massive DISC-Bildung zu großen Mengen aktiver Caspase-8. Diese löst eine Caspasenkaskade aus, indem Effektorcaspasen wie Caspase-3 proteolytisch gespalten und damit aktiviert werden. Dieser Signalweg umgeht die Mitochondrien und wird folglich nicht durch Bcl-2 inhibiert. Zwar werden auch in Typ I-Zellen Mitochondrien während der Apoptose aktiviert, allerdings sind diese Zellen durch die direkte Caspase-Kaskade unabhängig vom mitochondrialen Apoptose-Signalweg (siehe Abbildung I.4). Ergebnisse von Studien mit Mausmodellen, in denen der Typ II-Signalweg durch Deletion oder Überexpression von kritischen Proteinen wie z.B. Apaf-1 oder Procaspase-9 ausgeschaltet ist, unterstreichen die physiologische Bedeutung des Zwei-Signalwege-Modells.

Während Thymozyten Bid-defizienter Mäuse genauso sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind wie Thymozyten aus Wildtyp (Wt)-Mäusen, sind Hepatozyten der Biddefizienten Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp resistent (Yin *et al.*, 1999). In Bax/Bak doppelt-defizienten Mäusen sind die Hepatozyten ebenfalls resistent, während ihre Thymozyten und T-Zellen vergleichbar sensitiv sind wie die Wildtyp-Zellen (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Dieselbe Dichotomie zeigen Mäuse, die Bcl-2 als Transgen überexprimieren: Hepatozyten sind resistent, T-Zellen und Thymozyten dagegen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Lacronique *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1996; Strasser *et al.*, 1995). Thymozyten und T-Zellen scheinen also Typ I-Zellen zu sein, während Hepatozyten Typ II-Zellen darstellen.



Abb. I.4: Zwei CD95-Signalwege. Erläuterungen siehe Text.

3.4 Die Signaltransduktion anderer Todesrezeptoren

Die biologische Funktion des TNF/TNF-Rezeptor-Systems ist komplexer und weniger gut definiert als die des CD95/CD95L-Systems, da zwei verschiedene Liganden (TNF α und LT α) an zwei Rezeptoren (TNF-R1 (CD120a) und TNF-R2 (CD120b)) binden können (Peter *et al.*, 1998; Wajant, 2003). Außerdem haben lösliches (sTNF) und membranständiges TNF (mTNF) unterschiedliche Affinitäten gegenüber beiden Rezeptoren (Wallach *et al.*, 1999). TNF ruft ein weites Spektrum zellulärer Reaktionen wie die Induktion von Cytokinen, Proliferation, Differenzierung oder Apoptose hervor. Demgemäß werden, verglichen mit dem CD95/CD95L-System, von diesem System auch Signaltransduktionswege größerer Diversität aktiviert (Tracey und Cerami, 1993; Vandenabeele *et al.*, 1995). Diese umfassen unter anderem die drei bekannten MAP-Kinase-Signalwege, die Induktion von NF κ B sowie die

Aktivierung von Caspasen (Wallach et al., 1999). Die Diversität der Signalwege spiegelt sich auch auf der Ebene der Adaptormoleküle wider. So koppelt TRADD TNF-R1 an FADD und Caspase-8 (Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1995) (Abbildung I.5). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl dominant negatives (DN) FADD (bestehend nur aus der DD) als auch inaktive Caspase-8 neben der Signaltransduktion von CD95 auch die von TNF-R1 blockieren können (Boldin et al., 1995a; Chinnaiyan et al., 1996b). Darüber hinaus verhalten sich Zellen, die FADD- oder Caspase-8-defizient sind, resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose (Juo et al., 1998; Juo et al., 1999; Varfolomeev et al., 1998). MADD, ein DD-enthaltendes Adaptormolekül mit Homologie zu Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, koppelt TNF-R1 an die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (Brown und Howe, 1998; Schievella et al., 1997). RIP dagegen vermittelt die TNF-R1-abhängige NFkB-Aktivierung (siehe Abbildung I.5). Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass sich die Signalleitung von TNF-R1 von der von CD95 bzw. TRAIL-R1/R2 unterscheidet (Varfolomeev und Ashkenazi, 2004). Für die Stimulation von TNF-R1 wurde beschrieben, dass sie in der Bildung zweier Signalkomplexe resultiert (Micheau und Tschopp, 2003). Komplex I wird direkt an der Membran gebildet und enthält neben TNF-R1 und TNF die Proteine RIP, TRAF-1/2 und möglicherweise weitere bisher nicht identifizierte Moleküle (siehe Abbildung I.5). Es wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung von NFkB nach Stimulation von TNF-R1 in Abhängigkeit von TRAF-2 erfolgt. Über TRAF-2 soll die Rekrutierung des IKK-Komplexes sowie die Aktivierung von JNK erfolgen. Der Komplex I enthält aber weder FADD noch Caspase-8, sondern soll von der Membran ins Cytosol translozieren. Dort erfolgt die Rekrutierung von FADD, Procaspase-8/10 und c-FLIP_{L/S}. Der dabei entstehende Komplex II wird auch als ,Traddosome' bezeichnet (Micheau und Tschopp, 2003). Die Aktivierung von Caspase-8 soll im Komplex II erfolgen (siehe Abbildung I.5). Die Entscheidung zwischen Überleben und Apoptose hängt in diesem Modell entscheidend von der Effizienz der Bildung von Komplex II, der Procaspase-8 Prozessierung und Aktivierung sowie der Konzentration an c-FLIPs ab (Micheau und Tschopp, 2003). Dieses Model muss in Zukunft aber noch durch weitere Experimente, vor allem aus anderen Gruppen, bestätigt werden.



Abb. I.5: Die Signaltransduktion von TNFR. Erläuterungen siehe Text. Nach Lavrik et al., 2005.

Über die biologische Funktion von DR3 und DR6 ist noch relativ wenig bekannt. DR3 scheint auf solche Gewebe beschränkt zu sein, die reich an Lymphozyten sind, und spielt möglicherweise eine Rolle in ihrer Homöostase (Bodmer *et al.*, 1997; Chinnaiyan *et al.*, 1996a). Da DR3 strukturell und bezüglich der bindenden Adaptormoleküle dem TNF-R1 vergleichbar (D'Souza *et al.*, 1996) und ferner in der Lage ist, Apoptose auszulösen sowie NFκB zu aktivieren (Bodmer *et al.*, 1997; Chinnaiyan *et al.*, 1996a; Kitson *et al.*, 1996; Marsters *et al.*, 1996b; Screaton *et al.*, 1997), wird postuliert, dass DR3 ähnliche Signalwege stimuliert wie TNF-R1 (Bhardwaj und Aggarwal, 2003; Karin und Lin, 2002; Peter *et al.*, 1998).

Auch für TRAIL kommt eine immunregulatorische Rolle in Betracht (Marsters *et al.*, 1996a). Zudem hat TRAIL eine anti-tumorale Wirkung. So werden Tumorzelllinien im Gegensatz zu untransformierten Zellen effizient getötet (Walczak *et al.*, 1999). Sowohl FADD als auch Caspase-8 werden an den DISC von TRAIL-R1 und -R2 rekrutiert und sind für TRAILinduzierte Apoptose essentiell (Bodmer *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000). Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass TRAIL in Mäusen das Tumorwachstum inhibiert, ohne dass Nebenerscheinungen der Behandlung beobachtet wurden (Walczak *et al.*, 1999). Weiterhin ist beschrieben worden, dass TRAIL auch in Tumoren wirkte, die Bcl-2 oder Bcl- x_L hochreguliert haben und damit resistent gegenüber konventioneller Tumortherapie mit Chemotherapeutika sind (Walczak *et al.*, 2000).

4. Todeseffektordomänen (DED)-enthaltende Proteine

Die Todeseffektordomäne wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems unter Verwendung der Todesdomäne von TNF-R1 gefunden. Dabei wurde das Adaptormolekül FADD (MORT1) identifiziert, welches sowohl DD- als auch DED-Domänen besitzt (Boldin *et al.*, 1995b; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Für die DED-Domäne konnte gezeigt werden, dass sie strukturelle Ähnlichkeit zur DD-Domäne und der Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) aufweist. Alle drei bestehen aus 6 α -Helices (Abbildung I.6).



Abb. I.6: Übersicht über die Struktur der Todeseffektordomäne. Die DED-Domäne besteht aus 6 anti-parallelen, amphiphatischen α -Helices, die durch kurze ungeordnete Verbindungsstücke miteinander verbunden sind. Die Verbindung zwischen α 4 und α 5 besteht aus einer β -Schleife (nach Tibbetts *et al.*, 2003).

Obwohl die drei Domänen DD, DED und CARD strukturell verwandt sind, wurde bisher gezeigt, dass es nur zu spezifischen Interaktionen zwischen Proteinen mit jeweils gleichen Domänen kommen kann, also DD-DD, DED-DED und CARD-CARD.

Inzwischen sind eine Reihe DED-enthaltender Proteine identifiziert worden. Tabelle I.2 zeigt eine Übersicht bisher in Säugetieren gefundener DED-enthaltender Proteine.

DED-enthaltendes Protein	Referenz
FADD	(Boldin <i>et al.</i> , 1995b; Chinnaiyan <i>et al.</i> , 1995)
Caspase-8	(Kischkel <i>et al.</i> , 1995; Muzio <i>et al.</i> , 1996b)
Caspase-10	(Fernandes-Alnemri <i>et al.</i> , 1996; Vincenz und Dixit, 1997)
DEDD	(Stegh <i>et al.</i> , 1998)
DEDD2	(Roth <i>et al.</i> , 2002)
Hip-I	(Gervais <i>et al</i> ., 2002)
Ніррі	(Gervais <i>et al.</i> , 2002)
Bap31	(Ng <i>et al.</i> , 1997)
c-FLIP	(Goltsev <i>et al.</i> , 1997; Han <i>et al.</i> , 1997; Hu <i>et al.</i> , 1997b; Inohara <i>et al.</i> , 1997; Irmler <i>et al.</i> , 1997; Rasper <i>et al.</i> , 1998; Shu <i>et al.</i> , 1997; Srinivasula <i>et al.</i> , 1997)
PEA-15/PED	(Condorelli <i>et al.</i> , 1999)
BAR	(Zhang <i>et al.</i> , 2000)

Tabelle I.2: Übersicht über DED-enthaltende Proteine (nach Tibbetts et al., 2003).

Einige DED-Domänen sind zwischen verschiedenen Arten hoch konserviert. Zum Beispiel ist die DED-Domäne in DEDD identisch in Maus, Ratte und Mensch und die DED-Domäne in PEA15/PED ist identisch in Maus und Mensch (Tibbetts *et al.*, 2003).

Obwohl in Bakterien keine DED-enthaltenden Proteine bekannt sind, induzierte die DED-Domäne von FADD nach Überexpression in Bakterien Zelltod (Lee *et al.*, 2000). Diese Beobachtung ist nicht erklärbar, zumal in Bakterien auch keine Caspasen gefunden wurden. Möglicherweise evolvierten die DED-Proteine unabhängig von den Caspasen.

Wenn DEDs überexprimiert werden, bilden sich sogenannte Todeseffektorfilamente aus, die Zelltod hervorrufen (Siegel *et al.*, 1998). Dabei kommt es nach Überexpression im Cytoplasma zur Bildung unlöslicher, perinukleärer Filamente, welche über ihre DEDs zur Rekrutierung von inaktiven Procaspasen führen. Bei welchen intrazellulären Konzentrationen es allerdings zur Ausbildung dieser Strukturen kommt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Für DED-enthaltende Proteine sind sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Funktionen beschrieben worden. Als pro-apoptotische DED-enthaltende Proteine sind die Komponenten des DISC bekannt, die eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Apoptose spielen (s.o.). Als anti-apoptotische DED-enthaltende Proteine wurden u.a. c-FLIPs (s.u.) und PED/PEA-15 beschrieben.

Für PEA-15/PED wurde gezeigt, dass es CD95- sowie TNF-induzierte Apoptose inhibieren kann (Condorelli *et al.*, 1999; Kitsberg *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2002). PEA-15/PED-15 enthält eine N-terminale DED-Domäne, und es wurde gezeigt, dass seine Aktivität von

Proteinkinase C (PKC) und Calcium/Calmodulin-Kinase II (CaMKII) reguliert werden kann. Phosphorylierungen der Serine 104 und 116 sind entscheidend für die Rekrutierung an den DISC und somit für die anti-apoptotischen Eigenschaften (Kubes *et al.*, 1998).

Es ist bisher nicht geklärt, warum die DED-enthaltenden Proteine sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften haben können. Die verschiedenen Rollen DED-enthaltender Proteine hängen von ihren molekularen Interaktionen ab. Wahrscheinlich ist die homotypische Interaktion zwischen DED-Domänen abhängig von hydrophoben Wechselwirkungen (Eberstadt *et al.*, 1998; Weber und Vincenz, 2001). Deshalb ist es in zukünftigen Studien notwendig, diese molekularen Wechselwirkungen biochemisch zu charakterisieren, um therapeutisch in die komplexe Funktionsweise DED-enthaltender Proteine eingreifen zu können.

5. Caspase-8

5.1 Caspase-8: Expression und Funktion

Mit CAP4 wurde die erste Komponente des DISC identifiziert, die potenziell enzymatische Aktivität besitzt (Kischkel *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1996b). Da der C-Terminus des Moleküls Homologien zu der Proteasenfamilie der Caspasen aufweist (Alnemri *et al.*, 1996), die früher auch als ICE-ähnliche Proteasen bezeichnet worden sind, wurde CAP4 FLICE (engl.: FADD-like Interleukin-1ß-converting enzyme) genannt (Muzio *et al.*, 1996b). Weitere Synonyme für dieses Molekül sind MACH (Boldin *et al.*, 1996) und MCH5 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996), wobei die offizielle Nomenklatur Caspase-8 als Namen vorsieht (Alnemri *et al.*, 1996). Das humane Gen für Caspase-8, *CASP8*, ist auf dem Locus 2q33-34 lokalisiert, während sich das homologe Gen für die murine Caspase-8, *Casp8*, in der chromosomalen Region 1B-proximal C befindet (Kischkel *et al.*, 1998).

Sowohl die murinen als auch die humanen Caspase-8-Transkripte sind durch Northern Blot in Herz, Milz, Lunge, Leber und Niere nachweisbar, während in Hoden und im Skelettmuskel kaum Transkripte nachgewiesen werden können (Kischkel *et al.*, 1998).

Bislang sind 11 verschiedene mRNA-Spezies für Caspase-8 beschrieben (Boldin *et al.*, 1996; Breckenridge *et al.*, 2002; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Himeji *et al.*, 2002; Muzio *et al.*, 1996b), die als Caspase-8/a bis 8/k bezeichnet werden (Abbildung I.7). Für die verschiedenen Spleißvarianten werden unterschiedliche Funktionen diskutiert, und zwar sowohl die Inhibition als auch die Verstärkung von CD95-induzierter Apoptose (Boldin *et al.*, 1996). Auf Proteinebene sind zunächst nur Caspase-8/a und -8/b identifiziert worden. Später ist von einer weiteren Isoform 8/i berichtet worden, die bisher nur in peripheren Blut-Lymphozyten auf Proteinebene nachweisbar ist (Eckhart *et al.*, 2001; Himeji *et al.*, 2002). Aus Überexpressionsstudien ist bekannt, dass Caspase-8/i inhibitorisch auf Apoptose wirkt. Sie besitzt zwar Tandem-DEDs, aber keine Protease-Domänen. Eine alternative Spleiß-Donorstelle nach Exon 11 führt zur Nutzung eines alternativen Stopp-Codons und damit zu einem verkürzten offenen Leserahmen, der lediglich die beiden DEDs und einen verkürzten C-Terminus codiert.



Abb. I.7 Caspase-8-Isoformen. (A) Exonstruktur von *CASP8*. (B) mRNA der bekannten Isoformen. (C) Nachgewiesene Isoformen auf Proteinebene. Ein Startcodon ist durch einen Pfeil, ein Stoppcodon durch ein Rad gekennzeichnet.

Caspase-8/k ist eine vierte Isoform von Caspase-8, die auf Proteinebene detektiert wurde (Breckenridge *et al.*, 2002). Sie besitzt eine N-terminale Verlängerung von 59 Aminosäuren,

die sogenannte NEX-Domäne (engl.: N-terminal extension). Diese Domäne erlaubt die selektive Rekrutierung dieser Isoform an BAP31, ein integrales Protein des Endoplasmatischen Retikulums. Diese Rekrutierung erfolgt aber nur nach apoptotischer Stimulation mit dem adenoviralen Modell-Onkogen E1A. Die Rekrutierung und Aktivierung erfolgt FADD-unabhängig und kann durch Bcl-2 blockiert werden. Dieses System könnte einen zusätzlichen Aktivierungs-Mechanismus für die Initiator-Caspase-8 darstellen (Breckenridge et al., 2002).

Neben heterozygoten Mutationen in CD95, CD95L und Caspase-10, die zur Ausbildung von ALPS führen können, gibt es auch eine vererbbare Krankheit, die durch eine Mutation im Caspase-8-Gen hervorgerufen wird. Homozygote Individuen zeigen einen Defekt bei der Apoptoseinduktion in Lymphozyten. Anders als beim Krankheitsbild des Autoimmun-Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) führt die ererbte Mutation von Caspase-8 zu Defekten bei der Aktivierung von T und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Damit spielt Caspase-8 wahrscheinlich eine wichtige postnatale Rolle in der Immunaktivierung naiver Lymphozyten. Ein Verlust der Caspase-8-Aktivität führt im Gegensatz zur knock-out-Maus nicht zu pränataler Letalität (Chun *et al.*, 2002).

Die murine Caspase-8 ist bisher weniger gut charakterisiert als die humane Caspase-8. Bislang ist lediglich eine Isoform bekannt (Sakamaki *et al.*, 1998; Van de Craen *et al.*, 1998), die Existenz weiterer Isoformen ist aber relativ wahrscheinlich, zumal in der Maus kein Homolog zu Caspase-10 existiert. Eine homozygote Mutation im Gen der murinen Caspase-8 führt zu pränataler Letalität. Murine Embryos, denen Caspase-8 fehlt, weisen eine Fehlentwicklung der Herzmuskulatur und eine Akkumulation von Erythrozyten auf (Varfolomeev *et al.*, 1998). Neben ihrer wichtigen und nicht-redundanten Funktion in der Signaltransduktion von multiplen Rezeptoren der TNF/NGF-Rezeptorfamilie spielt Caspase-8 also in der Embryonalentwicklung eine lebenswichtige Rolle.

Zusätzlich zu ihrer Funktion in der initialen Phase der Apoptose-Induktion wurde kürzlich beschrieben, dass Procaspase-8 an der NF κ B-Aktivierung nach B-Zell-Rezeptor (BZR)- und T-Zell-Rezeptor (TZR)-Stimulation beteiligt ist. Es wurde gezeigt, dass Procaspase-8 nach Stimulation verschiedener Immunrezeptoren mit dem Bcl10-MALT1 (engl.: mucosa-associated lymphatic tissue)-Komplex assoziiert und direkt den IKK-Komplex an diesen Komplex rekrutiert. Die Aktivierung von NF κ B in diesem Komplex soll abhängig sein von der enzymatischen Aktivität von Procaspase-8 (Su *et al.*, 2005).

5.2 CAP3

CAP3 wurde nach zweidimensionaler (2D)-Gelelektophorese neben CAP1, CAP2 und CAP4 als ein Protein entdeckt, welches nach Apoptose-Stimulation an den DISC von oligomerisiertem CD95 bindet. CAP1 und CAP2 wurden als Serin-phosphoryliertes FADD identifiziert (Kischkel et al., 1995). CAP4 wurde später als FADD-bindende Protease identifiziert, die heute als Procaspase-8 bekannt ist (Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995). Mittels Nano-Elektrospray Tandem-Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass Procaspase-8 zwei N-terminale DEDs besitzt, die auch in CAP3 identifiziert wurden (Muzio et al., 1996a). Wiederholte Sequenzierung von CAP3 resultierte in der Identifikation der Peptidsequenzen FLSLDYIPQR und FLLQEEISK, wobei die zuerst genannte Sequenz in der N-terminalen Hälfte der ersten DED von Procaspase-8 lokalisiert ist und von Exon 5 des CASP-8-Gens codiert wird. Die zweite Peptidsequenz liegt im N-terminalen Abschnitt der zweiten DED-Domäne und wird vom Exon 7 des CASP8-Gens codiert. Weil für CAP3 ein Molekulargewicht von etwa 26 kD ermittelt worden war, wurde CAP3 anfänglich für die fast ebenso große Prodomäne von Caspase-8 gehalten, die nach der Prozessierung am DISC gebunden bleibt (Muzio et al., 1996a). Erst weitere Studien der Prozessierung von Procaspase-8 in 2D-Gelen konnten aber für die Prodomäne von Procaspase-8 zwei zusätzliche Spots identifizieren, die andere isoelektrische Punkte als CAP3 aufwiesen und als CAP5 und CAP6 bezeichnet wurden (Medema et al., 1997a). Für CAP3 wurde vermutet, dass es während der Prozessierung von Procaspase-8 in seiner Konzentration unverändert an den DISC assoziiert ist. In in-vitro-Caspase-8-Spaltungs-Experimenten wurde kein Produkt identifiziert, welches CAP3 ähnelt. Dazu wurde Procaspase-8 in-vitro-translatiert, zusammen mit einem DISC inkubiert und die Prozessierung visualisiert (Medema et al., 1997a). Deshalb wurde lange Zeit vermutet, dass es sich bei CAP3 um eine bislang nicht identifizierte Spleißvariante von Caspase-8 handelt, die Ähnlichkeiten zu den beiden kurzen Spleißvarianten von c-FLIP, c-FLIPs, und Caspase-10, Caspase-10/c, besitzt (Sprick et al., 2002).

Weil CAP3 bislang im DISC verschiedener Zelltypen detektiert wurde, ist für CAP3 eine wichtige regulatorische Funktion, möglicherweise eine katalytische Funktion bei der Prozessierung von Procaspase-8 im DISC diskutiert worden (Medema *et al.*, 1997a).

5.3 Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-8 am DISC

5.3.1 Das ,induced proximity'-Modell

Die Prozessierung und Aktivierung von Caspase-8 wurde seit 1998 mit dem Modell der ,induced proximity' erklärt (Salvesen und Dixit, 1999). Dieses Modell integriert die Arbeiten verschiedener Gruppen, die autoproteolytische Aktivierung von Procaspase-8 demonstrierten, wenn Procaspase-8 Moleküle in enge Nachbarschaft gebracht werden (Chen et al., 2002; Muzio et al., 1998; Srinivasula et al., 1998; Yang et al., 1998a; Yang et al., 1998b). Die verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten ähnliche Methoden, indem sie die Caspase als Fusionsprotein mit einer heterologen Dimerisierungsdomäne, zumeist der FK506 Bindedomäne, einsetzten. Diese Domäne lässt sich mit Hilfe des dimeren Liganden FK1012 artifiziell dimerisieren. Obwohl mit dieser Methode gezeigt werden kann, dass Procaspase-8 durch induzierte Oligomerisierung zur Autoprozessierung gebracht werden konnte, bleibt zu bedenken, dass die Prodomäne der Procaspase-8 jeweils durch die Dimerisierungsdomäne substituiert wurde und damit ein Einfluss der Prodomäne während der Autoprozessierung nicht analysiert wurde. Ein weiteres Problem bei Verwendung dieser Methode ist die die Verwendung nicht-nativer Hybrid-Proteine, möglicherweise unspezifischer Oligomerisierung unterliegen könnten. Interessanterweise können Caspasen sehr leicht aktiviert werden, wenn sie in Bakterien überexprimiert werden, wahrscheinlich durch induzierte Nachbarschaft aufgrund hoher Proteinkonzentrationen. Deshalb ist es umstritten, ob Procaspase-8 unter physiologischen Bedingungen auf gleiche Art und Weise prozessiert wird (Shi, 2004).

5.3.2 Dimerisierung als Voraussetzung für die Aktivierung

Obwohl das ,induced proximity'-Modell eine Reihe von Beobachtungen subsummiert, kann es nicht erklären, auf welche Weise Initiator-Caspasen, wie Procaspase-8, mechanistisch prozessiert und aktiviert werden können. Die initialen Experimente, um diese Fragestellung zu untersuchen, kamen von Salvesen *et al.* Sie zeigten durch biochemische Studien an Caspase-8 und -9, dass Dimerisierung zur Aktivierung von Initiatorcaspasen führen kann (Boatright *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2002; Donepudi *et al.*, 2003; Renatus *et al.*, 2001). Diese Hypothese wurde als ,proximity-induced dimerization'-Modell bekannt, also die Aktivierung

der Initiatorcaspasen nach induzierter Nachbarschaft im Dimer. Dieses Modell baut auf der ,induced proximity'-Hypothese auf und beschreibt zum ersten Mal die spezifische Konformation der Initiatorcaspase als Dimer. Wichtig ist hier, dass eine Dimerisierung von Caspase-Monomeren entscheidend von den intermolekularen Bindungen abhängt und sich unterscheidet von der unspezifischen Oligomerisierung, welche durch heterologe Dimerisierungsdomänen hervorgerufen werden kann (s.o.).

Das ,proximity-induced dimerization'-Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich Caspase-9 in einem Gleichgewicht zwischen einer überwiegenden Fraktion von Caspase-9-Monomeren und einer kleineren Fraktion von Homodimeren befinden soll (Renatus *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte eine enzymatische Aktivität der Homodimere nach Gelfiltration und anschließend *in-vitro*-Assay gezeigt werden, während die Monomere überwiegend inaktiv waren (Renatus *et al.*, 2001). Nicht erklärt werden konnte, warum die Caspase-9-Homodimere nach Verdünnung nicht zu Monomeren dissoziiert sind, und warum die Caspase-9-Monomere nach Konzentrierung nicht zur Bildung von Caspase-9-Homodimeren gezwungen werden konnten.

Basierend auf dem ,proximity-induced dimerization' Modell wurde vorhergesagt, dass das Apoptosom bzw. der DISC die Dimerisierung der Initiatorcaspasen-9 bzw. -8 fördern und die beiden Caspasen aufgrund lokal hoher Konzentrationen zur Autoprozessierung bringen können (Boatright *et al.*, 2003; Renatus *et al.*, 2001). Trotzdem sind diese Vorhersagen nicht experimentell bestätigt worden. Interessanterweise wurde für das Apoptosom eine heptamere Struktur gefunden (Acehan *et al.*, 2002), während für den DISC eine überwiegend trimere Struktur bestimmt wurde (Banner *et al.*, 1993). Aufgrund ihrer ungeraden Symmetrie ist unklar, wie beide Komplexe die Dimerisierung der gebundenen Initiatorcaspasen fördern.

Abschließend kann folgendes festgehalten werden: Dem Modell des ,induced proximity' liegen experimentelle Beobachtungen verschiedener Gruppen zugrunde. Das ,proximityinduced dimerization'-Modell ist ein detaillierteres Modell, welches die Konformation der Inititorcaspasen mit einbezieht und damit einen ersten Schritt in Richtung des Prozessierungsund Aktivierungsmechanimus darstellt. In zukünftigen Studien ist zusätzlich zur biochemischen detaillierten Analyse des Mechanimus entscheidend, den physiologischen Kontext mit einzubeziehen.

5.3.3 Mechanismus der Prozessierung von Procaspase-8 am DISC

Für die Prozessierung von Procaspase-8 am DISC wurden zwei aufeinander folgende proteolytische Schritte vorgeschlagen. Zuerst wird die 10 kD große Untereinheit (p10) abgespalten, danach erfolgt die Abspaltung der 18 kD großen Untereinheit (p18). Nach Abspaltung der p10-Untereinheiten bleiben die von beiden Caspase-8 Isoformen gebildeten N-termini der Größen p43 und p41 übrig. Nach Abspaltung von p18 bleiben die beiden Prodomänen p26 und p24 übrig (Scaffidi *et al.*, 1997). Diese Spaltungen können durch die Expression von c-FLIPs unterbunden werden. Die Überexpression der kurzen Isoform c-FLIPs verhindert vollständig die Autoprozessierung, und die Abspaltung von p10 ist nicht möglich. Bei Überexpression von c-FLIP_L ist die Abspaltung von p10 möglich, allerdings wird die weitere Prozessierung inhibiert (Krueger *et al.*, 2001b).

In anderen Studien wurde dagegen gezeigt, dass die ektopische Expression von c-FLIP_L die Prozessierung der Procaspase-8 am CD95-DISC fördern kann (Chang *et al.*, 2002; Micheau *et al.*, 2002). Ebenso wurde mit Hilfe von aufgereinigten Proteinen gezeigt, dass c-FLIP_L Procaspase-8 und -10 durch Bildung heterodimerer Komplexe aktiviert (Boatright *et al.*, 2004).

Der Einfluss von c-FLIP auf die Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-8 wurde kürzlich mit Hilfe von RNA-Interferenz untersucht (Sharp et al., 2005). Schon aus embryonalen Fibroblasten von c-FLIP-knockout-Mäusen war bekannt, dass sie eine höhere Sensitivität bezüglich Todesliganden-induzierter Apoptose aufwiesen (Yeh et al., 2000). Auch die gleichzeitige Herunterregulation der beiden c-FLIP-Spleißvarianten c-FLIPs und c-FLIP_L führte zu erhöhter Apoptose-Induktion nach Stimulation mit CD95L oder TRAIL (Chawla-Sarkar et al., 2004; Dutton et al., 2004; Ganten et al., 2004; Kung et al., 1979; Mathas et al., 2004; Rippo et al., 2004; Siegmund et al., 2002; Zhang et al., 2004). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde der Einfluss von c-FLIP_L und c-FLIP_S jeweils nach selektiver Herunterregulation mittels RNA-Interferenz analysiert (Sharp et al., 2005). Die selektive Herunterregulation von c-FLIP_L zeigte, dass in diesen Zellen mehr Procaspase-8 an den DISC rekrutiert, prozessiert und aktiviert wurde als in den Kontrollzellen, die endogene Mengen an c-FLIP_L enthielten. Wahrscheinlich scheint somit die hauptsächliche Rolle von c-FLIP_L eine inhibitorische zu sein und weniger eine aktivierende Rolle bei der Autoprozessierung von Procaspase-8 zu spielen. Somit erfolgt die Prozessierung von Procaspase-8 im DISC wahrscheinlich Dimer-abhängig und ein Procaspase-8-Dimer aktiviert ein anderes Procaspase-8-Dimer.



Abb. I.8 Procaspase-8-Aktivierung im Dimer. Nach Stimulation des Todesrezeptors bildet sich der DISC aus. Es wird FADD rekrutiert und Procaspase-8. Dann bilden sich Procaspase-8-Dimere durch stabile Interaktion über ihre Proteasedomänen aus und erhalten Procaspase-8-Aktivität (I). Die Procaspase-8-Aktivität eines Dimers führt zu initialen Spaltung der beiden Procaspasen-8 eines anderen Dimers zwischen dessen großen und kleinen Proteasedomänen (II). Abschließend erfolgt nach konformationeller Änderung des partiell prozessierten Procaspase-8-Dimers dessen weitere Spaltung zwischen Prodomänen und großen Proteasedomänen. Dadurch entsteht das mature Caspase-8 Heterotramer, welches ins Cytosol entlassen wird (III) (nach Chang *et al.*, 2003).

Abbildung I.8 zeigt schematisch, wie die Aktivierung der Procaspase-8 wahrscheinlich erfolgt (Chang *et al.*, 2003).

Neben der Aktivierung am DISC wurde kürzlich gezeigt, dass Procaspase-8 auch durch Proteolyse mittels anderer Proteasen aktiviert werden kann und eine Autoprozessierung der Aktivierung nicht in jedem Fall vorangehen muss (Murphy *et al.*, 2004; Sohn *et al.*, 2005). Diese Art der Aktivierung war bislang nur für Effektor-Caspasen bekannt. Die Spaltung erfolgt direkt in der Kette und führt zur Aktivierung von Caspase-8. Diese Spaltung korrelierte mit der Aktivität der Protease Granzym B (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Medema *et al.*, 1997b) und in anderen System mit der Aktivität von Caspase-6 (Cowling und Downward, 2002; Slee *et al.*, 1999b). In der Studie von Murphy *et al.* wurden die bisherigen Korrelationen über biochemische Analysen direkt bewiesen (Murphy *et al.*, 2004). In einer weiteren biochemischen Analyse von Sohn *et al.* wurde gezeigt, dass für diese nichtkanonische Aktivierung der Procaspase-8 sowohl Caspase-6- als auch Caspase-3-Aktivität notwendig sind (Sohn *et al.*, 2005).

6. FLICE-inhibitorische Proteine (FLIPs)

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

6.1 Virale FLIPs (v-FLIPs)

Datenbankrecherchen führten zur Identifikation viraler Apoptoseinhibitoren mit N-terminal enthaltenen Tandem-DEDs. Aufgrund dieser Struktureigenschaft wurden die Mitglieder dieser Familie v-FLIPs (viral <u>FLICE</u> inhibitory proteins) genannt (Thome *et al.*, 1997). V-FLIPs werden von γ-Herpesviren wie dem equinen Herpesvirus-2 (EHV-2), dem bovinen Herpesvirus-4 (BHV-4), dem Herpesvirus Saimiri (HVS), dem Kaposi-Sarkom-assoziierten humanen Herpesvirus-8 (HHV-8) sowie dem humanen Molluscum Contagiosum Virus (MCV) codiert (Bertin *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997a; Thome *et al.*, 1997). Sie werden an den CD95-DISC rekrutiert und inhibieren auf diese Weise die Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-8. Auch andere Todesrezeptorsysteme (TNF-R1, DR3 und TRAIL-R) werden durch v-FLIPs blockiert (Meinl *et al.*, 1998). Eine Deletion des v-FLIP-Gens aus HVS bestätigte dessen anti-apoptotische Aktivität und zeigte ferner, dass v-FLIP nicht für die Replikation, Transformationskapazität oder Pathogenität von HVS benötigt wird (Glykofrydes *et al.*, 2000). Auch die T-Zell spezifische transgene Expression von MC159vFLIP des humanen Molluscum Contagiosum Virus in Mäusen blockierte CD95-induzierte Apoptose in Thymozyten und peripheren T-Zellen (Wu *et al.*, 2004).

6.2 Zelluläre FLIPs (c-FLIPs)

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

et al., 1997; Hu *et al.*, 1997b; Inohara *et al.*, 1997; Irmler *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998; Shu *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997).

Multiple Splicevarianten von c-FLIP wurden beschrieben (Abbildung I.9), von denen allerdings nur zwei, bezeichnet als c-FLIP_L und c-FLIP_S, auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten (Irmler *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999).



Abb. I.9 c-FLIP-Isoformen. (A) Exonstruktur von *CFLAR*. (B) mRNA der bekannten Isoformen. (C) Nachgewiesene Isoformen auf Proteinebene. Ein Startcodon ist durch einen Pfeil, ein Stoppcodon durch ein Rad gekennzeichnet (nach Djerbi *et al.*, 2001).

Während c-FLIP_S mit einem Molekulargewicht von 27 kD aus zwei DEDs und einem kurzen C-terminalen Rest aus 19 Aminosäuren besteht, ist c-FLIP_L mit einem Molekulargewicht von 55 kD homolog zu Procaspase-8. Neben den Tandem-DEDs verfügt es über zwei Domänen, die der p18- sowie der p10-Domäne von Caspase-8 ähnlich sind und als p20 bzw. p12 bezeichnet werden. Wie Procaspase-8 enthält cFLIP_L zwischen diesen beiden Domänen hinter D376 eine Spaltstelle für Caspasen mit der Sequenz LEVD (Irmler *et al.*, 1997; Shu *et*

al., 1997). Die konservierten Motive HG und QA<u>C</u>QG, die in Caspase-8 an der Katalyse beteiligt sind, finden sich allerdings nicht in c-FLIP_L. Hier sind die entsprechenden Sequenzen RG, respektive QN<u>Y</u>VV.

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

Über die Funktion von c-FLIP gibt es gegensätzliche Aussagen. So wurde c-FLIP zunächst (Shu et al., 1997) und in weiteren Analysen als pro-apoptotisches Molekül beschrieben (Han et al., 1997; Inohara et al., 1997), während andere Untersuchungen eine apoptoseinhibierende Funktion von c-FLIP zeigten (Hu et al., 1997b; Irmler et al., 1997; Kataoka et al., 1998; Rasper et al., 1998; Srinivasula et al., 1997). Auch eine gegensätzliche Funktion in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie sowie dem Expressionsniveau von c-FLIP wurde diskutiert (Goltsev et al., 1997; Wallach, 1997). Eine Studie zum Verhalten stabil c-FLIPLüberexprimierender Zellen gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli zeigte, dass c-FLIPL effizient Todesrezeptor-vermittelte Apoptose blockiert, nicht jedoch solche, die durch Perforin/Granzym B, verschiedene Chemotherapeutika oder y-Strahlung ausgelöst wird (Kataoka et al., 1998). Da jedoch allen diesen Studien Untersuchungen mit stabiler oder transienter Überexpression des Proteins zugrunde liegen, ist die physiologische Situation damit noch nicht erfasst. Da die Überexpression von DED-enthaltenden Proteinen unspezifisch Apoptose auslösen kann, muss eine in Überexpressionsystemen beobachtete pro-apoptotische Funktion von c-FLIP kritisch diskutiert werden (Irmler et al., 1997; Scaffidi et al., 1999; Siegel et al., 1998). Auch mit Hilfe von RNA-Interferenz konnte gezeigt werden, dass sowohl c-FLIPs als auch c-FLIP_L anti-apoptotische Funktion haben und die anfangs beobachtete pro-apoptische Funktion eher artifizieller Natur ist (Sharp et al., 2005).

6.3 Regulation der Expression von c-FLIP

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

Eine weitere Regulation der Expression von c-FLIP Isoformen erfolgt über proteolytischen Abbau (Poukkula *et al.*, 2005). Lange Zeit war nur wenig über die Regulation der Halbwertszeit der beiden c-FLIP-Isoformen bekannt. Es wurde u.a. durch die Verwendung des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) beobachtet, dass c-FLIP_S eine kürzere Halbwertszeit aufwies als c-FLIP_L (Scaffidi *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2004). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Halbwertszeit beider c-FLIP-Spleißvarianten aktiv über Ubiquitinabhängige Degradation erfolgt (Kim *et al.*, 2002; Perez und White, 2003). Kürzlich wurde berichtet, dass die beiden e-FLIP-Isoformen, e-FLIP_L und c-FLIP_S, eine unterschiedliche Halbwertszeit aufweisen (Poukkula *et al.*, 2005). In dieser Studie wurden mittels Mutationsanalyse die Ubiquitin-Akzeptor-Lysine identifiziert, die für die Degradation eine wichtige Rolle spielen. Diese Lysine unterscheiden sich in c-FLIP_L und c-FLIP_S voneinander. Der kurze C-Terminus von c-FLIP_S, dessen Sequenz in c-FLIP_L nicht auftritt, hat eine zusätzliche destabilisierende Wirkung, die sich durch solche Ubiquitin-Akzeptoren erklären lässt.

6.4 Die Rolle von c-FLIP im Immunsystem

6.4.1 Apoptose im Immunsystem

Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Organismus. Sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und die Beseitigung von alten, geschädigten oder mutierten Zellen. Im Immunsystem ist sie der Hauptmechanismus, über den potenziell autoreaktive oder nicht mehr benötigte Immunzellen beseitigt werden (Baumann *et al.*, 2002). T-Zellen durchlaufen im Thymus die Prozesse der positiven und negativen Selektion.

Aber nicht nur in der Entwicklung von Lymphozyten sondern auch während einer Immunantwort ist Apoptose für den Erhalt der Zellhomöostase essentiell. Nach Erkennung eines Antigens durch T-Zellen proliferieren diese und führen ihre Effektorfunktionen aus. Ist das Antigen beseitigt, werden die nun nicht mehr benötigten, aktivierten T-Zellen durch Apoptose eliminiert. Dies wird als Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) bezeichnet (Combadiere *et al.*, 1998; Dhein *et al.*, 1995b; Peter *et al.*, 1997). Beim AICD spielt das CD95/CD95L-System eine entscheidende Rolle. Die Stimulation des TZR auf bereits aktivierten T-Zellen führt zu einer verstärkten Produktion von CD95L. Durch eine Interaktion des CD95/CD95L-Systems werden die Zellen durch Apoptose beseitigt (Alderson *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995a; Ju *et al.*, 1995). Wird diese Homöostase durch einen verminderten AICD gestört, kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen (Krammer, 1999).

6.4.2 Die physiologische Rolle von c-FLIP im Immunsystem

Bereits in einer der ersten Beschreibungen von c-FLIP wird über eine Verminderung des c-FLIP_L-Expressionsniveaus in aktivierten primären T-Zellen berichtet. Dies lässt vermuten, dass c-FLIP zur Sensitivierung von aktivierten T-Zellen gegenüber AICD beiträgt (Irmler *et al.*, 1997). Retrovirale Rekonstitution aktivierter T- und B-Zellen mit c-FLIP verhinderte CD95-vermittelten AICD in diesen Zellen (Van Parijs *et al.*, 1999). *In vivo* führt eine erhöhte Expression von c-FLIP zur Produktion von Autoantikörpern und zur Entwicklung von Erscheinungen wie sie bei Autoimmunerkrankung beobachtet wurden. Das lässt vermuten, dass c-FLIP zum Erhalt der Selbst-Toleranz notwendig ist (Van Parijs *et al.*, 1999).

Anfänglich lag der Schwerpunkt der meisten Studien zu c-FLIP auf der langen Spleißvariante, c-FLIP_L, vermutlich weil diese in der Regel stärker exprimiert wird als c-FLIP_S. Für c-FLIP_S konnte später gezeigt werden, dass es als Effektor CD28-vermittelter Kostimulation von T-Zellen dient (Kirchhoff *et al.*, 2000b) und zudem zur Resistenz TZR-restimulierter T-Zellen gegenüber AICD beiträgt (Kirchhoff *et al.*, 2000a).

TZR-Restimulation bereits aktivierter T-Zellen über den TZR führt ebenfalls zu einer massiven Steigerung des Expressionsniveaus von c-FLIP_s, was die DISC-Aktivierung nach Stimulation von CD95 inhibiert und folglich vor Apoptose schützt. Die Induktion von

murinem c-FLIP nach wiederholter Antigengabe konnte ebenfalls in einem TZR-transgenen Mausmodell beobachtet werden (Inaba *et al.*, 1999).

Nicht nur die Homöostase von T-, sondern auch die von B-Zellen scheint durch die Modulation von c-FLIP_L beeinflusst zu werden. Nach Stimulation von humanen tonsillaren B-Zellen über CD40 oder den BZR wird c-FLIP_L induziert und an den CD95-DISC rekrutiert (Hennino *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Zudem scheint c-FLIP_L an der Regulation des Überlebens von B-Zellen aus den Keimzentren nach erfolgreicher Affinitätsreifung beteiligt zu sein (Hennino *et al.*, 2001).

Dendritische Zellen (DC) und Macrophagen stellen neben den lymphoiden Zellen einen weiteren wichtigen Teil des Immunsystems dar. Sie präsentieren z.B. T- und B-Zellen Antigene, sind jedoch auch an Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Atherosklerose beteiligt. Macrophagen differenzieren aus zirkulierenden Monozyten und gehen dabei von einem CD95-sensitiven in einen -resistenten Zustand über. Dieser Wechsel korreliert mit einem Anstieg der Expression von c-FLIP (Perlman et al., 1999). Unreife DCs nehmen im peripheren Gewebe Antigene auf und transportieren sie zu den lymphoiden Organen. Während der Wanderung reifen die DCs, d.h. die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen verringert sich, und die Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle nimmt zu. Nach zwei Tagen verschwinden die DCs aus lymphoiden Organen, vermutlich durch Apoptose. Es wurde berichtet, dass unreife im Gegensatz zu reifen DCs sensitiv gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sind, wobei letztere ein erhöhtes c-FLIP_L-Expressionsniveau aufweisen (Leverkus et al., 2000). Todesrezeptorsysteme scheinen somit wichtiger für die Homöostase unreifer DCs zu sein als für die Apoptoseinduktion in reifen DCs.

Die Überexpression von c-FLIP induziert nicht nur das Auftreten von Autoimmunerkrankungen (Van Parijs *et al.*, 1999), sondern kann auch dazu beitragen, dass sich Tumore einer Immunantwort durch cytotoxische T-Zellen *in vivo* entziehen (Djerbi *et al.*, 1999; Medema *et al.*, 1999). Mäuse mit einem T-Zell-spezifischen Transgen für das virale FLIP-E8 haben stark reduzierte Thymozytenzahlen, obwohl diese Zellen resistent gegenüber CD95vermittelter Apoptose sind (OhYama *et al.*, 2000). Die Reduktion der Thymozytenzahlen wurde ebenfalls vor einem CD95^{-/-}-Hintergrund beobachtet, was darauf schließen lässt, dass dieses Phänomen unabhängig von CD95 ist. Interessanterweise ist der Phänotyp dieser Mäuse vergleichbar mit dem von Mäusen, die ein Transgen für eine dominant-negative Mutante von FADD tragen, was darauf hindeutet, dass ein anderes Todesrezeptorsystem für die Selektion von Thymozyten von entscheidender Bedeutung ist (Newton *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 1998). C-FLIP-defiziente Mäuse sterben embryonal an Tag E10,5 und lassen folglich keine auf das Immunsystem bezogene Analyse zu (Yeh *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise ähnelt ihr Phänotyp dem von FADD- und Caspase-8-defizienten Mäusen (Varfolomeev *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 1998b). Alle drei sterben vermutlich aufgrund fehlerhafter Herzentwicklung.

6.5 C-FLIP und NFkB-Signalleitung

6.5.1 NFkB Signalleitung

Als NFkB wird allgemein eine Reihe dimerer Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die ähnliche DNA-Sequenzen, sogenannte kB-Erkennungsequenzen, erkennen und binden können. In Säugetieren sind fünf NFkB-Proteine bekannt: cRel, RelA, RelB, NFkB1/p50 und NFkB2/p52. Während die Rel-Proteine Transkriptionsaktivierungs-Domänen besitzen, fehlen diese in p50 und p52. Ihre Aktivierungsfunktion besteht darin, mit einem der drei Rel-Proteine Heterodimere zu bilden (May und Ghosh, 1997). NFkB Proteine sind in unstimulierten Zellen im Cytoplasma lokalisiert und translozieren nach Stimulation schnell in den Zellkern (Ghosh und Karin, 2002). Dieser Prozess wird als NFKB Aktivierung bezeichnet und hängt von zwei Signalwegen ab. Die klassische NF KB Signalleitung erfolgt über den sogenannten IkB-Kinase-Kompex (IKK-Komplex), in welchem IkB-Kinasen nach ihrer Aktivierung den NF κ B Inhibitor I κ B (engl.: inhibitor of κ B) phosphorylieren. Die Phosphorylierung dient als Signal für eine anschließende Ubiquitinylierung und Degradation (Ghosh und Karin, 2002). Die IkB sequestrieren die meisten NFkB in einem inaktiven Zustand im Cytoplasma. Dadurch wird die Translokation in den Kern verhindert (Ghosh und Karin, 2002) (Abbildung I10). Eine Ausnahme stellt p52:RelB dar. Die Aktivierung des p52:RelB Dimers erfolgt alternativ durch proteolytische Prozessierung aus dem cytoplasmatischen p100:RelB Dimer (Ghosh und Karin, 2002).

Der IKK-Komplex, der Bestandteil der Signalleitung des klassischen NF κ B Signalweges ist, besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKK α und IKK β , und einer regulatorischen Untereinheit, IKK γ (auch als NEMO bezeichnet) (Rothwarf und Karin, 1999).



Abb. I.10 Der klassische NFkB-Signalweg. Erläuterungen siehe Text (nach Sauer et al., 2003)

Genetische Studien zeigen, dass IKK β und IKK γ für die Phosphorylierung und Degradation von I κ B entscheidend sind, wohingegen IKK α davon verschiedene, nicht-redundante Funktionen hat (Ghosh und Karin, 2002). IKK α kann Homodimere bilden, die nicht mit IKK γ assoziieren, die eine wichtige Rolle bei der phosphorylierungs-induzierten proteolytischen Prozessierung von p100 spielen und damit an der Aktivierung des alternativen NF κ B Signalweges beteiligt sind (Senftleben *et al.*, 2001). Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges ist zudem abhängig von der NF κ B-induzierenden Kinase (NIK), welche IKK α phosphorylieren und somit aktivieren kann (Senftleben *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Kürzlich wurde ein Peptidinhibitor gefunden, welcher die Assoziation von IKK β an IKK γ verhindert und damit die Aktivierung des klassischen NF κ B Signalweges blockiert, während der alternative NF κ B-Signalweg nicht beeinträchtigt ist (Jimi *et al.*, 2004).

6.5.2 Die Rolle von c-FLIPs in der NFkB-Signalleitung

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass c-FLIPs nicht nur anti-apoptotische Eigenschaften in der Apoptose-Signaltransduktion innehaben sondern zusätzliche

regulatorische Funktionen auf die zelluläre Proliferation von T-Zellen ausüben können (Thome und Tschopp, 2001). Es wird vermutet, dass die proliferative Signaltransduktion durch CD95 initiiert wird, denn durch biochemische Studien wurde gezeigt, dass bei Überexpression von c-FLIP zusätzliche Moleküle wie RIP und TRAF-1/2 an den DISC rekrutiert wurden und NFκB aktiviert wurde (Kataoka *et al.*, 2000a). Seitdem wurde in verschiedenen Überexpression-Studien gezeigt, dass c-FLIPs die Aktivierung von NFκB auslösen können. C-FLIP-induzierte NFκB-Aktivierung konnte durch die Verwendung verschiedener dominant negativer Moleküle, die an der NFκB Aktivierung beteiligt sind, unterbunden werden. Dazu gehören z.B. IKKs, TRAF1 und 2 (Chaudhary *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000a). Kürzlich wurde beschrieben, dass c-FLIP_L in das Spaltprodukt p43-FLIP gespalten werden muss, bevor dieses TRAF-2-abhängig NFκB aktivieren kann (Kataoka und Tschopp, 2004).

Auch für virale FLIPs wurde beschrieben, dass sie neben anti-apoptotischen Funktionen auch NF κ B aktivieren können. V-FLIPs aktivierten NF κ B-abhängige Reporterplasmide in 293T-Zellen und konnten mit zentralen Kinasen des NF κ B-Signalweges interagieren (Chaudhary *et al.*, 1999; Field *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Matta *et al.*, 2003). Für das v-FLIP aus Kaposi-Sarkoma-assoziierte Herpesvirus wurde gezeigt, dass es direkt an IKK γ binden kann und so die Aktivierung des IKK-Komplexes auslöst (Field *et al.*, 2003). Eine direkte Interaktion des endogenen c-FLIPs mit dem IKK-Komplex ist bisher nicht beschrieben.

7. Aufgabenstellung

Die zelluläre Homöostase wird in mehrzelligen Organismen durch den Prozess der Apoptose aufrechterhalten. CD95 ist einer von acht bislang identifizierten Rezeptoren, die direkt Apoptose auslösen können und als Todesrezeptoren bezeichnet werden. CD95-vermittelte Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für die Homöostase des Immunsystems. Fehlregulationen im CD95-System tragen außerdem zur Entstehung von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Krebs oder AIDS bei.

Bei der initialen Regulation Todesrezeptor-vermittelter Apoptose spielen vor allem Proteine eine Rolle, die sich durch das Vorhandensein von DEDs auszeichnen. Es sind sowohl proapoptotische als auch anti-apoptotische DED-enthaltende Proteine bekannt. Zu den proapoptotischen DED-enthaltenden Proteinen gehören u.a. Procaspase-8 und -10, während zu den wichtigsten anti-apoptotischen DED-enthaltenen Proteinen die c-FLIPs gehören. Das CD95-vermittelte Todessignal wird nach Aktivierung des Rezeptors durch Anlagerung von cytosolischen Signalmolekülen mit DED-Domänen übertragen. Durch Bindung des CD95-Liganden wird CD95 oligomerisiert, und es bildet sich ein DISC. In den CD95-DISC werden sowohl die pro-apoptotischen als auch die anti-apoptotischen DED-Proteine rekrutiert und abhängig von ihrem Mengenverhältnis zueinander wird der Prozess der Apoptose initiiert oder blockiert.

Aber nicht nur in CD95-vermittelter Apoptose spielen DED-enthaltende Proteine eine Rolle. Zunehmende Evidenz spricht dafür, dass DED-Proteine zusätzliche Funktionen bei der Kontrolle zellulärer Aktivierung sowie Proliferation innehaben. Somit charakterisiert die DED-Domäne eine Familie von Proteinen, die im Zentrum der Regulation zellulärer Homöostase stehen und Proliferation und Apoptose zugleich regulieren können.

In dieser Arbeit sollten die Identitäten bislang unbekannter DED-enthaltender Proteine geklärt werden und ihre Funktion in der Regulation sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Signalwege entschlüsselt werden.

Bei der Entdeckung des CD95-DISC wurden sogenannte Zytotoxizität-assoziierte Proteine (engl. CAPs) gefunden, die nach und nach identifiziert und charakterisiert wurden. Dabei stellten sich CAP1 und CAP2 als Adaptormoleküle FADD (CAP1) sowie phosphoryliertes FADD (CAP2) heraus. CAP4 wurde als Procaspase-8 identifiziert und charakterisiert. Die Identität von CAP3 war bis heute ungeklärt, und ihre Entschlüsselung war eine weitere Aufgabe dieser Arbeit.

Kurz nach der Entdeckung des CD95-DISC wurden sogenannte c-FLIPs als wichtige DEDenthaltende Regulatoren initialer Apoptose-Signalleitung gefunden. Bislang waren zwei Spleißvarianten bekannt, c-FLIP_L und c-FLIP_S. Die Funktion dieser beiden c-FLIP-Isoformen in der Regulation Todesrezeptor-induzierter Apoptose stand in den letzten Jahren im Zentrum wissenschaftlicher Studien vieler Arbeitsgruppen. In diesen Studien gab es bereits erste Hinweise darauf, dass an der komplexen Regulation sowie Fehlregulationen zum einen der Proliferation und zum anderen der Apoptose zusätzliche c-FLIP-Isoformen eine Rolle spielen. Deshalb war es Aufgabe dieser Arbeit, diese bisher unbekannten Regulatoren zu suchen und zu identifizieren sowie in funktioneller wie auch mechanistischer Weise ausführlich zu charakterisieren.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

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

1.2 Häufig verwendete Puffer

DNA-Probenpuffer (10 x):	50% (v/v)	Glycerol
	0,42% (w/v)	Bromphenolblau oder Orange G (Sigma)
10 x HBS:	1,4 M	NaCl
	100 mM	KCl
	500 mM	HEPES
	20 mM	Na ₂ HPO ₄
	22,2 mM	Glucose
	mit 200 mM	Na ₂ HPO ₄ auf pH 6,5 eingestellt
5 x KCM:	500 mM	KCl
	150 mM	CaCl ₂
	250 mM	MgCb
Lysepuffer (Eukaryonten):	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl, $pH = 7,5$
	1 mM	PMSF
	10% (w/v)	Glycerol

	1% (w/v)	Triton X-100	
	10 T/500 ml	Complete (Ro	oche)
PBS:	137 mM	NaCl	
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄	pH = 7,4
TE:	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	pH = 7,5
Probenpuffer reduz. (5 x):	50% (v/v)	Glycerol	
	10% (w/v)	SDS	
	50 mM	Tris-HCl	pH = 6,8
	25% (v/v)	β-Mercaptoet	hanol
	0,25 mg/ml	Bromphenolb	lau
Sammelgel (5%):	24 mM	Tris-HCl	pH = 6,8
	5% (w/v)	Acrylamid/Bis	sacrylamid 37,5:1
	0,1% (w/v)	SDS	
	0,1% (w/v)	Ammoniumpe	ersulfat (APS)
	0,1% (w/v)	Tetramethylet	hylendiamin (TEMED)
Laemmli-Trenngel:	37,5 mM	Tris-HCl	pH = 8,8
	7,5-15% (w/v)Acrylamid/Bis	sacrylamid 37,5:1
	0,1% (w/v)	SDS	
	0,03% (w/v)	APS	
	0,1% (w/v)	TEMED	
Laufpuffer (Gelelektroph.):	25 mM	Tris-Base	
	0,19 M	Glycin	
	1% (w/v)	SDS	

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

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Verwendung	Referenz, Bezugsquelle
BL21(DE3)pLysS	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen, Deutschland
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen, Deutschland

1.3.2 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Beschreibung
BJAB	EBV-negative Burkitt-ähnliche
	lymphoblastoide Zellinie (human)
Boe ^R	Pre-B-Zelllymphom-Linie
Raji	humane Burkitt-Lymphom-Linie
SKW6.4	humane B-Zell-Lymphom-Linie
J16	humane T-Zell-Leukämie-Linie
H9	humane T-Zell-Leukämie-Linie
CEM	humane T-Zell-Leukämie-Linie
HUT78	humane T-Zell-Leukämie-Linie
JA3 Caspase-8 def. (Klon I.92)	Juo <i>et al.</i> , 1998
JA3 FADD def. (Klon I.21)	Juo <i>et al.</i> , 1998
293T	Humane embryonale Nieren-Zelllinie

1.4 Nährmedien

1.4.1 Medien für die Zellkultur

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

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

Folgende Antibiotika oder Zusätze wurden zur Selektion von eukaryontischen Zellen eingesetzt: Zeocin, Na-Salz (Invitrogen, Karlsruhe).

1.4.2 Medien für Bakterien

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

Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100 μ g/ml) oder Kanamycin (40 μ g/ml) zugegeben.

1.5 Antikörper

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

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-APO-1 (IgG3)	CD95	(Trauth et al., 1989)
C-20	CD95	Santa Cruz Biotechnology,
(Kaninchen, polyklonal)		Heidelberg
C15 (IgG2b)	Caspase-8, p18 Untereinheit	(Scaffidi et al., 1997)
C5 (IgG2a)	Caspase-8, p10 Untereinheit	(Scaffidi et al., 1997)
N1 (IgG1)	Caspase-8, Prodomäne	Transduction Laboratories,
		Lexington, USA
N2 (IgG1)	Caspase-8, Prodomäne	Transduction Laboratories,
		Lexington, USA
NF6 (IgG1)	c-FLIP	(Scaffidi et al., 1999)
anti-FADD (IgG1)	FADD	Transduction Laboratories,
		Lexington, USA
anti-CD3 (OKT3)	CD3	(Kung et al., 1979)
anti-IgG, HRP	Maus IgG	Jackson, USA
(Ziege, polyklonal)		
anti-IgG1, HRP	Maus IgG1	Southern Biotechnology,
(Ziege, polyklonal)		Birmingham, USA
anti-IgG2a, HRP	Maus IgG2a	Southern Biotechnology,
(Ziege, polyklonal)		Birmingham, USA
anti-IgG2b, HRP	Maus IgG2b	Southern Biotechnology,
(Ziege, polyklonal)		Birmingham, USA
anti-Kaninchen, HRP	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology,
(Ziege, polyklonal)		Heidelberg

1.6 Apoptosestimuli und -inhibitoren

Substanz	Hersteller/Referenz
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg
anti-APO-1	(Trauth <i>et al.</i> , 1989)
LZ-CD95L	(Walczak <i>et al.</i> , 1999)
FLAG-TRAIL	(Walczak <i>et al.</i> , 1999)

1.7 Molekularbiologische Materialien

1.7.1 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pcDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pEF4/Myc-HIS	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe

1.7.2 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen.

Name	Sequenz (5'-3')
5'- Procaspase-8_fw	5'-ggggtaccccATGGACTTCAGCAGAAATC-3'
3'-1-210_rev	5'-gctctagagcctaGTCCGAGATTGTCATTACC-3'
3'-1-216_rev	5'-gctctagagcctaATCCTGTTCTCTTGGAGAG-3'
3'-1-223_rev	5'-gctctagagcctaGTCCAAAGTCTGTGATTC-3'
3'- Procaspase-8_rev	5'-gctctagagcTTAATCAGAAGGGAAAAGT-3'
5'-D210A_fw	5'-CAATCTCGGCCTCTCCAAG-3'
5'-D216A_fw	5'-GAGAACAGGCTAGTGAATC-3'
5'-D210A_rev	5'-CTTGGAGAGGCCGAGATTG-3'
5'-D216A_rev	5'-GATTCACTAGCCTGTTCTC-3'
5'-c-FLIP_fw	5'-ggggtaccccATGTCTGCTGAAGTCATCC-3'
5'-c-FLIPS_rev	5'-gctctagagcctaCATGGAACAATTTCCAAG-3'
5'-c-FLIPR_rev	5'-gctctagagcctaTGCTGGGATTCCATATG-3'
3'-p22-FLIP_rev	5'-gctctagagcctaATCCTTGAGACTCTTTTGG-3'

Kleinbuchstaben bezeichnen Restriktionsschnittstellen und sonstige Nukleotidüberhänge.

1.7.3 Enzyme und Kits

Es wurden folgende Enzyme bzw. Kits verwendet:

Enzym/Kit	Bezugsquelle
Taq DNA Polymerase	Roche Pharmaceuticals, Mannheim
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
High Fidelity PCR Kit	Roche Pharmaceuticals, Mannheim

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

1.8 Geräte

Gerät		Hersteller
		D
Autoradiographienulien		Rego
Blotapparatur Semi-Dry	20 x 25 cm	CTI/Biorad
Brutschrank Stericult Inkubator		Forma Scientific
Durchflusscytometer FACScan		Becton Dickin-
		son
Gefrierschränke:	-20°C	Liebherr
	-80°C	Forma Scientific
Gelelektrophoresekammer	SDS-PAGE	CTI
Heizbad		Köttermann
Heizblock Thermostat 5320		Eppendorf
Mikroskope:	Lichtmikroskop ID 02	Zeiss
	Phasenkontrastmikroskop	Leitz
	Labovert FS	
Mikrowellengerät Micromaxx		Medion AG
Minigelelektrophoresekammer		Biorad
Netzgerät Electrophoresis Power Supply		Renner
Consort 865		
pH-Meter WTW		WTW
Photoeinheit	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda

Spektro-Photometer 6505 UV/Vis		Jenway
Quarzküvetten Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsgerät Curix 160		Agfa-Gevaert
Schüttelinkubator Certomat HK		Braun
Thermocycler	DNA Engine DYAD	MJ
Vakuumrotationsverdampfer 100H		Bachofer
Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Company
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Mettler
	Präzisionswaage PE 3600	Mettler
Zählkammer Neubauer		HBG
Zentrifugen:	Biofuge A	Heraeus
	Biofuge Fresco	Heraeus
	Megafuge 1.OR	Heraeus
	Omnifuge 2.ORS	Heraeus
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS, 5C	Beckmann
	PLUS	

1.9 Software

Folgende Computersoftware wurde verwendet: Microsoft Office, VectorNTI, CellQuestPro, BioEdit 5.0.9, Corel PhotoPaint 11, Adobe Acrobat 5.

2. Methoden

2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung höherer Zellen erfordern sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden, und wurden daher in Zellkulturlabors an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich γ–bestrahlte Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen der Firmen Renner, Falcon (Becton Dickinson), Greiner und Nunc verwendet. Die verwendeten Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert (siehe II.1.4.1): RPMI 1640 Medium: BJAB; Boe^R, Raji, SKW6.4, J16, H9, CEM, HUT78, JA3-Caspase-8 def., JA3-FADD def. RPMI 1640 Medium mit 25 U/ml IL-2, mit 10% FCS: primäre humane T-Zellen DMEM Medium mit 10% FCS: 293T

Transfizierte Zellen wurden mit folgenden Zusätzen kultiviert:

BJAB-Kontrolle, BJAB-c-FLIP_R, BJAB-c-FLIP_S, BJAB-c-FLIP-p22 mit RPMI 1640 Medium und 100 μ g/ml Zeocin.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab

1,5 ml einer Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurden abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm, 20°C) und das Pellet in 500 μl STET-Puffer (8% Sucrose, 0,5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH8) resuspendiert. Durch Zugabe von 50 μl Lysozym-Lösung (50 mg/ml) wurden die Bakterien 3 min bei RT lysiert. Danach wurde für 90 s bei 95°C inkubiert, um Proteine zu denaturieren, und der Debris abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 0,5 ml Isopropanol und 50 μ l Ammoniumacetat (8 M) präzipitiert und sofort abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und danach in 30 μ l TE oder sterilem Wasser gelöst. Um RNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurde 1 μ l (500 μ g/ml) DNase-freie RNase zugegeben.

Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Dafür wurden 400 ml LB-Medium in einem 1 l-Fernbachkolben mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und mit 500 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur oder einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Nach Inkubation über Nacht (ü.N.) bei 37°C unter Schütteln wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (Sorvall GS-3, 10 min, 5000 rpm, 4°C) und die Bakterien in 12 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 12 ml des Lysepuffers P2 zugegeben, und das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 12 ml eiskaltem Puffer P3 wurden Proteine und chromosomale DNA gefällt; Es wurde 20 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (Sorvall SS-34, 30 min, 20000 x g und 4°C). Der Überstand wurde auf eine Anionen-Austauschersäule (Qiagen-tip 500) aufgegeben, die zuvor mit 6ml Puffer QBT äquilibriert worden war, wobei die Plasmid-DNA unter den gegebenen pH- und Salzbedingungen an die Säulenmatrix gebunden blieb (1,6 M Salz, pH = 7,0). Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 50 ml-Röhrchen eluiert und mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (Heraeus Varifuge, 30 min, 6000 rpm, 4°C) wurde das DNA-Pellet in 5 ml eiskaltem 70% igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend im Vakuum getrocknet und in 200 µl H₂O gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

2.2.2 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lässt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage der Reaktion sind zyklische Temperaturänderungen, welche optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen schaffen. 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. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	Desoxynukleotide (je 10 mM)
1 µl	Primer 1 (200 pmol)
1 µl	Primer 2 (200 pmol)
20 ng	Template DNA
1 µl	Taq DNA-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Start		5 min bei 94°C
25-35 Zyklen	Denaturierung	1 min bei 94°C
	Annealing	1 min bei 56°C
	Elongation	1 min bei 72°C
Termination		10 min bei 72°C

2.2.3 Restriktionsspaltung von DNA

Es wurden etwa 1 - 2 μ g Plasmid-DNA aus Mini- bzw. Maxipräparation mit 10 U einer Restriktionsendonuklease im vom Hersteller angegebenen enzymspezifischen Puffer für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Fragmente konnten anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt werden.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstandene DNA-Fragmente können im analytischen Agarosegel (TAE/1% Agarose/0,00001% Ethidiumbromid) mittels Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Dazu wurden sie mit DNA- Probenpuffer versehen, in Geltaschen pipettiert und 20-60 min bei 100 V aufgetrennt. Zur Kalibrierung des Gels wurde neben die zu untersuchenden Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit definiertem Fragmentgemisch aufgetragen.

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

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

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

2.2.6 Transformation von Bakterien

Durch Transformation wurde Plasmid-DNA zwecks Amplifikation in Bakterien einge bracht. Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren dienten kompetente Bakterien der *Escherichia coli*-Stämme BL21(DE3)PLysS und TOP10. Für die Transformation wurden jeweils 100 µl kompetente Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und 10 µl DNA-Lösung (ca. 100 - 200 ng DNA) zusammen mit 20 µl 5 x KCM und 70µl H₂O zugefügt. Es folgte eine 20minütige Inkubation auf Eis, im Anschluss daran eine 10-minütige Inkubation bei RT. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit je 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versehen und 60 min bei 37°C zur Induktion der Antibiotika-Resistenzen inkubiert. Die Selektion auf plasmidtragende Bakterien erfolgte in Petrischalen mit antibiotikahaltigem LB-Agar ü.N. bei 37°C. Die DNA mehrerer makroskopisch sichtbarer Kolonien wurde mittels Minipräparation gewonnen und zur Kontrolle des enthaltenen Plasmids einer Restriktionsanalyse unterworfen. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde schließlich in größerem Maßstab mittels Maxipräparation gewonnen und für weitere Experimente eingesetzt.

Zur Herstellung der kompetenten Bakterien wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und auf eine OD_{600} von 0,5-0,6 kultiviert. Nach Zentrifugation der Bakterienlösung bei 5000 rpm für 15 min bei 4°C wurden die Pellets in 7,5 ml TSB-Medium resuspendiert (5% [v/v] DMSO, 10 mM MgCb, 10 mM MgSO₄, 10% [w/v] PEG 6000 in LB-

Medium). Die resuspendierten Zellen wurden für 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend in 100 µl-Aliquots in Stickstoff schock-gefroren und für die Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.2.7 Ortsgerichtete Mutagenese

Ortsgerichtete Mutagenese bedeutet das spezifische Einbringen einer Mutation in eine Nukleinsäuresequenz, in diesem Falle in ein Plasmid. Hierzu wurde die Technik der überlappenden PCR verwendet.

Dazu wurde mittels zweier überlappender Primer die gesamte Sequenz des Inserts in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert und mittels überlappender Primer Punktmutationen in die Sequenz eingebracht. In einer dritten PCR-Reaktion wurden die überlappenden Insert-Sequenzen über die beiden äußeren Primer amplifiziert und damit die beiden DNA-Abschnitte zur vollständigen Sequenz verbunden. Nach entsprechender Restriktion der Inserts wurden diese in den pEF4-Myc/His-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert. Die PCR-Reaktionen wurden wie oben beschrieben angesetzt und durchgeführt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Präparation primärer humaner T-Zellen

500 ml Vollblut wurden mit 1 ml Heparin (Braun, Melsungen) versetzt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Je 15 ml Ficoll (Biochrom, Berlin) wurden mit 25 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal gewaschen (1000 rpm/10 min/ 20°C/ Bremse auf Stufe 6 und 900 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 2) und in 200 ml RPMI/FCS aufgenommen. Alle Waschschritte wurden mit sterilem PBS oder RPMI ohne FCS durchgeführt. Anschließend wurden Monozyten und Macrophagen, d.h. adhärente Zellen, depletiert, indem die Zellen auf 2 große Kulturflaschen verteilt und mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Nichtadhärente Zellen, d.h. die Lymphozyten, wurden abgenommen und zentrifugiert (1200 rpm/10 min/20°C). Die Lymphozyten wurden mit RPMI/FCS auf 8 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und 1:2 mit 2% AET-Erythrozyten (s.u.) gemischt (Rosettierung). Das Gemisch wurde zentrifugiert (1000 rpm/10 min/20°C/Bremse auf Stufe 2), der Überstand bis auf 20 ml abgenommen und das Pellet (Rosetten) vorsichtig wieder resupendiert. Die Rosetten wurden auf 15 ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert (2420 rpm/20 min/20°C/ohne Bremse). Das Pellet aus T-Zellen und Erythrozyten wurde gewaschen (1200 rpm/10 min/20°C), und die Erythrozyten mit dem vierfachen Volumen (bezogen auf das Pellet) an ACK-Puffer (frisch verdünnt aus 10 x Puffer: 41,45g NH₄Cl, 5g KHCO₃, 0,186g EDTA, pH 7,27 ad 500 ml Wasser) lysiert. Dazu wurden Pellet und ACK-Puffer durch Pipettieren bis zur Lyse vermischt. Die Lyse der Erythrozyten zeigt sich durch einen Farbumschlag von trüb-hellrot nach klar-dunkelrot. Dann wurde mit RPMI/FCS auf 50 ml aufgefüllt und die T-Zellen mit RPMI/FCS auf 2 x 10^6 /ml eingestellt. Anschließend wurde mit 1 µg/ml PHA über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf 2 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und mit 25 U/ml Interleukin-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

AET-Erythrozyten

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

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

2.3.2 Transfektion von Zellen

Elektroporation

Für die stabile Transfektion von BJAB-Zellen wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dazu wurden 5×10^6 Zellen pro Ansatz abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm), in je 300 µl Kulturmedium resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach Zugabe von 10 bis 30 µg Plasmid-DNA wurde kurz gemischt und mit 950 µF und 250 V elektroporiert. Anschließend wurde die Suspension zügig in eine kleine Kulturflasche

überführt, in der 10 ml warmes Kulturmedium vorgelegt waren. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen gezählt und zu je 5000 Zellen pro 200 μ l Kulturmedium in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte verteilt. Zur Selektion wurde dem Medium Zeocin (100 μ g/ml) zugegeben. Nach etwa zwei Wochen waren erste Zellansammlungen in den Mikrotiterplatten makroskopisch erkennbar. Sie wurden nach Expansion mittels Western Blot auf die Anwesenheit des gewünschten Proteins überprüft und positive Klone weiter expandiert.

Ca₃(PO₄)₂-Methode

Für die Transfektion von 293T-Zellen für Luciferase-Assays wurden 2 x 10^5 Zellen pro well in eine 24-well-Titerplatte ausgesät und ü.N. kultiviert. Zur Transfektion wurden 1 µg Reporterplasmid zusammen mit 1-1000 ng des zu untersuchenden Plasmids in 100 µl HBS gemischt und anschließend vorsichtig mit 5 µl 2,5 M CaC½ unterschichtet. Nach etwa 10 min Inkubation zur Ausbildung von Ca-DNA-Kristallen wurde der Transfektionsansatz für 10 min bei RT auf die Zellen gegeben, nachdem zuvor das Zellkulturmedium entfernt wurde. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versetzt und ü.N. oder wie angegeben kultiviert.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt. In dieser Arbeit wurde die IEF zur Trennung der Proteingemische in erster Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt angewendet. Anschließend erfolgte die weitere Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Präparation von 2D-Gelen.

Dabei wurden zwei unterschiedliche Verfahrensweisen verwendet. Zum einen wurde die isoelektrische Fokussierung mittels Zylindergelen durchgeführt, zum anderen mittels IPG Gel-Streifen der Firma Amersham Biosciences.

Fokussierung mittels Zylindergel

Zur Fokussierung wurden Acrylamidzylindergele mit einem Durchmesser von 2,3 mm und einer Länge von 187 mm gegossen. Für fünf Gele wurde dabei folgender Ansatz verwendet:

Harnstoff	4,0 g
IEF Acrylamid (28,38% (w/v) Acrylamid,	933 µl
1,62% (w/v) Bisacrylamid)	
H ₂ O	1,228 ml
Ampholin Serva, pH 5,0 - 7,0	193 µl
Ampholin Pharmacia, pH 5,0 - 7,0	193 µl
Ampholin Pharmacia, pH 3,5 - 10,0	140 µl
10% NP-40	1,4 ml
TEMED	5 µl
10% APS	7 µl

Vor der Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung entgast. Die Polymerisierung benötigte wenigstens zwei Stunden. Danach wurde in der IEF-Kammer unten 10 mM H₃PO₄ und oben 20 mM NaOH (beide entgast) vorgelegt. Die Gele wurden gespült und mit je 10 µl Puffer (8 M Harnstoff, 1% [v/v] Ampholin Pharmacia, pH 5,0 - 7,0, 5% NP-40, 10 mM Dithiothreitol [DTT]) überschichtet. Der Vorlauf erfolgte bei konstantem Stromfluss von 0,33 mA/Gel, bis eine Spannung von 1200 V erreicht war. Nach Aufnahme der Proben im zehnfachen Volumen Probenpuffer (8 M Harnstoff, 2% [v/v] Ampholin Pharmacia, pH 5,0 - 7,0, 4% NP-40, 100 mM DTT) wurden sie für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die so vorbereiteten Proben wurden auf die Zylindergele gegeben und mit 10 µl Puffer überschichtet. Der Lauf erfolgte bei 1200 V für 18 bis 20 h Durch Wasserdruck wurden die Gele dann aus den Kapillaren gepresst und 5 min in 4 ml Äquilibrierungspuffer (60 mM 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 zur Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

Fokussierung mittels IPG-Gel-Streifen

Zur Fokussierung mittels IPG-Gel-Streifen (engl.: Immobiline pH gradient, IPG) wurden Immobiline DryStrips von 18 cm Länge und einem pI-Bereich von 4-7 der Firma Amersham Biosciences verwendet. Vor der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen zu ihrer ursprünglichen Stärke von 0,5 mm rehydriert. Protein-Proben wurden direkt in die Rehydrierungslösung gegeben (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% [w/v] CHAPS, 18 mM DTT, 0,5% [v/v] IPG-Puffer [Amersham Biosciences], 0,01% [w/v] Bromphenolblau), während für die isoelektrische Fokussierung eines Lysates 10 µl dieses Lysates, entsprechend 1 x 10⁷ Zellen, in 340 µl Rehydrierungslösung aufgenommen wurde.

Zur Analyse von Immunpräzipitaten wurde die Protein-A/G-Sepharose in 370 µl Rehydrierungslösung aufgenommen und bei 30°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 6000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, um die Protein-A/G-Sepharose abzutrennen. 350 µl der in Rehydrierungspuffer gelösten Proben wurden auf die Streifen-Halterung gegeben. Anschließend wurde der Streifen mit der Gelseite zur Lösung gewandt im Schiffchen positioniert. Nach Überschichtung der Streifen mit Silikonöl (IPG Cover Fluid, Amersham Biosciences) erfolgte die isoelektrische Fokussierung nach folgendem Programm: 6 h Rehydrierung (0 V), 6 h 30 V, Gradient bis 8000 V, insgesamt 1800000 Vh.

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurden die Streifen in 10 ml Äquilibrierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH8,8, 6M Harnstoff, 30% [v/v] Glycerol, 2% [w/v] SDS, 65 mM DTT, 0,01% [w/v] Bromphenolblau) für 20 min inkubiert, nachfolgend ebenfalls in Äquilibrierungspuffer, bei dem DTT durch 2,5% (w/v) Iodacetamid ersetzt wurde, für 20 min äquilibriert. In der zweiten Dimension wurden die Streifen in der SDS-Gelektrophorese weiter prozessiert.

2.4.2 SDS-Polvacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

Die Zusammensetzung der Gele ist in Abschnitt II.1.2 angegeben. 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) konnten die Gele beladen werden. Proteinlösungen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95°C inkubiert.

Die Zylindergele der 2D-Gelelektrophorese aus der isoelektrischen Fokussierung wurden auf die Sammelgele gelegt und mit Agaroselösung (0,169 M Tris/HCI, pH 8,8, 0,9% [w/v] SDS, 9% Glycerol, 1% [w/v] Agarose, 0,01% [w/v] Bromphenolblau) fixiert, die zuvor durch Aufkochen gelöst und mit DTT (Endkonzentration 50 mM) versetzt worden war.

Die Immobiline-Strips wurden entsprechend den Zylindergelen auf die Sammelgele gelegt und mit Agaroselösung (0,5% [w/v] Agarose, 0,01% [w/v] Bromphenolblau) fixiert. Der Lauf der Gele erfolgte bei 80 bis 130 V für 12-20 h.

2.4.3 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen wurde ein "Semidry"-Verfahren eingesetzt. Dazu wurden die Graphitelektroden der Blotkammer (Biorad) mit Transferpuffer befeuchtet. Darauf wurden vier Lagen mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, anschließend die befeuchtete Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), das Gel und vier Lagen befeuchtete Filterpapiere aufgelegt. Die Proteine wurden aus dem Gel auf die in Richtung Anode liegende Membran geblottet. Der Transfer erfolgte 90 min lang bei 0,8 mA/cm² und Raumtemperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% (w/v) Milchpulver oder 5% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS-Tween (0,05% Tween-20 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Blot wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Der Primärantikörper wurde in PBS-Tween verdünnt (Hybridomüberstände: 1:5 - 1:20 Verdünnung und aufgereinigte Antikörper: 0,1-1,0 µg/ml) und der Blot unter Schütteln für 16 h bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBS-Tween wurde mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20 000 in PBS-Tween) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und anschließend der Blot wiederum dreimal je 10 min mit PBS-Tween gewaschen. Gleiche Teile

der Detektionsreagenzien A und B (Renaissance-Kit, NEN, Bad Homburg) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

2.4.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden aus Hybridomüberständen mit 45% (w/v) Ammoniumsulfat gefällt, das Präzipitat zentrifugiert (Sorvall GS-3 Rotor, 5000 rpm, 10 min, 4°C), in Wasser aufgenommen und über Nacht gegen PBS oder Wasser dialysiert. Die so konzentrierten Antikörper wurden nach Zentrifugation (Megafuge 10R, 6000 rpm, 10 min, 4°C) und Filtration (0,22 µm MillexGS von Millipore) auf eine Protein A-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumen 0,1 M Tris/HCl (pH 8) gewaschen, während die Effizienz an einem Durchflussphotometer bei 280 nm kontrolliert wurde. Anschließend wurden die monoklonalen Antikörper mit 0,1 M Glycin (pH 3) in 3 ml-Fraktionen eluiert. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 3 M Tris/HCl (pH 8,8) neutralisiert und gegen PBS dialysiert. Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, sterilfiltriert, in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.4.5 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die behandelten und unbehandelten Zellen in Lysepuffer (siehe II.1.2) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand des Lysates wurde dann für die Immunpräzipitation verwendet, wobei an 30µl Protein A- oder Protein G-Sepharose gekoppelte Antikörper eingesetzt wurden. Die Immunpräzipitationen erfolgten für mehr als 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler.

2.4.6 DISC-Analyse

Für die Analyse des CD95-DISC wurden zwei Ansätze verwendet. Für den stimulierten DISC wurden Zellen in der Regel für 5 min mit 2 μ g/ml anti-APO-1 stimuliert und anschließend wie oben beschrieben lysiert. Der unstimulierte Ansatz wurde erst nach der Lyse mit 2 μ g

anti-APO-1 versetzt. Anschließend wurden beide Lysate identisch behandelt. Im Falle der Stimulation mit LZ-CD95L wurden Zellen in 1 ml Zellkultur-Überstand von mit LZ-CD95L transfizierten CV-1/EBNA Zellen resuspendiert. Nach Stimulation für 5 min bei 37°C wurden die stimulierten und die unstimulierten Zellen lysiert und CD95 mit 2 μ g anti-APO-1 immunpräzipitiert.

Im Anschluss wurde der an anti-APO-1 gebundene, stimulierte oder unstimulierte CD95-Rezeptor mit 30 μ l Protein A-Sepharose für 1-2 h bei 4°C präzipitiert, die Sepharosematrix durch Zentrifugation (7000 rpm, 30 s, 4°C) entfernt und mehrfach in Lysepuffer gewaschen. Das Immunpräzipitat wurde entweder zweidimensional oder eindimensional gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

2.4.7 Kopplung von Antikörpern an Sepharose

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

2.4.8 In-vitro-Caspase-8-Spaltung und DISC-Rekrutierungsanalysen

Komplementäre DNAs (cDNAs) von Procaspase-8-Konstrukten, c-FLIP_R, c-FLIP_S, c-FLIP_p22, c-FLIP_L wurden *in-vitro* mit dem T7-Polymerase-Retikulozytenlysat-System (TNT, Promega, Mannheim) entsprechend der Herstellerangaben translatiert. Für das *in-vitro*-Spaltungsexperiment bzw. für Rekrutierungsexperimente wurde der CD95-DISC von 5 x 10^7 unmarkierten Zellen immunpräzipitiert. Dann wurde das Immunpräzipitat in 50 µl Reaktionspuffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 0,1% CHAPS; 100 mM NaCl; 100 mM DTT und 20% Saccharose) 24 h bei 4°C mit *in-vitro*-translatiertem Protein inkubiert. Die Ansätze

wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrocellulosemembranen (Hybond ECL, Amersham) transferiert. Die Membranen wurden getrocknet und autoradiographiert.

2.4.9 Luciferase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurden 293T-Zellen mittels $Ca_3(PO_4)_2$ -Methode transfiziert (s.o.). Nach Kultivierung ü.N. wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen, bevor sie mit 50 µl Passive Lysis-Puffer (Promega, Mannheim) bei RT für 30 min lysiert wurden. Zwischen 2 und 10 µl des Lysates wurden mit 50 µl Messpuffer versetzt und die Lichtemission mittels Duoluminomat (Berthold, Bad Wildbad) nach 2 s Reaktionszeit bestimmt.

Messpuffer:

470 μΜ	Beetle Luciferin (Kaliumsalz)
1,07 mM	$(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 * 5 H_2O$
20 mM	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycine
2,67 mM	MgSO ₄
100 µM	EDTA
33,3 mM	DTT
270 μΜ	CoA(OAc)
530 µM	Adenosintriphosphat (ATP)

Der Messpuffer wurde nach dem Ansetzen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

III. Ergebnisse

1. Die Rolle von CAP3 in der CD95-Signalleitung

Bei der initialen Analyse des immunpräzipitierten CD95-DISCs konnten nach Auftrennung in 2D-Gelen und Silberfärbung vier Spots detektiert werden, welche als Cytotoxizitätsassoziierte Proteine (CAP) 1-4 bezeichnet wurden (Kischkel et al., 1995). Diese Bezeichnung steht für ihre Eigenschaft, an der Zytotoxizität beteiligt zu sein, welche durch einen CD95-Liganden oder den agonistischen Antikörper anti-APO-1 hervorgerufen werden kann. CAP1 wurde als FADD identifiziert, während CAP2 eine serinphosphorylierte Variante von FADD darstellt. CAP4 wurde ursprünglich mittels Nanoelektrospray Tandem Massenspektrometrie sequenziert und als Procaspase-8/a identifiziert (Muzio et al., 1996b). In weiteren Studien wurde der DISC bei längerer Stimulation mit anti-APO-1 untersucht und dabei zwei weitere CAPs, CAP5 und CAP6, detektiert. CAP5 und CAP6 wurden als Prodomänen von Procaspase-8/a und -8/b identifiziert (Medema et al., 1997a; Scaffidi et al., 1997). Über ESI-MS/MS Analysen von CAP3 wurden zwei Sequenzen gefunden, welche sich als identisch mit Sequenzen im N-Terminus von Procaspase-8 herausstellten (Muzio et al., 1996b). Deshalb wurde lange Zeit vermutet, dass es sich um eine kurze Spleißform von Caspase-8 handeln könnte, die den kurzen Spleißvarianten von c-FLIP, c-FLIP_s, und Caspase-10, Caspase-10/c, ähnelt.

1.1 CAP3 kann in CD95-DISCs verschiedener Zelllinien detektiert werden

In früheren Studien wurde CAP3 mit Hilfe von 2D-Gelen als ein Protein des CD95-DISC gefunden. Dabei wurde CAP3 mittels Immunpräzipitation und Autoradiographie radioaktiv metabolisch markierter Zellen detektiert. Alternativ erfolgte die Visualisierung über Silberfärbung mit anschließender Nanoelektrospray Tandem Massenspektrometrie (Kischkel *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, CAP3 mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot zu detektieren. Zur DISC-Immunpräzipitation wurde anti-APO-1 verwendet. Als Antikörper im Western Blot wurde das in der Arbeitgruppe generierte N2-Hybridom eingesetzt. N2 ist ein anti-Caspase-8 mAk, der

spezifisch den N-Terminus von Procaspase-8 erkennt. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte CAP3 im CD95-DISC von B-lymphoblastoiden Zellen SKW6.4 visualisiert werden (Abbildung III.1A). Auch die übrigen CAP-Proteine konnten in ihrem typischen Muster detektiert werden: FADD (CAP1), phosphoryliertes FADD (CAP2), Procaspase-8/a (CAP4), p26 (CAP5) und p24 (CAP6). Die CAP-Proteine stimmten mit den für sie beschriebenen Molekulargewichten und pIs überein: CAP1 (27 kD, pI 5,2), CAP2 (28 kD, pI 5,15), CAP3 (27 kD, pI 5,05), CAP4/a (55 kD, pI 4,9), CAP4/b (53 kD, pI 5,0), CAP5 (26 kD, pI 4,75) und CAP6 (24 kD, pI 4,86) (Kischkel *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997a). Die beiden Procaspase-8-Spots konnten nicht optimal aufgelöst werden, weil ein starkes Signal der schweren Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers im Western Blot diese Spots überlagerte.



Abb. III.1 CAP3 kann in CD95-DISCs verschiedener Zelllinien detektiert werden. (A) Aus 10⁸ SKW6.4-Zellen wurde der CD95-DISC nach 5 min Stimulation mit anti-APO-1 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitation wurde mit Protein-A Sepharose durchgeführt, die Immunpräzipitate in 2D-Gelen aufgetrennt und im Western Blot entwickelt. Dazu wurde der anti-Caspase-8 mAk N2 und ein anti-FADD mAk verwendet. Die Position der verschiedenen DISC-Proteine wurden mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) CD95-DISCs wurden wie in (A) aus den Zelllinien H9, CEM, JA3 und JA3-Caspase-8 defizienten Zellen immunpräzipitiert und visualisiert. Links wurden als Muster die Migrationspositionen von CAP3, p26 und p24 dargestellt.

Im Folgenden wurden verschiedene T und B Zelllinien auf die Anwesenheit von CAP3 im CD95-DISC hin untersucht (Abbildung III.1B). CAP3 konnte in der Typ I-Zelllinie H9 sowie

in den Typ II-Zelllinien CEM und JA3 detektiert werden. Im CD95-DISC von Caspase-8 defizienten JA3-Zellen konnte CAP3 nicht detektiert werden. Somit kann CAP3 zusammen mit den anderen Caspase-8-Spots mittels Immunpräzipitation und Western Blot in den CD95-DISCs verschiedener Zelllinien nachgewiesen werden.

1.2 Identifizierung von CAP3 als verlängerte Prodomäne von Procaspase-8/a

Die Detektion von CAP3 nach eindimensionaler Gelektrophorese mittels Laemmli-Gelen erwies sich als nicht möglich, weil die Auftrennung nicht ausreichte, um p26 von CAP3 zu separieren.



Abb. III.2 Identifizierung von CAP3 als verlängerte Prodomäne von Procaspase-8/a. (A) Der CD95-DISC wurde aus 10⁸ HUT78-Zellen immunpräzipitiert, die entweder mit (+) oder (-) LZ-CD95L für 5 min stimuliert wurden. Die Immunpräzipitate wurden in 15% Anderson-Gelen aufgetrennt und die Western Blots mit dem anti-Caspase-8 mAk N2 (oben) oder dem anti-Caspase-8 mAk C15 (unten) visualisiert. (B) Schematische Darstellung von Procaspase-8/a und möglicher Procaspase-8-Prodomänen, die für die Identifizierung von CAP3 kloniert wurden. Die Epitope, die die beiden anti-Caspase-8 mAk N1 und N2 erkennen, sind aufgezeigt. Das in Procaspase-8/b fehlende Exon wurde als weiße Box eingezeichnet. (C) Die möglichen Prodomänen von Procaspase-8, 1-223 (Bahn 2), 1-216 (Bahn 3) und 1-210 (Bahn 4) wurden zusammen mit dem CD95-DISC aus SKW6.4-Zellen (Bahn 1) in 15% Anderson-Gelen aufgetrennt und im Western Blot mittels anti-Caspase-8 mAk N2 visualisiert. Deshalb wurden 15% Anderson Gele verwendet, die eine bessere Auftrennung im Bereich von 20 bis 30 kD erlauben (Anderson, 1978).

Mit Hilfe dieser Gele und anschließendem Western Blot konnte CAP3 sowie p26 und p24 nach erfolgter Stimulation des CD95-Rezeptors visualisiert werden (Abbildung III.2A). CAP3 wurde aber nur nach Stimulation detektiert, während es im unstimulierten Fall nicht vorhanden war. Dies deutet bereits darauf hin, dass es sich bei CAP3 weniger um eine Spleißisoform von Caspase-8 handeln könnte, die konstitutiv exprimiert ist, sondern vielmehr um ein Produkt, das bei der Prozessierung von Procaspase-8 generiert wird.

Abbildung III.2B zeigt, dass N-terminal von der großen katalytischen Untereinheit p18 der Procaspase-8 drei Aspartate lokalisiert sind, die als mögliche Spaltstellen für die Autoprozessierung der Caspase-8 in Frage kommen. Sie stellen mögliche Spaltstellen dar, aus denen CAP3 während der Prozessierung von Procaspase-8 generiert werden könnte. Diese Spaltstellen sind TISD²¹⁰, REQD²¹⁶ und QTLD²²³, wobei REQD²¹⁶ eine konservierte Spaltstelle sowohl in humaner als auch in muriner Procaspase-8 darstellt (Sakamaki et al., 1998). Bisher wurde angenommen, dass die Prodomänen p26 und p24 jeweils nach Spaltung an dieser Spaltstelle generiert werden. Um zu testen, ob die beschriebene Prodomäne p26 nach Spaltung an der Spaltstelle REQD²¹⁶ generiert wird, wurden die aufgezeigten möglichen Prodomänen kloniert (Abbildung III.2B). Diese Prodomänen wurden in-vitro-translatiert und zusammen mit einem DISC in 15% Anderson-Gelen analysiert (Abbildung III.2C). Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei dem Konstrukt, welches die Aminosäuren 1-216 umfasst, aufgrund des Molekulargewichtes um CAP3 handeln könnte und nicht, wie bisher angenommen, um p26. Als p26 stellte sich der N-terminus von Procaspase-8 heraus, der die Aminosäuren 1-210 umfasst (Abbildung III.2C). Somit handelt es sich bei CAP3 vermutlich um eine längere Prodomäne, die während der Autoprozessierung der Procaspase-8 am CD95-DISC durch Spaltung an der Aminosequenz REQD²¹⁶ auftritt.

Interessanterweise konnte eine weitere Bande auf der Höhe zwischen p26 und p24 beobachtet werden (Abbildungen III.2A und C). Das Molekulargewicht dieser Bande deutet darauf hin, dass sich um CAP3/b handeln könnte, welches als CAP3 aus Spaltung der Caspase-8 Isoform Caspase-8/b hervorgegangen ist. Mögliche Spaltstellen für die Generierung von CAP3/b und p24 sind Asp²⁰¹ und Asp¹⁹⁵. Die Detektion von CAP3/b ist dadurch erschwert, dass CAP3/b bei weniger starker Auftrennung mit normalen 15% Anderson-Gelen mit dem Signal von p26 überlappt. Die Auftrennung war nur möglich mit großformatigen 15% Anderson-Gelen in Sequenziergel-Apparaturen.

1.3 Kinetik der CAP3-Generierung und -prozessierung am DISC

Der DISC bildet sich innerhalb weniger Sekunden nach Stimulation des CD95-Rezeptors (Kischkel *et al.*, 1995). Dabei wurde bereits gezeigt, dass CAP3 nach 10 min Stimulation des CD95-Rezeptors detektiert werden kann (Abbildung III.1A und B). Um die Kinetik der CAP3-Generierung zu untersuchen, wurden SKW6.4-Zellen mit LZ-CD95L für verschiedene Zeiten stimuliert, daraufhin die CD95-DISCs immunpräzipitiert und mit Hilfe von 2D-Gelen aufgetrennt (Abbildung III.3A). Es zeigte sich, dass CAP3 bereits nach 5 min Stimulation im CD95-DISC detektierbar war. Nach 30 min verringerte sich die Intensität des CAP3 Spots und nach 60 min war der CAP3 Spot deutlich reduziert. P26 und p24 waren ebenfalls nach 5 min sichtbar, die zugehörigen Spots waren 10-30 min nach der Stimulation am stärksten, aber beide Spots waren noch nach 120 min Stimulation im DISC beobachtbar.



Abb. III.3 Kinetik der CAP3-Generierung und –prozessierung am DISC. 10⁸ SKW6.4-Zellen wurden pro Ansatz für die angegebenen Zeiten mit anti-APO-1 stimuliert und entweder im 2D-Gel (A) oder im 15% Anderson-Gel (B) aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe des anti-Caspase-8 mAk N2 entwickelt.

Um die gesamte zelluläre Menge an Caspase-8 kinetisch zu untersuchen, wurden SKW6.4-Zellen für die aufgezeigten Zeitpunkte mit anti-APO-1 stimuliert und anschließend mit dem anti-Caspase-8 mAk N1 immunpräzipitiert (Abbildung III.3B). Dieser Antikörper erkennt ebenso wie der bereits beschriebene mAk N2 spezifisch den N-Terminus von Caspase-8 und damit auch die verschiedenen Prodomänen. Die zeitliche Abnahme von CAP3 ähnelte der Abnahme, die schon im 2D-Gel in Abbildung III.3A gezeigt wurde. Nach 60 min war CAP3 kaum noch detektierbar, wohingegen die Prodomänen p26 und p24 zum gleichen Zeitpunkt die höchste Intensität zeigten. Diese Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass es sich bei CAP3 um ein Zwischenprodukt der Procaspase-8 Autoprozessierung handelt, welches schnell degradiert bzw. weiterprozessiert wird. Leider konnten aus technischen Gründen die Stimulationsdauer nicht noch weiter verkürzt werden, um die Generierung von CAP3 noch genauer zu analysieren.

1.4 CAP3 wird am DISC in Gegenwart des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk generiert

Um die Problematik der kürzeren Stimulation zu umgehen, wurde in den folgenden Experimenten auf den Pan-Caspase Inhibitor zVAD-fmk zurückgegriffen. Eine Vorinkubation der Zellen für 30 min mit zVAD-fmk sollte ein "Einfrieren" der Procaspase-8 Prozessierung ermöglichen. Da zVAD-fmk das aktive Zentrum der Caspase-8 kovalent bindet, wird dadurch eine weitere Autoprozessierung durch Caspase-8-Aktivität verhindert. Die Behandlung mit zVAD-fmk inhibierte die Procaspase-8-Prozessierung weder im Lysat noch in der CD95-DISC Immunpräzipitation vollständig (Abbildung III.4A). So wurden die Spaltprodukte p43 und p41 generiert, während die weitere Spaltung zu den Prodomänen p26 und p24 ausblieb. Interessanterweise wurde im Gegensatz zur nicht erfolgten Spaltung der beiden Prodomänen, p26 und p24, CAP3 durch die zVAD-fmk Vorinkubation und nachfolgende CD95-Stimulation verstärkt generiert.

Dieses Phänomen konnte auch im 2D-Gel bestätigt werden (Abbildung III.4B). Der CAP3 Spot ist der einzige Spot, der sich bei höheren und immer noch spezifischen Konzentrationen von zVAD-fmk verstärkt. Diese Verstärkung scheint dosis-abhängig zu erfolgen, wie eine Titration der zVAD-fmk Konzentration bestätigte (Abbildung III.4C). Die Verstärkung der Bande von CAP3 im Western Blot sowie des Spots im 2D-Gel ist neben dem Molekulargewicht (Abbildung III.2C) ein zusätzlicher Beweis dafür, dass es sich tatsächlich um dasselbe Protein handelt, welches mit zwei verschiedenen Methoden visualisiert wurde, also letztlich um die Procaspase-8 Prodomäne, die die N-terminalen Aminosäuren 1-216 umfasst.



Abb. III.4 CAP3 wird am DISC in Gegenwart des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk generiert. (A-C) CD95-DISCs wurden aus 10⁸ SKW6.4-Zellen nach 5 min Stimulation mit anti-APO-1 immunpräzipitiert. Dafür wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an zVAD-fmk für 30 min vorinkubiert. Die DISCs wurden immunpräzipitiert, mit Hilfe von 15% Anderson-Gelen (A, C) bzw. 2D-Gelen (B) aufgetrennt und mittels Western Blot sichtbar gemacht. Die verwendeten mAk zur Entwicklung der Western Blots sind neben den Blots verzeichnet. (D) 10⁸ SKW6.4-Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M Biotin-zVAD-fmk vorinkubiert und wie in (A-C) weiterprozessiert. Zur Entwicklung des Western Blots wurde neben dem anti-Caspase-8 mAk N2 (links) auch Streptavidin-HRP (rechts) verwendet.

Offensichtlich verhindert die Vorinkubation mit zVAD-fmk nicht die Generierung von CAP3 bei initialer Procaspase-8 Autoprozessierung. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass Caspase-8 zwei verschiedene Arten von Aktivität am DISC hat (Chang *et al.*, 2003). Eine Aktivität stammt von der bereits prozessierten Caspase-8, die als Heterotetramer vorliegt und in der weiteren Signalleitung Bid oder Caspase-3 spalten kann. Die andere Aktivität stammt von der dimerisierten Procaspase-8 und führt zur Autoprozessierung der Procaspase-8, nicht aber zur Spaltung von anderen Zielproteinen der weiteren Signalkaskade (Chang *et al.*, 2003). Die

bereits beschriebenen Daten deuten darauf hin, dass CAP3 ebenfalls durch eine Procaspase-8-Aktivität generiert wird, die nicht durch zVAD-fmk inhibierbar ist. Möglicherweise wird CAP3 initial durch die Procaspase-8-Aktivität geschnitten und nachfolgend durch das Caspase-8 Heterotetramer weiterprozessiert.

Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, wurden die beiden Caspase-8-Aktivitäten am DISC untersucht. Dazu wurde biotinylierter Pan-Caspase-8 Inhibitor (Biotin-zVAD-fmk) zur Vorinkubation der Zellen verwendet (Abbbildung III.4D). Nach Entwicklung mit Streptavidin-HRP wurden die Caspase-8 Spaltprodukte p43/41 und p18 visualisiert, aber die Procaspase-8 Banden p55/53 im DISC zeigten keine Bindung von Biotin-zVAD-fmk. Dies bestätigt, dass die Procaspase-8-Aktivität, welche möglicherweise für die Generierung von CAP3 im DISC ursächlich ist, nicht durch zVAD-fmk inhibierbar ist. Nicht nur p18 als aktive Komponente des Caspase-8 Heterotetramers wurde detektiert, sondern ebenfalls p43/41 als teilprozessierte Procaspase-8. Das deutet darauf hin, dass das aktive Zentrum der Procaspase-8 nach erfolgter Spaltung der kleinen Untereinheit p10 dem Substrat zVAD-fmk zugänglich wird. Das aktive Caspase-8 Heterotetramer könnte somit folgende Strukturen haben: p43/p18/p10₂, p43₂/p10₂ oder durchprozessierte p18₂/p10₂. Diese Ergebnisse stimmen mit kürzlichen Beobachtungen in der Literatur überein (Chang *et al.*, 2003; Lavrik *et al.*, 2003).

1.5 CAP3 wird aus Procaspase-8/a am CD95-DISC generiert

Um zu zeigen, dass CAP3 am CD95-DISC aus Procaspase-8 gespalten wird, wurden Punktmutationen in Procaspase-8/a eingeführt. Dabei wurden die Aspartate Asp²¹⁰ und Asp²¹⁶, die für die Spaltung der Prodomänen entscheidend sind, in Alanine mutiert und folgende Mutanten generiert: D210A, D216A, D210A/D216A (Abbildung III.5A). Die Prozessierung der verschiedenen Mutanten wurde *in-vitro* in einem Caspase-8-

Spaltungsexperiment untersucht (Abbildung III.5B). Dazu wurden CD95-DISCs aus SKW6.4-Zellen immunpräzipitiert und mit *in-vitro* translatierter, [³⁵S]-markierter Procaspase-8 inkubiert. Dabei wird die hinzugefügte Procaspase-8 an den CD95-DISC rekrutiert und prozessiert. Die prozessierten Spaltprodukte können nach Gelelektrophorese und Autoradiographie visualisiert werden. Bei Prozessierung der Wt-Procaspase-8 wurden die Spaltprodukte p43 und die Prodomäne p26 generiert (Abbildung III.5B, Bahn 1). Die D216A-Procaspase-8 Mutante zeigte das gleiche Spaltungsmuster wie die Wt-Procaspase-8, also ebenfalls die Spaltprodukte p43 und p26 (Abbildung III.5B, Bahn 3). Die Generierung der


Prodomäne p26 erfolgte dagegen nicht in den Procaspase-8-Mutanten D210A und D210A/D216A (Abbildung III.5B, Bahnen 2 und 4).

Abb. III.5 CAP3 wird aus Procaspase-8/a am CD95-DISC generiert. (A) Übersicht über die klonierten Procaspase-8 Mutanten (Wt-Wildtyp, D210A, D216A, D210A/D216A. (B) *In-vitro* Procaspase-8 Spaltungsassays wurden mit *in-vitro*-translatierten und [³⁵S]-markierten Procaspase-Mutanten ü.N. bei 4°C durchgeführt. Die entstandenen Prozessierungsprodukte sind jeweils angegeben. (C) *In-vitro* Procaspase-8 Spaltungsassays wurden mit der *in-vitro*-translatiertem und [³⁵S]-markierten Procaspase-8 Mutante D210A in An- bzw. Abwesenheit von 50 μ M zVAD-fmk bei für die angegebenen Zeiten bei 4°C durchgeführt. Die entstandenen Prozessierungsprodukte sind jeweils angegebenen Zeiten bei 4°C durchgeführt. Die entstandenen Prozessierungsprodukte sind jeweils angegebenen Zeiten bei 4°C durchgeführt.

Während in der Doppelmutante D210A/D216A überhaupt keine Generierung einer Prodomäne erfolgte, konnte für die Mutante D210A die Generierung einer weiteren Prodomäne beobachtet werden, welche vom Molekulargewicht genau mit CAP3 übereinstimmt. CAP3 wurde nicht in den Mutanten D216A und D210A/D216A gespalten, was darauf hindeutet, dass CAP3 wirklich durch Spaltung nach dem Asp²¹⁶ aus Procaspase-8/a hervorgeht. Es findet keine Prozessierung der Doppelmutante zu einer Prodomäne statt, obwohl das Asp²²³ nicht mutiert wurde. Das weist darauf hin, dass die Spaltstelle QTLD²²³ für die Prozessierung von Procaspase-8 keine Rolle zu spielen scheint. Interessanterweise konnte

die Generierung von CAP3 im Falle der Prozessierung von Wt-Procaspase-8/a nicht beobachtet werden (Abbildung III.5B, Bahn 1). Das bedeutet, dass CAP3 möglicherweise nur intermediär gespalten wird und anschließend eine schnelle Weiterprozessierung in die nicht mehr weiter prozessierbare Prodomäne p26 erfolgt. Weder in dieser Untersuchungen noch in vorhergehenden Arbeiten konnte die Generierung von CAP3 mit dem verwendeten Procaspase-8 Spaltungsexperiment detektiert werden (Kischkel et al., 2001; Medema et al., 1997a; Scaffidi et al., 1997). Möglicherweise ist die Weiterprozessierung von CAP3 in die kürzere Prodomäne p26 so schnell, dass CAP3 aufgrund der schnellen Kinetik nicht beobachtet wurde, da die Prozessierungsreaktion ü.N. bei 4°C erfolgt. Deshalb wurden im Folgenden verschiedene Bedingungen für die Prozessierung von Procaspase-8 getestet, um die Generierung von CAP3 zu visualisieren. Dazu wurde die Prozessierung in-vitrotranslatierter, [³⁵S]-markierter Wt-Procaspase-8 für kürzere Zeitpunkte untersucht (1-120 min) (Abbildung III.5C). Auch in Anwesenheit von zVAD-fmk konnte keine Prozessierung zu CAP3 im Caspase-8-Spaltungassay gezeigt werden. Wahrscheinlich sind die Substratkonzentrationen von in-vitro-translatierter Procaspase-8 unterschiedlich zu denen im DISC in vivo, welches in unterschiedlichen Spaltungskinetiken resultieren kann. Die schnelle Weiterprozessierung von CAP3 in die kürzere Prodomäne p26 verhinderte wahrscheinlich die Detektion von CAP3 mittels Caspase-8 Spaltungsexperiment (siehe auch Abbildung III.3).

1.6 CAP3 wird am CD95-DISC zu p26 weiterprozessiert

Um zu analysieren, ob CAP3 wirklich in die kürzere Prodomäne p26 gespalten werden kann, wurde ein æverser *in-vitro*-Caspase-8-Spaltungsassay entwickelt. Für diesen Assay wurden *in-vitro*-translatierte, [³⁵S]-markierte Prodomänen (Aminosäuren 1-210, 1-216 und 1-223) mit Lysaten von anti-APO-1 stimulierten SKW6.4-Zellen inkubiert und anschließend mit dem DISC immunpräzipitiert (Abbildung III.6A).

Sowohl CAP3 als auch die längere Prodomäne, die die Aminosäuren 1-223 umfasst, wurden zu p26 gespalten. Der Input als Kontrolle ist ebenfalls visualisiert worden, und es ist erkennbar, dass nicht schon von Anfang an eine Prozessierung der Prodomänen zu beobachten war. In diesem Assay kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Spaltung von CAP3 in p26 DISC-unabhängig im Lysat erfolgte.

Um im Folgenden zu analysieren, ob die Weiterprozessierung von CAP3 in p26 wirklich am DISC stattfindet, wurde der Caspase-8-Spaltungsassay verwendet. Dazu wurden *in-vitro*-translatierte, [³⁵S]-markierte Prodomänen (1-210, 1-216 und 1-223) mit immunpräzipitierten

DISCs inkubiert und die Spaltung am DISC analysiert. Nach Inkubation wurde die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen DISCs von den Überständen getrennt, jeweils über Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Dabei wurden die längeren Prodomänen ebenfalls in p26 gespalten, während p26 nicht weiter prozessiert werden konnte (Abbildung III.6B, Bahnen 1, 3 und 5).



Abb. III.6 CAP3 wird am CD95-DISC zu p26 weiterprozessiert. (A) Für den reversen *in-vitro*-Proaspase-8 Spaltungsassay wurden die verschiedenen Prodomänen *in-vitro*-translatiert, [³⁵S]radioaktiv markiert und ü.N. bei 4°C mit Lysaten von SKW6.4-Zellen inkubiert, welche zuvor mit anti-APO-1 stimuliert wurden. Anschließend wurden die CD95-DISCs immunpräzipitiert, in 15% Anderson-Gelen aufgetrennt und autoradiographiert. (B) Für den *in-vitro* Procaspase-8 Spaltungsassay wurden wie in (A) radioaktiv markierte Prodomänen translatiert und ü.N. in An-(Bahnen 7-12) bzw. Abwesenheit (Bahnen 1-6) von 50 μ M zVAD-fmk mit bereits immunpräzipitierten CD95-DISCs aus SKW6.4-Zellen inkubiert, anschließend die Protein-A-Speharose mit den DISCs (ungerade Bahnen) von den Überständen (gerade Bahnen) getrennt und sämtliche Proben über 15% Anderson-Gele aufgetrennt und autoradiographiert. Die DISCs wurden auf Anwesenheit ihrer Komponenten im Western Blot analysiert.

In Anwesenheit von zVAD-fmk wurde die Prozessierung der längeren Prodomänen in p26 am DISC inhibiert (Abbildung III.6B, Bahnen 7, 9, 11). Es ist wahrscheinlich, dass die Prozessierung von CAP3 in p26 am DISC durch die Aktivität von teilprozessierter oder vollständig prozessierter Caspase-8 erfolgt. Diese Aktivität ist - anders als die Procaspase-8-Aktivität, welche für die Generierung von CAP3 verantwortlich ist - durch zVAD-fmk

inhibierbar (siehe auch Abbildung III.4). Die Überstände der Caspase-8 Spaltungsassays enthielten nach der Prozessierung weniger Prodomänen als die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen DISCs (Abbildung III.6B, gerade Bahnen: DISC-enthaltende Protein-A-Sepharose, ungerade Bahnen: Überstände des Spaltungs-Assays). Das zeigt, wie effizient die Rekrutierung der *in-vitro*-translatierten Prodomänen an die DISCs erfolgte. Als Kontrollen für die Anwesenheit der DISCs im Caspase-8 Spaltungsassay wurden die verschiedenen DISC-Komponenten mittels Western Blot analysiert: CD95, FADD, Caspase-8 (Abbildung III.6B). Damit wurde direkt gezeigt, dass CAP3 aus der Prozessierung von Procaspase-8 im DISC hervorgeht und seine Existenz nur vorübergehender Natur ist. Nach Entstehung von vollständig prozessierter, aktiver Caspase-8 beginnt sofort die Prozessierung von CAP3 in die Prodomäne p26. Dieser Vorgang verhindert die Detektion von CAP3 im *in-vitro*-Caspase-8-Spaltungsassay und erschwerte damit lange Zeit die Identifizierung dieses kurzen Caspase-8-Fragment s.

2. C-FLIP_R, ein neuer Regulator Todesrezeptor-induzierter Apopto se

Nach Identifizierung des Proteins CAP3 als ein kurzes DED-enthaltendes Protein stellte sich die Frage, ob es auch vom homologen Protein c-FLIP weitere kurze DED-enthaltende Varianten gibt, die an der komplexen Regulation Todesrezeptor-vermittelter Apoptose beteiligt sein können. Auf mRNA-Ebene sind 11 verschiedene Spleißvarianten von c-FLIP beschrieben (Djerbi *et al.*, 2001). Dagegen wurden auf Proteinebene bisher nur zwei c-FLIP Isoformen identifiziert, c-FLIP_L und c-FLIP_S (Djerbi *et al.*, 2001; Rasper *et al.*, 1998).

2.1 Detektion einer weiteren c-FLIP-Bande mittels Western Blot

Um die Expression weiterer Isoformen auf Proteinebene zu detektieren, wurden Lysate verschiedener Zelllinien (Abbildung III.7A), sowie c-FLIP-Immunpräzipitationen (Abbildung III.7B) mittels Western Blot aufgetrennt und analysiert.



Abb. III.7 Detektion einer weiteren eFLIP-Bande mittels Western Blot (A) Zelluläre Lysate der angegebenen Zelllinien wurde mittels 12% Laemmli-Gel aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe des anti-FLIP mAk NF6 entwickelt. Die Positionen von c-FLIP_L, c-FLIP_S und der neuen eFLIP Variante sind gekennzeichnet. (B) 5 x 10⁷ Zellen der angegebenen Zelllinien wurde lysiert und die verschiedenen c-FLIP-Spleißvarianten mit dem anti-FLIP mAk NF6 immunpräzipitiert, im 12% Laemmli-Gel aufgetrennt und der Western Blot mit Hilfe des anti-FLIP mAk NF6 entwickelt.

Dabei wurde eine weitere c-FLIP-Bande detektiert, deren Molekulargewicht etwa 1 kD kleiner als das der bereits bekannten Isoform c-FLIP_s ist. Diese neue c-FLIP-Bande wurde sowohl in SKW6.4 als auch in Raji-Zellen als einzige c-FLIP-Bande neben der von c-FLIP_L detektiert. In den Zelllinien Boe^R und J16 wurden alle drei c-FLIP Isoformen detektiert, und in den übrigen Zelllinien wurden nur die beiden c-FLIP Isoformen c-FLIP_s und c-FLIP_L detektiert.

2.2 Identifizierung der neuen c-FLIP-Bande als c-FLIP_R

Bei Translation möglicher Isoformen *in silico* wurde c- $FLIP_R$ über sein Molekulargewicht gefunden, das dem der neuen c-FLIP-Bande entsprechen könnte. Für die c-FLIP-Detektion wurde der mAk NF6 verwendet, dessen Epitop am N-Terminus von c-FLIP lokalisiert ist, der folglich alle c-FLIP-Isoformen detektieren kann, die zwei DEDs besitzen (Abbildung III.8A).



Abb. III.8 Exon-Intron Organisation der c-FLIP mRNAs und die codierten c-FLIP-Proteine. (A) Übersicht über die drei c-FLIP-Spleißvarianten, c-FLIP_{L/S/R}. Alle c-FLIP-Proteine enthalten 2 Tandem-DEDs im N-Terminus, c-FLIP_L enthält zusätzlich eine große (p20) und eine kleine (p12) Caspaseähnliche Domäne, die beide katalytisch inaktiv sind. C-FLIP_{S/R} enthalten nur einen kurzen C-Terminus, in welchem sich die beiden Spleißvarianten unterscheiden. (B) In allen Spleißvarianten werden die Tandem-DEDs durch die Exons 36 codiert. Start-Codons sind als Pfeile und Stopp-Codons als Sternchen gekennzeichnet. Durch alternatives Spleißen resultiert eine mRNA für c-FLIP_S, die im Gegensatz zu c-FLIP_L das Exon 7 enthält, welches das Stopp-Codon codiert. Im Gegensatz dazu wird in der mRNA für c-FLIP_R das Intron 6 nicht exzisiert und codiert zu Beginn des Introns das Stopp-Codon für c-FLIP_R.

Dies ist ein erster Hinweis auf die Identität der bisher unbekannten c-FLIP-Bande. Sie enthält vermutlich den gleichen N-Terminus wie c-FLIP_s und besitzt damit ebenfalls die beiden DEDs. Abbildung III.8A zeigt die drei c-FLIP-Isoformen auf Proteinebene. Das ,R' in c-FLIP_R steht für Raji, weil die entsprechende mRNA zuerst aus Raji-Zellen kloniert wurde.

Abbildung III.8B zeigt die Exon-Struktur der verschiedenen c-FLIP-Isoformen auf. In den mRNAs, die c-FLIP_L codieren, wird das Exon 7 herausgespleißt. Dadurch entsteht ein offener Leserahmen, der im Exon 14 terminiert wird und für c-FLIP_L codiert. Wenn Exon 7 während des Spleißens nicht exzisiert wird, entsteht der offene Leserahmen für c-FLIPs, welcher in Exon 7 terminiert wird. Die Translation dieser mRNA führt zu dem kürzeren c-FLIPs. Die noch kürzere Isoform c-FLIP_R wird dann codiert, wenn das Intron 6 nicht herausgespleißt wird (Djerbi et al., 2001). Am Anfang des Introns 6 ist ein Stopp-Codon enthalten, welches den offenen Leserahmen für c-FLIP_R terminiert (Abbildung III.8B). Im Folgenden wurde mittels RT-PCR die Expression der beiden mRNAs für c-FLIP_S und c-FLIP_R überprüft. Es wurden die Primer, wie in Abbildung III.9A schematisch abgebildet, verwendet. Die Sense-Primer für beide Reaktionen hybridisieren am Anfang des Exons 3 direkt am Translationsstart. Der Antisense-Primer für c-FLIP_S-cDNA hybridisiert zu Beginn des Exons 7, welches in der mRNA für c-FLIP_L herausgespleißt wird. Auf diese Weise sollte nur die cDNA von c-FLIP_s amplifiziert werden. Ähnlich wurde der Antisense-Primer für die cDNA von c-FLIP_R so gewählt, dass er am Anfang des Introns 6 hybrididisiert, welches aus den cDNAs für c-FLIP_L und c-FLIP_S herausgespleißt wird. Damit sollte nur die cDNA von c-FLIP_R amplifiziert werden.

Abbildung III.9B zeigt die RT-PCR für beide c-FLIP-mRNAs. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Zelllinien SKW6.4 und Raji ausschließlich die mRNA für c-FLIP_R exprimieren, während die Zelllinien HUT78 und J16 die mRNAs sowohl für c-FLIP_S als auch für c-FLIP_R exprimieren. Weil in den Zelllinien SKW6.4 und Raji lediglich die mRNA für c-FLIP_R vorhanden ist, wird c-FLIP_R als einzige kurze Isoform translatiert. Enthalten die Zellen allerdings mRNAs für c-FLIP_S und c-FLIP_R, wird in den meisten Zelllinien überwiegend c-FLIP_S translatiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass primäre humane T-Zellen ebenfalls mRNAs für c-FLIP_R und c-FLIP_S enthalten (Abbildung III.9B).

Nach Klonierung der beiden kurzen c-FLIP-Isoformen c-FLIP_S und c-FLIP_R wurden diese *invitro*-translatiert und jeweils einzeln in Lysate von HUT78-Zellen gegeben. Anschließend wurde eine c-FLIP Immunpräzipitation durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. In der Kontrolle wurde überwiegend c-FLIP_S detektiert und in geringer Konzentration c-FLIP_R.



Abb. III.9 Identifizierung von c-FLIP_R und Expressions profil von c-FLIP_S- und c-FLIP_R-mRNA. (A) Übersicht über Primer, die für die Klonierung und die RT-PCR verwendet wurden. (B) Von 1 x 10⁶ HUT78, J16, Raji, SKW6.4 und primären humanen T-Zellen wurde RNA isoliert und revers transkribiert. Die PCR für c-FLIP_S und c-FLIP_R wurde mit spezifischen Primern durchgeführt. (C) C-FLIP_S und c-FLIP_R wurden *in-vitro*-translatiert und zu Lysaten von HUT78-Zellen hinzugefügt, anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation mit Hilfe des anti-FLIP mAk NF6. Endogene Expression der beiden Spleißvarianten sind in der Kontrolle gezeigt (Bahn 1), dann folgen 2 Experimente, in denen die c-FLIP_R Bande durch Hinzufügen von c-FLIP_R verstärkt wurde (Bahnen 2 und 3) und schließlich wurde das gleiche Experiment zweifach für c-FLIP_S durchgeführt (Bahnen 4 und 5).

Wenn das Lysat vor der c-FLIP Immunpräzipitation mit *in-vitro*-translatiertem c-FLIP_R versetzt wurde, konnte die unbekannte eFLIP-Bande im Western Blot verstärkt werden. Damit besitzt die endogene unbekannte c-FLIP-Bande ein Molekulargewicht, welches identisch mit dem des klonierten c-FLIP_R ist. Als Kontrolle wurde das gleiche Experiment für c-FLIP_s durchgeführt. In diesem Fall wurde die endogene c-FLIP_s-Bande verstärkt.

2.3 c-FLIP_R wird an den CD95-DISC rekrutiert und weist ähnliche antiapoptotische Eigenschaften wie c-FLIP_s auf

Nachdem die unbekannte c-FLIP-Bande als c-FLIP_R identifiziert wurde, wurde anschließend die Funktion näher untersucht. Eine zentrale Funktion von c-FLIP_S in CD95-vermittelter

Apoptose ist die Inhibition der Caspase-8-Aktivierung im DISC (Krueger *et al.*, 2001b; Schmitz *et al.*, 2004). Zuerst wurde untersucht, ob c-FLIP_R an den CD95-DISC rekrutiert wird. Dazu wurden CD95-DISCs aus den Zelllinien HUT78, J16, SKW6.4 und Raji immunpräzipitiert. Außer c-FLIP_L und c-FLIP_S konnte auch c-FLIP_R im CD95-DISC detektiert werden (Abbildung III.10A).



Abb. III.10 Zelllinien, die nur cFLIP_R exprimieren, bilden funktionale CD95-DISCs. (A) Von 10⁸ SKW6.4-, HUT78-, Raji- und J16-Zellen wurden CD95-DISCs nach 5 min Stimulation mit anti-APO-1 immunpräzipitiert, im 12% Laemmli-Gel aufgetrennt und im Western Blot die Anwesenheit der verschiedenen DISC-Komponenten analysiert. (B) C-FLIP_S und c-FLIP_R wurden *in-vitro*-translatiert, [³⁵S]-radioaktiv markiert und mit CD95-DISCs aus 5 x 10⁷ HUT78-Zellen ü.N. bei 4°C inkubiert. Die hinzugefügte Menge entspricht den aufgetragenen Inputs. Nach Inkubation wurde die Protein-A-Sepharose mit den enthaltenen DISCs (Bahnen 3-6) gewaschen und zusammen mit den Überständen der Inkubation (Bahnen 7-10) in einem 15% Laemmli-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. (C) Mit c-FLIP_S oder c-FLIP_R stabil transfizierte BJABs wurden für 48 h bei 37°C mit den angegeben Konzentrationen an anti-APO-1 behandelt. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie über FSC/SSC quantifiziert. Die Expressionniveaus der c-FLIP Proteine wurden im Western Blot mit Hilfe des anti-FLIP mAk NF6 kontrolliert.

In den Zelllinien SKW6.4 und Raji wurde c-FLIP_R anstelle des nicht vorhandenen c-FLIP_S in den CD95-DISC rekrutiert. CD95, FADD und Caspase-8 wurden als Kontrollen für die DISC-Immunpräzipitation entwickelt. Das p43-Fragment von c-FLIP_L, das durch Caspase-8-Aktivität generiert wird, konnte ebenfalls im DISC detektiert werden.

Nachdem die Rekrutierung von c-FLIP_R an den DISC qualitativ gezeigt war, stellte sich die Frage, welche Affinitäten die beiden kurzen c-FLIP Isoformen zu FADD im DISC haben. Um die Rekrutierung von c-FLIP_S und c-FLIP_R an den DISC auf semiquantitative Weise zu analysieren, wurden die beiden Proteine *in-vitro*-translatiert und [35 S]- radioaktiv markiert. CD95-DISCs wurden immunpräzipitiert und anschließend jeweils mit den radioaktiv markierten Proteinen c-FLIP_R und c-FLIP_S inkubiert. Nach Inkubation wurde die Protein-A-Sepharose mit dem immunpräzipitierten CD95-DISC vom Überstand getrennt und nittels Western Blot analysiert (Abbildung III.10B). Damit konnte gezeigt werden, dass ein großer Anteil des Inputs (Bahnen 1 und 2) der radioaktiv markierten c-FLIPs an den DISC gebunden wurde (Bahnen 3-6), während ein geringerer Anteil im Überstand detektiert wurde und damit nicht rekrutiert worden ist (Bahnen 7-10). Der Versuch wurde mit SKW6.4 als Zelllinie (Bahnen 4, 6, 8, 10), die nur c-FLIP_R exprimiert, und mit HUT78 als Zelllinie (Bahnen 3, 5, 7, 9), die überwiegend c-FLIP_S exprimiert, durchgeführt. In beiden Zelllinien wurde eine vergleichbare Menge an radioaktiv markiertem c-FLIP_R und c-FLIP_S an den DISC rekrutiert, was eine vergleichbare Affinität bezüglich FADD in verschiedenen Zelllinien aufzeigt.

Um die anti-apoptotischen Eigenschaften von c-FLIP_R *in vivo* zu analysieren, wurden BJAB-Zellen generiert, die stabil entweder c-FLIP_S oder c-FLIP_R exprimieren (Abbildung III.10C, Western Blot). Diese stabilen Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-APO-1 für 48 h inkubiert und der CD95-vermittelte Zelltod mittels Durchflusszytometrie bestimmt (FSC/SSC). Bei Inkubationen mit ansteigenden Konzentrationen an anti-APO-1 konnte gezeigt werden, dass c-FLIP_R ebenso wie c-FLIP_S inhibitorisch wirkte. Ein vollständiger Block der Apoptose konnte nicht erwirkt werden, da ein Zell-Pool und keine klonalen Zelllinien für das beschriebene Experiment verwendet wurden.

2.4 C-FLIP_R und c-FLIP_s haben ähnliche Halbwertszeiten

In der Literatur wurden kurze Halbwertszeiten für c-FLIP Proteine beschrieben (Fulda *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2004). Deshalb wurde im Folgenden die Halbwertszeit von c-FLIP_R mit Hilfe des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) untersucht (Abbildung III.11). Zunächst wurden die Zelllinien SKW6.4 und HUT78 verwendet, die überwiegend c-FLIP_s oder c-FLIP_R exprimieren. Beide Zellen zeigten nach CHX-Behandlung eine Abnahme der jeweils kurzen c-FLIP Isoform nach bereits 2 h und stärker nach 4 h (Abbildung III.11A). Um die Halbwertszeiten der beiden kurzen eFLIP Isoformen besser vergleichen zu können, wurde die Zelllinie Boe^R verwendet, weil sie die beiden kurzen c-FLIP Isoformen exprimiert.

Auch in dieser Zelllinie weisen c- $FLIP_R$ und c- $FLIP_S$ vergleichbare Halbwertszeiten auf und werden schnell degradiert. Procaspase-8 und FADD wurden als Kontrollen verwendet, um gleiche Ladung im Western Blot zu gewährleisten. Die Halbwertszeiten beider Proteine sind länger als die der beiden kurzen c-FLIP-Proteine (Abbildung III.11B).



Abb. III.11 cFLIP_R und c-FLIP_S sind sich ähnlich in Bezug auf Halbwertszeit und Affinität zum CD95-DISC. (A) 5 x 10⁷ HUT78- oder SKW6.4-Zellen wurden für 0, 2 oder 4 h mit 10 μ g/ml CHX behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden mit Hilfe von 12%-Laemmli Gel und Western Blot unter Verwendung des anti-FLIP mAk NF6 analysiert. (B) 5 x 10⁷ Boe^R-Zellen wurden für die angegeben Zeiten mit 10 μ g/ml CHX behandelt und wie an (A) beschrieben weiter prozessiert. Boe^R-Zellen (C) und SKW6.4-Zellen (D) wurden für 4 h mit 10 μ g/ml CHX behandelt, anschließend gewaschen und mit den angegebenen Konzentrationen an anti-APO-1 für 24 h inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie über FSC/SSC quantifiziert.

Boe^R-Zellen wurden als resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose beschrieben, obwohl sie CD95 auf der Oberfläche exprimieren (Scaffidi *et al.*, 1999). Die Vermittlung der Resistenz könnte durch hohe endogene Konzentrationen an kurzen c-FLIP Isoformen hervorgerufen werden. Um diese Fragestellung zu klären, wurden Boe^R-Zellen für 4 h mit CHX inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit Medium über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen mit anti-APO-1 stimuliert. Der spezifische Zelltod wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Während Zellen, die nicht mit CHX behandelt wurden,

resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose blieben, konnte nach CHX Behandlung eine Sensitivierung beobachtet werden (Abbildung III.11C). Wie in Abbildung III.11B gezeigt wurde, sind die Konzentrationen an c-FLIP_s und c-FLIP_R nach 4 h CHX-Behandlung stark reduziert. Eine geringere Konzentration an beiden kurzen c-FLIP-Isoformen erleichtert CD95vermittelte Caspase-8 Prozessierung im DISC und führt damit zur Initiierung der Caspasen-Kaskade und zur Apoptose. Die CHX-Behandlung von SKW6.4-Zellen, die ausschließlich c-FLIP_R exprimieren, führte zu erhöhter Sensitivität. SKW6.4-Zellen exprimieren endogen soviel c-FLIP_R, dass sie resistent gegenüber einer Behandlung mit 10 ng/ml anti-APO-1 sind. Nach Reduktion der c-FLIP-Konzentration steigt die Sensitivität gegenüber geringen Mengen an anti-APO-1 an und Apoptose wird ausgelöst (Abbildung III.11D).

2.5 C-FLIP_R in primären humanen T-Zellen

Es wurde beschrieben, dass c-FLIPs die Resistenz kurzeit-aktivierter T-Zellen bezüglich CD95-induzierter Apoptose vermittelt (Kirchhoff et al., 2001). Außerdem wurde es als Mediator CD28-vermittelter Co-Stimulation und als Ursache für die Resistenz bezüglich Aktivierungs-induzierten Zelltods nach TZR-Stimulation charakterisiert (Kirchhoff et al., 2001; Kirchhoff et al., 2000a; Schmitz et al., 2004). Weil die mRNA für c-FLIP_R in primären humanen T-Zellen gefunden wurde (Abbildung III.11B), wurde mittels Western Blot die Expression von c-FLIP_R auf Proteinebene in verschiedenen T-Zell-Spendern untersucht. Dabei wurde in manchen Spendern nur die Expression von c-FLIP_S und in anderen Spendern die Expression beider kurzen c-FLIP Proteine simultan detektiert (Abbildung III.12A). Im Weiteren wurde untersucht, ob sich c-FLIP_R und c-FLIP_S nach primärer Stimulation der T-Zellen sowie nach TZR-Restimulation an Tag 6 ähnlich verhalten. Wie bereits in der Literatur gezeigt, wurden hier für c-FLIP_L keine Konzentrationsunterschiede zwischen Tag 0 und Tag 6 detektiert. Gleichzeitig konnte aber gezeigt werden, dass sowohl c-FLIP_s als auch c-FLIP_R an Tag 6 herunterreguliert wurden, was vermutlich die Sensitivierung der T-Zellen an Tag 6 mit Lectin nach primärer Stimulation verursacht (Abbildung III.12B). Wurden die sensitiven Tag 6-Zellen allerdings mittels anti-CD3 Antikörper restimuliert, wurden beide kurzen c-FLIP Proteine wieder verstärkt exprimiert.

Um die Restimulation über den TZR sowie die Co-Stimulation über CD28 genauer zu untersuchen, wurden T-Zellen zweier Spender verwendet. Alle drei Stimulationen führten zur Hochregulation von c-FLIP_s bzw. c-FLIP_s und c-FLIP_R. Besonders starke Hochregulation wurde nach CD3/28 Co-Stimulation erhalten, was bereits für c-FLIP_s beschrieben war.



Interessanterweise wurde c-FLIP_R nach Stimulationen nicht hochreguliert, wenn nicht in T-Zellen des Spenders schon zu Beginn kein c-FLIP_R detektierbar war (Abbildung III.12C).

Abb. III.12 eFLIP_R in primären humanen T-Zellen. (A) Primäre humane TZellen verschiedener Spender wurden aufgereinigt und anschließend lysiert. Aus den Lysaten wurden NF6-Immunpräzipitationen durchgeführt, im 15% Laemmli-Gel aufgetrennt und auf die Anwesenheit der jeweiligen c-FLIP Isoformen hin analysiert. (B, C) Primäre humane T-Zellen wurden aufgereinigt (Tag 0) und mit 1 µg/ml PHA für 16 h kultiviert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 5 weitere Tage mit 25 U/ml IL-2 im Medium kultiviert. An Tag 6 wurden die primären humanen T-Zellen mit mAk gegen CD3, CD28 oder CD3/CD28 stimuliert. Nach weiteren 1-2 Tagen wurden die Zellen lysiert. Aus den Lysaten wurden NF6-Immunpräzipitationen durchgeführt, im 15% Laemmli-Gel aufgetrennt und auf die Anwesenheit der jeweiligen c-FLIP Isoformen hin analysiert. Das Experiment in (C), rechts wurde als Duplikat durchgeführt.

Mit den obigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass beide kurzen c-FLIP-Isoformen c- $FLIP_s$ und c- $FLIP_R$ vergleichbare biochemische Eigenschaften besitzen sowie in den analysierten Systemen einer vergleichbaren Regulation unterliegen.

3. p22-FLIP aktiviert NFkB und inhibiert CD95-Signalleitung

Bei der Suche nach neuen kurzen DED-enthaltenden Proteinen, die sowohl bei der komplexen Regulation Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sowie Überlebens-Signalwegen eine Rolle spielen könnten, gab es bereits bei der Detektion von c-FLIP_R Hinweise darauf, dass es noch eine weitere kurze c-FLIP-Variante gibt. Die Entschlüsselung ihrer Identität und ihre Charakterisierung wurden daher mit den folgenden Experimenten durchgeführt.

3.1 Detektion von p22-FLIP

Bei der Entwicklung zellulärer Lysate verschiedener T- und B-Zelllinien mit dem anti-FLIP mAk NF6, wurde eine neue c-FLIP Bande visualisiert, die eine ungefähre Größe von 22 kD aufweist (Abbildung III.13A). Aufgrund der Tatsache, dass der mAk NF6 gegen die beiden DED-Domänen von c-FLIP gerichtet ist, konnten die c-FLIP-Isoformen c-FLIP_{L/R/S} sowie das Spaltprodukt p43-FLIP detektiert werden, denen gemeinsam ist, dass sie alle N-terminal Tandem-DEDs besitzen. Zudem wurde eine 22 kD große c-FLIP-Bande detektiert, die wahrscheinlich die beiden N-terminalen Tandem-DEDs von c-FLIP darstellt und somit eine den Prodomänen von Procaspase-8/-10 ähnliche Struktur aufweisen könnte. P22-FLIP wurde in den B-lymphoblastoiden Zellen Boe^R, Raji und den T-Zelllinien HUT78 und JA3 detektiert, während diese Bande weder in der T-Zelllinie CEM noch in primären humanen Tund B-Zelllinien vorhanden zu sein scheint (Abbildung III-13A, rechts). Um die erhaltenen Daten zu bestätigen, wurde alternativ der mAk NF6 in einer Immunpräzipitation eingesetzt. Anschließend wurden die c-FLIP-Proteine im Western Blot visualisiert (Abbildung III.13B). Dabei konnten aus den gleichen Zelllinien, wie in Abbildung III.13A beschrieben, das neue 22 kD große c-FLIP-Protein immunpräzipitiert werden. P22-FLIP war zusätzlich zu der in Abbildung III.13A gefundenen T-Zelllinie CEM auch nicht in der B-Zelllinie SKW6.4 vorhanden.

Weiterhin wurde analysiert, ob die Anwesenheit von p22-FLIP Caspase-abhängig ist. Dazu wurden sowohl JA3- (Abbildung III.13C) als auch HUT78-Zellen (Abbildung III.13D) mit zVAD-fmk inkubiert.



Abb. III.13 Caspase-abhängige Anwesenheit von p22-FLIP in Tumorzelllinien, aber nicht in primären Lymphozyten. (A) Gesamtzelllysate der angegeben en Zelllinien oder primären humanen Lymphozyten wurden im 12% Laemmli-Gel aufgetrennt und im Western Blot auf die verschiedenen c-FLIP Proteine hin untersucht. Neben c-FLIP_L und den beiden kurzen c-FLIP Isoformen konnte eine etwa 22 kD große Bande beobachtet werden. Rechts: Primäre humane B und TZellen wurden aufgereinigt und die T-Zellen wie oben beschrieben aktiviert. An Tag 1 und Tag 6 wurden Lysate hergestellt und mit Lysaten von primären humanen B-Zellen auf die Anwesenheit der verschiedenen c-FLIP-Proteine hin analysiert. (B) Mit den angegebenen Zelllinien wurden wie bereits oben beschrieben NF6-Immunpräzipitationen durchgeführt und analysiert. JA3-Zellen (C) und HUT78-Zellen (D) wurden jeweils mit 20 μ M zVAD-fmk für 30 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit einer unbehandelten Kontrolle lysiert. Die Expression der 22 kD großen c-FLIP-Bande wurde wie in (A) visualisiert.

Es stellte sich heraus, dass die p22-FLIP-Bande nach Inkubation mit dem Caspase-Inhibitor verschwand. Daraus ergibt sich, dass p22-FLIP in Anwesenheit von Caspase-Aktivität generiert wird und es sich vermutlich weniger um eine weitere bisher nicht beschriebene c-FLIP Isoform, sondern vielmehr um ein c-FLIP-Spaltprodukt handelt.

3.2 Identifizierung von p22-FLIP als c-FLIP-Spaltprodukt

Um zu analysieren, ob es sich bei p22-FLIP tatsächlich um ein Spaltprodukt handelt und an welcher Spaltsequenz es generiert wird, wurde die Sequenz der verschiedenen c-FLIP-Isoformen auf die Anwesenheit möglicher Aspartate hin überprüft, nach denen die Caspasen als Aspartat-spezifische Cysteinproteasen bekanntlich schneiden. Dabei wurde das Asp¹⁹⁸ gefunden, welches in allen drei c-FLIP-Isoformen vorkommt und als mögliche Spaltstelle für die Generierung von p22-FLIP in Frage kommt (Abbildung III.14A).



Abb. III.14 Identifizierung von p22-FLIP. (A) Übersicht über die beiden Spleißvarianten c-FLIP_L und c-FLIP_s und p22-FLIP. Das Epitop des anti-FLIP mAk NF6 ist ebenfalls angegeben sowie das Asp¹⁹⁸, an dem p22-FLIP generiert wird. (B) Lysate und NF6-Immunpräzipitationen wurden aus 5 x 10⁷ Boe^R-Zellen hergestellt. Der klonierte N-Terminus von c-FLIP (1-198) wurde *in-vitro*-translatiert und ansteigende Volumina des Translats zu den Lysaten bzw. NF-6-Immunpräzipitationen gegeben, die Proben in 15% Laemmli-Gelen aufgetrennt und wie oben beschrieben im Western Blot visualisiert. (C) Lysate der angegebenen Zelllinien wurde hergestellt und zusammen mit den *in-vitro*-translatierten [³⁵S]-radioaktiv markierten Proteinen cFLIP_s, c-FLIP_L oder FLAG-c-FLIP_L ü.N. bei 4°C in An - oder Abwesenheit von 50µM zVAD-fmk inkubiert. Die Reaktionen wurden in 12% Laemmli-Gelen aufgetrennt, geblottet und autoradiographiert.

Es wurde der N-Terminus von c-FLIP bis hin zum Asp¹⁹⁸ kloniert. Nach *in-vitro*-Translation des Konstruktes 1-198 von c-FLIP wurden ansteigende Mengen des translatierten Proteins zum Lysat von Boe^R titriert. Anschließend wurden die Lysate mit den enthaltenen Konstrukten per SDS-Gelelektrophorese und Western Blot aufgetrennt und visualisiert (Abbildung III.14B). In einem ähnlichen Experiment wurden ansteigende Konzentration des *in-vitro*-translatierten Konstruktes 1-198 zu Lysaten von Boe^R-Zellen hinzugefügt und anschließend mit Hilfe des mAk NF6 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden ebenfalls per SDS-Gelelektrophorese und Western Blot aufgetrennt und visualisiert (Abbildung III.14B).

Um im Weiteren zu untersuchen, von welchem c-FLIP p22-FLIP generiert wird, wurden folgende *in-vitro*-Experimente durchgeführt: C-FLIP_L, c-FLIP_S und FLAG-c-FLIP_L wurden *in-vitro*-translatiert und [³⁵S]-radioaktiv markiert. Die einzelnen radioaktiv markierten c-FLIP-Proteine wurden anschließend mit Lysaten von JA3- und HUT78-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von zVAD-fmk inkubiert, über Gelelektrophorese aufgetrennt und entstandene Spaltprodukte mittels Autoradiographie visualisiert (Abbildung III.14C). Dabei wurde c-FLIP_S in p22-FLIP und einen sehr kurzen C-Terminus, der aufgrund seiner geringen Größe nicht sichtbar gemacht werden konnte, gespalten. C-FLIP_L wurde in die beiden Produkte p22-FLIP und einen etwa 33 kD großen C-Terminus gespalten, während nach Spaltung von FLAG-FLIP_L die beiden Produkte FLAG-p22-FLIP und der etwa 33 kD große C-Terminus resultierten. Die Inkubation der Spaltungsreaktion mit zVAD-fmk verhinderte die Prozessierung in die beschriebenen Produkte und zeigte Konsistenz mit den in Abbildung III.13C und D gezeigten Daten. Auch *in-vitro* konnte die Generierung von p22-FLIP nachempfunden werden und gezeigt werden, dass diese Reaktion abhängig von Caspase-Aktivität ist.

3.3 P22-FLIP wird durch die Aktivität von Procaspase-8 generiert

Interessanterweise ist eine Caspase-Aktivität für die Spaltung von c-FLIP in p22-FLIP verantwortlich, zugleich konnte in den bisherigen Analysen gezeigt werden, dass diese Spaltung unter nicht-apoptotischen Bedingungen in nicht-stimulierten Zellen stattfindet. Unter diesen Überlebens-Bedingungen wurde nicht erwartet, dass eine Caspase-Aktivität in den Zellen zu finden ist. Weil von Procaspase-8 berichtet wurde, dass sie katalytische Aktivität besitzen kann, ohne vorher prozessiert worden zu sein (Boatright *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003), wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob es sich bei der hier gefunderen

Caspase-Aktivität evtl. um die der Procaspase-8 handeln könnte. Dazu wurde Procaspase-8 aus HUT78-Zellen immunpräzipitiert und anschließend mit *in-vitro*-translatiertem, [35 S]-radioaktiv markiertem c-FLIP_L inkubiert. Die Inkubation wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von zVAD-fmk durchgeführt (Abbildung III.15A, links oben).



Abb. III.15 p22-FLIP wird durch Procaspase-8-Aktivität generiert. (A) Links: Procaspase-8 wurde aus J16-Zellen mit Hilfe des anti-Caspase-8 mAk C15 immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden in Reaktionspuffer mit *in-vitro*-translatiertem, [³⁵S]-radioaktiv markierten c-FLIP_L für 1 h bei 37°C inkubiert und die Spaltprodukte nach 12% Laemmli-Gelelektrophorese und Blot autoradiographisch visualisiert. Anschließend wurde mit Hilfe des anti-Caspase-8 mAk C15 ein Western Blot der Reaktion entwickelt. Rechts: *In-vitro*-translatiertes, [³⁵S]-radioaktiv markiertes c-FLIP_L wurde mit ansteigenden Konzentration an rekombinanter Caspase-8 für 1 h bei 37°C inkubiert und genauso wie oben beschrieben analysiert. (B) Übersicht über die Aktivität des Caspase-8 Heterotetramers. Dieses spaltet im DISC unter apoptotischen Bedingungen c-FLIP_L in die beiden Produkte p43-FLIP und p12-FLIP. (C) Übersicht über die Aktivität der Procaspase-8. Diese spaltet unter nicht-apoptotischen Bedingungen c-FLIP_L in die beiden Produkte p22-FLIP und p33-FLIP.

Die entstandenen Spaltprodukte wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Procaspase-8 wirklich c-FLIP_L in die beiden Spaltprodukte p22-FLIP und den C-Terminus spalten konnte und dass diese Aktivität durch zVAD-fmk blockierbar war. Wahrscheinlich erfolgt die beobachtete Spaltung von c-FLIP in einem Heterodimer, welches aus c-FLIP und Procaspase-8 gebildet werden kann. Um sicherzugehen, dass es sich nicht um die Aktivität bereits prozessierter Caspase-8 handelt, sondern um die Procaspase-8-Aktivität, wurde ein Western

Blot mit einem Antikörper durchgeführt, der sowohl die Procaspase-8 als auch die prozessierten Produkte von Caspase-8 wie p43/41 und p18 erkennen kann (Abbildung III.15A, links unten). Dabei konnte gezeigt werden, dass lediglich die Procaspase-8 in der Spaltungsreaktion vorhanden war und keine der prozessierten Produkte. Als weitere Kontrolle wurde ein Spaltungsassay durchgeführt, dem anstelle von Procaspase-8 aktivierte rekombinante Caspase-8 in zwei Konzentrationen hinzugefügt wurde (Abbildung III.15A, rechts oben). Diese Reaktion resultierte in der Spaltung von c-FLIP_L in die beiden bereits bekannten Spaltprodukte p43-FLIP sowie p12-FLIP.

Zusammenfassend ließ sich in diesen Experimenten zeigen, dass c-FLIP unter apoptotischen Bedingungen durch die Aktivität bereits prozessierter Caspase-8 in die beiden Spaltprodukte p43-FLIP und p12-FLIP gespalten wird (Abbildung III.15B). Diese Spaltung erfolgt bekanntermaßen am DISC. Dagegen kann c-FLIP in die beiden bisher unbekannten Spaltprodukte p22-FLIP und den C-Terminus gespalten werden, wenn sich die Zelle unter nicht-apoptotischen Bedingungen befindet. Dann werden im Cytosol vermutlich Heterodimere aus c-FLIP und Procaspase-8 gebildet, die dazu führen können, dass p22-FLIP entsteht (Abbildung III.15C).

3.4 P22-FLIP inhibiert Todesrezeptor-induzierte Apoptose

C-FLIP Proteine sind als Inhibitoren Todesrezeptor-vermittelter Apoptose bekannt. Um zu testen, ob p22-FLIP ebenfalls anti-apoptotische Eigenschaften aufweist, wurden stabile BJAB-Zellen generiert, die hohe bzw. niedrige Mengen an p22-FLIP exprimieren (Abbildung III.16A). Beide Zelllinien sind dadurch charakterisiert, dass sie im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen eine reduzierte Sensitivität bezüglich CD95-vermittelter Apoptose aufweisen (Abbildung III.16B). Eine stark erhöhte Resistenz konnte vor allem für die BJAB-Zellen beobachtet werden, die größere Mengen an p22-FLIP exprimieren. Dieser Effekt wurde sowohl für die Stimulation des CD95-Rezeptors mit anti-APO-1 als auch bei Stimulation mit dem LZ-CD95-Liganden erhalten (Abbildung III.16B).

Weiterhin wurde die Resistenz gegen Ligation des TRAIL-Rezeptors, eines weiteren Todesrezeptors, untersucht. Ähnlich wie bei CD95-vermittelter Apoptose zeigten die beiden p22-FLIP stabil transfizierten BJAB-Zellen auch bezüglich TRAIL-vermittelter Apoptose eine erhöhte Resistenz (Abbildung III.16C). Dabei stellten sich die BJAB, die größere Mengen an p22-FLIP exprimieren, als besonders resistent gegenüber allen verwendeten Konzentrationen an FLAG-TRAIL heraus. Zur Kontrolle wurden verschiedene andere Stimuli

verwendet, um Zelltod in den stabilen BJABs auszulösen, der nicht Todesrezeptor-vermittelt ist (Daten nicht gezeigt). Der Zelltod aller stabilen Klone nach Stimulation mit Thapsigargin, Tunicamycin, UV, Cycloheximid oder Staurosporin war vergleichbar, so dass keine generelle Resistenz der BJAB-Klone durch stabile Transfektion und Selektion dieser Zellen erwirkt wurde.



Abb. III.16 p22-FLIP inhibiert Todesrezeptor-vermittelte Apoptose. (A) Stabil transfizierte BJABs, die viel (hi) oder wenig (lo) p22-FLIP exprimieren, wurden zusammen mit den Kontroll-Transfektanten lysiert und die c-FLIP-Expression nach 12% Laemmli-Gel und Western Blot analysiert. (B) Die in (A) getesteten BJABs wurden für 20 h bei 37°C mit 1 μ g/ml anti-APO-1 oder 50 μ l/ml LZ-CD95L inkubiert und der Zelltod mittels Durchflusszytometrie über FSC/SSC quantifiziert. (C) Experiment wie in (B), Inkubation erfolgte hier mit den angegebenen Konzentrationen an FLAG-TRAIL für 20 h bei 37°C. (D) CD95-DISC wurden aus 5 x 10⁷ p22-FLIP (hi) und Kontrollzellen immunpräzipitiert und nach Auftrennung im 12% Laemmli-Gel im Western Blot auf die Anwesenheit der verschiedenen DISC-Komponenten hin analysiert. (E) 5 x 10⁷ Boe^R-Zellen wurden für die angegeben Zeiten mit 10 μ g/ml CHX behandelt und wie an (D) beschrieben weiterprozessiert und mit den angegebenen Konzentrationen an anti-APO-1 oder FLAG-TRAIL für 24 h inkubiert. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie über FSC/SSC quantifiziert.

Die anti-apoptotische Funktion von c-FLIPs erfolgt durch deren Rekrutierung an den DISC. Dort verhindern sie die Prozessierung und damit Aktivierung von Caspase-8 (Krueger *et al.*, 2001b). Aus diesen Gründen wurde im Folgenden untersucht, ob die in Abbildung III.16B und C beobachtete Resistenz über die Bindung von p22-FLIP an den DISC erfolgt. Dazu wurden CD95-DISC-Immunpräzipitationen aus Kontroll- und p22-FLIP-transfizierten BJAB durchgeführt. Die DISC-Immunpräzipitationen wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die verschiedenen DISC-Komponenten unter Verwendung verschiedener Antikörper visualisiert. Neben den bekannten DISC-Komponenten CD95, FADD, Caspase-8, c-FLIP_L, c-FLIP_S und p43-FLIP konnte auch die Rekrutierung von p22-FLIP gezeigt werden (Abbildung III.16D). Im Falle der BJAB-Zellen, die größere Mengen an p22-FLIP exprimieren, wurde die Prozessierung von Procaspase-8 in die Spaltprodukte p43/41 und p18 und damit die Aktivierung dieser Caspase komplett inhibiert. Dieser Befund erklärt die beobachtete Resistenz p22-FLIP-enthaltender Zellen gegenüber CD95- sowie TRAIL-vermittelter Apoptose.

Eine besondere Eigenschaft von c-FLIP-Proteinen ist ihre kurze Halbwertszeit (Fulda et al., 2000; Schmitz et al., 2004). Es wurde beschrieben, dass Zellen gegenüber Todesrezeptorvermittelter Apoptose mit Hilfe des Translationsinhibitors Cycloheximid sensitiviert werden können (Fulda et al., 2000; Schmitz et al., 2004). Dies korreliert mit einer schnellen Herunterregulation von c-FLIP, das aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit schneller abgebaut wird als andere Proteine, die an der Todesrezeptor-vermittelten Signalleitung beteiligt sind. Für Boe^R-Zellen wurde gezeigt, dass sie zwar hohe Mengen an CD95 auf ihrer Oberfläche exprimieren, trotzdem aber komplett resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose sind. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Resistenz von Boe^R Zellen zumindest teilweise durch p22-FLIP vermittelt wird, da diese Zellen große Mengen an endogenem p22-FLIP exprimieren. Die Behandlung dieser Zellen mit CHX resultierte in einer substantiellen Herunterregulation von c-FLIP_{S/R} und p22-FLIP nach 4 h, während sich die Konzentration an Procaspase-8 innerhalb dieser Zeit kaum veränderte (Abbildung III.16E). In Abbildung III.16F wurde nun gezeigt, dass die verminderte Expression der kurzen c-FLIP-Isoformen und vor allem von p22-FLIP dazu führten, dass die Boe^R gegen CD95- und TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert wurden. Damit konnte gezeigt werden, dass Zellen mit erhöhten Konzentrationen an p22-FLIP sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Todesrezeptorvermittelter Apoptose auszeichnen. Für die Resistenzvermittlung gegen CD95 induzierte Apoptose sind in den Boe^R-Zellen vermutlich die drei kurzen c-FLIP-Proteine c-FLIP_S, c-FLIP_R und p22-FLIP verantwortlich.

3.5 P22-FLIP induziert NFkB

P22-FLIP wird unter nicht-apoptotischen Bedingungen generiert und kann Todesrezeptorinduzierte Apoptose blockieren. Daher wurde die Fragestellung untersucht, ob p22-FLIP auch weitere Überlebensfunktionen in der Zelle hat. V-FLIPs wie z.B. Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus und p22-FLIP weisen eine hohe Homologie auf (Daten nicht gezeigt). Für v-FLIPs wurde demonstriert, dass sie NFkB-Aktivität induzieren können (Chaudhary et al., 1999; Liu et al., 2002). Deshalb wurde untersucht, ob p22-FLIP ebenfalls NFkB-Aktivität induzieren kann (Abbildung III.17A). Dazu wurden 293T-Zellen mit MEKK1 als Positivkontrolle und p22-FLIP sowie cFLIP_L transfiziert und durch Co-Transfektion eines NFkB-Luciferase-Reporters gezeigt, dass p22-FLIP sogar stärker als MEKK1 NFkB-Aktivität induzieren kann (Abbildung III.17A). Um auszuschließen, dass der Unterschied in der Induktion von NFKB zwischen c-FLIP_L und p22-FLIP von unterschiedlichen Expressionsniveaus her resultiert, wurde im Western Blot gezeigt, dass die Expressionsniveaus der beiden Proteine in allen Proben vergleichbar waren (Abbildung III.17A). Die Expressionsniveaus der c-FLIP-Proteine waren im Vergleich zu endogenem c-FLIP_L so hoch (Abbildung III.17A), dass die Induktion von NFKB möglicherweise auch aufgrund der massiven Proteinexpression beobachtet werden könnte. Deshalb wurde im weiteren die Expression nach 1 bis 11 h nach erfolgter Transfektion gestoppt und die Proben sowohl im Luciferase-Assay bezüglich NFkB-Aktivierung als auch im Western Blot bezüglich der Expression von p22-FLIP analysiert (Abbildung III.17B). Dabei stellte sich heraus, dass bereits nach 8 h eine schwache Expression von p22-FLIP erfolgte und zugleich NFkB-Aktivität gemessen werden konnte. Damit wurde gezeigt, dass auch kleine Mengen an p22-FLIP bereits spezifisch NFkB aktivieren und diese Expressionsniveaus noch unter den endogenen Expressionsniveaus von einigen Zelllinien liegen (vgl. Abbildung III.13A). Für alle folgenden NFkB-Aktivierungs-Assays wurde die Transfektion nach 10-11 h Inkubation gestoppt. Als Kontrolle für die spezifische Induktion von NFkB wurden auch Luciferase-Assays mit AP1- und SP-1 Reporterplasmiden durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese zeigen die Aktivität von weiteren Transkriptionsfaktoren an, die entweder bei genereller Transkriptionsaktivierung (AP1) aktiviert werden oder konstitutiv aktiv sind (SP1). Damit konnte festgestellt werden, dass keine generelle transkriptionelle Aktivierung durch p22-FLIP erfolgt ebenso wie die Tatsache, dass die konstitutive Aktivität von SP1 nicht beeinflusst wurde. Somit verändert p22-FLIP spezifisch die Aktivität von NFkB.



Abb. III.17 p22-FLIP induziert NFkB Aktivität (A) 293T-Zellen wurden wie in Abschnitt II. beschrieben co-transfiziert mit MEKK-1, p22-FLIP oder c-FLIP_L und dem Luciferase-Reporter-Plasmid. NFkB-Luciferase-Aktivität wurde nach 16 h Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Quadrupletts durchgeführt und sind als MW \pm Standardabweichung angegeben. GFP-Transfektion diente als Kontrolle, um eine 100% ige Transfektionsrate zu garantieren. Die Lysate der Luciferase-Messungen wurden auch nach 12% Laemmli-Gel und Western Blot auf die Expressionsniveaus von c-FLIP hin untersucht (rechts). (B) 293T-Zellen wurden wie in (A) beschrieben mit p22-FLIP transfiziert und nach den angegebenen Zeiten wurde die NFkB-Aktivität sowie das Expressionniveau von c FLIPs ebenfalls wie in (A) beschrieben untersucht. (C) 293T-Zellen wurden mit MEKK-1, p22-FLIP, c-FLIP_L und p43-FLIP zusammen mit dem Luciferase-Reporter-Plasmid co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 11 h mit den angegebenen Konzentrationen an zVAD-fmk inkubiert, lysiert und die NFkB-Luciferase-Aktivität wie in (A) beschrieben bestimmt.

Es wurde bereits beschrieben, dass die Spaltung von c-FLIP_L eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung von NF κ B darstellt. Als verantwortliches Spaltprodukt wurde das eigentlich nur unter pro-apoptotischen Bedingungen beobachtbare Spaltprodukt p43-FLIP identifiziert (Kataoka und Tschopp, 2004). Deshalb wurde die Aktivierung von NF κ B durch die verschiedenen c-FLIP-Proteine in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk untersucht (Abbildung III.17C). Interessanterweise resultierten ansteigende Konzentrationen an zVADfmk in einer geringeren NF κ B-Aktivierung durch die Proteine p43-FLIP sowie cFLIP_L, während die NF κ B-Aktivierung durch die Proteine MEKK1 als Kontrolle sowie p22-FLIP von zVAD-fmk unbeeinflusst blieben. Das könnte bedeuten, dass für die Aktivierung von NFκB durch c-FLIP die Spaltung in das Spaltprodukt p43-FLIP nicht ausreicht, sondern die Spaltung am Asp¹⁹⁸ in p22-FLIP eine notwendige Voraussetzung für c-FLIP-induzierte NFκB-Aktivierung darstellt.

3.6 P22-FLIP aktiviert NFkB durch direkte Interaktion mit dem IKK-Komplex

In den folgenden Untersuchungen wurde analysiert, über welchen Mechanismus p22-FLIP die Aktivierung von NFκB induziert.



Abb. III.18 p22-FLIP induziert NFkB über den IKK-Komplex. (A-C) 293T-Zellen wurden mit p22-FLIP, dem Luciferase-Reporter-Plasmid und den angegebenen Mengen an kB α (A), kB β (B), Wt-IKK α/β oder mutIKK α/β (C) co-transfiziert. Die NFkB-Luciferase-Aktivität wurde nach 11 h Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Quadrupletts durchgeführt und sind als MW ± Standardabweichung angegeben. GFP-Transfektion diente als Kontrolle, um eine 100%ige Transfektionsrate zu garantieren. (D) 293T-Zellen wurden wie angegeben co-transfiziert und nach 16 h lysiert. Immunpräzipitationen mit Hilfe eines Ak, der gegen FLAG gerichtet ist sowie dem anti-FLIP mAk NF6 wurden durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden in 12% Laemmli-Gelen aufgetrennt und im Western Blot auf die angegebenen Proteine hin untersucht. Die Co-Transfektion von p22-FLIP mit ansteigenden Konzentrationen des NF κ B-Inhibitors I κ B α führte zur spezifischen Inhibition der p22-FLIP-induzierten NF κ B-Aktivität (Abbildung III.18A). Das gleiche Ergebnis wurde für die Co-Transfektion mit einem weiteren Inhibitor, I κ B β , erhalten.

Beide Experimente zeigten, dass die NF κ B-induzierende Wirkung weiter oben in der Signalleitung erfolgt. Deshalb wurden weitere Komponenten des IKK-Komplexes untersucht, die für die Phosphorylierung und Induktion der I κ B-Degradation verantwortlich sind. Die Co-Transfektion sehr geringer Konzentrationen an IKK α bzw. IKK β zeigten keinen Einfluss auf die Induktion der Aktivität von NF κ B durch p22-FLIP, wohingegen DN-IKK α und DN-IKK β die NF κ B Aktivierung blockierten (Abbildung III.18C). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Aktivierung von NF κ B durch p22-FLIP vom IKK-Komplex abhängig zu sein scheint.

Deshalb wurde nachfolgend untersucht, ob p22-FLIP NF κ B durch Bindung an IKK γ und Aktivierung des IKK-Komplexes induziert. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für das v-FLIP des Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus vorgeschlagen (Field *et al.*, 2003). Dazu wurden FLAG-IKK α , β oder γ zusammen mit p22-FLIP in 293T-Zellen co-exprimiert und anschließend sowohl p22-FLIP- als auch FLAG-Immunpräzipitationen durchgeführt (Abbildung III.18D). Dabei stellte sich heraus, dass p22-FLIP mit IKK γ interagiert und dadurch möglicherweise die Konformation des IKK-Komplexes derart verändert, dass es zur Autoaktivierung kommt. Nach Autoaktivierung des IKK-Komplexes wird I κ B phosphoryliert, degradiert und schließlich NF κ B freigesetzt.

Damit wurde gezeigt, dass c-FLIP neben der anti-apoptotischen Funktion der Inhibition von Procaspase-8 Prozessierung im DISC auch für alternative Überlebenssignalleitungen wie z.B. für die NFκB-Signaltransduktion wichtig ist.

IV. Diskussion

1. Die Rolle von CAP3 in der CD95-Signalleitung

Caspase-8 spielt eine entscheidende Rolle als Initiator-Caspase der CD95-induzierten Apoptose (Juo *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1996b; Varfolomeev *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde CAP3 als eine intermediäre Prodomäne von Caspase-8 identifiziert. Es existierten mehrere Hypothesen bezüglich der Identität und Funktion von CAP3. Die anerkannteste Hypothese war, dass es sich um eine kurze Spleißvariante von Caspase-8 handeln würde, die den beiden kurzen Spleißvarianten c-FLIP_S und Caspase-10/c ähnelt (Medema *et al.*, 1997a; Sprick *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998a). In dieser Arbeit wurde CAP3 als Intermediat der Prozessierung von Procaspase-8 identifiziert und charakterisiert. Es entsteht initial bei der Autoprozessierung von Procaspase-8 durch Spaltung an Asp²¹⁶ und wird dann durch die Aktivität teilweise bzw. vollständig prozessierter Caspase-8 in die kürzere Prodomäne p26 weiterprozessiert.

Es sind zwei Procaspase-8 Isoformen bekannt, Procaspase-8/a und -8/b, die beide an den DISC rekrutiert werden (Scaffidi *et al.*, 1997). Ihre Autoprozessierung erfolgt simultan von p55/53 in p43/41 und anschließend in p26/24. In dieser Arbeit konnte ein Produkt identifiziert werden, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um CAP3/b handelt und welches die verlängerte Prodomäne der Procaspase-8/b darstellt. Die Überlappung mit p26 verhindert häufig die Detektion dieser zweiten verlängerten Prodomäne. Außerdem scheint das Verhältnis von CAP3/a zu CAP3/b Zelltyp-abhängig zu variieren. In manchen Zelllinien ist CAP3/b kaum detektierbar, während CAP3/a visualisiert werden kann. Das deutet darauf hin, dass Caspase-8/a und -8/b teilweise verschiedene Prozessierungskinetiken besitzen könnten. Diese Fragestellung könnte in weiteren Arbeiten geklärt werden.

CAP3 Prozessierung nach CD95-Stimulation erfolgt über eine schnelle Kinetik innerhalb von Minuten. Dies konnte in dieser Arbeit zum einen am endogenen DISC gezeigt werden und zum anderen durch einen *in-vitro*-Caspase-8-Spaltungsassay. Im zuletzt genannten Assay konnte CAP3 nur detektiert werden, wenn die Mutante D210A verwendet wurde und nicht bei Verwendung der Wt-Procaspase-8. Dass CAP3 nie im Caspase-8-Spaltungsassay zu visualisieren war, wurde lange Zeit als Hauptargument für die Hypothese verwendet, dass es sich bei CAP3 eher um eine Spleißvariante als um ein proteolytisches Spaltprodukt handelt.

99

Es ist aber wahrscheinlich, dass sich die *in vitro* beobachtete Spaltungskinetik von der Caspase-8-Prozessierung *in vivo* unterscheidet. Das würde erklären, warum es methodisch nicht möglich ist, die Prozessierung von CAP3 unter Verwendung der Wt-Procaspase-8 *in vitro* nachzustellen. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass CAP3 *in vivo* im Zuge der Procaspase-8-Autoprozessierung gebildet wird und anschließend mit sehr schneller Kinetik in die nicht mehr weiter spaltbare Prodomäne p26 weiterprozessiert wird.

Weitere Erkenntnisse zum Mechanismus der CAP3-Generierung und Procaspase-8-Prozessierung wurden durch Verwendung des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk erhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von zVAD-fmk die Generierung von CAP3 nicht inhibiert, aber die Weiterprozessierung in die kürzere Prodomäne p26 blockiert. Diese Ergebnisse stimmen mit einer kürzlich erschienenen Publikation über die Prozessierung von Procaspase-8 überein, die ebenfalls zwei verschiedenen Substratspezifitäten von Caspase-8 aufzeigt, zum einen die Procaspase-8-Aktivität und zum anderen die teilweise oder vollständig prozessierte Caspase-8 (Chang *et al.*, 2003). Dieser Theorie folgend ist die Procaspase-8-Dimer-Aktivität für die Generierung von CAP3 ursächlich, während die Substrataktivität der prozessierten Caspase-8 für die Weiterprozessierung von CAP3 in p26 verantwortlich ist. Interessanterweise erwies sich zVAD-fmk als ein Werkzeug, um die beiden Substratspezifitäten zu unterscheiden. Mittels Biotin-zVAD-fmk konnte gezeigt werden, dass die reife Caspase-8-Aktivität auch bereits von p43/41, also der teilweise prozessierten Caspase-8 ausgehen kann, nicht jedoch von der Procaspase-8 p55/53.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann das folgende Modell für die Aktivierung von Procaspase-8 vorgeschlagen werden (Abbildung III.19). Zuerst wird Procaspase-8 über homophile Interaktionen der DEDs an FADD und darüber an den CD95-Rezeptor rekrutiert. In einer Reihe von *in-vitro*-Studien wurde gezeigt, dass eine Dimerbildung der Aktivierung von Caspase-8 vorangeht (Boatright *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1998). Dabei kann ein aktives Procaspase-8 Dimer ein anderes Procaspase-8 Dimer prozessieren und aktivieren. Die Spaltung involviert die Spaltsequenzen an den Resten Asp³⁷⁴, Asp³⁸⁴ und Asp²¹⁶.

Als Ergebnis der Spaltungen werden die Produkte p43, CAP3, p18 und p10 generiert. Weiterhin bewirkt die mature Caspase-8-Aktivität die Weiterprozessierung von CAP3 in die Prodomäne p26, welche am DISC gebunden bleibt und wahrscheinlich wichtige strukturbildende Funktionen übernimmt. So wurde in Überexpressions-Studien gezeigt, dass die Prodomänen von Caspase-8 ohne vorherige Stimulation des CD95-Rezeptors Apoptose induzieren können (Siegel *et al.*, 1998). Die Überexpression von DED-enthaltenden Proteinen wie FADD oder Prodomänen von Caspase-8 als GFP-Fusionsprotein resultierte in der Bildung so genannter Todeseffektorfilamente (engl.: death effector filaments). An diese Filamente wurden FADD und Procaspase-8 rekrutiert und letztere aktiviert. Da die Prodomänen von Caspase-8 nach erfolgter Prozessierung am DISC gebunden bleiben, kann vermutet werden, dass sich unterhalb des DISC Todeseffektorfilament-ähnliche Strukturen ausbilden, welche als "Plattformen" dienen könnten, um weitere Procaspase-8 Moleküle effizient zu rekrutieren und prozessieren.



Abb. III.19 Modell der Procaspase-8-Aktivierung. (A) Bei Stimulation des DISC wird Procaspase-8 an den DISC rekrutiert und bildet Dimere. Nach Dimer-Bildung erfolgt die Prozessierung und Aktivierung der Procaspase-8. Ein Procaspase-8-Dimer kann ein anderes Dimer spalten und die Spaltung erfolgt an den angegebenen Asp³⁷⁴, Asp³⁸⁴ und Asp²¹⁶. Aus diesen Spaltungen resultieren p43, CAP3, p18 und p10. Die Aktivität der gebildeten maturen Caspase-8 prozessiert im weiteren CAP3 in die kürzere Prodomäne p26. Dieser Schritt kann durch den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk inhibiert werden.

Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Funktion von CAP3 im DISC und der Procaspase-8 Prozessierung zu erhalten, wurden Caspase-8 defiziente JA3-Zellen sowie 293-Zellen, die reduzierte Mengen an Caspase-8 exprimieren (Kataoka und Tschopp, 2004), mit Wt-Procaspase-8 und den Mutanten D210A, D216A und D210A/D216A stabil transfiziert. Trotz stabiler Expression konnte eine Prozessierung der Procaspase-8 nach CD95-Stimulationen in diesen Zellen nicht erreicht werden. Auch nach transienter Transfektion wurde die Procaspase-8 nicht prozessiert, was auf einen anderen Defekt in den verwendeten Zellen hindeutet.

Um die funktionelle Rolle von CAP3 zu untersuchen und mit p26 zu vergleichen, wurden BJAB-Zellen generiert, die die Prodomänen 1-210 (p26) und 1-216 (CAP3) stabil exprimierten. In diesen Studien wurden keine Unterschiede in CD95-induzierter Apoptose für die beiden Prodomänen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die DISC-Bildung erfolgt vergleichbar in CAP3 und p26 exprimierenden BJABs (Daten nicht gezeigt). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit beider Prodomänen wurde eine redundante Rolle in der CD95-Signalleitung erwartet.

Eine detaillierte Analyse der Prozessierung und Aktivierung von Procaspase-8 am DISC ist von æntraler Bedeutung, um die CD95-induzierte Apoptose zu verstehen. In dieser Arbeit wurde die Prozessierung der Procaspase-8 direkt am DISC untersucht, im Gegensatz zu den bereits oben angesprochenen Studien, die die Prozessierung mittels künstlich dimerisierter Procaspase-8 artifiziell untersuchten. Dabei wurde CAP3 als intermediäres Spaltprodukt bei der Prozessierung von Procaspase-8 identifiziert. Es ist essentiell, alle einzelnen Prozessierungsschritte der Procaspase-8-Aktivierung zu kennen, um eventuell CD95induzierte Apoptose initial beeinflussen zu können. Diese Beeinflussung könnte zukünftig Bedeutung für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren CD95-induzierter Apoptose haben, die therapeutisch einsetzbar sind. Krankheiten, die mit einer Fehlregulation der CD95-Signalleitung einhergehen sind zum Beispiel: Alzheimer Erkrankung, Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, Hodgkin-Lymphom und verschiedene Krebserkrankungen.

2. c-FLIP_R, ein neuer Regulator Todesrezeptor-induzierter Apoptose

Neben CAP3 wurde in dieser Arbeit ein weiteres DED-enthaltendes Protein identifiziert und als FLIP_R bezeichnet. C-FLIP_R wurde bisher nur auf mRNA-Ebene identifiziert, eine Identifizierung auf Proteinebene ist bislang nicht erfolgt (Djerbi et al., 2001). Nach Überexpression von c-FLIP_R in einer murinen Zelllinie wurde eine inhibitorische Funktion gefunden, die auch für humane Krebszelllinien und primäre humane T-Zellen bestätigt wurde (Djerbi et al., 2001). In einer weiteren Arbeit, in der Lysate verschiedener humaner Krebszelllinien auf die Anwesenheit von c-FLIP-Isoformen hin untersucht wurden, konnte ebenfalls eine weitere kleinere c-FLIP-Bande in SKW6.4-Zellen gezeigt werden (Scaffidi et al., 1999). Diese Bande wurde wie auch in weiteren Studien immer als c-FLIP_S bezeichnet, repräsentiert aber wohl eher c-FLIP_R (Scaffidi et al., 1999). Strukturell sind sich die beiden kurzen c-FLIP-Isoformen, c-FLIP_R und c-FLIP_S, sehr ähnlich. Beide besitzen N-terminal 2 DEDs und unterscheiden sich nur in ihrem C-Terminus. Die C-terminalen Sequenzen werden durch den Beginn des Introns 6 im Falle von c-FLIP_R und durch den Beginn des Exons 7 im Falle von c-FLIPs codiert. Deshalb war zu erwarten, dass die Affinitäten beider kurzen c-FLIP Isoformen zum DISC ähnlich sind, was durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden konnte. Nicht nur die Affinitäten zum DISC zeigten sich als vergleichbar, sondern auch die Halbwertszeit und die inhibitorische Funktion bezüglich CD95-induzierter Apoptose. Da c-FLIP_R in den Zelllinien Raji und SKW6.4 als einzige kurze Isoform exprimiert wird und der biochemische Vergleich beider Isoformen keine Unterschiede zeigt, ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Proteine funktionell redundant sind.

Diese Annahme wurde ebenfalls mit der Regulation beider kur zen c-FLIP Isoformen in T-Zell-Stimulations- und TZR-Restimulations-Modellen bestätigt. Nach primärer Stimulation wurden beide Isoformen an Tag 1 hochreguliert und an Tag 6 herunterreguliert, um die Zellen bezüglich Aktivierungs-induziertem Zelltod zu sensitivieren. Auch nach TZR/CD28-Restimulation an Tag 6 wurden beide kurzen c-FLIP Isoformen hochreguliert, um Resistenz gegenüber Aktivierungs-induziertem Zelltod zu erwirken.

3. p22-FLIP aktiviert NFkB und inhibiert CD95-Signalleitung

Für c-FLIP-Proteine ist bekannt, dass sie nach Überexpression NFκB aktivieren können (Hu *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000b; Kataoka und Tschopp, 2004). Trotzdem ist der exakte Mechanismus bisher ungeklärt. In dieser Arbeit konnte mechanistisch gezeigt werden, wie es abhängig von c-FLIP zur Aktivierung von NFκB kommen kann (Abbildung III.20).



Abb. III.20 Übersicht über die Funktionen von p22-FLIP. P22-FLIP wird im Cytosol durch die Aktivität der Procaspase-8 im Heterodimer mit c-FLIP generiert und weist dann eine hohe Homologie zu v-FLIPs auf. P22-FLIP kann mit Hilfe der Tandem-DEDs an den DISC rekrutiert werden und dort die Todesrezeptor-induzierte Apoptose blockieren. Gleichsam kann p22-FLIP an IKK γ binden und damit den IKK-Komplex aktivieren. Nach Autoaktivierung des IKK-Komplexes kann dieser IkB als Inhibitor von NFkB phosphorylieren und damit für die Degradation markieren. Nach Degradation von IkB wird NFkB freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren. Dort erfolgt die Aktivierung der Transkription entsprechender anti-apoptotischer Zielgene.

Es wurde gezeigt, dass für die Aktivierung von NF κ B durch c-FLIP eine vorherige Spaltung von c-FLIP in das N-terminale DED-enthaltene Fragment p22-FLIP erforderlich ist. P22-FLIP kann durch Spaltung sowohl von c-FLIP_L als auch von c-FLIP_{S/R} generiert werden. Nach erfolgter Spaltung erwies sich p22-FLIP als starker Aktivator von NF κ B durch direkte Bindung an den IKK-Komplex bzw. IKK γ . Zusätzlich zur Funktion der NF κ B-Aktivierung kann p22-FLIP an den DISC rekrutiert werden und dort Todesrezeptor-vermittelte Procaspase-8 Prozessierung und Aktivierung verhindern.

P22-FLIP wird im Cytosol vermutlich nach Bildung eines Heterodimers mit Procaspase-8 generiert. Die Möglichkeit der Heterodimerbildung beider Proteine wurde kürzlich beschrieben (Boatright *et al.*, 2004; Micheau *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Procaspase-8 (p55/p53) c-FLIP an Asp¹⁹⁸ spalten kann. Diese Spaltung erfolgt ohne vorherige Stimulationen eines Todesrezeptors, ohne DISC-Bildung und ohne vorherige Prozessierung von Procaspase-8. Interessanterweise wurde beobachtet, dass durch das aktive Caspase-8 Heterotetramer die Generierung von p22-FLIP nicht erfolgen kann. Durch aktive Caspase-8 erfolgt die Spaltung von c-FLIP in p43-FLIP und den kurzen C-Terminus p12-FLIP am DISC. Das zeigt, dass Procaspase-8 und prozessierte Caspase-8 unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, was mit einer Reihe von Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt (Chang *et al.*, 2003).

Diese Daten unterstützen die bisher umstrittene Rolle von Procaspase-8 bezüglich Überlebens-Signalleitung (Su *et al.*, 2005). Ohne Stimulation eines Todesrezeptors erfolgt die Spaltung von c-FLIP in p22-FLIP, welches NFkB-Signalleitung als einen Überlebens-Signalweg induzieren kann. Auch die Inhibition der Procaspase-8-Aktivität ist konsistent mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. Es konnte gezeigt werden, dass p22-FLIP als finales c-FLIP-Spaltprodukt für die Aktivierung von NFKB verantwortlich ist. Dieses Ergebnis widerspricht einem anderen Bericht, in welchem p43-FLIP als das NFKB-induzierende Spaltprodukt beschrieben wurde (Kataoka und Tschopp, 2004). In dieser Arbeit konnte durch Inhibition von Caspasen deutlich gezeigt werden, dass das Spaltprodukt p43-FLIP weiterprozessiert werden muss, um NFkB zu aktivieren, während sich p22-FLIP als insensitiv bezüglich der Inkubation mit zVAD-fmk zeigte. Damit ist p43-FLIP als Mediator der NFkB-Aktivierung, wie von Kataoka und Tschopp beschrieben, eher unwahrscheinlich. In der Literatur ist beschrieben, dass p43-FLIP durch Wechselwirkung mit TRAF-2 und RIP in der Lage ist, NFkB zu induzieren (Kataoka und Tschopp, 2004). Deshalb wurde in Überexpressionsstudien untersucht, ob p22-FLIP an RIP binden kann, eine spezifische Wechselwirkung konnte aber nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Da aber eine Bindung an IKKy erfolgt, ist anzunehmen, dass p22-FLIP direkt über den IKK-Komplex NF_kB aktiviert.

P22-FLIP hat eine sehr hohe strukturelle Homologie zu viralen FLIPs (v-FLIPs) wie z.B. zum Kaposi-Sarkom-assoziierten Herpesvirus (Field *et al.*, 2003). Diese v-FLIPs wurden ursprünglich als Inhibitoren Todesrezeptor-vermittelter Apoptose gefunden, erst später wurde

die Funktion als Aktivator von NFκB beobachtet. Für v-FLIPs wurde ebenfalls eine Interaktion mit IKKγ beschrieben (Field *et al.*, 2003). Es wurde beschrieben, dass die Region in IKKγ, welche für die Interaktion mit den v-FLIP verantwortlich ist, die Aminosäuren 173-272 umfasst (Field *et al.*, 2003). Aufgrund der hohen strukturellen Homologie von v-FLIPs und p22-FLIP ist es sehr wahrscheinlich, dass die Bindung von p22-FLIP an IKKγ über dieselben Motive erfolgt. Die exakte Wechselwirkung mit dem IKK-Komplex sollte in zukünftigen Studien analysiert werden. Wahrscheinlich führt die Bindung von p22-FLIP an den IKK-Komplex zu einer konformationellen Änderung des Komplexes mit sich anschließender Autophosphorylierung und Autoaktivierung.

Es konnte gezeigt werden, dass p22-FLIP durch die Aktivität von Procaspase-8 in verschiedenen Tumorzelllinien generiert wird. Dies erscheint als ein möglicher Weg, um konstitutiv NFκB zu aktivieren und damit Überlebens-Signalwege zu kontrollieren. So konnte z.B. für klassische Hodgkin-Lymphome gezeigt werden, dass diese konstitutiv NFκB aktivieren und zugleich erhöhte Mengen an c-FLIP exprimieren (Dutton *et al.*, 2004). Interessanterweise sind Hodgkin-Lymphome B-Zell-Lymphome und in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die höchste Expression an p22-FLIP in Boe^R-Zellen detektiert wurde, die ebenfalls ein B-Zell-Lymphom darstellen. Zugleich besitzen diese Zellen den Vorteil, dass sie gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose resistent sind und damit leichter der Immunantwort gegen die entstehen Tumoren entkommen können. Ein ähnlicher Überlebens-Mechanismus wurde für KSHV-infizierte Lymphomzellen gefunden (Matta *et al.*, 2003). Auch diese Zellen wiesen zum einen eine erhöhte Resistenz gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose und zum anderen eine konstitutive Aktivität von NFκB auf.

Sobald Zellen durch Todesliganden stimuliert werden, erfolgt eine Prozessierung der Procaspase-8 in aktive Caspase-8 und die Generierung von p22-FLIP wird gestoppt (Daten nicht gezeigt). Die Prozessierung der Procaspase-8 erfolgt im DISC zusammen mit der Spaltung von c-FLIP in p43-FLIP und p12-FLIP, und eine Aktivierung von NFKB unter diesen Bedingungen ist nicht mehr nötig. Somit stellt p22-FLIP möglicherweise eine entscheidende Stellgröße zwischen Leben und Tod dar. Der aufgezeigte Mechanismus bietet evtl. therapeutische Angriffspunkte für die Behandlung bestimmter Tumorarten wie z.B. Hodgkin-Lymphome.

4. DED-enthaltende Proteine regulieren Leben und Tod

DED-enthaltende Proteine sind eine Klasse von Proteinen, die in Zellen Leben und Tod kontrollieren und wie z.B. c-Myc und Ras sind sie Teil einer steigenden Anzahl von Proteinen, die in mehr als nur einem Signalweg interagieren. Das zeigt, dass Modelle biochemischer Signalwege, die jeweils nur eine Funktion dieser Proteine darstellen, veraltetet sind. Die Signalwege, die zelluläres Überleben und Zelltod regulieren, sind stark miteinander vernetzt. Deshalb haben Veränderungen in Proteinen wie FADD, eFLIP oder Caspase-8 parallele Effekte sowohl bezüglich Proliferation als auch der Apoptose. Von daher ist eine Betrachtung der Gesamtmenge dieser Proteine, ihrer subzellulären Lokalisation sowie der Regulation ihrer Funktion z.B. durch Inhibitoren für eine kontrollierte Regulation unabdingbar.

So wäre es z.B. für eine sich nicht teilende, terminal differenzierte Zellen vorteilhaft, Todes-Signalwege zu inhibieren, nachdem die Proliferationsphase beendet ist. Dagegen könnte es für sich schnell teilende Zellen mit einer natürlichen Tendenz zur malignen Transformation von Vorteil sein, wenn ihre Todessignalwege stabil sind. Deshalb haben Tibbets *et al.* das Modell der DED-Protein-Familie propagiert, die als eine Art ,Zellerneuerungs-Kontrollpunkt' sowohl Proliferation als auch Zelltod co-regulieren können (Tibbetts *et al.*, 2003) (Abbildung III.21).



Abb. III.21 Kontrolle des Zellerneuerungs-Kontrollpunktes. Die relative Menge DED-enthaltender Proteine, ihre subzelluläre Lokalisation und die Regulation ihrer Funktionen variieren mit dem Status der zellulären Differenzierung. Sich schnell teilende undifferenzierte Zellen besitzen die höchste Konzentration DED-enthaltender Proteine, während nicht proliferierende, terminal differenzierte Zellen eine geringere und genau kontrollierte Menge an DED-enthaltenden Proteinen besitzen (nach Tibbetts *et al.*, 2003).

Im Allgemeinen wird der Prozess der Zellerneuerung als eine Balance zwischen Proliferation und Zelltod angesehen. Wenn man sich die Zellerneuerung aber als eine Verschiebung des Zellerneuerungs-Kontrollpunktes vorstellt, also über die relative Menge von Proteinen und ihrer zellulären Lokalisation, erhält man eine andere Art von Regulation. Eine solche Regulation erklärt auf einfache Weise die Umwandlung sich schnell teilender, Apoptosesensitiver Zellen in differenzierte, Apoptose-resistente Zellen wie z.B. reife terminal differenzierte Zellen, die aus Progenitor-Zellen oder Stamm-Zellen hervorgegangen sind. Genau an dieser Schnittstelle der Entscheidung stehen die DED-enthaltenden Proteine. Deshalb wurden Mutationen und Fehlregulationen von DED-enthaltenden Proteinen als Ursachen in einer Reihe von Erkrankungen identifiziert. Die Fehlregulation von DEDenthaltenden Proteinen führt zu Lymphoproliferation, Autoimmunität, Immundefizienz sowie neuronaler Degradation. Auch die extensive Nutzung DED-enthaltender Proteine durch Viren zeigt ihre zentrale Rolle als Scheidepunkt zwischen zellulärem Leben und Tod. Deshalb sind die DED-enthaltenden Proteine wichtige Angriffspunkte pharmazeutischer Intervention. Um in die komplexe Regulation der DED-enthaltenden Proteine eingreifen zu können, ist ein molekulares Verständnis ihrer Funktionsweise und ihrer Wechselwirkungen in verschiedenen Signalwegen unabdingbar.

Diese Arbeit deutet die komplexe Wirkungsweise DED-enthaltender Proteine an und zusammen mit zukünftigen Untersuchungen sollte die Wirkungsweise dieser Proteine in biochemischen Details aufgeklärt werden. Diese Studie zeigt auf, wie ähnlich Überlebensund Todesprozesse auf zellulärer Ebene beieinander liegen, und wie die beiden Prozesse, die lange für Zeit als sehr unterschiedlich geglaubt wurden, auf molekularer Ebene durch die gleichen Moleküle reguliert werden können.

V. Anhang

1. Literatur

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. and Akey, C.W. (2002) Threedimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9, 423-432.
- Alderson, M.R., Tough, T.W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A.,
 Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F. and Lynch, D.H. (1995) Fas ligand
 mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*, 181, 71-77.
- Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K. and Peter, M.E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, 22, 207-220.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong,W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (1978) Analytical technique for cell fractions. XXII. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins. Multiple gradient-slab gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **85**, 341-354.
- Aravind, L., Dixit, V.M. and Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*, **24**, 47-53.
- Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H. and Lesslauer, W. (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptorhuman TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, **73**, 431-445.
- Barclay, A.E., Franklin, K.J. and Prichard, M.L. (1944) *The fetal circulation and cardiovascular system and the changes they undergo at birth.* Blackwell, Oxford.
- Barnhart, B.C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G. and Peter, M.E. (2004)
 CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo J*, 23, 3175-3185.
- Baumann, S., Krueger, A., Kirchhoff, S. and Krammer, P.H. (2002) Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med*, **2**, 257-272.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Ottilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H.,
 Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., Lenardo, M.J., Tomaselli, K.J. and Cohen,
 J.I. (1997) Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit
 both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1172-1176.
- Bhardwaj, A. and Aggarwal, B.B. (2003) Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol*, **23**, 317-332.
- Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P.R., Marco, S.D., Krebs, J.F., Wu, J.C., Tomaselli,
 K.J. and Grutter, M.G. (1999) The three-dimensional structure of caspase-8: an
 initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des*, 7, 1125-1133.
- Boatright, K.M., Deis, C., Denault, J.B., Sutherlin, D.P. and Salvesen, G.S. (2004) Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J*, **382**, 651-657.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R. and Salvesen, G.S. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, **11**, 529-541.
- Bodmer, J.L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L.E., Browning, J.L., MacDonald, H.R. and Tschopp, J. (1997) TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity*, 6, 79-88.
- Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J. and Tschopp, J. (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol*, 2, 241-243.
- Bodmer, J.L., Schneider, P. and Tschopp, J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*, **27**, 19-26.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85, 803-815.
- Boldin, M.P., Mett, I.L., Varfolomeev, E.E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J.H. and Wallach, D. (1995a) Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem*, **270**, 387-391.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. and Wallach, D. (1995b) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, 270, 7795-7798.

- Breckenridge, D.G., Nguyen, M., Kuppig, S., Reth, M. and Shore, G.C. (2002) The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4331-4336.
- Brown, T.L. and Howe, P.H. (1998) MADD is highly homologous to a Rab3 guaninenucleotide exchange protein (Rab3-GEP). *Curr Biol*, **8**, R191.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F. and et al. (1995) Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation- induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, **373**, 441-444.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L. and Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288, 2351-2354.
- Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E. and Yang, X. (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J*, 22, 4132-4142.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E. and Yang, X. (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J*, **21**, 3704-3714.
- Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H. and Baltimore, D. (1998) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*, 281, 1860-1863.
- Chaudhary, P.M., Eby, M.T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L. and Hood, L. (2000) Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene*, **19**, 4451-4460.
- Chaudhary, P.M., Jasmin, A., Eby, M.T. and Hood, L. (1999) Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene*, 18, 5738-5746.
- Chawla-Sarkar, M., Bae, S.I., Reu, F.J., Jacobs, B.S., Lindner, D.J. and Borden, E.C. (2004) Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, **11**, 915-923.
- Chen, M., Orozco, A., Spencer, D.M. and Wang, J. (2002) Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem*, **277**, 50761-50767.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-512.

- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. and Dixit, V.M. (1996a) Signal transduction by DR3, a death domaincontaining receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, **274**, 990-992.
- Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G. and Dixit, V.M. (1996b)
 Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem*, 271, 4573-4576.
- Chu, K., Niu, X. and Williams, L.T. (1995) A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11894-11898.
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T.P., Straus, S.E. and Lenardo, M.J. (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, **419**, 395-399.
- Clarke, P.G.H. and Clarke, S. (1996) Nineteenth century research on naturally occuring cell death and related phenomena. *Anat Embryol*, **193**, 81.
- Combadiere, B., Reis e Sousa, C., Trageser, C., Zheng, L.X., Kim, C.R. and Lenardo, M.J. (1998) Differential TCR signaling regulates apoptosis and immunopathology during antigen responses *in vivo*. *Immunity*, **9**, 305-313.
- Condorelli, G., Vigliotta, G., Cafieri, A., Trencia, A., Andalo, P., Oriente, F., Miele, C., Caruso, M., Formisano, P. and Beguinot, F. (1999) PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis. *Oncogene*, **18**, 4409-4415.
- Cowling, V. and Downward, J. (2002) Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ*, **9**, 1046-1056.
- Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D.R. and Simon, H.U. (2002) Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat Med*, 8, 61-67.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-252.
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moller, P. and Krammer, P.H. (1992) Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol*, **149**, 3166-3173.

- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1995a) Autocrine Tcell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, **373**, 438-441.
- Dhein, J., Walczak, H., Westendorp, M.O., Baumler, C., Stricker, K., Frank, R., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1995b) Molecular mechanisms of APO-1/Fas(CD95)mediated apoptosis in tolerance and AIDS. *Behring Inst Mitt*, 13-20.
- Djerbi, M., Darreh-Shori, T., Zhivotovsky, B. and Grandien, A. (2001) Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol*, **54**, 180-189.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A.I., Bogen, B., Biberfeld, P. and Grandien, A. (1999) The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med*, **190**, 1025-1032.
- Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C. and Grutter, M.G. (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell*, **11**, 543-549.
- D'Souza, S.D., Bonetti, B., Balasingam, V., Cashman, N.R., Barker, P.A., Troutt, A.B., Raine, C.S. and Antel, J.P. (1996) Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med*, **184**, 2361-2370.
- Dutton, A., O'Neil, J.D., Milner, A.E., Reynolds, G.M., Starczynski, J., Crocker, J., Young,
 L.S. and Murray, P.G. (2004) Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6611-6616.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions during Apoptsis. Ann Rev Biochem, 68, 383-424.
- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J. and Fesik, S.W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, **392**, 941-945.
- Eckhart, L., Henry, M., Santos-Beneit, A.M., Schmitz, I., Krueger, A., Fischer, H., Bach, J.,
 Ban, J., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Mollinedo, F. and Tschachler, E. (2001)
 Alternative Splicing of Caspase-8 mRNA during Differentiation of Human
 Leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 777-781.
- Ehret, A., Li-Weber, M., Frank, R. and Krammer, P.H. (2001) The effect of HIV-1 regulatory proteins on cellular genes: derepression of the IL-2 promoter by Tat. *Eur J Immunol*, **31**, 1790-1799.

- Eramo, A., Sargiacomo, M., Ricci-Vitiani, L., Todaro, M., Stassi, G., Messina, C.G., Parolini,
 I., Lotti, F., Sette, G., Peschle, C. and De Maria, R. (2004) CD95 death-inducing
 signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type
 II cells. *Eur J Immunol*, **34**, 1930-1940.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. and Alnemri, E.S. (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7464-7469.
- Field, N., Low, W., Daniels, M., Howell, S., Daviet, L., Boshoff, C. and Collins, M. (2003) KSHV vFLIP binds to IKK-gamma to activate IKK. *J Cell Sci*, **116**, 3721-3728.
- French, L.E. and Tschopp, J. (2003) Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*, **10**, 117-123.
- Fulda, S., Meyer, E. and Debatin, K.M. (2000) Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1- converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res*, **60**, 3947-3956.
- Ganten, T.M., Haas, T.L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M.R., Fas, S.C., Krueger, A.,
 Weigand, M.A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., Krammer, P.H. and Walczak, H.
 (2004) Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ*, **11 Suppl 1**, S86-96.
- Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., Rasper, D.M., Roy, S., Hayden, M.R. and Nicholson, D.W. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol*, 4, 95-105.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.
- Glucksmann, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol Rev, 26, 59-81.
- Glykofrydes, D., Niphuis, H., Kuhn, E.M., Rosenwirth, B., Heeney, J.L., Bruder, J.,
 Niedobitek, G., Muller-Fleckenstein, I., Fleckenstein, B. and Ensser, A. (2000)
 Herpesvirus saimiri vFLIP provides an antiapoptotic function but is not essential for viral replication, transformation, or pathogenicity. *J Virol*, 74, 11919-11927.

- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M. and Wallach, D. (1997) CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. J Biol Chem, 272, 19641-19644.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. and Ferguson, T.A. (1995) Fas ligandinduced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, **270**, 1189-1192.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999a) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X.-M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S.J. (1999b) Caspase Cleaved BID Targets
 Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents
 This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *J Biol Chem*, 274, 1156-1163.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. and Tschopp, J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274, 1363-1366.
- Han, D.K., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask, B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M. and Hood, L. (1997) MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11333-11338.
- Han, Z., Bhalla, K., Pantazis, P., Hendrickson, E.A. and Wyche, J.H. (1999) Cif (Cytochrome c Efflux-Inducing Factor) Activity Is Regulated by Bcl-2 and Caspases and Correlates with the Activation of Bid. *Mol Cell Biol*, **19**, 1381-1389.
- Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Palleja, M., Krammer, P.H. and Defrance, T. (2000)Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol*, **165**, 3023-3030.
- Hennino, A., Berard, M., Krammer, P.H. and Defrance, T. (2001) FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med*, **193**, 447-458.
- Himeji, D., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Hayashi, K., Watanabe, T. and Harada, M. (2002) Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood*, **99**, 4070-4078.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P. and

Tschopp, J. (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*, **23**, 1428-1440.

- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B. and Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, 1, 489-495.
- Holmstrom, T.H., Schmitz, I., Soderstrom, T.S., Poukkula, M., Johnson, V.L., Chow, S.C., Krammer, P.H. and Eriksson, J.E. (2000) MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *Embo J*, 19, 5418-5428.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways.
 Cell, 84, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation. *Cell*, **81**, 495-504.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. and Dixit, V.M. (1997a) A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 9621-9624.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. and Dixit, V.M. (1997b) I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD- 95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 17255-17257.
- Hu, W.H., Johnson, H. and Shu, H.B. (2000) Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem*, **275**, 10838-10844.
- Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., Ultsch, M.H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos,A.M. and Kelley, R.F. (2000) A unique zinc-binding site revealed by a high-resolutionX-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, **39**, 633-640.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K. and Yonehara, S. (1999) The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, **398**, 777-785.
- Inaba, M., Kurasawa, K., Mamura, M., Kumano, K., Saito, Y. and Iwamoto, I. (1999) Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J Immunol*, **163**, 1315-1320.

- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. and Nunez, G. (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10717-10722.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**, 190-195.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-10937.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66, 233-243.
- Jackson, C.E. and Puck, J.M. (1999) Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr*, **11**, 521-527.
- Jimi, E., Aoki, K., Saito, H., D'Acquisto, F., May, M.J., Nakamura, I., Sudo, T., Kojima, T., Okamoto, F., Fukushima, H., Okabe, K., Ohya, K. and Ghosh, S. (2004) Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med*, **10**, 617-624.
- Ju, S.T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z. and Marshak-Rothstein, A. (1995) Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature*, **373**, 444-448.
- Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J. and Blenis, J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol*, **8**, 1001-1008.
- Juo, P., Woo, M.S., Kuo, C.J., Signorelli, P., Biemann, H.P., Hannun, Y.A. and Blenis, J. (1999) FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ*, **10**, 797-804.
- Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.
- Kataoka, T., Budd, R.C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M. and Tschopp, J. (2000a) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*, 10, 640-648.
- Kataoka, T., Budd, R.C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmler, M., Burns, K., Hahne,M., Kennedy, N., Kovacsovics, M. and Tschopp, J. (2000b) The caspase-8 inhibitor

FLIP promotes activation of NF-kappaB and erk signaling pathways [In Process Citation]. *Curr Biol*, **10**, 640-648.

- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmler, M., Thome, M., Froelich, C.J. and Tschopp, J. (1998) FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*, 161, 3936-3942.
- Kataoka, T. and Tschopp, J. (2004) N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 24, 2627-2636.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K.,
 Okumura, K. and Yagita, H. (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas
 ligand. *J Exp Med*, **182**, 1777-1783.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z. and Leder, P. (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, 8, 297-303.
- Keppler, O.T., Peter, M.E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I.,
 Schwartz-Albiez, R., Reutter, W. and Pawlita, M. (1999) Differential sialylation of
 cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility
 for CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology.*, 9, 557-569.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M. and Reed, J.C. (2002) An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277, 22320-22329.
- Kirchhoff, S., Krueger, A., Baumann, S. and Krammer, P.H. (2001) TCR/CD3 Restimulation und CD28 Kostimulation induzieren die Expression von c-FLIPshort und verhindern CD95 vermittelte Apoptose in T-Zellen. *Immunologie Aktuell*, 1, 117-118.
- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Krueger, A., Schmitz, I. and Krammer, P.H. (2000a) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol*, 165, 6293-6300.

- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Li-Weber, M. and Krammer, P.H. (2000b) Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol*, **30**, 2765-2774.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, 14, 5579-5588.
- Kischkel, F.C., Kioschis, P., Weitz, S., Poustka, A., Lichter, P. and Krammer, P.H. (1998) Assignment of CASP8 to human chromosome band 2q33-->q34 and Casp8 to the murine syntenic region on chromosome 1B-proximal C by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **82**, 95-96.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J. and Ashkenazi, A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, **12**, 611-620.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D. and Ashkenazi, A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*, 2, 2.
- Kitsberg, D., Formstecher, E., Fauquet, M., Kubes, M., Cordier, J., Canton, B., Pan, G., Rolli, M., Glowinski, J. and Chneiweiss, H. (1999) Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNFalpha-induced apoptosis. *J Neurosci*, **19**, 8244-8251.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R. and Farrow, S.N. (1996) A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*, **384**, 372-375.
- Krammer, P.H. (1999) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, **71**, 163-210.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. Nature, 407, 789-795.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2001a) FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol*, **21**, 8247-8254.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2001b) Cellular flice-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the cd95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, **276**, 20633-20640.

- Kubes, M., Cordier, J., Glowinski, J., Girault, J.A. and Chneiweiss, H. (1998) Endothelin induces a calcium-dependent phosphorylation of PEA-15 in intact astrocytes: identification of Ser104 and Ser116 phosphorylated, respectively, by protein kinase C and calcium/calmodulin kinase II in vitro. *J Neurochem*, **71**, 1307-1314.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. and Schlossman, S.F. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, **206**, 347-349.
- Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V. and Kahn, A. (1996) Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med*, 2, 80-86.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lavrik, I., Golks, A. and Krammer, P.H. (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci*, **118**, 265-267.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ*, **10**, 144-145.
- Lee, S.W., Ko, Y.G., Bang, S., Kim, K.S. and Kim, S. (2000) Death effector domain of a mammalian apoptosis mediator, FADD, induces bacterial cell death. *Mol Microbiol*, 35, 1540-1549.
- Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Moller, P. (1993) Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest*, **69**, 415-429.
- Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H.W., Terbeck, G., Brocker, E.B. and Kampgen, E. (2000) Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE- inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand- mediated apoptosis. *Blood*, **96**, 2628-2631.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. and Yuan, J. (1998) Cleavage if BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Li, R., Pei, H., Watson, D.K. and Papas, T.S. (2000) EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene*, **19**, 745-753.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman,

D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R. and Thompson, C.B. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, **6**, 1389-1399.

- Liu, L., Eby, M.T., Rathore, N., Sinha, S.K., Kumar, A. and Chaudhary, P.M. (2002) The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem*, 277, 13745-13751.
- Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.
- Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, 10, 629-639.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Baumler, C. and Krammer, P.H. (1995) Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol*, 25, 2303-2307.
- Marsters, S.A., Pitti, R.M., Donahue, C.J., Ruppert, S., Bauer, K.D. and Ashkenazi, A. (1996a) Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr Biol*, 6, 750-752.
- Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D. and Ashkenazi, A. (1996b) Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol*, 6, 1669-1676.
- Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L. and Lenardo, M.J. (1998) Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem*, 273, 4345-4349.
- Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F.,
 Hirsch, B., Johrens-Leder, K., Vornlocher, H.P., Bommert, K., Stein, H. and Dorken,
 B. (2004) c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death
 receptor-induced apoptosis. *J Exp Med*, **199**, 1041-1052.

- Matta, H., Sun, Q., Moses, G. and Chaudhary, P.M. (2003) Molecular genetic analysis of human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 278, 52406-52411.
- May, M.J. and Ghosh, S. (1997) Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol*, **8**, 63-73.
- Medema, J.P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C.J. and Offringa, R. (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE- inhibitory protein. *J Exp Med*, **190**, 1033-1038.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1997a) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J*, **16**, 2794-2804.
- Medema, J.P., Toes, R.E., Scaffidi, C., Zheng, T.S., Flavell, R.A., Melief, C.J., Peter, M.E.,
 Offringa, R. and Krammer, P.H. (1997b) Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme
 B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol*, 27, 3492-3498.
- Meinl, E., Fickenscher, H., Thome, M., Tschopp, J. and Fleckenstein, B. (1998) Antiapoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today*, **19**, 474-479.
- Michaelson, J.S. (2000) The Daxx enigma. Apoptosis, 5, 217-220.
- Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C. and Leder, P. (1999) Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev*, **13**, 1918-1923.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C. and Grutter, M.G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, **277**, 45162-45171.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, **114**, 181-190.
- Mittl, P.R., Di Marco, S., Krebs, J.F., Bai, X., Karanewsky, D.S., Priestle, J.P., Tomaselli,
 K.J. and Grutter, M.G. (1997) Structure of recombinant human CPP32 in complex
 with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem*, 272, 6539-6547.
- Murphy, B.M., Creagh, E.M. and Martin, S.J. (2004) Interchain proteolysis, in the absence of a dimerization stimulus, can initiate apoptosis-associated caspase-8 activation. *J Biol Chem*, 279, 36916-36922.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and

Dixit, V.M. (1996a) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**, 817-827.

- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. (1996b) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*, 85, 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**, 2926-2930.
- Newton, K., Harris, A.W. and Strasser, A. (2000) FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *Embo J*, **19**, 931-941.
- Ng, F.W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P.E., Nicholson, D.W., Cromlish, J.A. and Shore, G.C. (1997) p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **139**, 327-338.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J. and Trauth, B.C. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem*, 267, 10709-10715.
- OhYama, T., Tsukumo, S., Yajima, N., Sakamaki, K. and Yonehara, S. (2000) Reduction of thymocyte numbers in transgenic mice expressing viral FLICE-inhibitory protein in a Fas-independent manner. *Microbiol Immunol*, 44, 289-297.
- Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C.F., Chang, H.M. and Yeh, E.T. (1996) Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin *J Immunol*, **157**, 4277-4281.
- Panka, D.J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K. and Mier, J.W. (2001) Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activity Regulates c-FLIP Expression in Tumor Cells. *J Biol Chem*, 276, 6893-6896.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A. and Ruberti, G. (1999) Identification and Characterization of a Ligand-independent Oligomerization Domain in the Extracellular Region of the CD95 Death Receptor. *J Biol Chem*, 274, 38241-38250.

- Parlato, S., Giammarioli, A.M., Logozzi, M., Lozupone, F., Matarrese, P., Luciani, F., Falchi, M., Malorni, W. and Fais, S. (2000) CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *Embo J*, **19**, 5123-5134.
- Peitsch, M.C. and Tschopp, J. (1995) Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol Immunol*, **32**, 761-772.
- Perez, D. and White, E. (2003) E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha by downregulating c-FLIP S. *J Virol*, **77**, 2651-2662.
- Perlman, H., Pagliari, L.J., Georganas, C., Mano, T., Walsh, K. and Pope, R.M. (1999) FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*, **190**, 1679-1688.
- Peter, M., Hellbardt, S., Schwartz-Albiez, A., Westendorp, M., Walczak, H., Moldenhauer, G., Grell, M. and Krammer, P. (1995) Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Diff*, 2, 163-171.
- Peter, M.E., Kischkel, F.C., Scheuerpflug, C.G., Medema, J.P., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1997) Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 deathinducing signaling complex. *Eur J Immunol*, **27**, 1207-1212.
- Peter, M.E. and Krammer, P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, **10**, 26-35.
- Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F.C. and Krammer, P.H. (1998) The Death Receptors. In Kumar, S. (ed.), *Apoptosis, problems and diseases*. Springer, Heidelberg, pp. 25-63.
- Pluta, A.F., Earnshaw, W.C. and Goldberg, I.G. (1998) Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. J Cell Sci, 111, 2029-2041.
- Poukkula, M., Kaunisto, A., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Katajamaki, T., Johnson, M.S., Sistonen, L. and Eriksson, J.E. (2005) Rapid turnover of c-FLIPS is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem*.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa,
 P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry,
 N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden,
 M.R., Roy, S. and Nicholson, D.W. (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a

mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, **5**, 271-288.

- Reinehr, R. and Haussinger, D. (2004) Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology*, **126**, 249-262.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci* USA, 98, 14250-14255.
- Rippo, M.R., Moretti, S., Vescovi, S., Tomasetti, M., Orecchia, S., Amici, G., Catalano, A. and Procopio, A. (2004) FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells. *Oncogene*, 23, 7753-7760.
- Rodriguez, I., Matsuura, K., Khatib, K., Reed, J.C., Nagata, S. and Vassalli, P. (1996) A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J Exp Med*, **183**, 1031-1036.
- Roth, W., Stenner-Liewen, F., Pawlowski, K., Godzik, A. and Reed, J.C. (2002) Identification and characterization of DEDD2, a death effector domain-containing protein. *J Biol Chem*, 277, 7501-7508.
- Rothwarf, D.M. and Karin, M. (1999) The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*, **1999**, RE1.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson,
 E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A. and Becker, J.W.
 (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of
 apoptosis. *Nat Struct Biol*, 3, 619-625.
- Sakamaki, K., Tsukumo, S. and Yonehara, S. (1998) Molecular cloning and characterization of mouse caspase-8. *Eur J Biochem*, **253**, 399-405.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10964-10967.
- Sato, T., Irie, S., Kitada, S. and Reed, J.C. (1995) FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science*, **268**, 411-415.
- Savill, J.S., Fadok, V., Henson, P. and Haslett, J.E. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis *Immunology Today*, 14, 131.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1997) FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem*, 272, 26953-26958.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 1541-1548.
- Schievella, A.R., Chen, J.H., Graham, J.R. and Lin, L.L. (1997) MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 12069-12075.
- Schlapbach, R., Spanaus, K.S., Malipiero, U., Lens, S., Tasinato, A., Tschopp, J. and Fontana,
 A. (2000) TGF-beta induces the expression of the FLICE-inhibitory protein and
 inhibits Fas-mediated apoptosis of microglia. *Eur J Immunol*, **30**, 3680-3688.
- Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S.C., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2004) Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol*, **172**, 2194-2200.
- Screaton, G.R., Xu, X.N., Olsen, A.L., Cowper, A.E., Tan, R., McMichael, A.J. and Bell, J.I. (1997) LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4615-4619.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Sharp, D.A., Lawrence, D.A. and Ashkenazi, A. (2005) Selective knockdown of the long variant of cellular FLICE inhibitory protein augments death receptor-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem*, **280**, 19401-19409.
- Shi, Y. (2004) Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*, **117**, 855-858.
- Shu, H.B., Halpin, D.R. and Goeddel, D.V. (1997) Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, **6**, 751-763.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y. and Lenardo, M.J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288, 2354-2357.

- Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J. and Lenardo, M.J. (1998) Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, **141**, 1243-1253.
- Siegel, R.M., Muppidi, J.R., Sarker, M., Lobito, A., Jen, M., Martin, D., Straus, S.E. and Lenardo, M.J. (2004) SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol*, 167, 735-744.
- Siegmund, D., Hadwiger, P., Pfizenmaier, K., Vornlocher, H.P. and Wajant, H. (2002) Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med*, 8, 725-732.
- Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J. (1999a) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 1067-1074.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. and Martin, S.J. (1999b) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *J Cell Biol*, 144, 281-292.
- Sohn, D., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R.U. (2005) Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor-triggered dimerization during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **280**, 5267-5273.
- Sprick, M., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. and Walczak, H. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 deathinducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J*, **21**, 4520-4530.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H. and Walczak, H. (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, **12**, 599-609.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1, 949-957.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Ottilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. and Alnemri,

E.S. (1997) FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 18542-18545.

- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E. and Seed, B. (1995) RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, 81, 513-523.
- Stegh, A.H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T.G., Grummt,
 I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) DEDD, a novel death effector domaincontaining protein, targeted to the nucleolus. *Embo J*, 17, 5974-5986.
- Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H. and Galle, P.R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med*, 2, 1361-1366.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H. and Cory, S. (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *Embo J*, 14, 6136-6147.
- Strasser, A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. Nat Rev, 5, 189-200.
- Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S. and Lenardo, M. (2005) Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science*, **307**, 1465-1468.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-1178.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T. and Nagata, S. (1994) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol*, 6, 1567-1574.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. and Nagata, S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*, 4, 31-36.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-853.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Tschopp, J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, **386**, 517-521.

- Thome, M. and Tschopp, J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*, **1**, 50-58.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: Enemies Within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Tibbetts, M.D., Zheng, L. and Lenardo, M.J. (2003) The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol*, **4**, 404-409.
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X. and Seed, B. (1996) RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *Embo J*, 15, 6189-6196.
- Torii, S., Egan, D.A., Evans, R.A. and Reed, J.C. (1999) Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *Embo J*, **18**, 6037-6049.
- Tracey, K.J. and Cerami, A. (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Ann Rev Cell Biol*, **9**, 317-343.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245, 301-305.
- Van de Craen, M., Van Loo, G., Declercq, W., Schotte, P., Van den brande, I., Mandruzzato, S., van der Bruggen, P., Fiers, W. and Vandenabeele, P. (1998) Molecular cloning and identification of murine caspase-8. *J Mol Biol*, **284**, 1017-1026.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A.K. and Baltimore, D. (1999) Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C- FLIP in lymphocytes. *Immunity*, 11, 763-770.
- Vandenabeele, P., Declerq, W., Vanhaesebroeck, B., Grooten, J. and Fiers, W. (1995) Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells J Immunol, 154, 2904-2913.
- Vander Heiden, M.G. and Thompson, C.B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*, **1**, E209-E216.
- Varfolomeev, E.E. and Ashkenazi, A. (2004) Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*, **116**, 491-497.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J.S., Mett,I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer,D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. and Wallach, D.

(1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, **9**, 267-276.

- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. Cell, 96, 245-254.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declerq, W., Grooten, J., Fiers, W. and Vandenabeele, P. (1998) Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J Exp Med*, **187**, 1477-1485.
- Vincenz, C. and Dixit, V.M. (1997) Fas-associated death domain protein interleukin-1betaconverting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem*, **272**, 6578-6583.
- Vogt, C. (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstrtricians), Solothurn.
- Wajant, H. (2003) Death receptors. Essays Biochem, 39, 53-71.
- Walczak, H., Bouchon, A., Stahl, H. and Krammer, P.H. (2000) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xLoverexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res*, 60, 3051-3057.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C. and Lynch, D.H. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5, 157-163.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferenz, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C. and Hammill, L.D. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta- converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. *Cell*, **78**, 343-352.
- Wallach, D. (1997) Apoptosis. Placing death under control. Nature, 388, 123, 125-126.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. and Boldin, M.P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Ann Rev Immunol*, **17**, 331-367.
- Walsh, C.M., Wen, B.G., Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Dixit, V.M. and Hedrick, S.M.(1998) A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity*, 8, 439-449.
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M. and Lenardo, M.J. (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13884-13888.

- Wang, J., Lobito, A.A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A. and Lenardo, M.J. (2000)Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP.*Eur J Immunol*, **30**, 155-163.
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E. and Lenardo, M.J. (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, **98**, 47-58.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nagata, S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, **356**, 314-317.
- Watt, W., Koeplinger, K.A., Mildner, A.M., Heinrikson, R.L., Tomasselli, A.G. and Watenpaugh, K.D. (1999) The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*, 7, 1135-1143.
- Weber, C.H. and Vincenz, C. (2001) The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci*, 26, 475-481.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, **14**, 2060-2071.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-730.
- Willis, S., Day, C.L., Hinds, M.G. and Huang, D.C. (2003) The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci*, **116**, 4053-4056.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A. and Raybuck, S.A. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme *Nature*, **370**, 270-275.
- Wright, D.A., Futcher, B., Ghosh, P. and Geha, R.S. (1996) Association of human Fas (CD95) with a ubiquitin-conjugating enzyme (UBC-FAP) *J Biol Chem*, **271**, 31037-31043.
- Wu, Z., Roberts, M., Porter, M., Walker, F., Wherry, E.J., Kelly, J., Gadina, M., Silva, E.M., DosReis, G.A., Lopes, M.F., O'Shea, J., Leonard, W.J., Ahmed, R. and Siegel, R.M. (2004) Viral FLIP impairs survival of activated T cells and generation of CD8+ T cell memory. *J Immunol*, **172**, 6313-6323.

- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
- Xiao, C., Yang, B.F., Asadi, N., Beguinot, F. and Hao, C. (2002) Tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J Biol Chem*, 277, 25020-25025.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*, **7**, 401-409.
- Yang, X., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1998a) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*, 1, 319-325.
- Yang, X., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1998b) Essential Role of CED-4 Oligomerization in CED-3 Activation and Apoptosis. *Science*, 281, 1355-1357.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1997) Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 89, 1067-1076.
- Yeh, J.H., Hsu, S.C., Han, S.H. and Lai, M.Z. (1998a) Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med*, **188**, 1795-1802.
- Yeh, W.C., Itie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (2000) Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, 12, 633-642.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M.,
 Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V.
 and Mak, T.W. (1998b) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 279, 1954-1958.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A. and Korsmeyer,
 S.J. (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis.
 Nature, 400, 886-891.
- Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, **169**, 1747-1756.
- Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y. and Kwon, B.S. (1999) A Newly Identified Member of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TR6) Suppresses LIGHT-mediated Apoptosis. J Biol Chem, 274, 13733-13736.

- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C. and Korsmeyer, S.J. (2000) Posttranslational Nmyristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, **290**, 1761-1765.
- Zhang, H., Xu, Q., Krajewski, S., Krajewska, M., Xie, Z., Fuess, S., Kitada, S., Godzik, A. and Reed, J.C. (2000) BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2597-2602.
- Zhang, X., Jin, T.G., Yang, H., DeWolf, W.C., Khosravi-Far, R. and Olumi, A.F. (2004) Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res*, 64, 7086-7091.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. and Pandolfi, P.P. (2000) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med*, **191**, 631-640.

2. Abkürzungen

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod (engl.: activation induced cell death)
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom (engl: acquired
	immunodeficiency syndrom)
Ak	Antikörper
ALPS	Autoimmun-Lymphoproliferatives Syndrom
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASK1	Engl.: apoptosis signaling kinase 1
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
BZR	B-Zell-Rezeptor (engl.: B cell receptor)
c-FLIP	Engl.: cellular FLICE-inhibitory protein
CAP	Engl.: cytotoxicity dependent APO-1-associated protein
CD	Engl.: cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHX	Cycloheximid
DC	Dendritische Zellen
DD	Todesdomäne (engl.: death domain)
DED	Todeseffektordomäne (engl.: death effector domain)
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex (engl.: death-inducing signaling
	complex)
DN	Dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Todesrezeptor (engl.: death receptor)
DTT	Dithiotreitol
ECL	Engl.: enhanced chemiluminescence
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

FADD	Engl.: Fas-associated death domain protein
FADD-DN	FADD-dominant negativ
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FSC/SSC	Engl.: Forward Scatter, sideward scatter
FLICE	Engl.: FADD-like ICE
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IAP	Engl.: Inhibitor of apoptosis
ICE	Engl.: Interleukin-1ß converting enzyme
IEF	Isoelektrische Fokussierung
lgG	Immunglobulin der Klasse G
IgG _H	schwere Kette eines Immunglobulins der Klasse G
lκB	Inhibitor von NF κB
IKK	ΙκΒ-Kinase
L	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kD	Kilodalton
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
LZ	Engl.: Leucin-Zipper
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEKK1	MAPK/ERK Kinase Kinase 1
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
min	Minute
NFκB	Nukleärer Faktor kB
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PHA	Phytohämagglutinin

pl	isoelektrischer Punkt
RACE	Engl.: rapid amplification of cDNA ends
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	Sekunde
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRAIL	Engl.: TNF-related apoptosis-inducing ligand
TZR	T-Zell-Rezeptor (engl.: T cell receptor)
U	Engl.: Unit, Einheit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v-FLIP	Engl.: viral FLICE-inhibitory protein
WB	Engl.: Western Blot
Wt	Wildtyp

Wenn nicht im Abkürzungsverzeichnis vorhanden, wurde für die Bezeichnung von

Aminosäuren der Ein-Buchstabencode verwendet.

3. Publikationsverzeichnis

Originalveröffentlichungen:

Eichhorst, S.T., Krueger, A., Muerkoster, S., Fas, S.C., Golks, A., Gruetzner, U., Schubert,
L., Opelz, C., Bilzer, M., Gerbes, A.L., Krammer, P.H. (2004) Suramin inhibits death
receptor-induced apoptosis *in-vitro* and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nat Med.*10, 602-9.

Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **280**,14507-13.

Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2005) The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell death and differentiation*: im Druck.

Golks, A., Brenner, D., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2005) Requirement of a novel N-terminal c-FLIP cleavage for the induction of NF-κB. Zur Publikation eingereicht.

Brenner, D., **Golks, A.**, Kiefer, F., Krammer, P.H., Arnold, R. (2005) A novel mechanism for activation or suppression of NF κ B by HPK1 determines sensitivity towards activation-induced cell death. Zur Publikation eingereicht.

Lavrik, I.N., **Golks, A**., Stoesser, S., Krammer, P.H. (2005) Recruitment of caspase-2 to the CD95 death inducing signaling complex. Zur Publikation eingereicht.

<u>Übersichtsartikel:</u>

Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H. (2005) Death receptor signaling. J Cell Sci. 118, 265-7.

Lavrik, I.N., **Golks, A**., Krammer, P.H. (2005) Caspases: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. Zur Publikation akzeptiert.

Krammer, P.H., **Golks, A.**, Fritsch, C., Lavrik, I.N. (2005) CD95 molecule page. *AfCS-Nature Molecule Pages*.

Poster:

Golks, A., Krueger, A., Lavrik, I.N., Krammer, P.H. (2003) The role of CAP3 in CD95 signaling. 4th DKFZ PhD meeting, Weil der Stadt.

Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2005) C-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg.

Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2005) Requirement of a novel N-terminal c-FLIP cleavage for the induction of NF-κB. Kongress 'Genetics control of T cell activation', Henningsvaer, Norwegen.

4. Erklärung

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

Heidelberg, im Juli 2005

.....

Alexander Golks