

**Untersuchung der Funktion von Mitochondrien
im Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Arne Lange
aus Kiel
2004

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Adam
 2. Referent: Prof. Dr. Frank Kempken
- Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 2004
- Zum Druck genehmigt: Kiel, 22.04.2004

Der Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
EINLEITUNG	4
1 Die unterschiedlichen Formen des Zelltodes: Nekrose	5
2 Die unterschiedlichen Formen des Zelltodes: Apoptose	5
2.1 Caspase-abhängige Signaltransduktion des Zelltodes	6
2.2 Der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)	7
2.3 Typ I und Typ II der TNF-vermittelten Signaltransduktion der Apoptose	8
3 Die unterschiedlichen Formen des Zelltodes: Caspase-unabhängiger programmierter Zelltod	10
3.1 Die Rolle von Mitochondrien im Caspase-unabhängigen Zelltod	11
3.2 Der Apoptose-induzierende-Faktor (apoptosis-inducing-factor AIF)	12
3.3 Die Funktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten	13
4 Fragestellung	14
MATERIAL UND METHODEN	15
1 Geräte und Materialien	15
2 Chemikalien und Reagenzien	16
3 Biologische Reagenzien	17
4 Vektoren und Plasmide	17
4.1 Transformation von Bakterien	17
4.2 Erstellung von FE65like in pcDNA3.1myc/his zur Transfektion	18
5 Agarosegelelektrophoresen	19
6 Zelllinien und Zellkultur	19
7 Herstellung stabil transfizierter Zellen durch Elektroporation	19
8 Stimulation von Zellen	20
9 Bestimmung der Zytotoxizität durch die Kristallviolett-färbung	20
10 Bestimmung der Zytotoxizität durch MTT Assay	21
11 Präparation von Nukleusextrakten	21
12 Präparation von Mitochondrien- und Cytosol-Extrakten	21
13 Präparation von Zellextrakten für Gesamtzelllysate und ATP Depletionsanalysen ..	22

14	Präparation von Zellextrakten für intrazelluläre NAD ⁺ Messungen.....	22
15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot Analyse...	23
16	Nachweis der Cytochrom c- und AIF-Freisetzung aus Mitochondrien mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).....	23
17	Darstellung der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in Zellen durch Dihydrorhodamin 123-Färbung.....	24
18	Statistische Auswertung	25
	ERGEBNISSE	26
1	Untersuchungen zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien.....	26
1.1	Cytochrom c-Freisetzung in HeLa Zellen.....	26
1.2	Freisetzung von Cytochrom c in HeLa, NIH3T3 und L929 Zellen	27
2	Untersuchungen zur Signaltransduktion bei der Freisetzung von <i>apoptosis-inducing-</i> <i>factor</i> (AIF) aus Mitochondrien	29
2.1	Untersuchungen zur Freisetzung von AIF in HeLa Zellen	29
2.2	Untersuchungen zur Freisetzung von AIF in L929sA Zellen	30
2.3	AIF-Freisetzung aus Mitochondrien in L929sA Fibrosarkomzellen	36
2.4	AIF-Freisetzung aus Mitochondrien in L929 Fibrosarkomzellen.....	38
2.5	AIF-Freisetzung aus Mitochondrien in L929 ATCC Fibrosarkomzellen	40
2.6	PARP als Mechanismus des Ceramid-induzierten Zelltodes?	42
2.7	Verhältnis zwischen ATP-Depletion und Zelltod in L929 Fibrosarkomzellen.....	44
2.8	Die Rolle von PARP im MNNG vermittelten Zelltod	47
2.9	Die Rolle von PARP im TNF vermittelten Zelltod.....	48
2.10	Die Rolle von Ceramid im TNF und MNNG vermittelten Zelltod.....	50
2.11	Proteasom Inhibitoren führen nicht zum Schutz vor ATP-Depletion und PARP Aktivierung bei TNF und MNNG vermitteltem Zelltod.....	52
3	Die Rolle von reaktiven Sauerstoffintermediaten im TNF-induzierten Zelltod.....	54
3.1	Untersuchungen zur Protektion der Radikalfänger BHA und BHT vor TNF- induziertem Zelltod	54
3.2	Messung von reaktiven Sauerstoffintermediaten mit DHR 123 im FACS	62
4	Generierung von TNF resistenten FE65like überexprimierenden L929 Zellen.....	65
	DISKUSSION	69
1	Untersuchungen zur Signaltransduktion von Cytochrom c.....	69
1.1	Freisetzung von Cytochrom c in HeLa Zellen	69

1.2	Freisetzung von Cytochrom c in L929 Zellen.....	70
2	Untersuchungen zur Signaltransduktion von AIF in HeLa Zellen.....	71
3	Untersuchungen zur Signaltransduktion von AIF in L929 Zellen	71
3.1	Nachweis der AIF Translokation in L929 Zelllinien durch Immunfluoreszenz	72
3.2	Nachweis der AIF Translokation in L929 Zelllinien durch Western-Blot.....	73
4	Die Rolle von reaktiven Sauerstoffintermediaten im TNF vermittelten Zelltod.....	76
5	FE65like als Mediator des TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Zelltodes?	78
	ZUSAMMENFASSUNG	80
	LITERATUR.....	82
	DANKSAGUNG.....	91
	LEBENS LAUF	92
	ERKLÄRUNG	93

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

×g	-faches der Erdbeschleunigung
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AIF	Apoptose-induzierender-Faktor (<i>apoptosis-inducing-factor</i>)
Apaf-1	Apoptotische Protease Aktivierungsfaktor 1
A-SMase	saure Sphingomyelinase
BHA	Tert-Butylhydroxyanisol
BHT	Tert-Butylhydroxytoluen
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
bp	Basenpaare
BuOOH	Tert-Butylhydroperoxid
CARD	Caspase Rekrutierungs-Domäne
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHX	Cycloheximid
CMTMRos	Tetramethylrosamin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>death effector domain</i>)
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence light</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxybis(ethylenitrilo-)tetraessigsäure
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne (<i>Fas-associated death domain</i>)
FAN	<i>factor associated with neutral sphingomyelinase activation</i>
FITC	Fluoreszein-iso-thiozyanat
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethan-Sulfonsäure

JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskop</i>
mCICCP	Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
mAIF	muriner Apoptose-induzierender-Faktor
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin
NAD ⁺	Nicotinadenindinucleotid
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NSD	N-SMase aktivierende Domäne
N-SMase	neutrale Sphingomyelinase
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
PES	Phenazin Ethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
RNase A	Ribonuklease A
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SMAC/DIABLO	<i>second mitochondrial apoptosis-activating protein/direct IAP-binding protein with low pI</i>
tBid	<i>truncated BH3 interacting domain death agonist</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TNF	humaner Tumor Nekrose Faktor-α
TMRE	Tetra-Methyl-Rhodamin-Esther
TR55 = TNF-R1	55 kDa TNF-Rezeptor 1
TR75 = TNF-R2	75 kDa TNF-Rezeptor 2
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne (<i>TNF-R1-associated death domain protein</i>)
TRAIL	<i>TNF-related-apoptosis-inducing-ligand</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

v/v

Volumen pro Volumen

w/v

Gewicht pro Volumen

zVAD

Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-
Fluoromethylketon

EINLEITUNG

Die Entstehung eines mehrzelligen Organismus ist auf miteinander abgestimmte Mitose, Differenzierung und Zelltod unweigerlich angewiesen. Jede Sekunde sterben mehrere Millionen überzählige, gealterte oder beschädigte Zellen des menschlichen Körpers durch programmierten Zelltod (Apoptose) ab (Kroemer *et al.*, 1998) und ebenso viele Zellen teilen und differenzieren sich. Während der Lebenszeit eines Organismus werden nach Berechnungen 99,9 % aller Zellen erneuert (Jacobsen *et al.*, 1997; Vaux *et al.*, 1999).

Dieser differenzierte Vorgang an Zelltod und Zellwachstum ist wichtig für die Homöostase des Organismus, seiner Zellverbände und auch einzelner Zellen. Erst dieses Zusammenspiel führt zu einem in Zellverbänden geordneten Organismus, der in der Lage ist spezifische Aufgaben zu lösen.

In der Ontogenese wird die Gastrulation des frühen Embryos erst durch den programmierten Tod der Zellen im Inneren der Blastula ermöglicht (Joza *et al.*, 2001). Voneinander getrennte Finger können erst entstehen, nachdem die dazwischen liegenden Häute (Interdigitalfalten) während der Embryonalphase durch programmierten Zelltod entfernt wurden. Auch das fortwährende Absterben von Hautzellen und deren Neubildung wird durch diesen fein abgestimmten Mechanismus gesteuert. Während der Entwicklungsphase des Gehirns sterben etwa 80 % der Ganglionzellen in der Katzenretina nach der Geburt ab, da sie durch fehlende Vernetzung unter einer Unterversorgung von neurotrophen Faktoren leiden (Meier *et al.*, 2000). Der programmierte Zelltod ist ebenfalls wichtig bei dem Hormon-gesteuerten Um- und Abbau des Gewebes nach Ende der Menstruation (Gosden *et al.*, 1997).

Grundsätzlich kann man sagen, dass selektiver Zelltod dort von Wichtigkeit ist, wo funktionsuntüchtige oder überflüssig gewordene Zellen entfernt werden müssen.

Gerät dieser im Normalfall ausgesteuerte Mechanismus zum Teil oder ganz außer Kontrolle, kommt es also zu Fehlern im Ablauf des programmierten Zelltods können sehr schwere Krankheitsbilder auftreten. Eine Störung in der Selektion von selbstreaktiven T-Zellen durch zu geringen programmierten Zelltod kann schwere Autoimmunerkrankungen zur Folge haben. Beispiele für solche Autoimmunerkrankungen sind der Typ I Diabetes bei dem die β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln in der Bauchspeicheldrüse durch diese körpereigenen Immunzellen zerstört werden. Eine weitere Autoimmunerkrankung ist die Rheumatoide Arthritis, bei der das körpereigene Immunsystem die Synovialmembran (Gelenkinnenhaut) als fremd erkennt und angreift. Auch ein Fehler in der Regulation des Immunsystems nach klonaler Ex-

pansion von Lymphozyten kann zu einem verlangsamten Absterben dieser Lymphozyten führen (Krammer, 2000) und damit auch zu Autoimmunerkrankungen.

Eine Fehlregulation von Signalwegen, die zu programmiertem Zelltod führen, kann zu unkontrolliertem Wachstum und zerstörendem Eindringen der betroffenen Zellen in umliegendes Gewebe und damit zu Krebs führen (Mignatti *et al.*, 1993).

Ein Übermaß an programmiertem Zelltod wird ebenfalls mit Krankheiten in Verbindung gebracht, z.B. mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer. Sind Komponenten des Immunsystems von diesem Fehler betroffen, kann eine verstärkte Anfälligkeit für Infektionen die Folge sein, z.B. mit Herpes- oder Adenoviren (Thompson, 1995; McLaughlin *et al.*, 2001).

1 Die unterschiedlichen Formen des Zelltodes: Nekrose

Die Nekrose wird als „Unfalltod“ der Zelle bezeichnet. Charakteristischerweise ist dieser Zelltod eine Folge eines externen Einflusses, wie mechanische Verletzung, Strahlung (z.B. Sonnenbrand) oder Sauerstoffmangel. Die dadurch ausgelöste Schädigung der Plasmamembran führt zu einem Einstrom von Natrium- und Kalium-Ionen und begleitend Wasser in die Zelle, wodurch Zellorganellen und die Zelle selbst stark anschwellen. Die für eine Nekrose typische entzündliche Reaktion des Körpers wird nach Platzen der Zelle durch deren ausgetretenen Zellinhalt ausgelöst. Zellen des Immunsystems werden durch die ausgetretenen Proteine zum Ort der Nekrose gelockt und sorgen durch Zytokine für die Symptome einer Entzündung und führen auch zur Schädigung des umliegenden Gewebes.

2 Die unterschiedlichen Formen des Zelltodes: Apoptose

Im Gegensatz zum „ungewollten“ Zelltod durch Nekrose wird mit dem Begriff der Apoptose ein physiologischer Zelltod bezeichnet, der geplant/programmiert ist. Erstmals als „Apoptose“ benannt wurde dieser programmierte Zelltod 1972 (Kerr *et al.*, 1972). Dieser Zelltod kann durch exogene Signale, z.B. Todesrezeptoren, oder endogene Signale, wie z.B. nach Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, ausgelöst werden. Auf morphologischer Ebene schwellen apoptotische Zellen nicht an, sondern schrumpfen zunächst und bilden kleine Bläschen auf der Zellmembran. Dieses Verhalten wird *blebbing* genannt und gehört zu der klassischen Morphologie einer apoptotischen Zelle. Eines der frühesten Merkmale bei intakten Zellen ist die Externalisierung von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran an

die Außenseite (Martin *et al.*, 1996; Fadeel *et al.*, 1999). Ein weiteres klassisches Merkmal ist die so genannte DNA-Fragmentation, bei der durch Kondensation des Chromatins und eine spezifische Spaltung der DNA elektrophoretisch gut nachweisbare Multimere von ~180 Bp entstehen. Auch der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ ist charakteristisch für diesen Zelltod.

Die ausführenden Enzyme der Apoptose sind die Caspasen, die enzymatisch viele Zielproteine degradieren (Fischer *et al.*, 2003) und u.a. für den Zerfall des Zellkerns verantwortlich sind. Auf die Caspasen wird im späteren Verlauf ausführlicher eingegangen. Durch den Abbau der Strukturproteine zerfällt die gesamte Zelle schließlich in kleine Vesikel, die aus den vorher entstandenen Bläschen hervorgehen. Hierbei kommt es zu keiner Freisetzung von intrazellulären Enzymen aus diesen Vesikeln und damit nicht zu einer entzündlichen Reaktion des Immunsystems. Die entstandenen Vesikel können von Nachbarzellen oder darauf spezialisierten Immunzellen phagozytiert werden.

2.1 Caspase-abhängige Signaltransduktion des Zelltodes

Die Effektorenzyme der Apoptose sind die bereits erwähnten Caspasen. Caspasen sind Cystein-Aspartat-Proteasen, die Zielproteine spezifisch nach der Aminosäure Aspartat in einem Protein schneiden (Nicholson *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 1999). Der Nachweis, dass Caspasen essentiell für das Apoptose-Programm sind, konnte einfach geführt werden, indem spezifische Caspase-Inhibitoren wie CrmA oder zVAD den apoptotischen Zelltod blockieren konnten (Miura *et al.*, 1995; Bodmer *et al.*, 1997). Ein Caspase-ähnliches Protein wurde zuerst in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt und CED-3 benannt. Über Sequenzhomologievergleiche wurde 1994 die erste Caspase im Säuger genom entdeckt, die im Jahr zuvor bereits unter einem anderen Namen (*IL-1 beta-converting enzyme*) kloniert worden war (Thornberry *et al.*, 1992; Miura *et al.*, 1993). Zur Zeit sind 11 Mitglieder der Caspase-Familie im Menschen durch Sequenz- und Funktionshomologie bekannt (Lamkanfi *et al.*, 2002). Die Mitglieder dieser Familie lassen sich in so genannte Aktivator- und Effektor-Caspasen unterteilen, je nachdem welche Hauptaufgabe sie in der Signaltransduktion übernehmen. Strukturell werden sie als Pro-Caspasen exprimiert und erst nach Abspaltung der Prodomäne kann ein aktives Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten gebildet werden. Die Abspaltung der Prodomäne kann durch gegenseitige Spaltung nach Bildung eines Dimers aus zwei Pro-Caspasen erfolgen. Dadurch aktivierte Caspasen können sowohl sich selbst als auch andere Caspasen spalten und bilden so einen sich positiv verstärkenden Mechanismus.

Caspasen wurden bisher in jedem vielzelligem Tier (Metazoa), darunter in Fadenwürmern (Nematoden) und Nesseltieren (Cnidaria) gefunden (Cikala *et al.*, 1999). Evolutiv verwandte Gruppen von Cystein-Proteasen sind die Metacaspasen (in Pflanzen, Pilzen und Protozoen) und die Paracaspasen (in Metazoen und *Dictyostelium spec.*). In einzelligen Eukaryoten konnten Caspase ähnliche Proteine in einem programmierten Zelltod nachgewiesen werden. So reagiert der Protist *Leishmania* auf H₂O₂ oder Staurosporin-Behandlung mit einer Form von Zelltod, die durch die auftretende DNA-Fragmentierung und Spaltung des Proteins Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) an eine Caspase-abhängige Form der Apoptose erinnert (Das *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2002a).

2.2 **Der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)**

Zytokine spielen bei der Übertragung von apoptotischen Signalen an Zielzellen eine große Rolle. Eines dieser Zytokine ist der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), der zuerst entdeckt wurde als Tumor schädigender Faktor (Carswell *et al.*, 1975). Physiologisch kann TNF verschiedenste Funktionen im Organismus erfüllen, wie Immunregulation und genregulatorische Funktionen, und erfüllt zudem eine wichtige Funktion bei der Abwehr von bakteriellen und parasitären Infektionen. TNF existiert in zwei Formen: als sezerniertes lösliches Molekül und als membranständiges, zellassoziertes Molekül.

Strukturell betrachtet besteht das zellassozierte TNF aus drei identischen Polypeptidketten von jeweils 157 Aminosäuren Länge, die jeweils eine Disulfidbrücke enthalten. Jede dieser Ketten hat ein Molekulargewicht von 26 kDa. Das lösliche monomere 17 kDa schwere TNF entsteht durch Abspaltung eines Signalpeptides aus dem zellassozierten TNF. TNF vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an zwei verschiedene Rezeptormoleküle, TNF-R1 mit einem Molekulargewicht von 55-60 kDa und TNF-R2 mit einem Molekulargewicht von 70-80 kDa (Brockhaus *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990). Die meisten physiologischen Reaktionen werden allerdings durch TNF-R1 vermittelt. TNF kann von vielen Zelltypen gebildet werden. Durch Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) aktivierte Makrophagen und Monozyten (Higuchi *et al.*, 1990) sowie Mastzellen gehören zu den wichtigsten Produzenten, aber auch T-Zellen und NK-Zellen können TNF sezernieren.

Die physiologische Wirkung von TNF ist abhängig von Zelltyp und Zellstatus sehr vielseitig (Vassalli, 1992). TNF ist u.a. ein starker Aktivator von neutrophilen Granulozyten und an der Modulation der Immunantwort auf inflammatorische Stimuli beteiligt. Fehlregulationen von TNF führen deshalb auch zu schweren Erkrankungen. So ist TNF an dem Krankheitsbild der

Sepsis als Reaktion auf eine systemische Infektion mit gramnegativen Bakterien maßgeblich beteiligt (neben anderen Zytokinen). Auch bei der Entstehung von einigen Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und rheumatische Arthritis (Firestein *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 1998) scheint TNF eine Rolle zu spielen.

2.3 Typ I und Typ II der TNF-vermittelten Signaltransduktion der Apoptose

Die durch Stimuli wie TNF vermittelte Apoptose kann prinzipiell über zwei verschiedene Signalwege in die Zelle geleitet werden, wobei beide Wege sich gegenseitig verstärken und ergänzen können (Los *et al.*, 1999) (siehe Abbildung 1).

Für beide Signalwege bildet der nach Bindung von TNF trimerisierte Rezeptor TNF-R1 den zentralen Angelpunkt. An die Todesdomäne (*death domain*, DD) im cytoplasmatischen Bereich des Rezeptors kann sich das Adapterprotein TRADD (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne) binden. TRADD besteht aus einer *death domain*, mit dem es am Rezeptor gebunden ist und einen weiteren Faktor FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) binden kann. FADD wiederum besteht aus 2 unterschiedlichen Domänen: Eine *death domain* und eine *death effektor domain* (DED), an die sich im Folgenden die Pro-Caspase-8 mit ihrer DED anlagert. Pro-Caspase-8 aktiviert sich nach Zusammenlagerung mit einer weiteren Pro-Caspase-8 selbst und bildet ein aktives Heterotetramer (Muzio *et al.*, 1998).

Im Verlauf des Typ I Signalweges werden durch eine nach Caspase-8 abfolgende Caspase-Kaskade weitere Caspasen aktiviert, vor allem die Caspase-3 (Stennicke *et al.*, 1999), die als die wichtigste der Effektor-Caspasen bezeichnet werden kann. Über eine positive Rückkopplung können über Caspase-6 weitere Einheiten von Caspase-8 aktiviert werden. Fortschreitende Aktivierung der Effektor-Caspasen führten zum Stopp der Protein Translation durch Zerstörung von wichtigen Transkriptionsfaktoren und zur Spaltung von weiteren wichtigen Proteinen in der Zelle, u.a. Strukturproteine und Proteine für die Zellhomöostase.

Weitere Mediatoren, wie z.B. Ceramid, können in dem TNF-induzierten programmierten Zelltod eine Rolle spielen. Ceramid wird durch Sphingomyelinasen (SMasen) oder durch *de novo* Synthese gebildet und ist als Botenstoff am Signalweg beteiligt (Hannun, 1996). TNF führt zur Aktivierung von SMasen, was zur Spaltung von Sphingomyelin in Phosphorylcholin und Ceramid führt. Der Signalweg zur Aktivierung der SMasen ist noch unbekannt, doch

wird der Aktivierung eine wichtige Funktion im TNF-induzierten Zelltod zugeschrieben (Wiegmann *et al.*, 1994; Hannun, 1996).

Wichtige Substrate für Caspasen sind z.B. PARP, ein durch DNA Strangbrüche aktiviertes DNA Reparaturenzym, und Lamine, die im Kern für die Aufrechterhaltung der Struktur nötig sind. Durch die Spaltung von PARP in ein 86 kDa und ein 25 kDa großes Fragment wird PARP inaktiviert und eine Reparatur der DNA unterbunden. Dadurch wird die DNA-Fragmentation ermöglicht. Insgesamt führt die Aktivierung der Effektor-Caspasen durch Spaltung unterschiedlichster Caspasesubstrate zum nukleären und zellulären Zusammenbruch der Zelle (Wolf *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2003) und zu den schon erwähnten morphologischen Erscheinungen.

Der Typ II des Signalweges unterscheidet sich vom Typ I vor allem durch die Beteiligung von Mitochondrien. Dieser Typ wird hauptsächlich durch direkte Einwirkung auf die Mitochondrien aktiviert (z.B. durch Chemotherapeutika oder Radioimmuntherapie (Friesen *et al.*, 2003)), aber auch die Aktivierung über den TNF-R1 ist möglich. Durch TNF-R1 aktivierte Caspase-8 führt zur Spaltung des Proteins Bid in tBid, was nach Anlagerung an die Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom c führt (Luo *et al.*, 1998). Die Freisetzung von Cytochrom c führt zusammen mit der apoptotischen Protease Aktivierungsfaktor 1 (Apaf-1) und dATP zur Bildung des so genannten Apoptosoms. An die Caspase Rekrutierungs-Domäne (CARD) von Apaf-1 kann sich die Pro-Caspase-9 binden, eine Initiator-Caspase. Über autokatalytische Spaltung wird Caspase-9 aktiviert und aktiviert ihrerseits Caspase-3 und Caspase-7. Auch hier führt die Möglichkeit, dass Caspase-7 weitere Einheiten von Caspase-9 aktivieren kann, zu einer sich selbst verstärkenden positiven Rückkopplung. Nach Aktivierung der Effektor-Caspasen treten die weiter oben erwähnten Effekte in der Zelle ein.

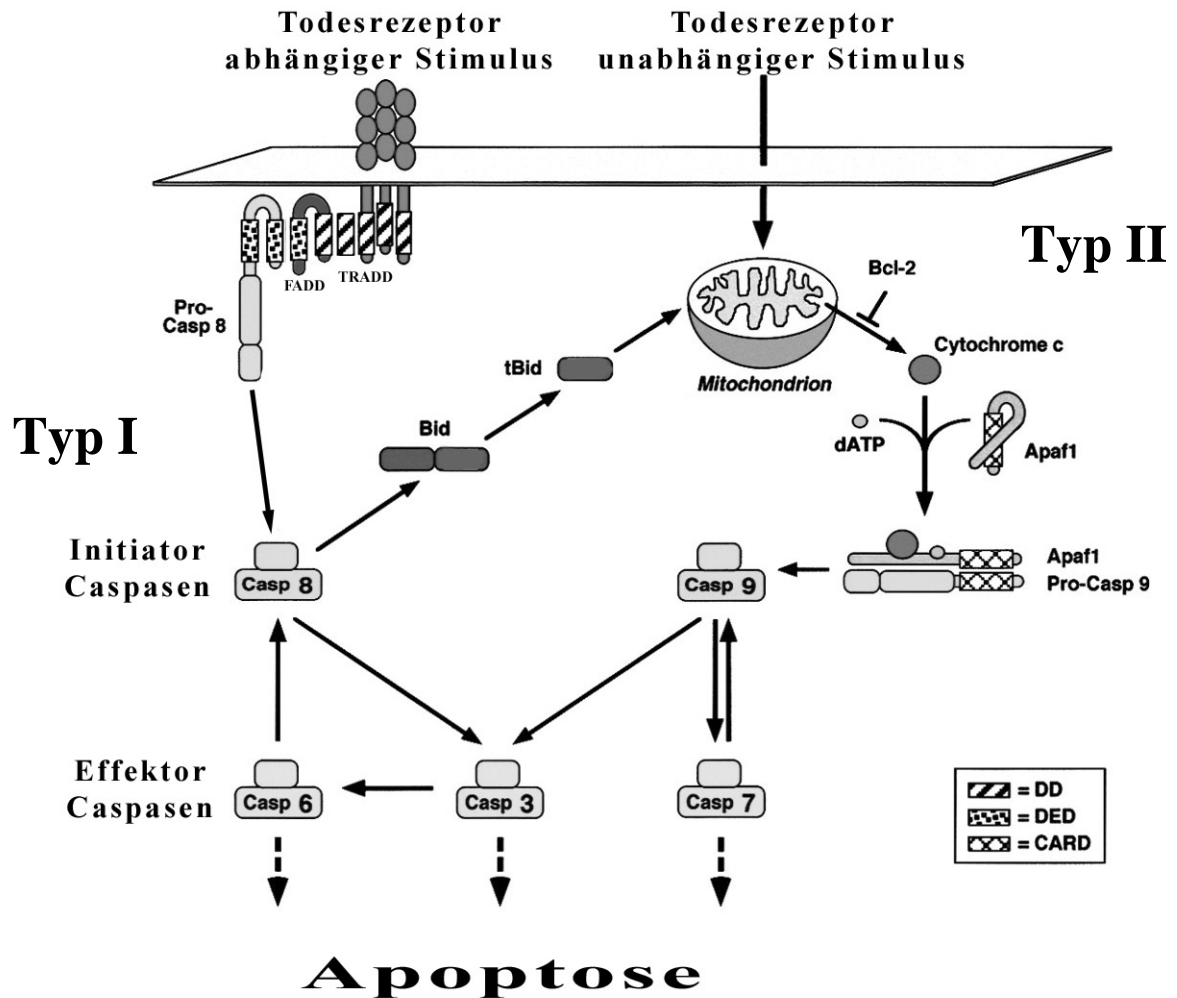


Abbildung 1: **Caspase-abhängige Apoptose des Typ I und Typ II Weges.** Nach Trimerisierung des TNF-R1 durch Bindung von TNF erfolgt die Bindung von TRADD und FADD und nachfolgend die Aktivierung von Caspase-8. Diese Initiator Caspase aktiviert u.a. die Effektor-Caspase-3 und kann über Caspase-6 in einer positiven Verstärkung vermehrt aktiviert werden. Im Verlauf der Typ II Antwort kann eine Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen wie Cytochrom c über die Wirkung von tBid (aktiviert durch Caspase-8 abhängige Spaltung von Bid) oder über Todesrezeptor unabhängige Stimuli erfolgen. Nach Freisetzung von Cytochrom c kommt es zur Bildung des Apoptosoms und zur Aktivierung von Caspase-9, Caspase-7 und Caspase-3 (nach Los *et al.*, 1999).

3 Die unterschiedlichen Formen des Zelltodes: Caspase-unabhängiger programmierter Zelltod

In den letzten Jahren wurde zunehmend beschrieben, dass die strikte Einteilung des Zelltodes in Nekrose und Apoptose überdacht werden muss, da Zellen beobachtet wurden die Merkmale der Apoptose zeigen, wie z.B. DNA-Fragmentation, ohne dass Caspase-Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Es müssen also Caspase-unabhängige Signalwege zum programmierten Zelltod existieren. Wie die verschiedene Zelltode wie Apoptose, Nekrose und Apoptose-ähnliche-Arten auf morphologischer Basis unterschieden werden können, ist umstritten. Eine

Möglichkeit ist z.B. die Unterscheidung nach der Art der Morphologie des Nukleus und des evtl. kondensierten Chromatins (Leist *et al.*, 2001; Jäätelä *et al.*, 2003).

Die Caspase-unabhängigen Signalwege scheinen eine evolutiv alte Form des programmierten Zelltodes zu sein (Lorenzo *et al.*, 1999; Cande *et al.*, 2002a), die vor allem für Zellsysteme im frühen Embryonalstadien oder bei Versagen der Caspase-abhängigen Signalwege wichtig werden. So scheint z.B. der programmierte Zelltod von aktivierten T-Zellen auch auf Caspase-unabhängige Wege angewiesen zu sein, während Caspasen in aktivierten T-Zellen eher einen Einfluss auf die Proliferation zu haben scheinen (Kennedy *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2002). Ebenso wurde für humane Jurkat Zellen beschrieben, dass *membrane blebbing* ohne Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung und Caspase-Aktivierung möglich ist (Toyoshima *et al.*, 1997).

An Caspase-unabhängigen Signalwegen beteiligte Faktoren sind die Lysosomen über die Freisetzung von Cathepsinen (Foghsgaard *et al.*, 2001) oder das Endoplasmatische Reticulum, das auf die Freisetzung von Calcium mit der Aktivierung von Calpain reagiert (Wang, 2000), einer Cystein Protease, welche wiederum einen Apoptose-ähnlichen Zelltod ohne Caspasen auslösen kann. Aber auch die Mitochondrien sind in diesen Signalwegen über die Freisetzung von Faktoren wie AIF (*apoptosis-inducing-factor*) (Susin *et al.*, 1999; Ferri *et al.*, 2001), Endonuclease G (Li *et al.*, 2001), der Serin Protease Omi/htra2 (Suzuki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003) oder Reaktiven Sauerstoffintermediaten (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992; Vercammen *et al.*, 1998a) beteiligt. Wie bei Fiers *et al.* (Fiers *et al.*, 1999) angedeutet, sind Apoptose und Nekrose möglicherweise nur die extremsten Beispiele unterschiedlicher Wege zum Zelltod.

3.1 Die Rolle von Mitochondrien im Caspase-unabhängigen Zelltod

Ein Mitochondrium ist ein von einer Doppelmembran umschlossenes Organell, das auch als "Kraftwerk" der eukaryontischen Zelle bezeichnet wird und verteilt im Cytosol vorliegt. Die Hauptfunktion des Mitochondriums ist es, im Rahmen der Zellatmung unter Sauerstoff-Verbrauch ATP herzustellen.

Nach der Endosymbiontenhypothese geht man davon aus, dass sowohl die Mitochondrien als auch die Chloroplasten der Pflanzen aus einer Symbiose von Prokaryonten mit Vorformen von Eukaryonten hervorgegangen sind. Hinweise darauf sind der Besitz eigener DNA, eine eigene Proteinsynthesemaschinerie und das Vorhandensein einer inneren Membran, die sich deutlich vom Bau der äußeren Membran unterscheidet.

Die äußere Membran begrenzt das gesamte Mitochondrium und enthält Poren aus Proteinkomplexen, die den Austausch von Molekülen und Ionen zwischen dem Mitochondrium und dem Cytosol regeln und ermöglichen. Große Moleküle können die Membran nur durch Transporterkomplexe durchqueren.

Die Struktur, an der die Zellatmung stattfindet, ist die innere Membran, die durch unterschiedlich geformte Einstülpungen erheblich vergrößert wird. Diese Membran enthält die Proteinkomplexe I-IV, welche die Atmungskette bilden (Poyton *et al.*, 1996). Durch einen Protonengradienten an dieser Membran entsteht ATP aus ADP und Phosphat im sogenannten Komplex V. Im durch diese Membran eingeschlossenen Raum, der Matrix, sind z.B. die mitochondriale DNA, die Enzyme der Mitochondrien-eigenen Proteintranslation und des Citratzyklus lokalisiert.

Im Intermembranraum zwischen äußerer und innerer Membran sind u.a. Teile der Atmungskette wie Cytochrom c lokalisiert, aber auch der Apoptose-induzierende-Faktor AIF.

In der Induktion der Apoptose spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle durch Freisetzung von pro-apoptotischen Enzymen wie Cytochrom c und SMAC/DIABLO (Apoptose-induzierung durch Bindung an Inhibitoren von Caspasen, IAPs). Auch Proteine des Caspase-unabhängigen Zelltodes, z.B. AIF oder Endocuclease G, können unter geeigneten Stimuli freigesetzt werden, ebenso wie reaktive Sauerstoffintermediate bei Fehlern in der Atmungskette produziert werden (Staniek *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002) und nach Bildung von Wasserstoffperoxid zu Schäden in der gesamten Zelle führen können.

3.2 *Der Apoptose-induzierende-Faktor (apoptosis-inducing-factor AIF)*

AIF wurde als mitochondriales 57 kDa Protein beschrieben, das durch Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ und/oder nach Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Susin *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1999). Die Kristallstruktur von murinem (Mate *et al.*, 2002) und humanem (Ye *et al.*, 2002) AIF ist bekannt. Strukturell wird AIF zunächst als 67 kDa großes Protein im Cytosol translatiert und erst nach Abspaltung der mitochondrialen Lokalisationssequenzen (MLS) in den Mitochondrien entsteht das reife etwa 57 kDa große Protein. Dieses enthält eine Kernlokalisationssequenz am N-Terminus und besteht aus 2 funktionell getrennten Domänen; einer DNA bindenden Domäne, die pro-apoptotisch zu sein scheint und einer Oxidoreduktase-Domäne, die anti-apoptotisch wirken könnte (Lipton *et al.*, 2002). Ein humanes AIF Homolog

(AMID/PRG3) zeigt pro-apoptische Funktion und ist ebenfalls Mitochondrien-assoziiert (Wu *et al.*, 2002; Ohiro *et al.*, 2002).

Die AIF-Freisetzung scheint in einigen Zellsystemen und bei einigen Stimuli eine Folge der Aktivierung von PARP zu sein. So konnte gezeigt werden, dass Formen von oxidativem Stress (z.B. durch NMDA) zur Aktivierung von PARP führen (Zhang *et al.*, 1994). Diese NMDA Stimulation wiederum führte zur Translokation von AIF in den Nukleus (Yu *et al.*, 2002). Zur Freisetzung von AIF führen noch andere pro-apoptische Stimuli, wie z.B. H₂O₂, das über eine Bax/Bak abhängige Cytochrom c-Freisetzung und die dadurch hervorgerufene Caspase Aktivierung zur AIF-Freisetzung führt (Arnoult *et al.*, 2002b; Arnoult *et al.*, 2003a). Überexpression von Bcl-2 oder anderen anti-apoptischen Mitgliedern dieser Familie, wie Bcl-x₁, verhindert die Freisetzung von AIF. Freigesetztes AIF transloziert in den Nukleus, wo es über noch unbekannte Mechanismen Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentation auslöst (Loeffler *et al.*, 2000). Diese Art der Fragmentation führt im Gegensatz zur klassischen Apoptose zu etwa 50 kBp großen Fragmenten (Cande *et al.*, 2002b). Wie diese Fragmentation ausgelöst wird, ist unbekannt. Vermutet wird, dass durch Dimerisierung von AIF an der DNA eine Plattform zur weiteren Bindung von ergänzenden Faktoren geschaffen wird (Lipton *et al.*, 2002). Nach genetischen Studien scheint AIF ein wichtiger Faktor im Zelltod in der frühen Embryonalentwicklung zu sein (Joza *et al.*, 2001). Allerdings reicht die einfache Überexpression von AIF in Zellen nicht aus, um Zelltod auszulösen (Arnoult *et al.*, 2003b), da sich überexprimiertes AIF in den Mitochondrien anreichert. Erst die cytosolische Form von AIF ist pro-apoptisch (Cande *et al.*, 2002b).

3.3 Die Funktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten

Eine weitere Möglichkeit, den Zelltod über einen Caspase-unabhängigen Weg einzuleiten, besteht in der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten, z.B. nach Stimulation von TNF-R1 oder Fas Rezeptor. Unter Bedingungen, bei denen Caspasen inhibiert sind (z.B. nach Zugabe von Inhibitoren wie zVAD), kommt es zu einem nekrotischen programmierten Zelltod (nach der Unterscheidung durch Chromatin Kondensation (Jäättelä *et al.*, 2003)) durch erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (Vercammen *et al.*, 1998b; Goossens *et al.*, 1999). Die Bildung der reaktiven Sauerstoffintermediate erfolgt in der Atmungskette in den Mitochondrien zu großen Teilen am Ubiquinon Redox-Kreislauf im Komplex III (Cadenas *et al.*, 1977). Aber auch Komplex I und II sind abhängig von Zelltyp (Cino *et al.*, 1989) an der Entstehung von reaktiven Sauerstoffintermediaten beteiligt. Grundsätzlich er-

folgt die Entstehung von reaktiven Sauerstoffintermediaten durch unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff während der oxidativen Phosphorylierung. Ein kleiner Teil der übertragenen Elektronen ist an der Entstehung von Superoxid $O_2^{\cdot-}$ beteiligt. Superoxid wird durch die Mangan abhängige Superoxid Dismutase (MnSOD) in H_2O_2 umgewandelt, was in dieser Form die Mitochondrien verlässt und weitere Zellschäden verursachen kann. Inhibition dieses Zelltodes kann durch Zugabe von Radikalfängern wie Tert-Butylhydroxyanisol (BHA) nach TNF Stimulation (Goossens *et al.*, 1999) oder Fas Stimulation (Vercaemmen *et al.*, 1998a) erfolgen.

4 Fragestellung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Ceramid eine wichtige Funktion im Caspase-unabhängigen TNF vermittelten Zelltod von L929 Zellen einnimmt, da ein erhöhter Abbau von Ceramid L929 Zellen vor TNF-induzierter Zytotoxizität schützen kann (Strelow *et al.*, 2000). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Ceramid Einfluss auf Mitochondrien hat, z.B. durch Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ (Pardo *et al.*, 2001) oder durch Inhibition der Elektronentransportkette an Komplex III (Gudz *et al.*, 1997) und dadurch hervorgerufener Induktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997).

Mitochondrien können also einen Caspase-unabhängigen Zelltod induzieren. Daher sollte in dieser Arbeit die Freisetzung von Cytochrom c und AIF sowie die Induktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten im Ceramid-induzierten Zelltod untersucht werden.

Da beschrieben wurde, dass Überexpression eines FE65like Proteins Zellen vor einem TNF-induzierten Zelltod schützen kann, sollte dieser Schutz in einem Ceramid-abhängigen Caspase-unabhängigen Kontext untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN

1 Geräte und Materialien

Berthold Detection Systems, Pforzheim	Luminometer FB 12
BD Biosciences, Heidelberg	FACSCalibur Analyser, 10 cm Ø Zellkultur-schalen (Falcon)
Biometra, Göttingen	Thermocycler Trio Thermoblock, Standard Power Pack P25, HORIZON 58, HORIZON 11•14 Agarosegel-elektrophoresekammern
Bio Rad, München	Gene Pulser, Elektroporationsküvetten, Mini-PROTEAN II Gelelektrophoresekammern, Nitrozellulosemembran 0,45 µM
Dynex, Denkendorf	Mikrotiterplattenlesegerät
Eastman Kodak., Stuttgart	Biomax und X-OMAT-AR Röntgenfilme
Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifuge (5415R), Kühlzentrifuge (4517R), Thermomixer 5436
Forma Scientific, Marietta, USA	Zellkulturbrutschrank
Invitrogen, Karlsruhe	Heraeus, Osterode LaminAir HB 2448K, Megafuge 1.0, Minifuge RF
Millipore, Billerica, USA	Centricon Zentrifugen-Filtereinheiten
Nunc, Wiesbaden	Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten mit sechs, zwölf und sechsundneunzig Kavitäten
Schleicher & Schüll, Dassel	Gel Blotting Papier GB002
Tecan Deutschland, Crailsheim	Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer
Zeiss, Oberkochen	Axioskop Fluoreszenzmikroskop

2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Grundchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in analytischer Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Life Science, Braunschweig	ECL-Detektions-Kit, Protein-Molekulargewichtsstandard, Big-Dye Terminator Kit 2.0
Bachem, Heidelberg	zVAD
BD Biosciences, Heidelberg	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt
Biochrom, Berlin	Glutamin, Click's/RPMI 1640-Zellkulturmedium, fötales Kälberserum, Trypsin/EDTA, PBS
Biomol, Hamburg	Deoxynucleotide Set
Boehringer, Mannheim	DAPI, PMSF
Bio Rad, München	TEMED
Fluka, Buchs	tert-Butylhydroperoxid
Invitrogen, Karlsruhe	Restriktionsenzyme, Agarose, 100 bp DNA-Längenstandard, Geneticin, Lipofectamin-Reagenz, DNA-Polymerase, T4 DNA Ligase, Restriktionsenzyme, Protein-Massenstandard
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	Restriktionsenzyme
Molecular Probes, Eugene, USA	Dihydrorhodamin 123 (DHR 123), Slowfade Light Antifade Kit
New England Biolabs, Frankfurt	Restriktionsenzyme
PEQLAB Biotechnologie, Erlangen	peqGOLD Universal Agarose
Pierce Biotechnology, München	BCA Proteinbestimmungs-Reagenz und BSA, Coomassie Proteinbestimmungs-Reagenz

Qiagen, Hilden	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, DyeEx 2.0 Spin Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN Plasmid Kits
Serva Electrophoresis, Heidelberg	Acrylamid/Bis-Lösung (37.5:1, 40 %)
Stratagene, La Jolla, USA	Pfx-Polymerase
TIB MolBiol, Berlin	Sequenzierprimer, Oligonukleotide für PCR

3 Biologische Reagenzien

Rekombinantes, humanes TNF (TNF, spezifische Aktivität 5×10^7 Einheiten/mg) wurde von Dr. G. Adolf (Bender Med Systems, Wien) zur Verfügung gestellt. Der monoklonale Antikörper gegen humanes PARP wurde bei BD Biosciences (USA), die monoklonalen Antikörper gegen AIF bei Santa Cruz (Heidelberg) und die Antikörper gegen natives und denaturiertes Cytochrom c bei Pharmingen (San Diego, USA) gekauft. Die POD-gekoppelten sekundären Antikörper (Ziege gegen Maus, Maus gegen Ziege, Ziege gegen Kaninchen, Ziege gegen Ratte) wurden von Dianova (Hamburg) gekauft.

4 Vektoren und Plasmide

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Standardprotokollen (Ausubel, 1988; Sambrook *et al.*, 2001) durchgeführt.

4.1 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte nach folgendem Protokoll: Kompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und die Ligationsansätze wurden wie nachfolgend angegeben zu den Zellen gegeben und durch Anschnippen des Eppendorf Gefäßes vorsichtig gemischt. Dieses Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec im Wasserbad unterzogen. Danach wurde zu den Zellen etwa 250 μl 37°C warmes LB0-Flüssigmedium (1 % w/v NaCl, 1 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, pH 7.0) gegeben und für 1 h auf einem Schüttler mit 200 Upm in horizontaler Lage geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend auf LB0-Agarplatten (1 % w/v NaCl, 1 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 1,5 % w/v Agar, pH 7.0) ausplattiert.

4.2 *Erstellung von FE65like in pcDNA3.1myc/his zur Transfektion*

Die vollständige kodierende Region des Proteins FE65like wurde wie folgt in den Vektor pcDNA3.1myc/his kloniert: Zur Amplifikation von FE65like-DNA aus cDNA aus L929 und NIH3T3 Zelllinien (freundlicherweise bereitgestellt von Frau Sabine Mathieu) wurden die Primer FE65_forward_myc (5'-CCg CCg AAT TCA Tgg ACg ACA CCC ACA Agg -3') und FE65_reverse_myc (5'-TTT AAg CTT ggg AgT CTC TgT gAC Cgg CCg -3') verwendet. Dazu wurde folgender 50 µl PCR-Ansatz verwendet: 80 ng DNA (Template), 5 µl 10 × Pfx-Puffer, 2 mM MgSO₄, 10 µl dNTPs (jeweils 2,5 mM), 0,1 µM Primer, 0,5 U Pfx-Polymerase, 29,5 µl H₂O_{Millipore}. PCR Verlauf mit 35 Zyklen: 3 min Vorinkubation bei 94°C, 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 45°C, 1 min bei 68°C, danach Abkühlung auf 4°C. Die PCR wurde über ein 1,2 %iges Agarosegel mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min in den TOPO-Vektor (Invitrogen) mit 4 µl des gereinigten PCR-Fragmentes, 1 µl der mitgelieferten Salt-Solution und 1 µl des pCR-Blunt-II-TOPO Vektors. Durch Transformation wurden 3 µl der Ligation in 60 µl TOP10 Bakterien eingebracht. Die entstandenen Klone wurden 2 × auf neue Ampicillin (100 ng/ml) Platten überimpft, um Reinkulturen zu erhalten. Diese wurden in einer Colony-PCR auf das Vorhandensein von FE65like getestet. Die positiven Klone wurden in 5 ml LB0-Flüssigmedium (1 % w/v NaCl, 1 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, pH 7,0) über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 Upm vermehrt und das Plasmid anschließend mit einem Plasmid Kit (QIAGEN) isoliert. Die DNA der Plasmidpräparation wurde sequenziert (BigDye Terminator Kit 2.0 mit dem Kapillarsequenzierer Abi Prism 310), um nur fehlerfreie DNA weiter zu verwenden. Der nachfolgende Restriktionsverdau des FE65myc/his im TOPO-Vektor und des Vektors pcDNA3.1myc/his (Invitrogen) erfolgte in 20 µl bei 37°C für 3 h (Doppelverdau mit HindIII und EcoRI in Puffer 2 von Invitrogen). Der Restriktionsverdau wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Der geschnittene Vektor wurde zur Sicherheit einer Phosphatase-Behandlung unterzogen, um die Anzahl der Re-Ligationen noch weiter zu verringern. Mit dem bereits oben geschnittenen Vektor pcDNA3.1myc/his (Invitrogen) und der FE65like DNA wurde eine Ligation angesetzt: 100 ng FE65like DNA, 500 ng Vektor DNA, 2 µl 10 × Ligase-Puffer, 1 µl T4 Ligase. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde in 80 µl XL1-Blue Bakterien transformiert.

5 Agarosegelelektrophoresen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8 - 1,2 %ige TAE-Agarosegele verwendet. Dazu wurden 0,8 - 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (2 M Tris pH 7,4, 2 M Essigsäure, 50 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Erstarren des Geles wurden die Proben mit der entsprechenden Menge $10 \times$ Auftragspuffer für Agarosegele (50 % v/v Glycerin, 100 mM EDTA, 1 % w/v SDS, 0,1 % w/v Bromphenolblau) versetzt und in die Taschen eingefüllt. Zur Abschätzung des Laufverhaltens der Fragmente wurden jeweils 7 μ l eines Längenstandards (Invitrogen, Karlsruhe) mit aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur in $1 \times$ TAE-Puffer bei 80 - 120 V. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel für 15 min in 4 μ g/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Analyse des Laufes erfolgte auf einem UV-Schirm bei 312 nm.

6 Zelllinien und Zellkultur

Die murine Fibrosarkomzelllinie L929ATCC, die humane T-Zell-Lymphomzelllinie Jurkat, sowie die humane Cervixadenokarzinomzelllinie HeLa wurden von der American Type Culture Collection (ATCC Rockville, USA) bezogen. Die Fibrosarkomzelllinie L929sA wurde aus dem Labor von Dr. P. Vandenabeele (Vanhaesebroeck *et al.*, 1992) bezogen. Die Zelllinie L929 entstand durch mehrjährige Passagen der L929ATCC. Alle drei L929 Zelllinien unterschieden sich prinzipiell nur in ihrer Sensitivität gegenüber den eingesetzten Stimuli. Die Reihenfolge in abnehmender Sensitivität: L929sA, L929, L929ATCC. HeLa sowie die verschiedenen L929 Zelllinien wurden in einer Mixtur aus Click's/RPMI 1640 Medium (50:50, v/v) gehalten. Dem Medium wurden jeweils 10 % v/v fötales Kälberserum, 10 mM Glutamin, je 50 μ g/ml Penicillin und Streptomycin und 0,5 % v/v einer β -Mercaptoethanol-Lösung (0,07 % v/v in 0,9 % PBS w/v) zugesetzt. Die Zelllinien wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in Gewebekulturflaschen oder -schalen bei 37°C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem mit 5 % w/v CO₂-begasteten Brutschrank gehalten. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in FCS mit 10 % v/v DMSO resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

7 Herstellung stabil transfizierter Zellen durch Elektroporation

Es wurden pro Ansatz 1×10^7 L929 Zellen in 0,8 ml eiskaltem Medium resuspendiert und mit 2 μ g des Resistenzplasmides (pcDNA3.1zeo) und 20 μ g des gewünschten Expressionsplasmides (FE65like in pcDNA3.1) in Elektroporationsküvetten vermischt und die Ansätze auf Eis

für 10 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Elektroporation bei $960 \mu\text{F} + 280 \text{V}$ in einem Gene Pulser. Die Zellen wurden nachfolgend für 10 min bei 37°C inkubiert und dann in $14 \text{ cm } \varnothing$ Zellkulturschalen in Zellkulturmedium überführt. 24 h nach Transfektion erfolgte die Selektion durch die Zugabe von 1 mg/ml Zeocin in frisches Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 3-5 Wochen, wobei das Medium alle drei Tage durch frisches Medium mit Zeocin ausgetauscht wurde. Zeocin resistente Klone wurden vereinzelt und in mehreren Aliquots in flüssigem Stickstoff bei -196°C langzeitgelagert.

8 Stimulation von Zellen

Die Behandlung von Zellen mit Zytokinen, Inhibitoren oder anderen Reagenzien erfolgte bei adhärennten Zelllinien grundsätzlich in Zellkulturschalen. Hierzu wurde die benötigte Anzahl Zellen (2×10^6 für $14 \text{ cm } \varnothing$ Zellkulturschalen, 1×10^6 für $10 \text{ cm } \varnothing$ Zellkulturschalen, 2×10^5 für 6-Well-, 1×10^4 für 96-Well-Platten) ausgesät und bis zur Adhärenz über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde danach gegen frisches Medium mit den gewünschten Zusätzen wie Zytokinen und/oder Inhibitoren ausgetauscht und die Zellen für unterschiedliche Zeitspannen bei 37°C inkubiert. Für die Analysen wurden die Zellkulturschalen mit PBS gewaschen und alle noch adhärennten behandelten Zellen durch Trypsin/EDTA Behandlung gesammelt und bei 1500 Upm und 4°C für 10 min sedimentiert. Die Stimulation von Suspensionszellen erfolgte durch Zugabe der Substanzen zum Medium und Mischen.

9 Bestimmung der Zytotoxizität durch die Kristallviolett-Färbung

Die Zellen wurden in fünffachen Ansätzen in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät (1×10^4 Zellen/Kavität) und nach Adhärenz mit frischem Medium mit den entsprechenden Zusätzen weiter bei 37°C inkubiert. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen einmal mit je $200 \mu\text{l}$ PBS gewaschen und für 15 min mit $50 \mu\text{l}$ einer Kristallviolett-Färbelösung (Kristallviolett $0,5 \%$ w/v, Formaldehyd 4% w/v, Ethanol 30% v/v, NaCl $0,17 \%$ w/v) bei 37°C gefärbt und fixiert. Die Färbelösung wurde mit Leitungswasser abgewaschen und die Platten bei 50°C getrocknet. Der an die Zellen gebundene Farbstoff wurde mit je $200 \mu\text{l}$ 33% Essigsäure (v/v) pro Kavität in Lösung gebracht und die Absorption bei 570 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

10 Bestimmung der Zytotoxizität durch MTT Assay

Für Suspensionszellen wie die humanen Jurkat Zellen musste der MTT Assay zur Messung der Zytotoxizität benutzt werden. Die Zellen wurden in fünffachen Ansätzen in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät (1×10^5 Zellen/Kavität) und sofort stimuliert. Nach der Behandlungszeit wurden 25 μ l MTT-Lösung (2,5 mg MTT/ml in PBS) pro Kavität zugegeben und 2 - 8 h bis zur Bildung von violett-blauen Kristallen bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 125 μ l Isopropanol/HCl 48:2 zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Ab- Pipettieren die entstandenen Kristalle in Lösung gebracht und die Absorption bei 570 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

11 Präparation von Nukleusextrakten

2×10^6 Zellen wurden in 14 cm \varnothing Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht bis zur Adhärenz bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Nach einem Waschgang mit eiskaltem PBS erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 2500 Upm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 μ l Puffer A (10 mM HEPES pH 7.8, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, Protease Inhibitoren (Boehringer Complete 40 μ l/ml)) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 25 μ l einer 10 % v/v NP-40 Lösung zugegeben und bei 4°C 2 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 8400 Upm wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 50 μ l Puffer C (20 mM HEPES pH7.8, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 M DTT, 1 mM PMSF, Protease Inhibitoren (Boehringer Complete 40 μ l/ml)) resuspendiert und 30 min bei 4°C geschüttelt. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 4°C für 5 min bei 14.000 Upm wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren.

12 Präparation von Mitochondrien- und Cytosol-Extrakten

1×10^6 Zellen wurden in 10 cm \varnothing Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht bis zur Adhärenz bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und 10 min bei 4°C und 1000 Upm zentrifugiert. Nach Resuspension in 5 ml kaltem PBS erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 750 \times g. Das Zellpellet wurde in Puffer A (20 mM HEPES pH7.5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, Protease Inhibitoren (Boehringer Complete 40 μ l/ml)) resuspendiert. Die Homogenisierung erfolgte

durch 15 Passagen durch eine 27-gauge Nadel. Die Homogenisate wurden für 5 min bei 4°C und 1000 ×g zentrifugiert. Das Zellpellet bildete die Mitochondrien-Fraktion, der Überstand die Cytosol-Fraktion. Das Mitochondrien-Zellpellet wurde in 40 µl Lysispuffer (20 mM TRIS pH7.5, 100 mM NaCl, 1 % v/v Triton X-100, 1 mM PMSF, Protease Inhibitoren (Boehringer Complete 40 µl/ml)) resuspendiert. Die cytosolische Fraktion wurde durch einen Centricon YM-10 Filter (Millipore) für 35 min bei 14.000 ×g zentrifugiert. Beide Fraktionen wurden bei -80°C eingefroren.

13 Präparation von Zellextrakten für Gesamtzellysate und ATP Depletionsanalysen

1×10^6 Zellen wurden in 10 cm Ø Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht bis zur Adhärenz bei 37°C inkubiert. Nach der gewünschten Behandlung einmalig mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend pro 10 cm Ø Zellkulturschale mit 400 µl ATP-Assay-Puffer (0,5 % v/v Triton X-100, 10 mM Tris pH7.5, 1 mM EDTA) zur Lyse für 10 min auf Eis inkubiert. Dadurch gewonnene Zellextrakte wurden in ein Eppendorf Gefäß überführt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 14.000 Upm bei 4°C kam der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß. Der Proteingehalt des Überstandes wurde durch BCA-Proteinbestimmung gemessen.

Für ATP Depletionsanalysen wurden 10 µg Proben mit einer 1:25 Verdünnung des ATP-Assay-Mix (Sigma) in Assay-Diluent (Sigma) vermischt und die Lichtentwicklung im Lumimeter (Berthold Detection Systems, Pforzheim) bei 370 - 630 nm gemessen.

14 Präparation von Zellextrakten für intrazelluläre NAD⁺ Messungen

Die Zellen wurden nach der Behandlung $1 \times$ mit eiskaltem PBS gewaschen und mit ATP-Assay-Puffer (0,5 % v/v Triton X-100, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) lysiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und eine BCA-Proteinbestimmung durchgeführt. Der Assay wurde in einer 96-well Platte mit 5fach Werten mit jeweils 20 µg Protein durchgeführt. Pro Kavität wurden 100 µl NAD-Assay-Puffer (8 % v/v Ethanol, 1 % w/v PVP, 0,5 mM EGTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.8, 1 mM PES, 0,44 mM MTT, 2 U ADH) zu 20 µg Protein pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot Analyse

Zur Darstellung von endogen und rekombinant exprimierten Proteinen in Zelllinien wurden Proteinextrakte zunächst mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) gelelektrophoretisch getrennt. Zuerst wurden der Proteingehalt jeder Probe bestimmt und die Proben in Volumen und Proteingehalt einander angeglichen. Danach wurden die Proteinproben mit $5 \times$ SDS-Probenpuffer (125 mM Tris pH 6.8, 20 % v/v Glycerin, 4 % w/v SDS, 10 % v/v β -Mercaptoethanol, 0,2 % w/v Bromphenolblau) in einem Endvolumen von 25 μ l versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 3 min bei mindestens 93°C erhitzt. Nach dem Auftrag auf ein Protein-Polyacrylamidgel (Trenngel mit 7,5 % oder 12 % Acrylamid) wurden die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden aus den Gelen im Nass-Transfer Verfahren (Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol) auf Nitrozellulosemembranen (0,2 μ m Porengröße) bei einer konstanten Spannung von 100 V in 1 h unter Kühlung transferiert. Die Transfereffizienz konnte durch eine reversible Färbung der Membran mit Ponceau-S (0,5 % w/v Ponceau-S in 1 % v/v Essigsäure) überprüft werden. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (4 % w/v Magermilchpulver in PBS + 0,1 % v/v Tween 20) unter dauerhaftem Schwenken inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal für je 10 min in PBS/Tween gewaschen und anschließend für 1-2 h (je nach Antikörper) in Antikörper Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal für 10 min mit PBS + 0,1 % v/v Tween 20 gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden nachfolgend dreimal für 10 min mit PBS + 0,1 % v/v Tween 20 gewaschen und mit Hilfe eines Chemilumineszenz Reagenz nach Anleitung des Herstellers entwickelt.

16 Nachweis der Cytochrom c- und AIF-Freisetzung aus Mitochondrien mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)

Deckgläser (rund, 14 mm \varnothing) wurden zunächst für L929 Zellen für 1 h mit Poly-L-Lysin (50 mg/ml) beschichtet, und für HeLa Zellen mit HCl (37 % v/v) vorbehandelt. Auf diesen Deckgläsern wurden in 12-well Platten 4×10^4 Zellen pro Kavität ausgesät und für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Adhärenz wurden als Positivkontrolle HeLa Zellen mit

$5 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ in einem UV-Bestrahlungsgerät bestrahlt und für 15 h kultiviert. L929 Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit 100 ng/ml TNF oder 1 mM MNNG stimuliert und für weitere 16 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen auf den Deckgläsern vorsichtig mit PBS gewaschen und 10 min bei -20°C in 1 ml eiskaltem Methanol fixiert und im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nachfolgend für 10 min in TBS (10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl) gewaschen und für 1 h in Blockierungspuffer (0,1 % w/v Glycin + 0,1 % w/v BSA in TBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBS wurden in einer Feuchtkammer auf Parafilm 50 μl Primärantikörper-Lösung (anti-Cytochrom c oder anti-AIF Antikörper, 1:100 in TBST) aufgetropft und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Die Antikörperbindung erfolgte bei 4°C über Nacht im Dunkeln. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 3×5 min in TBS gewaschen. In einer Feuchtkammer wurden auf Parafilm 50 μl Sekundärantikörper-Lösung (Ziege-gegen-Maus-IgM AlexaFluor 488 gekoppelt, 1:1000 in TBST) aufgetropft und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 37°C für 1 h. Danach wurden die Zellen wiederum 3×5 min in TBS und einmal 5 min in H_2O gewaschen. Auf Objektträger wurden 7 μl Trägerflüssigkeit (Slowfade, Molecular Probes) pipettiert und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Zur Analyse wurden die Zellen in einem Laser-Scanning-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emission von 525 nm digital aufgenommen.

17 Darstellung der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in Zellen durch Dihydrorhodamin 123-Färbung

Zur Messung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in Zellen wurden in Anlehnung an Sanchez-Alcazar (Sanchez-Alcazar *et al.*, 1997) 1 h vor Ende der Behandlungszeit 1 μM Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) in DMSO gelöst dem Zellkulturmedium zugegeben (Endkonzentration DMSO $< 0,1$ %). DHR 123 wird an den Mitochondrien durch reaktive Sauerstoffintermediate in der Gegenwart von Peroxidasen, Eisen oder Cytochrom c zu dem fluorogenen Farbstoff Rhodamin 123 oxidiert, der durchflußzytometrisch quantifiziert wurde. Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Umsetzung von DHR 123 wurden zu einer Zellprobe für 1 h 1 mM Tert-Butylhydroperoxid (BuOOH) zugegeben. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen für 10 min bei 1500 Upm und 4°C gesammelt und einmal mit FACS-PBS (PBS + 0,2 % FCS v/v) gewaschen. Die Zellen wurden im Anschluss in 250 μl FACS-PBS resuspendiert und die Ausbildung von Rhodamin 123 als Maß für die Bildung von reaktiven

Sauerstoffintermediaten im Durchflusszytometer bei 515 - 545 nm ermittelt (Anregung von Rhodamin 123 erfolgte bei 488 nm).

18 Statistische Auswertung

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten der biochemischen und funktionellen Analysen von Zellen geben ein repräsentatives Beispiel von mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten wieder. Die Fehlerbalken geben, wenn in den Bildunterschriften nicht anders erwähnt, die Standardabweichung von fünf Einzelbestimmungen wieder.

ERGEBNISSE

1 Untersuchungen zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien

Um zu klären, inwieweit die Freisetzung von Cytochrom c am Ceramid-vermittelten Zelltod von L929 Zellen beteiligt war, wurde zunächst das Nachweissystem etabliert. Hierzu wurden HeLa Zellen herangezogen, da in diesen Zellen Cytochrom c-Freisetzung beschrieben ist.

1.1 Cytochrom c-Freisetzung in HeLa Zellen

Zur Untersuchung der Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien in HeLa Zellen wurden aus HeLa Zellen Mitochondrien und Cytosol Fraktionen gewonnen und Cytochrom c per Western-Blot detektiert. Für HeLa Zellen war beschrieben, dass sie auf UV Stimulation mit der Freisetzung von Cytochrom c reagieren (von Ahsen *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2003). In diesem Experiment wurden HeLa Zellen mit UV-Bestrahlung, TNF und MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin) stimuliert und die Verteilung von Cytochrom c untersucht. MNNG führt über eine Alkylierung der DNA zu einer starken Aktivierung von DNA Reparaturenzymen und zur Depletion von NAD⁺ und ATP in der Zelle.

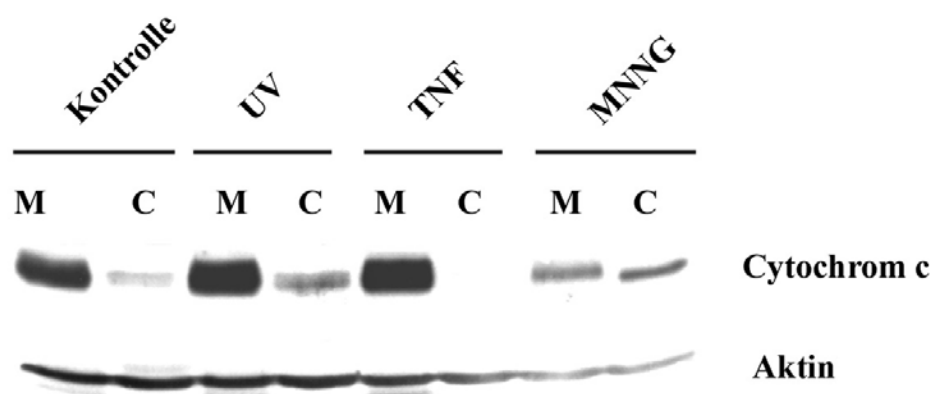


Abbildung 2: **Freisetzung von Cytochrom c aus HeLa Zellen.** HeLa Zellen wurden mit $5 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV stimuliert und 6 h inkubiert (UV) oder 20 h mit 100 ng TNF/ml (TNF) oder mit 0,5 mM MNNG für 15 min stimuliert und nach weiteren 16 h geerntet (MNNG) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). Mitochondriale (M) oder cytosolische Fraktionen (C) wurden mit anti-Cytochrom c oder anti- β -Aktin Antikörpern inkubiert und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, zeigten HeLa Zellen nach UV Stimulation eine erhöhte Cytochrom c-Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. MNNG Stimulation

fürhte ebenfalls zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien. Im Gegensatz dazu konnte nach TNF Stimulation keine Freisetzung von Cytochrom c festgestellt werden. HeLa Zellen reagierten also wie erwartet auf den bekannten Cytochrom c freisetzenden Stimulus UV-Bestrahlung. Die Wirkung von MNNG auf HeLa Zellen wurde bisher noch nicht beschrieben.

MNNG und TNF waren die beiden Stimuli, die in späteren Experimenten bei der Untersuchung zur Freisetzung von AIF aus L929 Zellen verwendet wurden und zur Vergleichbarkeit auch schon hier eingesetzt wurden.

1.2 Freisetzung von Cytochrom c in HeLa, NIH3T3 und L929 Zellen

In einem alternativen Nachweis wurde die Freisetzung von Cytochrom c in HeLa, NIH3T3 und L929 Zellen per Immunfluoreszenz mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM) untersucht (Abbildung 3). Die HeLa Zellen wurden mit UV-Bestrahlung, die L929 Zellen mit TNF und die NIH3T3 Zellen mit TNF/CHX stimuliert. Die Stimuli bei HeLa Zellen und NIH3T3 Zellen wurden beschrieben, Cytochrom c-Freisetzung auszulösen.

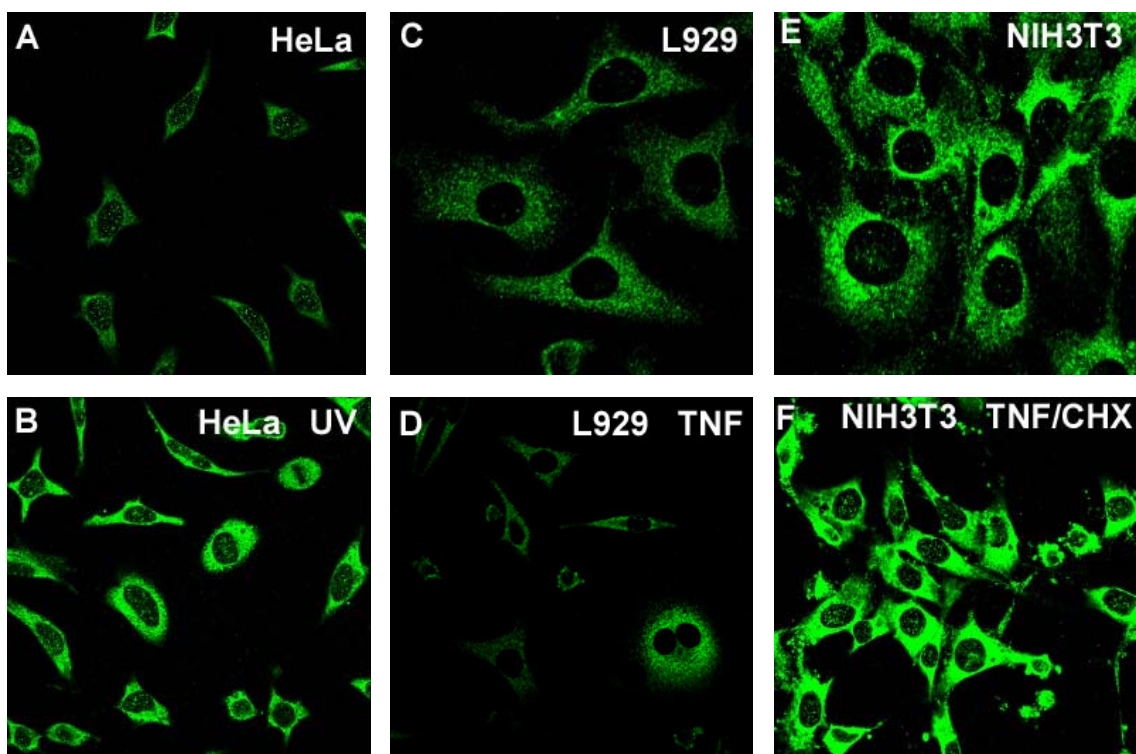


Abbildung 3: **TNF stimulierte L929 Zellen zeigen keine Cytochrom c-Freisetzung im LSM.** Unbehandelte HeLa (A), L929 (C) oder NIH3T3 (E) Zellen zeigen keine Cytochrom c-Freisetzung. Mit $5 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV stimulierte HeLa Zellen (B) oder 6 h mit 100 ng TNF/ml und 5 μg CHX/ml stimulierte NIH3T3 Zellen (F) zeigen Cytochrom c-Freisetzung. Für 20 h mit 100 ng TNF/ml stimulierte L929 Zellen (D) zeigen keine Cytochrom c-Freisetzung. Die Zellen

wurden mit einem anti-Cytochrom c spezifischen Antikörper (Pharmingen) gefärbt und durch ein LSM aufgenommen.

Bei NIH3T3 Zellen zeigte sich nach Stimulation mit TNF/CHX eine Zunahme der Fluoreszenz im Cytosol und damit eine Freisetzung von Cytochrom c. Die Freisetzung konnte ebenfalls bei HeLa Zellen nach UV-Bestrahlung gezeigt werden. Im Vergleich zu NIH3T3 Zellen und HeLa Zellen zeigten L929 Zellen nach Stimulation mit TNF keine erhöhte Fluoreszenz und damit keine Freisetzung von Cytochrom c.

NIH3T3 als Positivkontrolle zeigten also Cytochrom c-Freisetzung in der Immunfluoreszenz ebenso wie HeLa Zellen im Western-Blot (Abbildung 2) und in der Immunfluoreszenz (Abbildung 3). Daher wurde für die L929 Zellen die Cytochrom c-Freisetzung auch im Western-Blot untersucht (Abbildung 4).

Im folgenden Western-Blot wurde die L929 Laborzelllinie (Abbildung 3) weiter untersucht und als zusätzliche Kontrolle die hoch TNF sensitive Zelllinie L929sA. Beide Zelllinien wurden mit TNF und MNNG stimuliert und die Verteilung von Cytochrom c in mitochondrialen und cytosolischen Fraktionen untersucht.

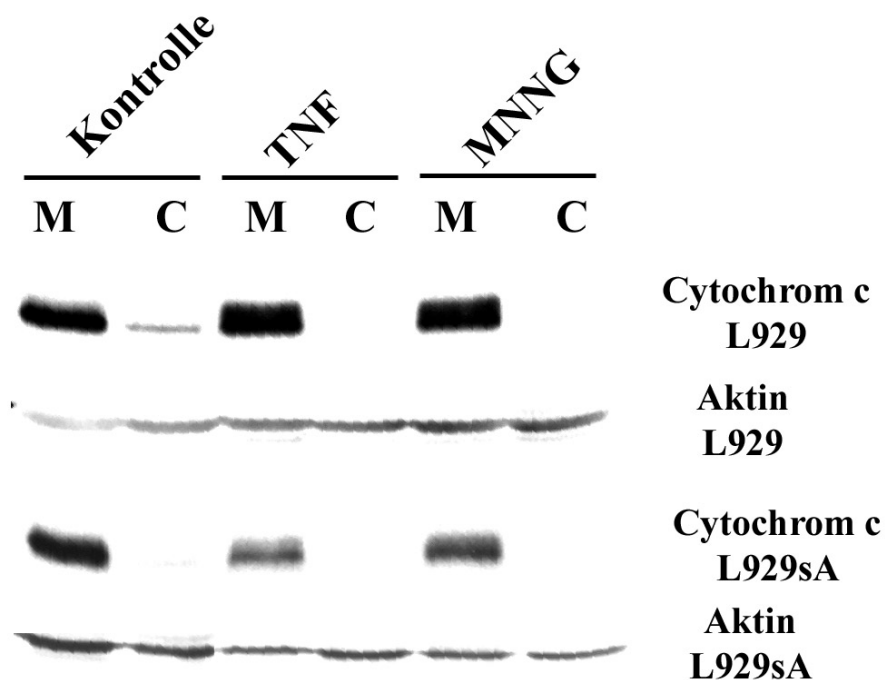


Abbildung 4: **L929 und L929sA Zellen zeigen keine Cytochrom c-Freisetzung im Western-Blot.** L929 und L929sA Zellen wurden für 16 h mit 100 ng TNF/ml stimuliert (TNF) oder für 15 min mit 0,5 mM MNNG stimuliert und 16 h inkubiert (MNNG) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). Mitochondriale (M) und cytosolische (C) Fraktionen wurden mit anti-Cytochrom c oder anti- β -Aktin Antikörper detektiert und die Banden mit ECL nachgewiesen.

In Übereinstimmung mit der Immunfluoreszenz in Abbildung 3 zeigten L929 Fibrosarkomzellen auch im Western-Blot (Abbildung 4) keine Freisetzung von Cytochrom c nach TNF oder MNNG Stimulation.

Die Freisetzung von Cytochrom c konnte in den Zelllinien der Positivkontrollen HeLa und NIH3T3 im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz eindeutig nachgewiesen werden, während bei L929 beide Nachweismethoden zeigten, dass unter den untersuchten Bedingungen keine Cytochrom c-Freisetzung auftrat.

2 Untersuchungen zur Signaltransduktion bei der Freisetzung von *apoptosis-inducing-factor* (AIF) aus Mitochondrien

Als ein weiterer den Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod auslösender Faktor wurde der *apoptosis-inducing-factor* (AIF) vorgeschlagen (Lorenzo *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 1999). Beschrieben wurde eine Caspase-unabhängige Induktion des Zelltodes durch Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien und Translokation in den Nukleus. Dieser Faktor und seine Rolle im TNF/Ceramid-vermittelten Zelltod wurde im Folgenden untersucht.

Für die Versuche mit den L929 Fibrosarkomzellen wurden drei verschiedene „Subtypen“ verwendet. Die sehr sensitiven L929sA Zellen (Vanhaesebroeck *et al.*, 1992), die Laborzelllinie L929 und die Referenz Zelllinie L929ATCC.

2.1 Untersuchungen zur Freisetzung von AIF in HeLa Zellen

In HeLa Zellen ist der klassische Weg der Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom c und anschließende Caspase Aktivierung möglich. In diesem Versuch wurde eine vermutete Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien von HeLa Zellen untersucht. Dazu wurden die selben Stimuli eingesetzt die zu Cytochrom c-Freisetzung geführt hatten (Abbildung 2).

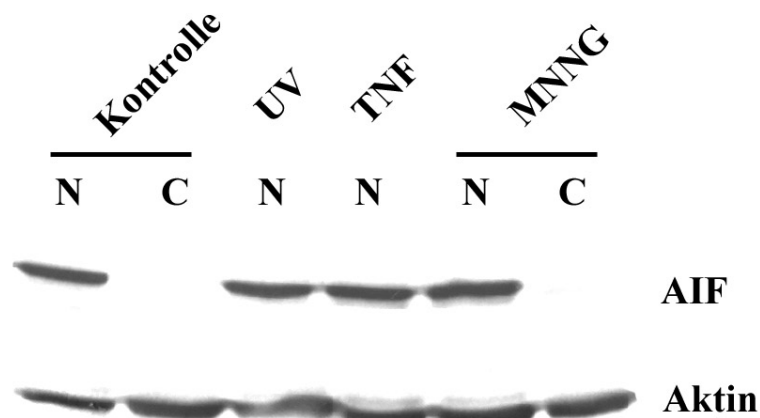


Abbildung 5: **HeLa Zellen zeigen keine Translokation von AIF aus Mitochondrien in den Nukleus.** HeLa Zellen wurden mit $5 \times 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV stimuliert und 6 h inkubiert (UV) oder für 20 h mit 100 ng TNF/ml stimuliert (TNF) oder für 15 min mit 0,5 mM MNNG stimuliert und 16 h inkubiert (MNNG) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). Nucleus- (N) und Cytosol-Extrakte (C) wurden mit anti-AIF und anti- β -Aktin Antikörpern behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, zeigten HeLa Zellen unter TNF oder MNNG Stimulation keine Freisetzung von AIF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da dieselben Stimuli in diesen Zellen zur Freisetzung von Cytochrom c führten (Abbildung 2), war dieser Versuch ein Hinweis, dass die Freisetzung von Cytochrom c und AIF voneinander unabhängig und Zelltyp abhängig gesteuert werden kann.

2.2 Untersuchungen zur Freisetzung von AIF in L929sA Zellen

Da in L929 Zellen keine Freisetzung von Cytochrom c nach TNF oder MNNG Stimulation festgestellt werden konnte, wurde nun die vermutete Freisetzung von AIF als Reaktion auf den Ceramid-induzierenden Stimulus TNF untersucht.

Zunächst wurden 3 unterschiedliche AIF Antikörper von Santa Cruz auf ihre Tauglichkeit im Western-Blot und im LSM untersucht. Für diese Versuche wurde die hoch TNF sensitive Zelllinie L929sA ausgewählt.

2.2.1 Test des polyklonalen Santa Cruz AIF-Antikörpers D-20

Der Antikörper D-20 ist ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege, gewonnen gegen ein Protein bestehend aus dem C-Terminus von murinem AIF (identisch zu humanem AIF). Der Antikörper erkennt laut Hersteller (Santa Cruz, Heidelberg) AIF aus Maus, Ratte und Mensch im Western-Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz.

Getestet wurde hier die Fähigkeit des Antikörpers, AIF Translokation in den Nukleus im Western-Blot sowie in der Immunfluoreszenz zu detektieren.

Aus stimulierten L929sA Zellen wurden durch zelluläre Fraktionierung Nukleus-Fractionen gewonnen und gegen eine unbehandelte Kontrolle verglichen.

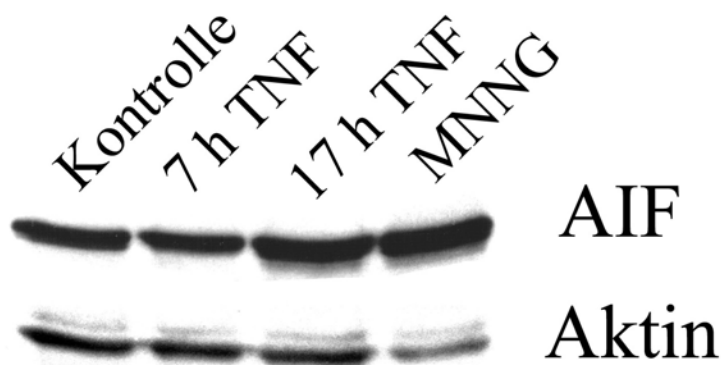


Abbildung 6: **L929sA zeigen Zunahme von AIF im Nukleus (Antikörper D-20)**. Kernfraktionen aus L929sA Zellen wurden 7 h (7H TNF) oder 17 h (17h TNF) mit 100 ng TNF/ml stimuliert oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (MNNG) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). Der Western-Blot wurde mit dem Antikörper D-20 gegen AIF und mit einem Antikörper gegen β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, zeigte sich eine relative Zunahme von AIF im Kern von 17 h TNF oder MNNG stimulierten L929sA Zellen im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle. Die deutliche Bande von AIF in der unbehandelten Kontrolle könnte mit einer Kontamination der Nukleus-Fraktion durch mitochondriales AIF durch die Methode der Nukleus-Fraktionierung erklärt werden.

Dieser Antikörper wurde ebenfalls in einer Immunfluoreszenz getestet.

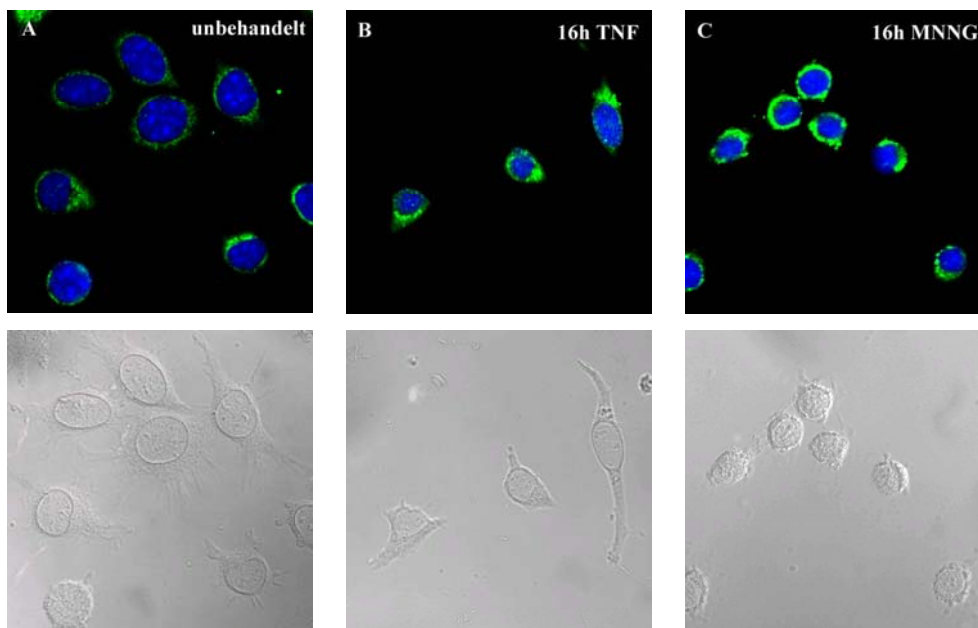


Abbildung 7: **L929sA zeigen mit dem AIF-Antikörper D-20 eine Translokation an die Kernperipherie im LSM.** L929sA Zellen wurden für 16 h mit 100 ng TNF/ml (B) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und 16 h inkubiert (C) oder nicht stimuliert (A). Die obere Reihe zeigt in Grün die Lokalisation von AIF und in Blau die DAPI-Kernfärbung. Die untere Reihe zeigt die Morphologie der Zellen aus der oberen Reihe im Hellfeld. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Ziege FITC verwendet.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, zeigten die Immunfluoreszenzen keine eindeutige Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Nukleus nach entsprechender Stimulation. Zu erkennen war eine Umverteilung von AIF aus den Mitochondrien (punktierte Färbung in Abbildung 7A) in den perinucleären Raum und eine relative Zunahme der Fluoreszenz (Abbildung 7B+C). Die Zunahme der Fluoreszenz könnte mit einer Zunahme des AIF Proteins oder mit einer besseren Zugänglichkeit von AIF (nach einer möglichen Translokation in den perinucleären Raum) für den primären Antikörper erklärt werden.

2.2.2 Test des polyklonalen Santa Cruz AIF-Antikörpers H-300

Der Santa Cruz Antikörper H-300 ist ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gewonnen gegen ein rekombinantes Protein bestehend aus den Aminosäuren 1-300 am N-Terminus von humanem AIF. Nach Angaben von Santa Cruz reagiert dieser Antikörper mit AIF aus Maus, Ratte und Mensch und ist für Western-Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz geeignet.

Dieser Antikörper wurde ebenfalls im LSM und im Western-Blot getestet.

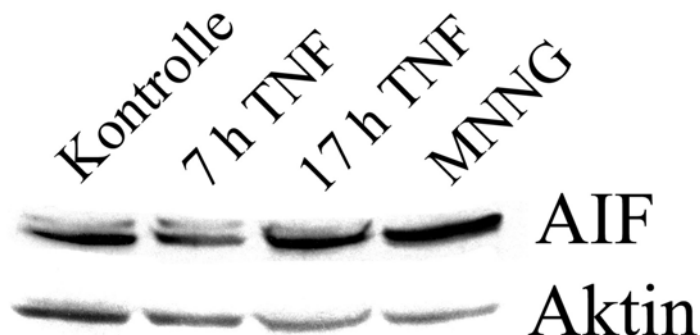


Abbildung 8: **L929sA zeigten Zunahme von AIF im Nukleus (Antikörper H-300)**. Kernfraktionen aus L929sA Zellen wurden 7 h mit 100 ng TNF/ml s(7H TNF) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (MNNG) oder nicht stimuliert (Kontrolle). Der Western-Blot wurde mit dem Antikörper H-300 gegen AIF und einem Antikörper gegen β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie in Abbildung 8 zu sehen, zeigte sich eine deutliche Zunahme von AIF im Zellkern nach 17 h TNF- sowie nach MNNG Stimulation. Auch dieser Antikörper wurde in einer Immunfluoreszenz mit den gleichen Stimuli wie bei dem Antikörper D-20 (Abbildung 7) getestet.

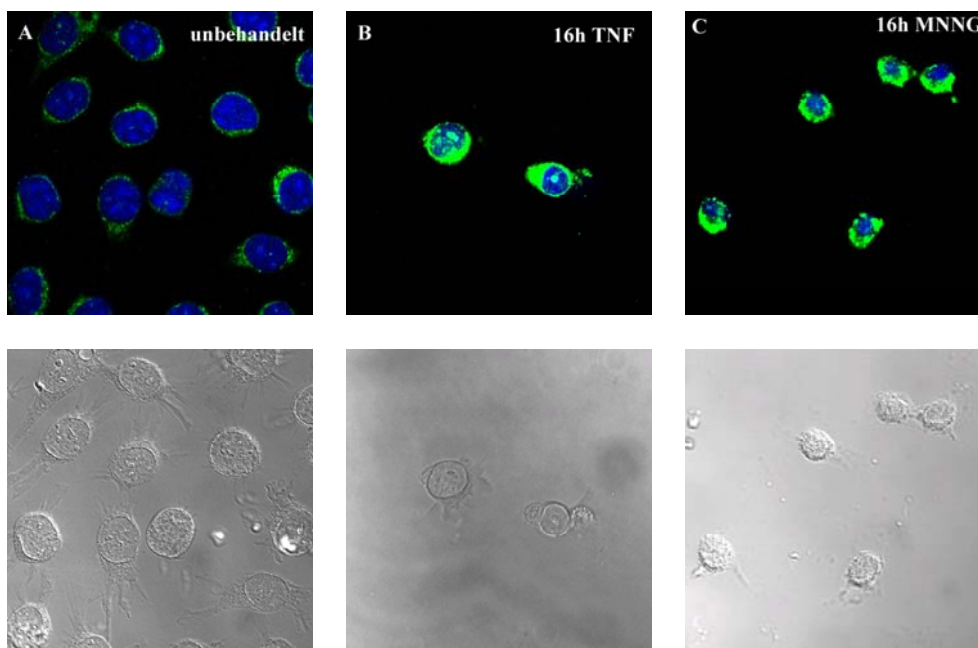


Abbildung 9: **L929sA zeigen mit dem AIF-Antikörper H-300 eine Translokation an die Kernperipherie im LSM**. L929sA Zellen wurden mit 100 ng TNF/ml für 16 h (B) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (C) oder nicht stimuliert (A). Die obere Reihe zeigt in Grün die Lokalisation von AIF und in Blau die DAPI-Kernfärbung. Die untere Reihe zeigt die Morphologie der Zellen in der oberen Reihe im Hellfeld. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Kaninchen Alexa Fluor488 eingesetzt.

Wie schon mit dem Antikörper D-20 (Abbildung 7) war auch für den AIF-Antikörper H-300 (Abbildung 9) keine eindeutige Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Nukleus

zu erkennen. Eine ähnliche Verteilung von AIF aus den Mitochondrien in einen perinucleären Raum war auch mit dem AIF-Antikörper H-300 in diesem Versuch zu sehen.

2.2.3 Test des monoklonalen Santa Cruz AIF-Antikörpers E-1

Der monoklonale Antikörper E-1 von Santa Cruz ist ein Maus Antikörper generiert gegen ein rekombinantes Protein, das aus den Aminosäuren 1-300 des Aminoterminus von humanem AIF bestand. Dieser Antikörper detektiert AIF aus Maus, Ratte und Mensch, und ist laut Hersteller (Santa Cruz, Heidelberg) im Western-Blot, in der Immunpräzipitation und in der Immunfluoreszenz einsetzbar.

Um auch für diesen Antikörper zu zeigen, dass durch zelluläre Fraktionierung die Translokation von AIF zu sehen ist, wurde ein weiterer Western-Blot durchgeführt.

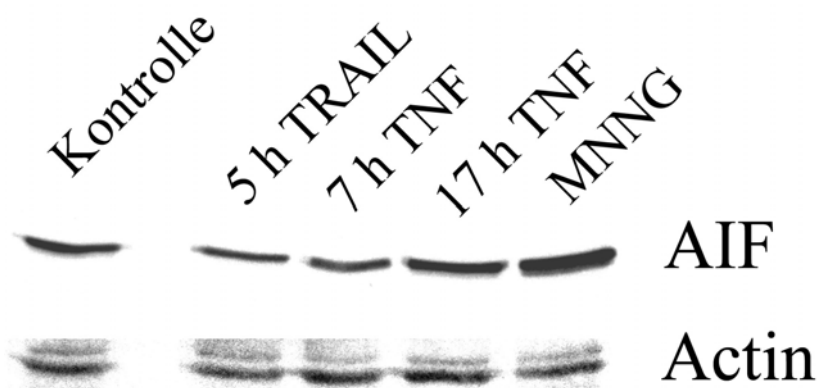


Abbildung 10: **L929sA zeigen Zunahme von AIF im Nukleus (Antikörper E-1)**. Kernfraktionen aus L929sA Zellen wurden für 5 h mit 1 µg/ml TRAIL (5h TRAIL) oder für 7 h (7h TNF) oder 17 h (17h TNF) mit 100 ng TNF/ml oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (MNNG) oder nicht stimuliert (Kontrolle). Der Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen AIF und β-Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Deutlich erkennbar war eine Zunahme von AIF in den Kernfraktionen von L929sA, in Abbildung 10 zu sehen, nach längerer TNF oder MNNG Stimulation. In dieser Stimulation wurde zum Test eine TRAIL Stimulation durchgeführt. TRAIL ist ein Stimulus, der in L929 Zellen Caspase Aktivierung und damit klassische Apoptose auslöst. Im Gegensatz zu TNF oder MNNG zeigte TRAIL keine Wirkung auf die AIF Translokation. Dieser Antikörper wurde ebenfalls in der Immunfluoreszenz getestet.

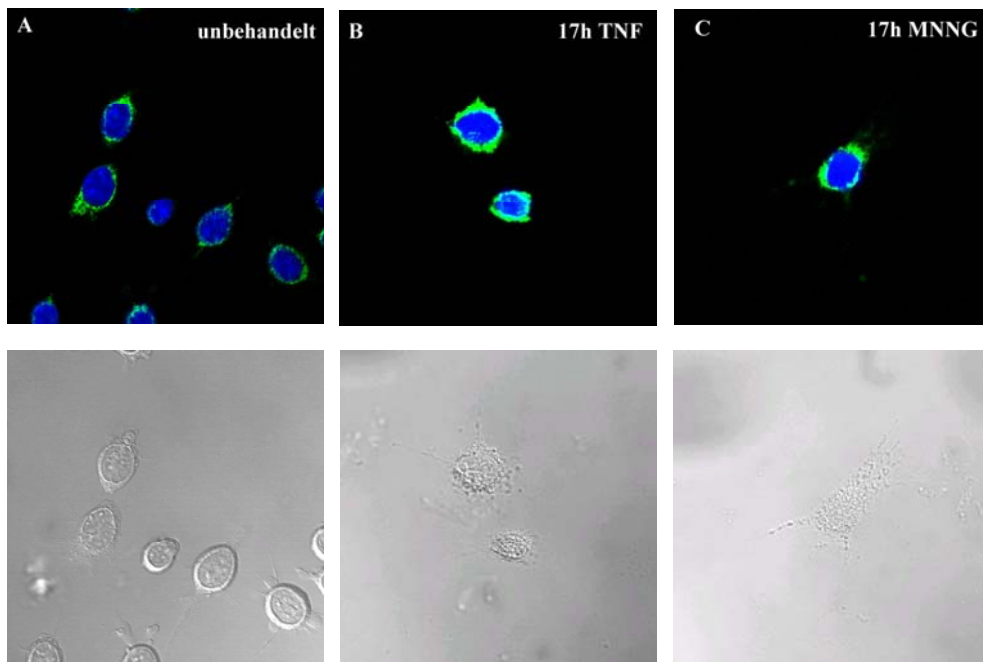


Abbildung 11: **L929sA zeigen mit dem AIF-Antikörper E-1 eine Translokation an die Kernperipherie im LSM.** L929sA Zellen wurden mit 100 ng TNF/ml für 17 h stimuliert (B) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 17 h inkubiert (C) oder nicht stimuliert (A). Die obere Reihe zeigt in Grün die Lokalisation von AIF und in Blau die DAPI-Kernfärbung. Die untere Reihe zeigt die Morphologie der Zellen aus der oberen Reihe im Hellfeld. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Maus Alexa Fluor488 verwendet.

Wie schon bei den ersten beiden getesteten Antikörpern zeigte auch der Antikörper E-1 von Santa Cruz (Abbildung 11) keine eindeutige Translokation. Die perinucleäre Verteilung von AIF nach Stimulation mit TNF oder MNNG war allerdings ebenfalls gut sichtbar.

Als Fazit der Überprüfung der 3 verschiedenen AIF Antikörper ließ sich feststellen, dass alle das gleiche Bild zeigten: Die Translokation von AIF in den Kern war durch mikroskopische Aufnahmen nicht eindeutig feststellbar, sondern allenfalls eine Änderung der Verteilung in der Zelle aus den Mitochondrien in einen perinucleären Raum.

Auch im Western-Blot zeigten die Antikörper das gleiche Bild: Alle zeigten eine Zunahme von AIF in den Kernfraktionen von L929sA Fibrosarkomzellen nach Stimulation mit TNF oder MNNG.

Zur Verifizierung dieser Translokation von AIF wurden die Untersuchungen auf die drei unterschiedlich sensitiven L929 Zelllinien und auf weitere Stimuli ausgeweitet.

2.3 AIF-Freisetzung aus Mitochondrien in L929sA Fibrosarkomzellen

In den folgenden Untersuchungen wurden die Bedingungen, unter denen eine AIF Translokation erfolgt, weiter ausgetestet. Zusätzlich zu TNF und MNNG wurden ergänzende Agenzien wie Cycloheximid (CHX) oder zVAD eingesetzt. CHX führte zu einer Aktivierung von Caspasen, während zVAD ein Pan-Caspase Inhibitor war. Der in Abbildung 13 eingesetzte zusätzliche Stimulus Imipramin führte zu einer Herabregulierung lysosomaler Enzyme. Bei Yu *et al.* wurde beschrieben (Yu *et al.*, 2002), dass PARP ein zur Freisetzung und Translokation von AIF wichtiger Faktor ist. Deshalb wurde PARP in die folgenden Untersuchungen eingeschlossen. Um zu klären, ob die Aktivierung dieses Faktors nicht die bestimmende Ursache für eine Translokation von AIF auf einen bestimmten Stimulus ist, wurde ein Inhibitor der Aktivierung von PARP, das 3-Aminobenzamid (3-AB), eingesetzt. Weitergehende Erklärungen zu PARP und dessen Funktion folgen an späterer Stelle.

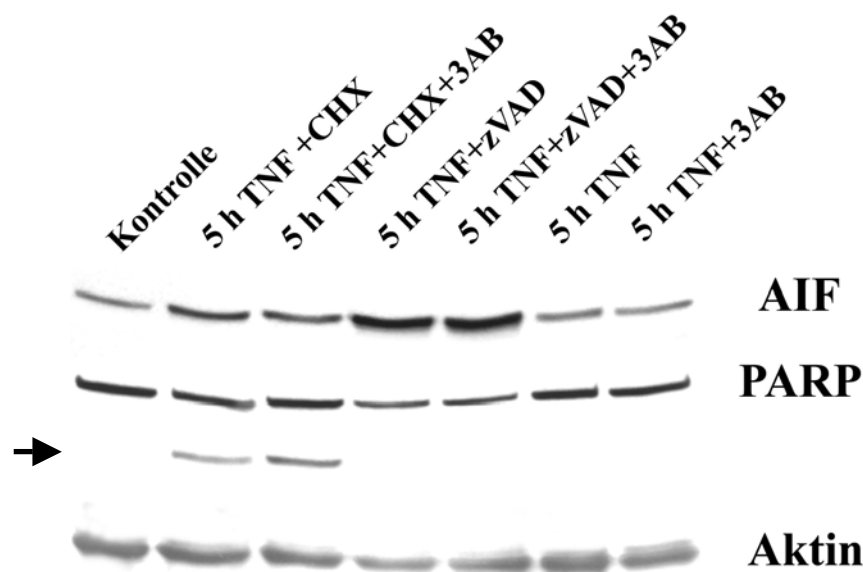


Abbildung 12: **AIF Translokation in Nukleus-Fractionen von L929sA Zellen I.** L929sA Zellen wurden 5 h mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml (mit oder ohne 3-AB) oder 5 h mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD (mit oder ohne 3-AB) oder 5 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) behandelt oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde in allen Ansätzen in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt. Die Nukleus-Fractionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β-Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen. Der Pfeil markiert das 86 kDa Spaltprodukt von PARP.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, zeigte sich eine deutliche AIF Translokation bei Stimulation mit TNF/zVAD unabhängig von dem PARP Inhibitor 3-AB. Eine Stimulation mit TNF/CHX (mit oder ohne 3-AB) war dagegen nicht ausreichend, um eine AIF Translokation oder PARP Aktivierung auszulösen. In dieser Arbeit wurde das „Verschwinden“ der PARP Bande im Western-Blot als Hinweis auf eine Aktivierung gedeutet. Diese schnelle Aktivierung zeigte

sich auch in Abbildung 23, wo innerhalb von 4 h nach MNNG Stimulation PARP aus dem Western-Blot „verschwunden“ war. Eine Inhibition der PARP Aktivierung durch 3-AB führte aber wieder zum „Auftauchen“ der PARP Bande. Da bekannt war, dass eine PARP Aktivierung zu einer massiven ADP-Ribosylierung an PARP selbst führte, wurde in dieser Arbeit aus den oben angeführten Gründen angenommen, dass PARP durch zunehmende Selbst-ADP-Ribosylierung nicht mehr von den Antikörper erkannt wurde und deshalb ein allmähliches Verblässen der Bande zu erkennen war.

TNF/CHX diente hier als Positivkontrolle zur Auslösung einer „klassischen“ Apoptose, angezeigt durch PARP Spaltung in ein 86 kDa Fragment (siehe Pfeil in Abbildung 12) durch Aktivierung von Caspase 3. Die Stimulation mit TNF/zVAD oder TNF/CHX führten beide zu einem ähnlichen Level an Zelltod (Abbildung 20). Die Stimulation mit 5 h TNF allein oder zusätzlich mit 3-AB führte weder zu einer Aktivierung von PARP noch zu einer AIF Translokation.

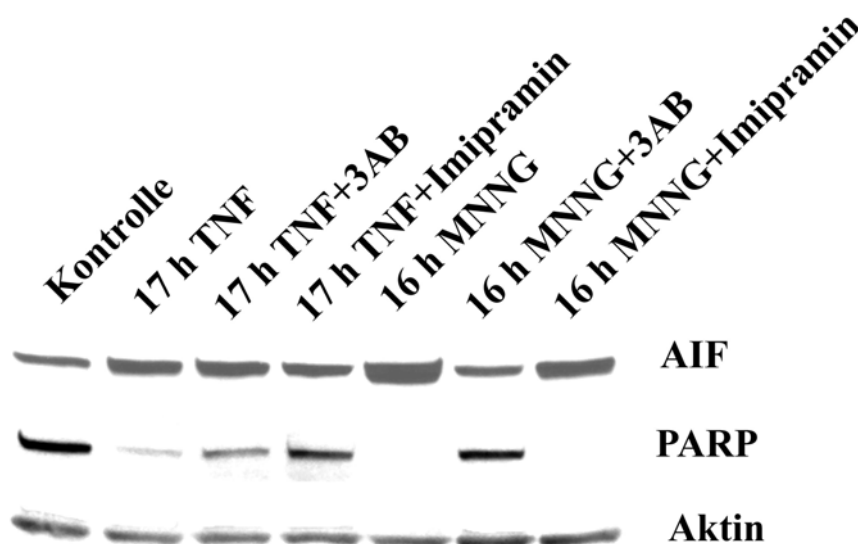


Abbildung 13: **AIF Translokation in Nukleus-Fractionen von L929sA Zellen II.** L929sA Zellen wurden 17 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde als Agens mit 2,5 mM und Imipramin mit 25 μ M die gesamte Stimulationszeit eingesetzt. Die Nukleus-Fractionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, zeigte sich eine AIF Translokation nach längerer Stimulation mit TNF und nach Stimulation mit MNNG in Abhängigkeit von weiteren Faktoren. Bei TNF Stimulation war 3-AB nicht in der Lage die AIF Translokation zu inhibieren, wohl aber die Aktivierung von PARP, sichtbar an der im Vergleich zum 17 h TNF Wert stärkeren PARP Bande. Imipramin als Zusatz bei TNF Stimulation führte zu einer Abschwächung der AIF

Translokation und zur Inhibition der PARP Aktivierung. Imipramin regulierte lysosomale Enzyme herunter, z.B. die ASMase. Dadurch wurde u.a. weniger Ceramid in den Zellen freigesetzt.

Ein anderes Bild ergab sich bei der MNNG Stimulation: MNNG allein führte zur AIF Translokation und PARP Aktivierung. MNNG Stimulation mit 3-AB führte zur Inhibition der AIF Translokation und der PARP Aktivierung, während MNNG Stimulation mit Imipramin keinerlei Effekt zeigte.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte Artefakte dieser Zelllinie waren, wurden die gleichen Experimente in der Laborzelllinie L929 und in den L929ATCC Zellen wiederholt.

2.4 *AIF-Freisetzung aus Mitochondrien in L929 Fibrosarkomzellen*

Im Vergleich zu den L929sA Zellen aus dem vorhergehenden Versuch wurde die Laborzelllinie L929 getestet. Auch diese Zelllinie wurde mit TNF allein, TNF/CHX, TNF/zVAD und MNNG stimuliert. Der PARP Inhibitor 3-AB wurde zu allen Stimuli zusätzlich eingesetzt.

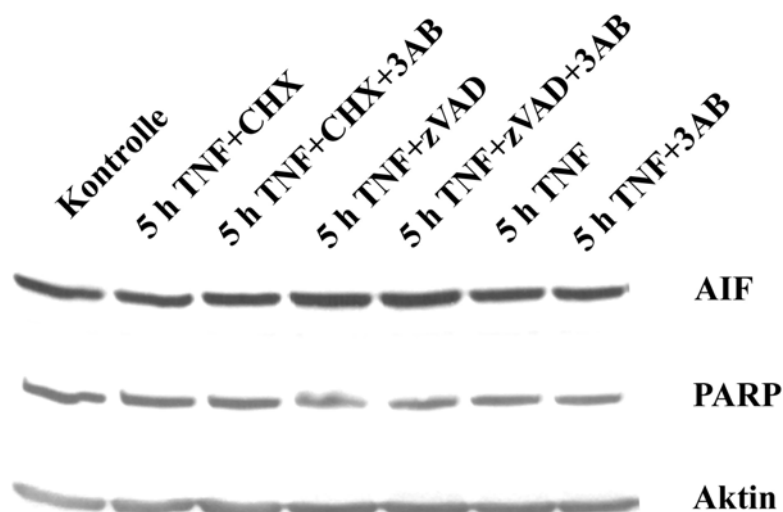


Abbildung 14: **AIF Translokation in Nukleus-Fractionen von L929 Zellen I.** L929 Zellen wurden 5 h mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml (mit oder ohne 3-AB) oder 5 h mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD (mit oder ohne 3-AB) oder 5 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) behandelt oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde in allen Ansätzen in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt. Die Nukleus-Fractionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β-Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Für das Experiment in Abbildung 14 wurden L929 Zellen genauso stimuliert wie die L929sA Zellen (Abbildung 12). Allerdings zeigten die L929 Zellen keine derart sichtbar ausgeprägte

AIF Translokation nach 5 h. Bei der PARP Aktivierung zeigte sich bei TNF/zVAD Stimulati-
on dennoch ein ähnlicher Effekt wie bei den L929sA Zellen. Auch bei den L929 Zellen wurde
die sichtbare Bande von PARP im Western-Blot schwächer, was auf eine Aktivierung von
PARP hinwies. Dazu zeigte sich allerdings höchstens ein marginaler Effekt bei der AIF
Translokation.

Die Stimuli, die bei den L929sA zu deutlichen Effekten führten, führten bei gleichen Inkuba-
tionsbedingungen noch nicht zu einer AIF Translokation. Daher wurden die Inkubationszeiten
für den zweiten Teil der Experimente angepasst.

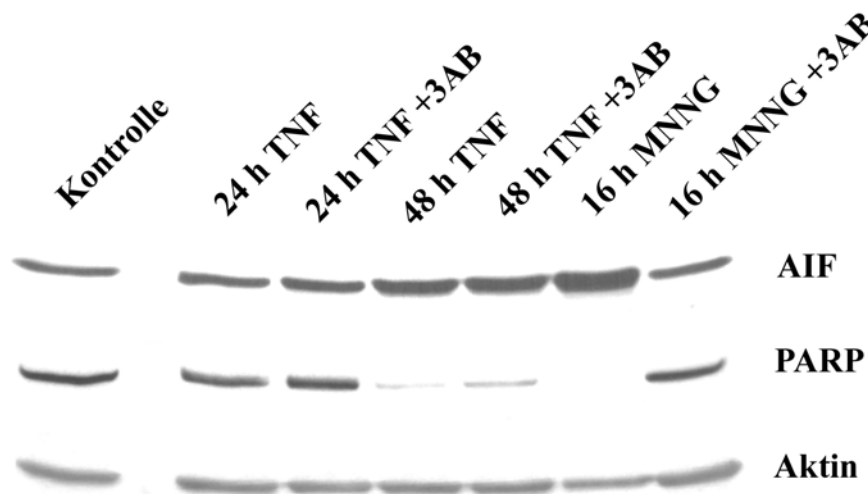


Abbildung 15: **AIF Translokation in Nukleus-Fraktionen von L929 Zellen II.** L929 Zellen wurden 24 h oder 48 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde in einer Konzentration von 2,5 mM die gesamte Stimulationszeit eingesetzt. Die Nukleus-Fraktionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

In Abbildung 15 zeigten sich (im Gegensatz zu Abbildung 14) dieselben Effekte wie sie schon im Prinzip bei den L929sA zu beobachten waren. Beginnend bei 24 h TNF Stimulation war eine AIF Translokation zu beobachten, auch hier unabhängig von dem eingesetzten PARP Inhibitor 3-AB. Die AIF Translokation war deutlich nach 48 h TNF Stimulation. Wie bei den L929sA inhibierte 3-AB die PARP Aktivierung zum Teil, nicht aber die AIF Translokation.

Nach MNNG Stimulation war ebenfalls eine AIF Translokation und eine PARP Aktivierung erkennbar, beide Effekte waren durch 3-AB komplett inhibierbar.

Die L929 Zellen zeigten also prinzipiell die gleichen Reaktionen auf die Stimuli wie die L929sA nach entsprechend der geringeren Sensitivität angepassten Stimulationszeiten. Als weitere Zelllinie wurde die Referenz Zelllinie L929ATCC getestet.

2.5 *AIF-Freisetzung aus Mitochondrien in L929 ATCC Fibrosarkomzellen*

Die Untersuchung der bisher eingesetzten Stimuli an L929ATCC Fibrosarkomzellen (ATCC CRL-2148) diente dazu, die gewonnenen Erkenntnisse abzusichern. Durch den Einsatz dieser Zelllinie ist gesichert, dass die Ergebnisse durch jeden Bezieher dieser Zelllinie von der ATCC nachzuvollziehen sind. Bei diesen Experimenten wurden die gleichen Stimuli wie schon bei der Laborzelllinie L929 eingesetzt.

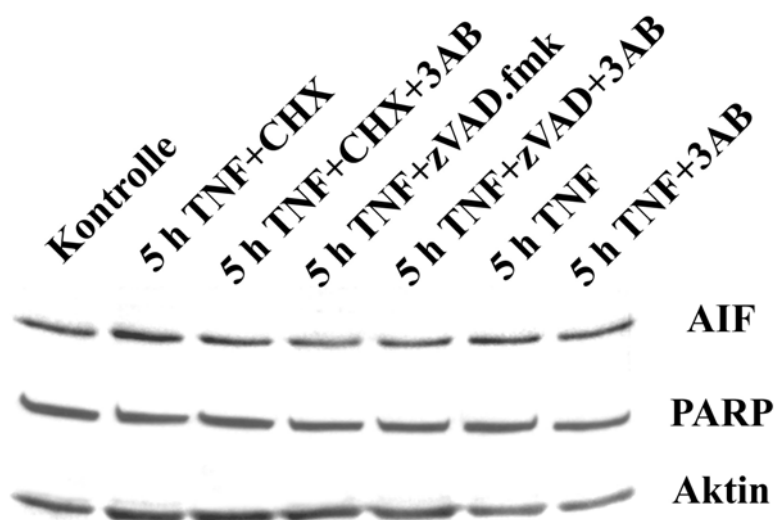


Abbildung 16: **AIF Translokation in Nukleus-Fractionen von L929ATCC Zellen I.** L929ATCC Zellen wurden 5 h mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) behandelt oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde in allen Ansätzen in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt. Die Nukleus-Fractionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β-Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie schon die L929 zeigten die L929ATCC (Abbildung 16) keine AIF Translokation und keine PARP Aktivierung nach Stimulation mit TNF, TNF/zVAD oder TNF/CHX. Diese Stimulierungen blieben in den 3 untersuchten L929 Zelllinien immer konstant. Die Sensitivität gegenüber den Stimuli nahm allerdings von den L929sA über die L929 bis zu den hier untersuchten L929ATCC ab. Daher könnte die abnehmende Zelltodesrate nach 5 h Stimulation der Grund für die nicht erfolgte PARP Aktivierung und/oder AIF Translokation sein.

Auch die L929ATCC Zellen wurden wie die L929 Zellen einer längeren TNF Stimulation und einer MNNG Stimulation unterzogen.

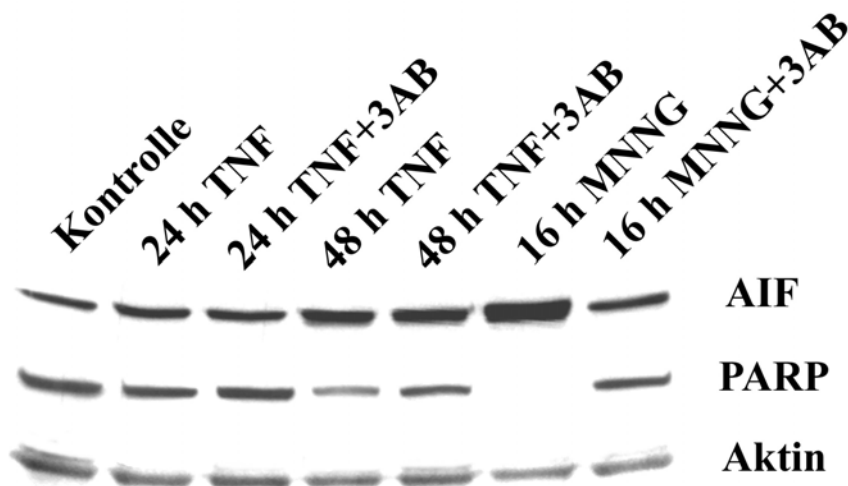


Abbildung 17: **AIF Translokation in Nukleus-Fractionen von L929ATCC Zellen II.** L929ATCC Zellen wurden für 24 h oder 48 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde in einer Konzentration von 2,5 mM die gesamte Stimulationszeit eingesetzt. Die Nukleus-Fractionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Betrachtet man die TNF Stimulation für die L929ATCC Zellen in Abbildung 17, so erkennt man eine AIF Translokation erst nach 48h. Auch hier ist kein Effekt von 3-AB auf die PARP Aktivierung oder die Translokation von AIF zu erkennen. Nach 24 h schienen die Zellen noch nicht soweit geschädigt worden zu sein, dass eine AIF Translokation erfolgen konnte.

Die MNNG Stimulation allerdings zeigte in allen drei Zelllinien ein einheitliches Bild. Auch die L929ATCC Zellen zeigten nach MNNG Stimulation eine deutliche AIF Translokation und PARP Aktivierung (Abbildung 17). Dieser Effekt war wie bei den L929sA Zellen (Abbildung 13) und L929 Zellen (Abbildung 15) durch 3-AB inhibierbar.

Im Unterschied zwischen TNF und MNNG Stimulation ließ sich für alle drei untersuchten Zelllinien feststellen, dass MNNG den klassischen Weg der PARP Aktivierung und AIF Translokation auslöste, wie er bei Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2002) beschrieben wurde, während die TNF Stimulation offenbar einen anderen Weg der AIF Translokation auslöste. 3-AB inhibierte bei TNF Stimulation die PARP Aktivierung, nicht aber die AIF Translokation unabhängig von weiteren zusätzlich eingesetzten Stimuli wie CHX oder zVAD.

Bei MNNG Stimulation inhibierte 3-AB die PARP Aktivierung und die AIF Translokation.

AIF scheint also erst in späteren Phasen des Zelltodes eine Rolle zu übernehmen oder sekundär als Folge des Zelltodes in den Zellkern zu translozieren.

2.6 *PARP als Mechanismus des Ceramid-induzierten Zelltodes?*

Wie schon bekannt (Yu *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003; Pogrebniak *et al.*, 2003; Skaper, 2003) führt PARP Aktivierung zu NAD^+ Verbrauch und im weiteren Verlauf zu ATP-Depletion. Wird PARP über das DNA alkylierende Agens MNNG aktiviert, führt das zur Bildung von ADP-Ribose Ketten auf entsprechenden Akzeptorproteinen, u.a. Histonen und PARP selbst.

Die Abhängigkeit der ATP-Depletion vom NAD^+ Verbrauch könnte angeben, ob eine Beziehung besteht oder ob beide Ereignisse unabhängig voneinander eintreffen. Ebenso könnte eine Relevanz für den Zelltod über TNF oder MNNG Stimulation festgestellt werden.

In diesem Versuch wurden bei L929ATCC Zellen nach Stimulation mit TNF oder MNNG in Gesamtlysaten die ATP- und NAD^+ - Spiegel relativ zur Kontrolle gemessen.

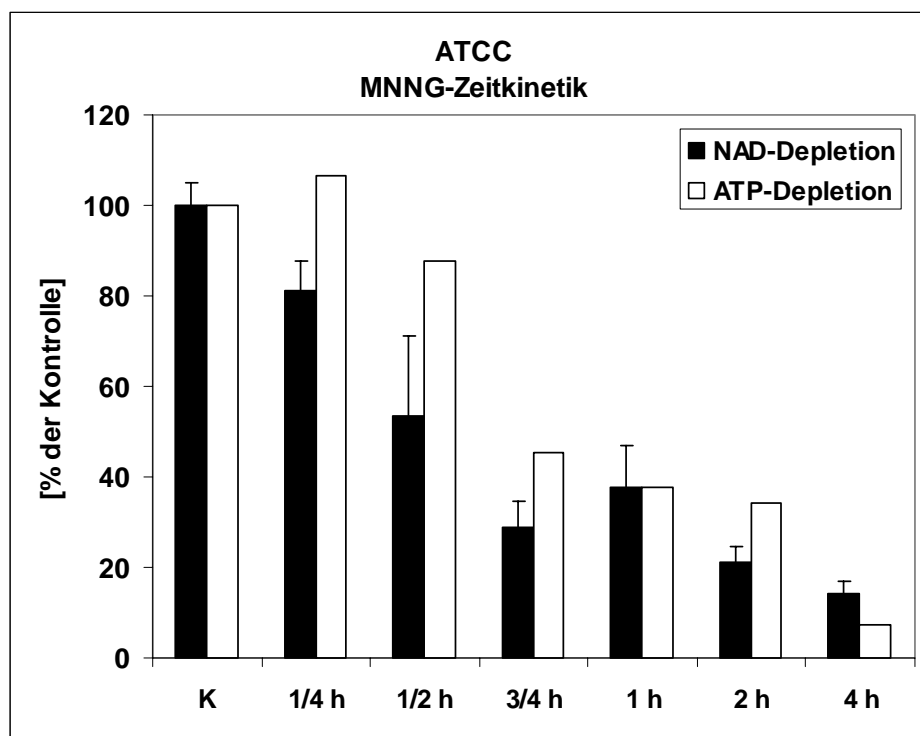


Abbildung 18: **NAD^+ und ATP-Depletion in Gesamtzelllysaten von L929ATCC nach MNNG Stimulation.** L929ATCC Zellen wurden 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und die angegebenen Zeiten inkubiert. Aus den unterschiedlich stimulierten Gesamtlysaten wurden relativer ATP- und NAD^+ - Gehalt bestimmt und gegen die unbehandelte Kontrolle (K) aufgetragen.

In Abbildung 18 wurden L929ATCC Zellen nach MNNG Stimulation auf ihren relativen ATP- und NAD^+ -Gehalt untersucht. Wie erwartet sank der NAD^+ Spiegel nach Stimulation mit MNNG durch Aktivierung von PARP schnell ab. In Folge der Neusynthesierung von NAD^+ aus ATP sank der ATP Spiegel in der Zelle ebenfalls.

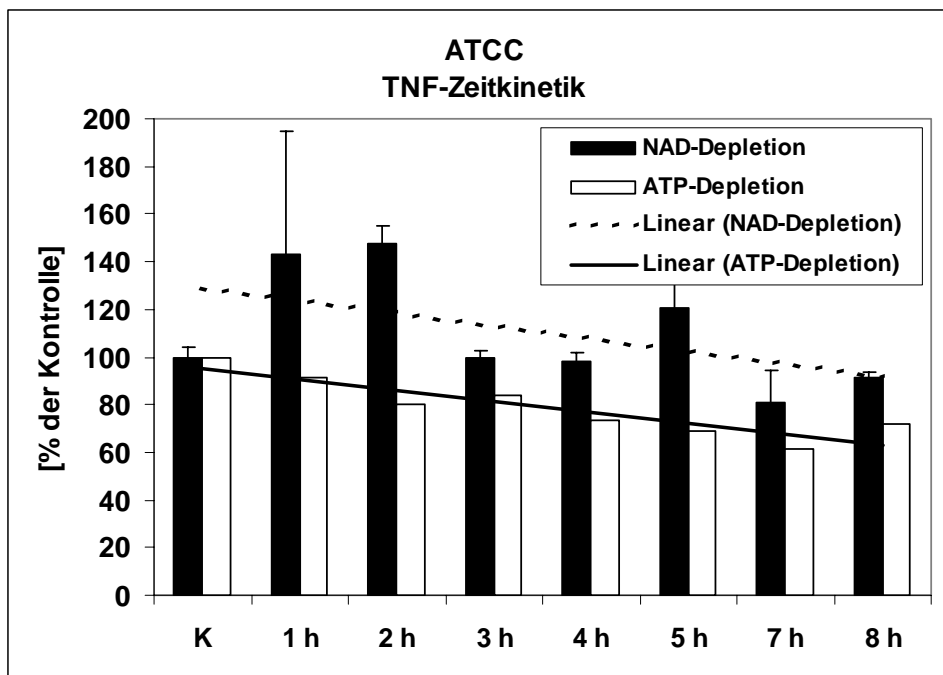


Abbildung 19: **NAD⁺ und ATP-Depletion in Gesamtzelllysaten von L929ATCC nach TNF Stimulation.** L929ATCC Zellen wurden die angegebenen Zeiten mit 100 ng TNF/ml stimuliert. Aus den Gesamtzelllysaten wurden relativer ATP- und NAD⁺- Gehalt bestimmt und gegen die unbehandelte Kontrolle (K) aufgetragen. Für beide Datenreihen wurde eine lineare Regressionsgerade berechnet.

Die Ergebnisse der TNF Stimulation (Abbildung 19) unterschieden sich grundlegend von den Ergebnissen der MNNG Stimulation (Abbildung 18). Innerhalb von 8 h TNF Stimulation war kein schnelles Absinken des NAD⁺- oder ATP-Spiegels zu beobachten. Der NAD⁺-Gehalt in der Zelle schien zunächst noch weiter zu steigen und sank im Verlauf von 8 h TNF Stimulation erst wieder auf den Gehalt der Kontrollzellen ab (bei einer linearen Regressionsgeraden). Von Beginn der Stimulation an begann der ATP Gehalt in der Zelle im Gegensatz zum NAD⁺-Gehalt leicht zu sinken, erreichte aber auch nach 8 h TNF Stimulation erst 70 % des Ausgangswertes und war somit ebenfalls noch deutlich höher als nach MNNG Stimulation. Schnelle PARP Aktivierung war also nur nach MNNG Stimulation zu sehen. PARP Aktivierung durch TNF Stimulation wiederum war keineswegs schnell, sondern erfolgte wenn überhaupt graduell über die gesamte Stimulationsdauer.

2.7 *Verhältnis zwischen ATP-Depletion und Zelltod in L929 Fibrosarkomzellen*

Um den in den letzten Versuchen sichtbaren Unterschied zwischen TNF und MNNG Stimulation weiter zu charakterisieren, wurde im Weiteren das Verhältnis zwischen ATP-Depletion und Zelltod in allen drei L929 Zelllinien über einen längeren Zeitraum und weiteren Stimuli untersucht.

Im folgenden Experiment wurden die Stimuli, die bereits unter 2.3 - 2.5 zur Untersuchung der Freisetzung und Translokation von AIF gedient hatten, wieder eingesetzt.

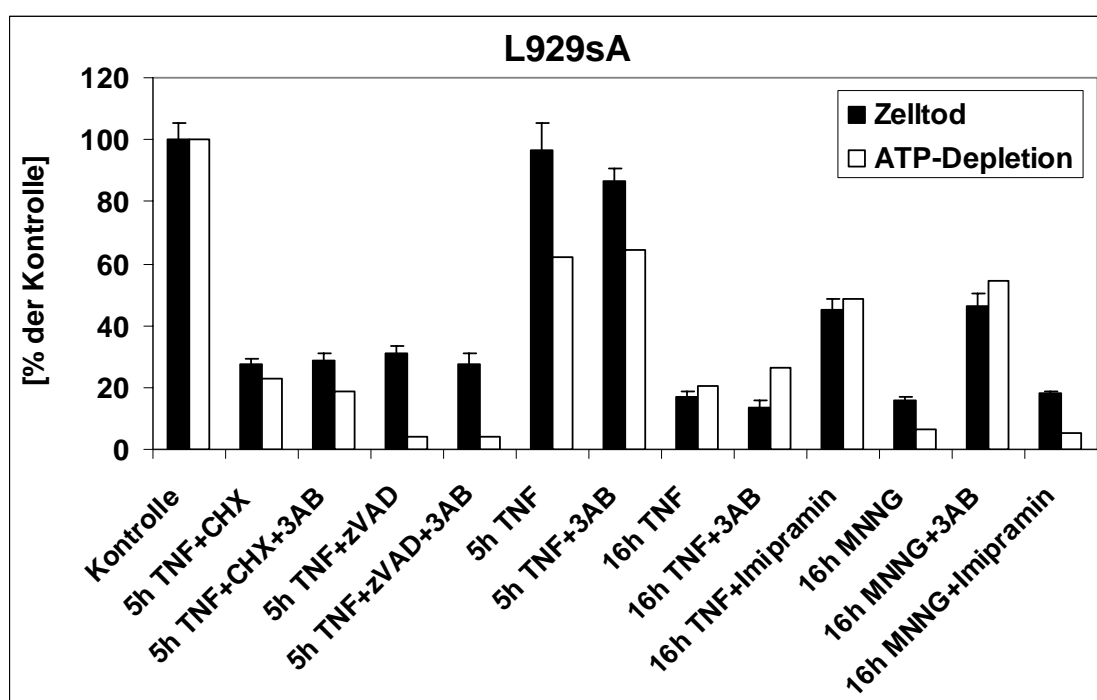


Abbildung 20: **ATP-Depletion und Zelltod in L929sA Zellen.** L929sA Zellen wurden 5 h mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h oder 16 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder nicht stimuliert. Zelltod und ATP-Depletion wurden nach den beschriebenen Methoden gemessen und gegen die Kontrolle aufgetragen.

In L929sA Zellen (Abbildung 20) zeigte die Messung des Zelltodes und des relativen ATP-Gehaltes bei den TNF Stimulationen sowie mit TNF/zVAD oder TNF/CHX keine Unterschiede zwischen der Stimulation mit oder ohne 3-Aminobenzamid (3-AB). Evident ersieht man daher, dass die Blockade der PARP Aktivierung keinerlei essentiellen Einfluss auf den auf TNF resultierenden Zelltod hat. Nur die zusätzliche Inkubation mit Imipramin zeigte bei der TNF Stimulation eine schützende Wirkung gegen den Zelltod und die ATP-Depletion. Dagegen zeigte sich ein eindeutiger Schutz von 3-AB vor ATP-Depletion und Zelltod in

MNNG-behandelten Zellen, während ein Schutz vor Ceramiden (durch Imipramin) hier keinen Einfluss auf das Überleben hatte.

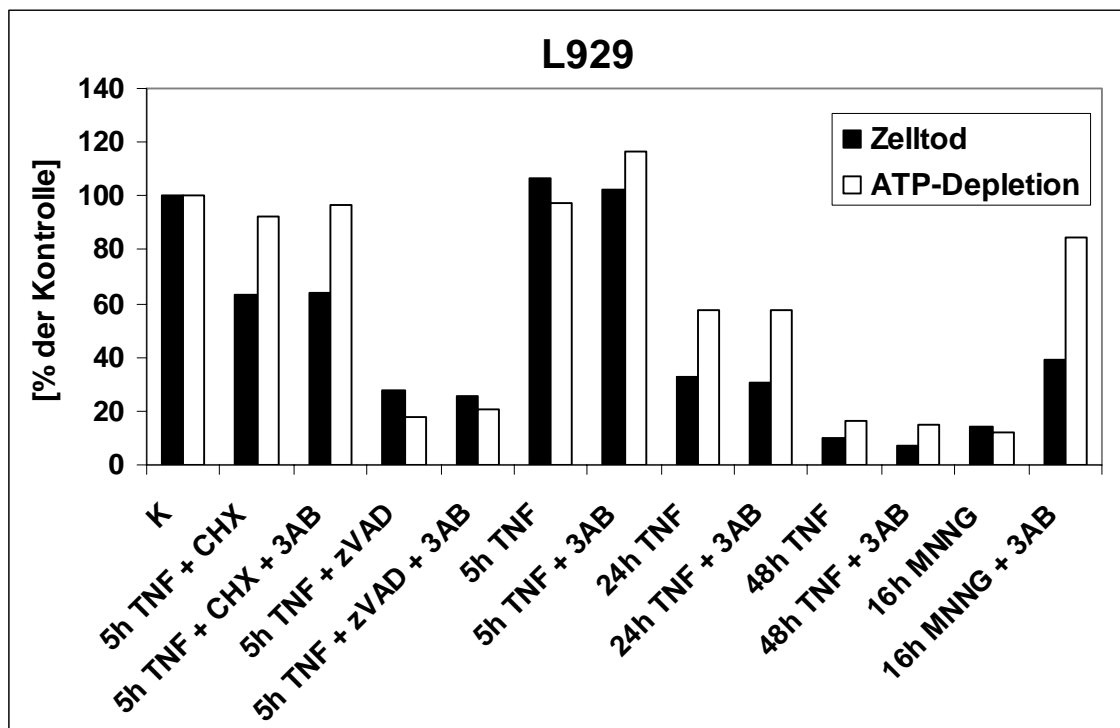


Abbildung 21: **ATP-Depletion und Zelltod in L929 Zellen.** L929 Zellen wurden 5 h mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h, 24 h oder 48 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder nicht stimuliert. Zelltod und ATP-Depletion wurden nach den beschriebenen Methoden gemessen und gegen die Kontrolle aufgetragen.

Die L929 Zellen (Abbildung 21) zeigten ein ähnliches Bild wie die L929sA Zellen (Abbildung 20). 3-AB zeigte bei TNF Stimulation keine schützende Wirkung, während bei MNNG eine deutliche protektive Wirkung zu erkennen war.

Die erhöhten Überlebensraten der L929 Zellen resultieren aus der geringeren Sensitivität gegenüber TNF.

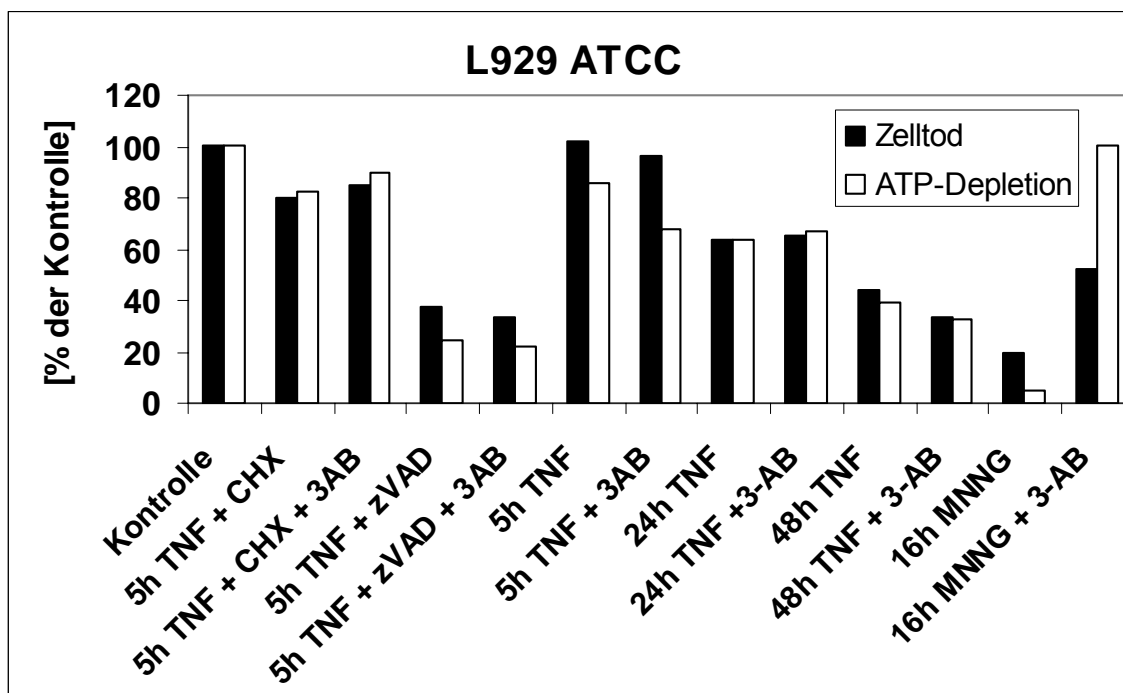


Abbildung 22: **ATP-Depletion und Zelltod in L929ATCC Zellen.** L929ATCC Zellen wurden 5 h mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD (mit oder ohne 3-AB) oder für 5 h, 24 h oder 48 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne 3-AB) oder für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für 16 h inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder nicht stimuliert. Zelltod und ATP-Depletion wurden nach den beschriebenen Methoden gemessen und gegen die Kontrolle aufgetragen.

Wie schon die L929sA und die L929 zeigten auch die L929ATCC (Abbildung 22), dass 3-AB bei TNF Stimulation keinerlei Einfluss auf das Überleben hatte, während 3-AB bei MNNG Stimulation die Zellen zum Teil schützen konnte.

In allen drei untersuchten L929 Zelllinien zeigte sich prinzipiell das gleiche Muster bei Reaktion auf die eingesetzten Stimuli. TNF Stimulation führte zu einer PARP-unabhängigen ATP Depletion und damit zum Zelltod, sichtbar daran, dass der Inhibitor der PARP Aktivierung 3-AB zu keinem Schutz vor ATP-Depletion und vorm Zelltod führte. MNNG Stimulation wiederum zeigte in den drei Zelllinien eine PARP-abhängige AIF Translokation, da 3-AB bei dieser Art der Stimulation zu einem Schutz vor ATP-Depletion und Zelltod führte.

Zusätzlich führte der Schutz vor Ceramid-Akkumulation durch Behandlung mit Imipramin zu einem Schutz vor TNF-induziertem Zelltod, während dieser Stimulus bei MNNG Stimulation keinen Schutz zeigte.

2.8 Die Rolle von PARP im MNNG vermittelten Zelltod

Um den bisher funktionell am wichtigsten erscheinenden Unterschied der Wirkung von TNF und MNNG, die Aktivierung von PARP, weiter zu charakterisieren, wurde PARP im Western-Blot näher untersucht.

Schädigung der DNA durch MNNG aktiviert das Reparaturenzym PARP, was zur Depletion von NAD^+ und ATP in der Zelle und zur ADP-Ribosylierung von Zielproteinen (u.a. Histonen und PARP selbst) führt.

Um zu untersuchen, ob diese beschriebene Aktivierung von PARP im Western-Blot zu sehen ist, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

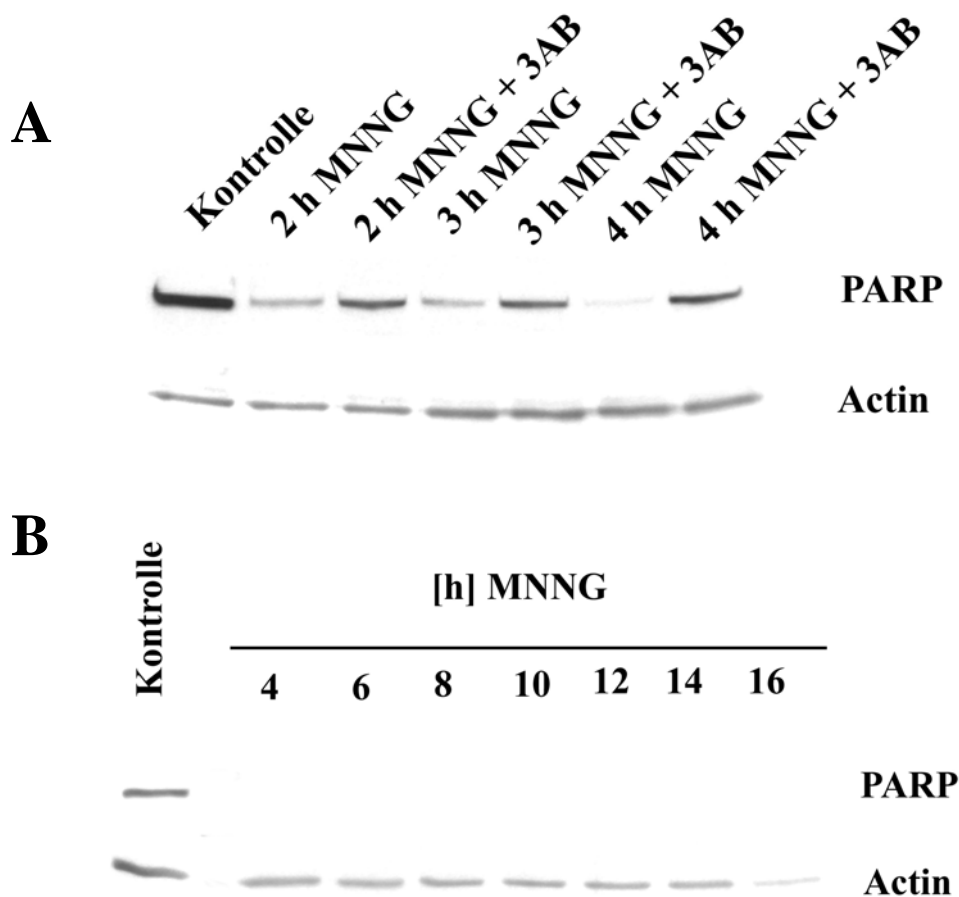


Abbildung 23: **Western-Blot von PARP nach MNNG Stimulation im Gesamtzelllysate von L929sA Zellen.** L929sA Zellen wurden 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und die angegebenen Zeiten inkubiert (mit oder ohne 3-AB) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). 3-Aminobenzamid (3-AB) wurde in einer Konzentration von 2,5 mM die gesamte Stimulationsdauer eingesetzt. Die Gesamtzelllysate wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Die MNNG Stimulationen (Abbildung 23A) zeigten eine deutliche schnelle Abnahme von PARP im Western-Blot und damit eine Aktivierung schon nach 2 h. Nach 4 h war das ge-

samte in den Zellen vorhandene PARP aktiviert und wurde im untersuchten Zeitraum nicht wieder deaktiviert (Abbildung 23B). 3-AB verhinderte teilweise die PARP Aktivierung, ebenfalls deutlich sichtbar im Gegensatz zu den Stimulationen ohne 3-AB (Abbildung 23A).

Um die Verknüpfung zwischen PARP Aktivierung und ATP-Depletion zu zeigen, wurde in einer Zeitkinetik MNNG stimulierte L929sA Zellen auf Zelltod und ATP-Depletion getestet.

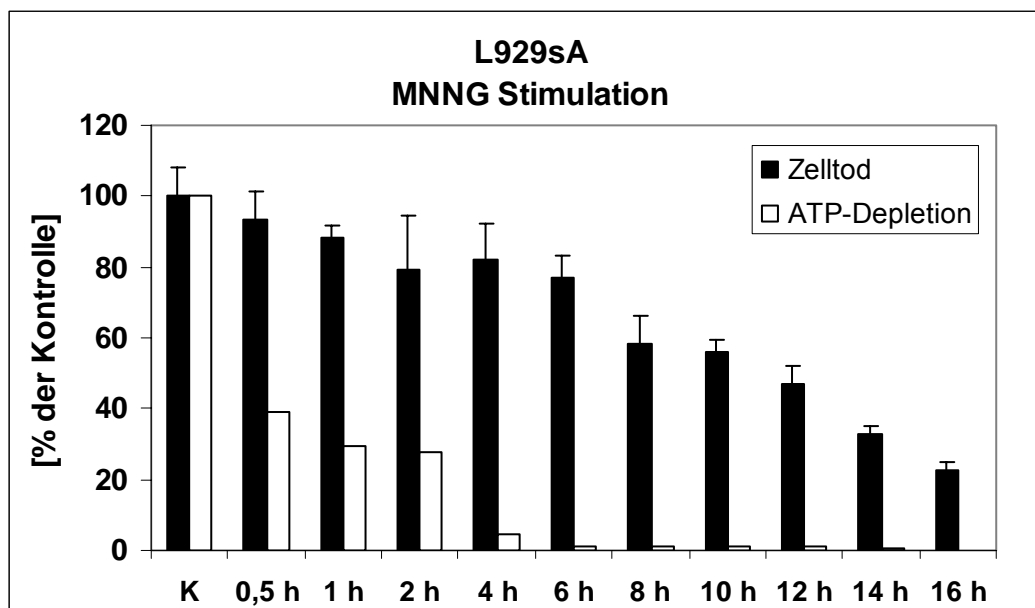


Abbildung 24: **Messung von Zelltod und ATP-Depletion in L929sA Zellen nach MNNG Stimulation.** L929sA Zellen wurden 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und für die angegebenen Zeiten inkubiert oder nicht stimuliert (K). Zelltod und ATP-Depletion wurden nach den beschriebenen Methoden gemessen und gegen die Kontrolle aufgetragen.

Vergleicht man den Verlauf der Aktivierung von PARP nach MNNG Stimulation aus den beiden Western-Blots mit dem Zelltod und der ATP-Depletion (Abbildung 24), so zeigte sich, dass sofort nach Beginn der MNNG Stimulation PARP aktiviert wurde und der NAD^+ - und ATP-Spiegel (siehe auch Abbildung 18) in der Zelle dramatisch abnahmen.

Die PARP Aktivierung nach MNNG Stimulation ist daher, wie in der Literatur für andere Zellsysteme beschrieben, ebenfalls ursächlich für den Zelltod in L929sA Zellen.

2.9 Die Rolle von PARP im TNF vermittelten Zelltod

Um den Einfluss von PARP im TNF/Ceramid-vermittelten Zelltod zu untersuchen, wurde auch hier ein Western-Blot sowie eine Messung des Zelltodes und der ATP-Depletion durch-

geführt. Als Beispiel für die L929 Zelllinien dienten auch in diesen Untersuchungen die L929sA Zellen.

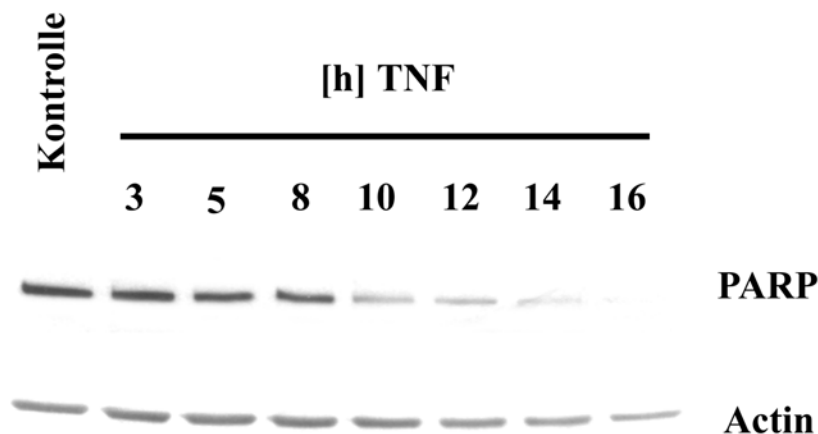


Abbildung 25: **Western-Blot von PARP nach TNF Stimulation im Gesamtzelllysat von L929sA Zellen.** L929sA Zellen wurden die angegebenen Zeiten mit 100 ng TNF/ml stimuliert oder nicht stimuliert. Die Gesamtzelllysate wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Im Gegensatz zur MNNG Zeitkinetik (Abbildung 23) zeigte die TNF Stimulation (Abbildung 25) keine sofortige Aktivierung von PARP. Vielmehr nahm die PARP Bande im Western-Blot über die Stunden der Stimulation graduell ab (und damit die Aktivierung zu).

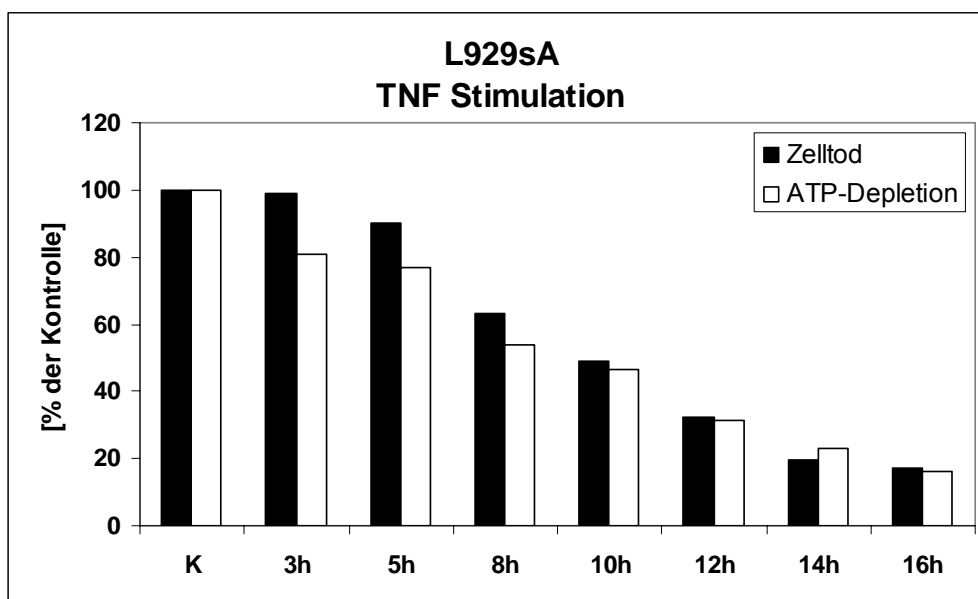


Abbildung 26: **Messung von Zelltod und ATP-Depletion in L929sA Zellen nach TNF Stimulation.** L929sA Zellen wurden die angegebene Zeit mit 100 ng TNF/ml stimuliert oder nicht stimuliert (K). Zelltod und ATP-Depletion wurden nach den beschriebenen Methoden gemessen und gegen die Kontrolle aufgetragen.

Während die Aktivierung von PARP im Verlauf der Stunden langsam zunahm, sank die Überlebensrate der Zellen und ihr ATP-Gehalt (Abbildung 26).

Im Gegensatz zur MNNG Stimulation kann daher bei der TNF Stimulation die PARP Aktivierung nicht ursächlich für den Zelltod sein.

2.10 Die Rolle von Ceramid im TNF und MNNG vermittelten Zelltod

Unter 2.7 wurde schon kurz auf die Funktion von Imipramin im TNF oder MNNG vermittelten Zelltod eingegangen. Imipramin diente als Agens um den Abbau der A-Smase zu induzieren. Dadurch wurde die Akkumulation von Ceramid in der Zelle verhindert, wodurch ein möglicher zentraler Mediator des TNF-induzierten Zelltodes in seiner Funktion deutlich eingeschränkt war. Dies ist wahrscheinlich der Mechanismus der Schutzwirkung von Imipramin beim TNF-induzierten Zelltod.

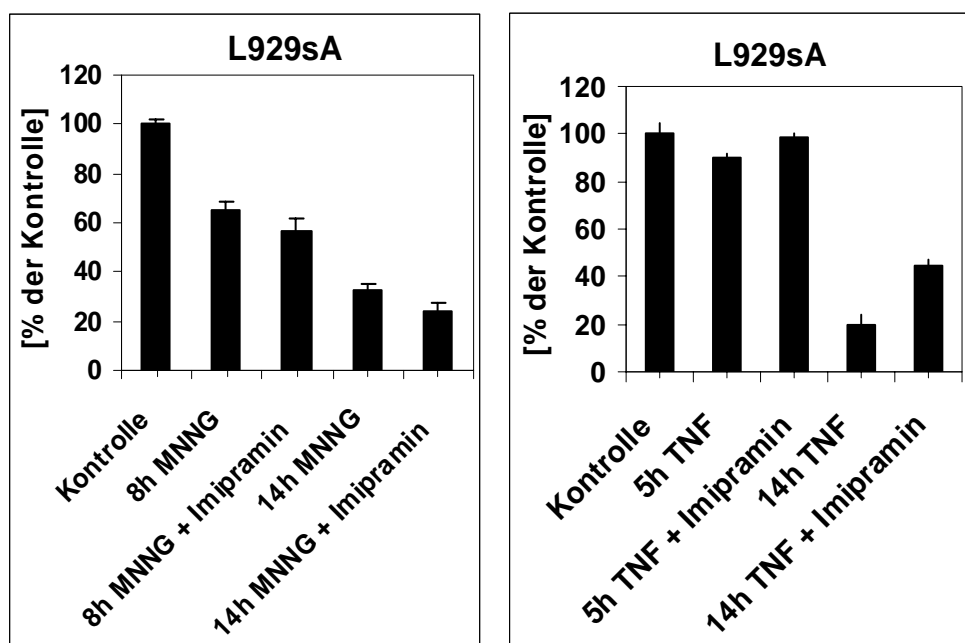


Abbildung 27: **Wirkung von Imipramin auf das Überleben von L929sA Zellen nach TNF oder MNNG Stimulation.** L929sA Zellen wurden für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und anschließend die angegebenen Zeiten inkubiert (mit oder ohne Imipramin) oder mit 100 ng TNF/ml für die angegebenen Zeiten stimuliert (mit oder ohne Imipramin) oder nicht stimuliert. Imipramin wurde mit 25 μ M die gesamte Stimulationszeit mit eingesetzt. Der Zelltod wurde mit einem Kristallviolettassay gemessen.

In Abbildung 27 ist die Wirkung von Imipramin auf die Stimulation von TNF oder MNNG zu sehen. Während Imipramin bei Kostimulation mit TNF mit zunehmender Stimulationsdauer

eine deutlichere Schutzwirkung zeigte, schien die Kostimulation bei MNNG zu einem erhöhten Zelltod zu führen.

Um die Wirkung von Imipramin genauer zu untersuchen, wurde ein weiterer Western-Blot durchgeführt. Hierbei wurden in einer Nukleuspräparation die AIF und PARP Verteilung analog zu den Experimenten aus 2.3 - 2.5 untersucht.

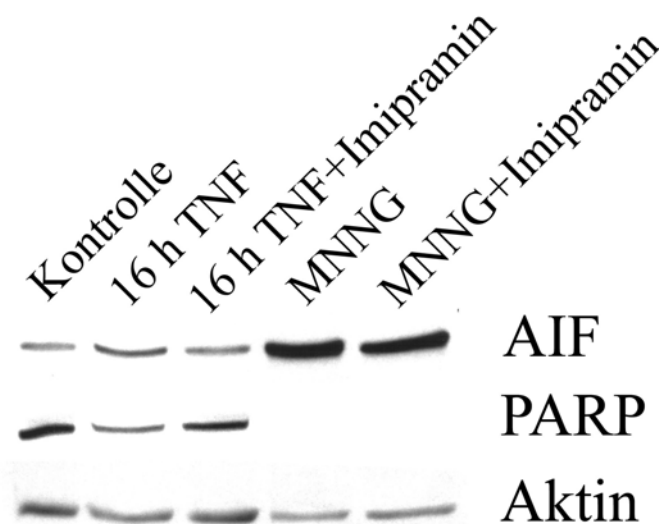


Abbildung 28: **Wirkung von Imipramin auf PARP in L929sA Zellen im Western-Blot nach TNF und MNNG Stimulation.** L929sA Zellen wurden 16 h mit 100 ng TNF/ml stimuliert (mit oder ohne Imipramin) oder 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und weitere 16 h inkubiert (mit oder ohne Imipramin) oder nicht stimuliert. Imipramin wurde mit 25 μ M eingesetzt. Die Nukleusfraktionen wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen AIF, PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Wie schon in Abbildung 13 zu erkennen, inhibierte Imipramin bei TNF Stimulation die Aktivierung von PARP und die AIF Translokation. Beides war deutlich im Western-Blot (Abbildung 28) zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigte Imipramin bei MNNG Stimulation keinen inhibitorischen Effekt. Die AIF Translokation sowie die PARP Aktivierung blieb im Vergleich zu der nur mit MNNG stimulierten Fraktion gleich.

Der Western-Blot (Abbildung 28) zeigte deutlich die unterschiedliche Wirkung von Imipramin bei TNF und MNNG Stimulation. Zusammen mit den Daten der Wirkung von 3-AB (Abbildung 13, Abbildung 15, Abbildung 17) ist ein unterschiedlicher Weg der Signaltransduktion von TNF und MNNG zur Freisetzung und Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Nukleus offensichtlich.

2.11 *Proteasom Inhibitoren führen nicht zum Schutz vor ATP-Depletion und PARP Aktivierung bei TNF und MNNG vermitteltem Zelltod*

Beschrieben wurde eine Aktivierung des PARP-abhängigen 20S Proteasoms nach TNF Stimulation (Ullrich *et al.*, 2001). Inhibition von PARP durch 3-AB führte zu einem kompletten Ausfall der Proteasom Aktivierung (Ullrich *et al.*, 2000). Die Aktivierung des 20S Proteasoms erfolgte durch ADP-Ribosylierung und scheint für die Degradierung von oxidativ geschädigten Proteinen verantwortlich zu sein (Ullrich *et al.*, 1999).

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob eine Inhibition des Proteasoms Einfluss auf die ATP-Depletion und damit den Zelltod in L929 Zellen hatte. Zusätzlich wurde die Aktivierung von PARP im Western-Blot untersucht. Als Proteasom Inhibitor wurde in diesem Versuch MG-132 eingesetzt. MG-132 ist ein spezifischer Inhibitor des 26S Proteasoms, von dem das 20S Proteasom ein Teil ist.

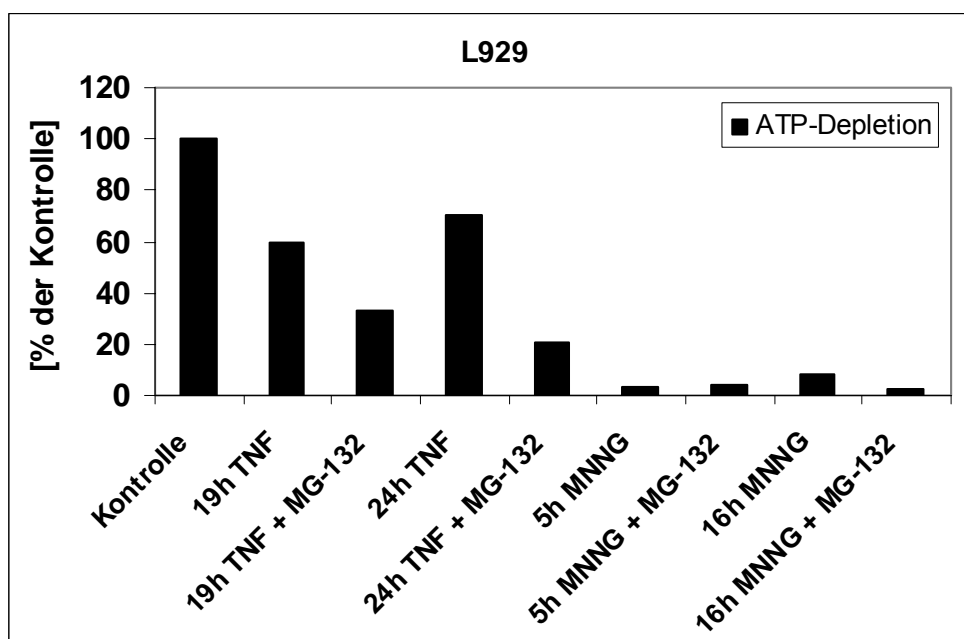


Abbildung 29: **Wirkung von MG-132 auf die ATP-Depletion in L929 Zellen.** L929 Zellen wurden die angegebenen Zeiten mit 100 ng TNF/ml stimuliert (mit oder ohne MG-132) oder mit 1 mM MNNG für 15 min und für die angegebenen Zeiten inkubiert (mit oder ohne MG-132) oder nicht stimuliert. MG-132 wurde für die gesamte Stimulationszeit mit 52,5 μ M eingesetzt.

Offensichtlich hatte die Inhibition des Proteasoms keinen Einfluss auf die ATP-Depletion und damit auf den Zelltod (Abbildung 29). Eher schien die Zugabe von MG-132 den ATP-Spiegel noch zusätzlich abzusenken. Dieser Effekt war bei TNF und MNNG Stimulation ähnlich.

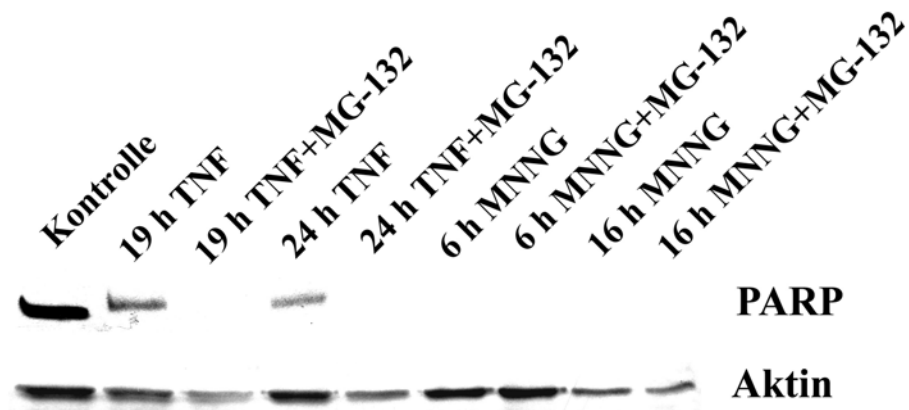


Abbildung 30: **Wirkung von MG-132 auf PARP bei L929 im Western-Blot.** L929 Zellen wurden die angegebenen Zeiten mit 100 ng TNF/ml stimuliert (mit oder ohne MG-132), mit 1 mM MNNG für 15 min stimuliert und für die angegebenen Zeiten inkubiert (mit oder ohne MG-132) oder nicht stimuliert. MG-132 wurde für die gesamte Stimulationszeit mit 52,5 μ M eingesetzt. Die Lysate wurden auf einem Western-Blot mit Antikörpern gegen PARP und β -Aktin behandelt und die Banden mit ECL nachgewiesen.

Die Inhibition des Proteasoms durch MG-132 hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung von PARP, zu erkennen an den Banden im Western-Blot (Abbildung 30). MG-132 könnte eher einen zusätzlich aktivierenden Einfluss auf PARP haben.

3 Die Rolle von reaktiven Sauerstoffintermediaten im TNF-induzierten Zelltod

Eine weitere Möglichkeit des Caspase-unabhängigen Zelltodes sind die durch TNF Einfluss auf die Atmungskette im Mitochondrium hervorgerufenen reaktiven Sauerstoffintermediate. Diese hochreaktiven Stoffe oxidieren Proteine in der Zelle und führen zum Zelltod. Es wurde beschrieben, dass TNF diese Radikalbildung auslösen kann (Goossens *et al.*, 1995; Boone *et al.*, 2000).

Um diese Möglichkeit des Zelltodes in den L929 Zelllinien ebenfalls zu betrachten, wurden FACS Messungen der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten und Kristallviolett-färbungen zur Messung des Zelltodes an unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt.

3.1 Untersuchungen zur Protektion der Radikalfänger BHA und BHT vor TNF-induziertem Zelltod

Um sich vor den reaktiven Sauerstoffintermediaten zu schützen, gibt es in der Zelle Schutzproteine und Enzyme. Um diesen protektiven Effekt zu verstärken, können in das umgebende Medium der Zellen synthetische Radikalfänger zugegeben werden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Stoffe sind BHA (3-tert-Butyl-4-hydroxyanisol) und BHT (Tert-Butylhydroxytoluen). Beide Stoffe sind einander chemisch sehr ähnlich.

Die Schutzwirkung von BHA oder BHT auf den TNF oder TNF/zVAD induzierten Zelltod wurde in den drei L929 Zelllinien sowie in den murinen NIH3T3 Zellen und den humanen Jurkat und Jurkat FADD defizienten Zelllinien gemessen.

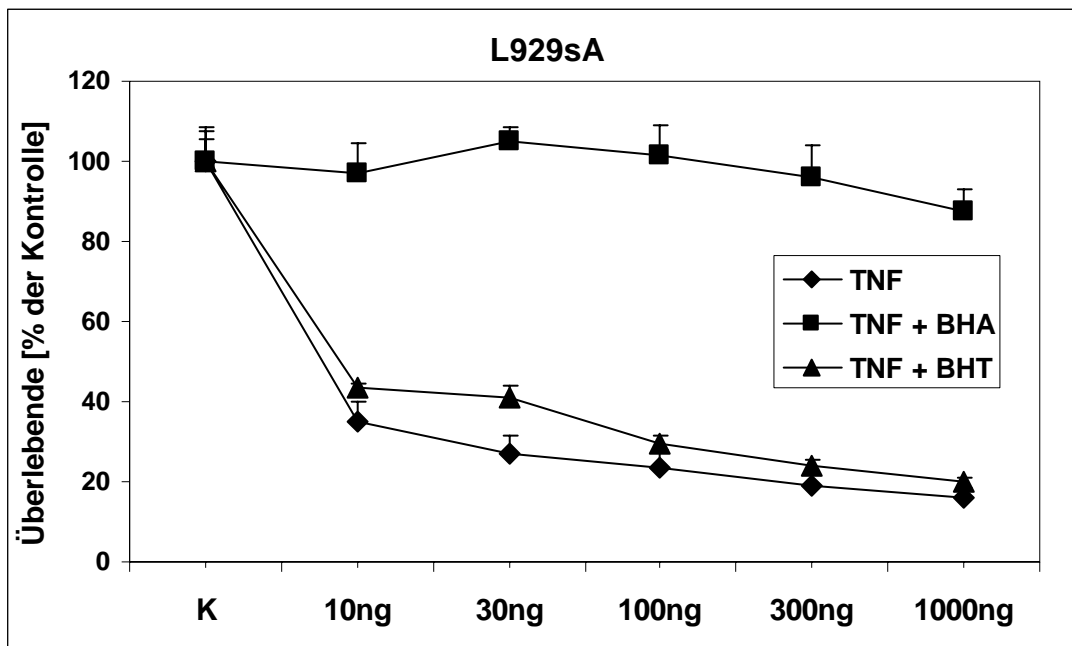


Abbildung 31: Zytotoxizitätsassay L929sA mit TNF + BHA/BHT Dosiskinetik. L929sA Zellen wurden für 16 h mit den angegebenen Mengen TNF/ml inkubiert oder nicht stimuliert (K). BHA und BHT wurden mit 150 μ M in die Versuche eingesetzt.

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, schützte BHA L929sA Zellen vor TNF-induziertem Zelltod, während BHT keinerlei Schutzwirkung zeigte.

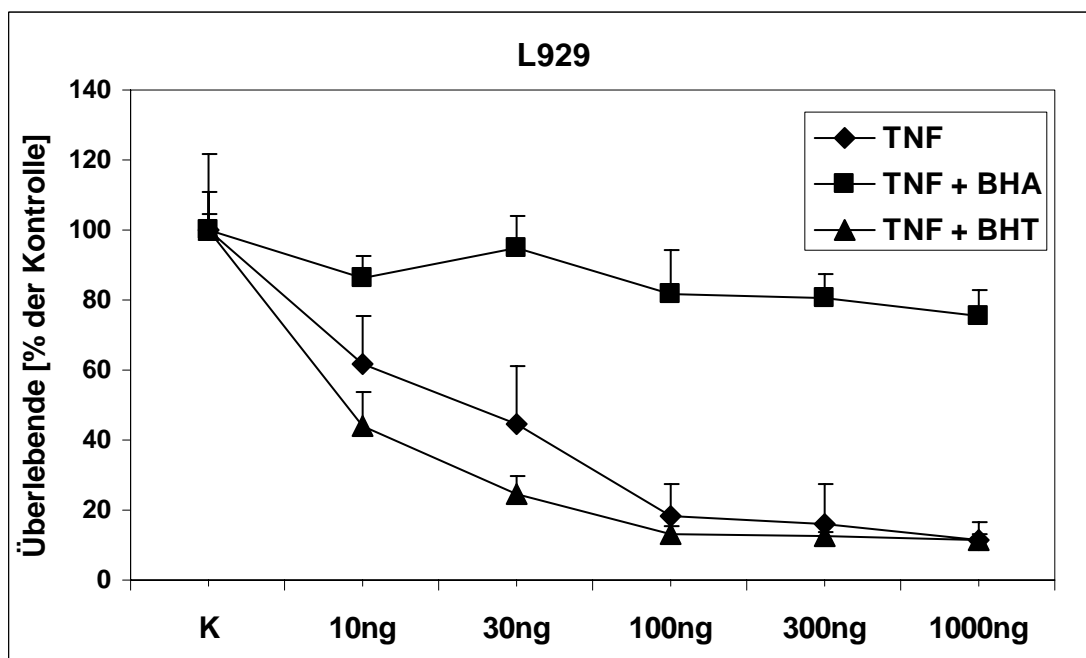


Abbildung 32: Zytotoxizitätsassay L929 mit TNF + BHA/BHT Dosiskinetik. L929 Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen Mengen TNF/ml inkubiert oder nicht stimuliert (K). BHA und BHT wurden mit 150 μ M in die Versuche eingesetzt.

Wie in Abbildung 32 deutlich zu erkennen ist, schützte BHA L929 Zellen vor TNF-induziertem Zelltod, während BHT keinerlei protektiven Einfluss hat.

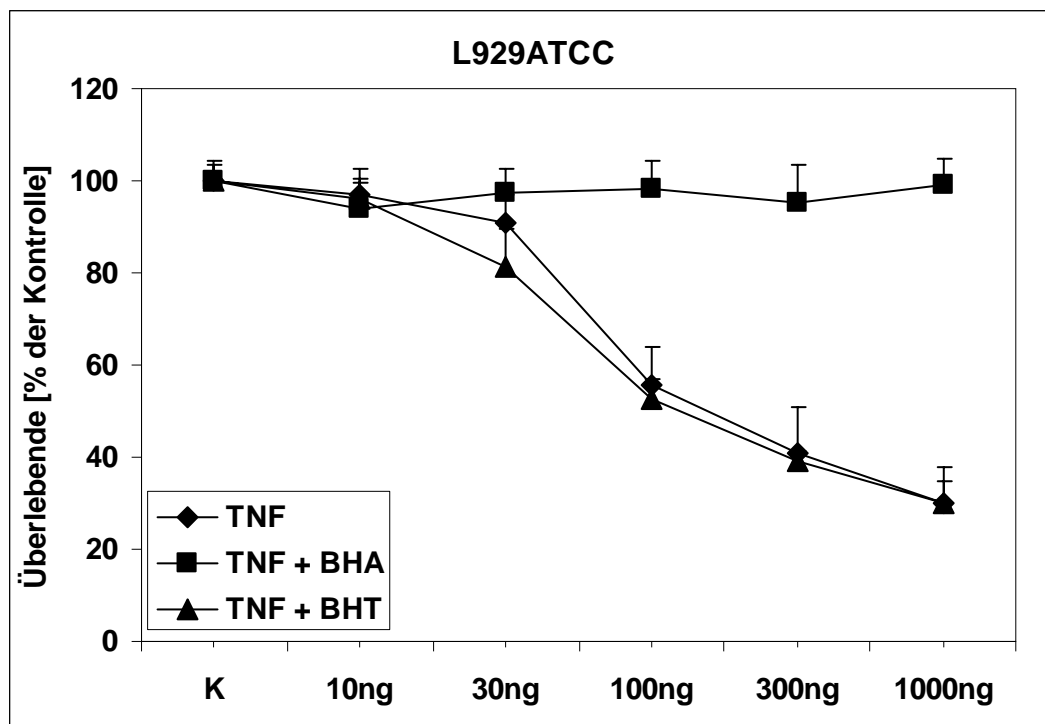


Abbildung 33: **Zytotoxizitätsassay L929ATCC mit TNF +BHA/BHT Dosiskinetik.** L929ATCC Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen Mengen TNF/ml inkubiert oder nicht stimuliert (K). BHA und BHT wurden mit 150µM in die Versuche eingesetzt.

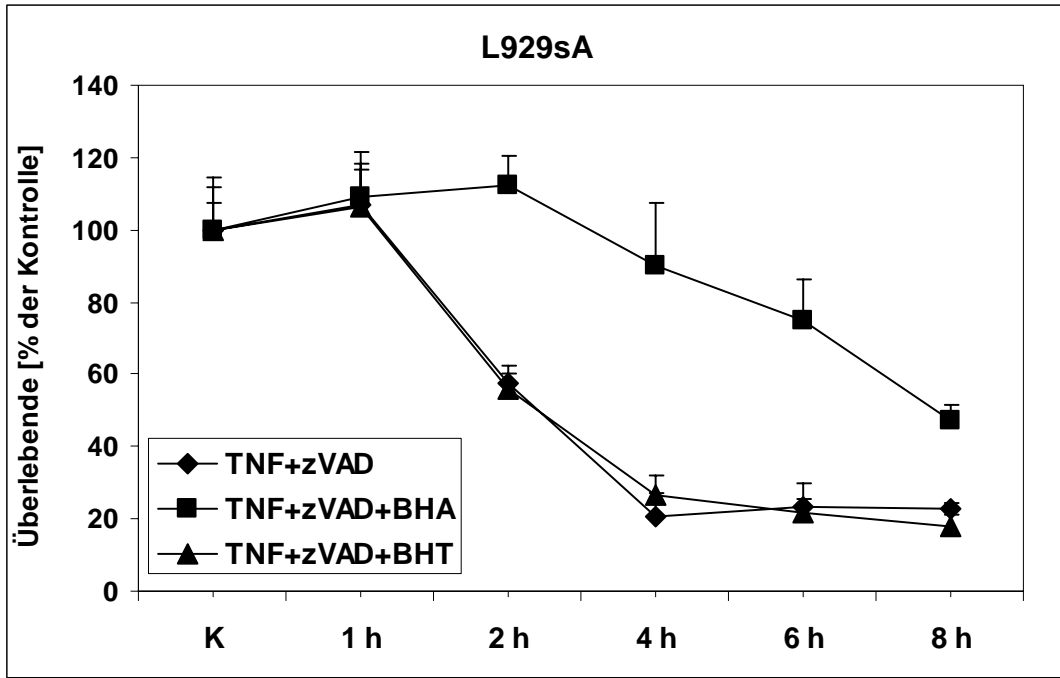
Wie in Abbildung 33 für L929ATCC Zellen zu sehen ist, schützte auch hier BHA vor TNF-induziertem Zelltod. Insgesamt zeigten alle drei untersuchten L929 Zelllinien mit BHA die beschriebene protektive Wirkung bei Stimulation mit TNF. Diese Zelllinien waren durch BHA in der untersuchten Zeit und der eingesetzten Zytokinmenge komplett vor dem TNF-induzierten Zelltod geschützt.

BHT hatte in keiner L929 Zelllinie eine schützende Wirkung.

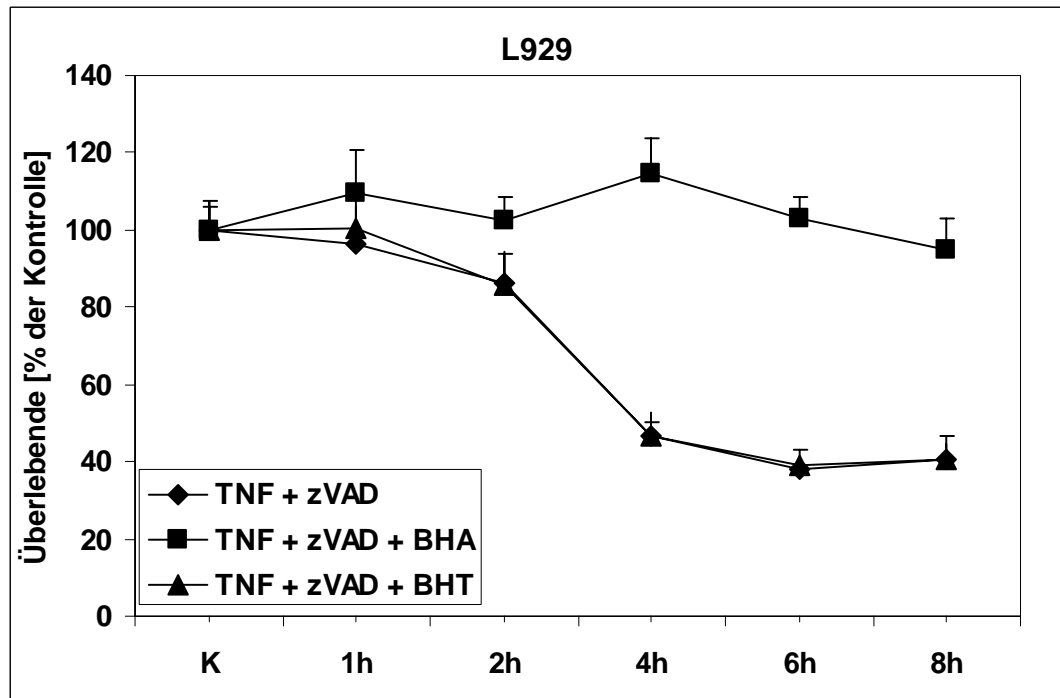
Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit Literaturdaten, in denen ein Schutz vor TNF-induziertem Zelltod durch BHA beschrieben wurde (Brekke *et al.*, 1992; Goossens *et al.*, 1995; Los *et al.*, 2002). BHT hatte in den in der Literatur untersuchten Systemen keinen (Brekke *et al.*, 1994) bis wenig Effekt (Goossens *et al.*, 1995).

Diese Versuche wurden zusätzlich in einer Zeitkinetik mit dem Pan-Caspase Inhibitor zVAD wiederholt. Auch für diese Versuche wurden alle drei L929 Zelllinien eingesetzt.

A



B



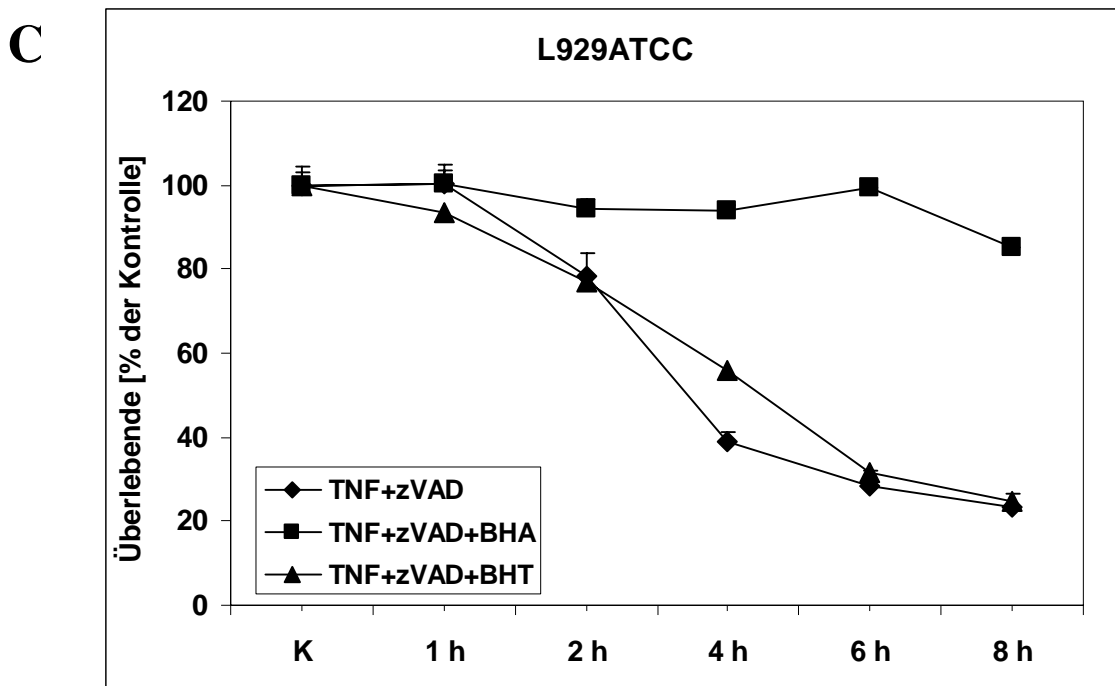


Abbildung 34: **Zytotoxizitätsassay L929sA, L929 und L929ATCC Zellen mit TNF/zVAD + BHA/BHT Zeitkinetik.** L929sA, L929 oder L929ATCC Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng TNF/ml und 50 μ M zVAD stimuliert. Die Kontrolle (K) wurde für 8 h mit zVAD inkubiert. BHA und BHT wurden mit 150 μ M in die Versuche eingesetzt.

Wie in Abbildung 34A-C zu sehen ist, konnten alle drei L929 Zelllinien vor einem TNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod ebenfalls durch BHA geschützt werden.

Um auszuschließen, dass diese Protektion nur ein Artefakt dieser Zelllinien war, wurden weitere Versuche in anderen Zelllinien durchgeführt.

Eine zusätzliche untersuchte Zelllinie war die murine Fibroblasten Zelllinie NIH3T3. Diese Zelllinie wurde mit TNF (mit oder ohne BHA) und TNF/zVAD (mit oder ohne BHA) stimuliert.

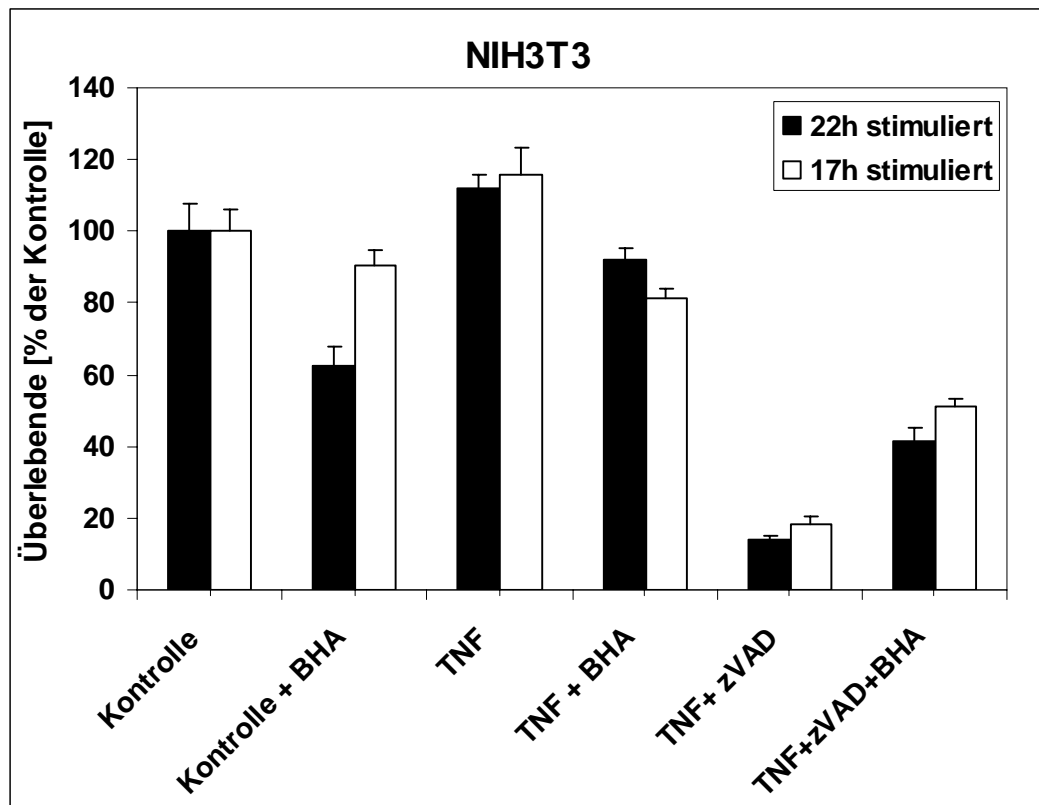


Abbildung 35: **Zytotoxizitätsassay NIH3T3 mit TNF + BHA oder TNF/zVAD + BHA.** NIH3T3 Zellen wurden für 22 h oder 17 h mit 100 ng TNF/ml (mit oder ohne BHA) oder für 22 h oder 17 h mit 100 ng TNF/ml und 50 μ M zVAD inkubiert (mit oder ohne BHA). Die Kontrolle wurde nicht stimuliert oder für 22 h oder 17 h mit BHA inkubiert. BHA und BHT wurden mit 150 μ M in die Versuche eingesetzt.

NIH3T3 Zellen konnten durch Kostimulation mit BHA vor dem TNF/zVAD induzierten Zelltod geschützt werden (Abbildung 35). Der Schutz bei Kostimulation mit TNF war nicht sichtbar, da BHA allein für diese Zellen über die Stimulationszeit toxisch wirkte.

Als zweite weitere Zelllinie wurden Jurkat Zellen untersucht. Zunächst die Jurkat Wildtyp Zellen. Um einen Caspase-unabhängigen Zelltod bei Jurkat Wildtyp Zellen zu induzieren, war eine Kombination aus TNF/CHX/zVAD nötig.

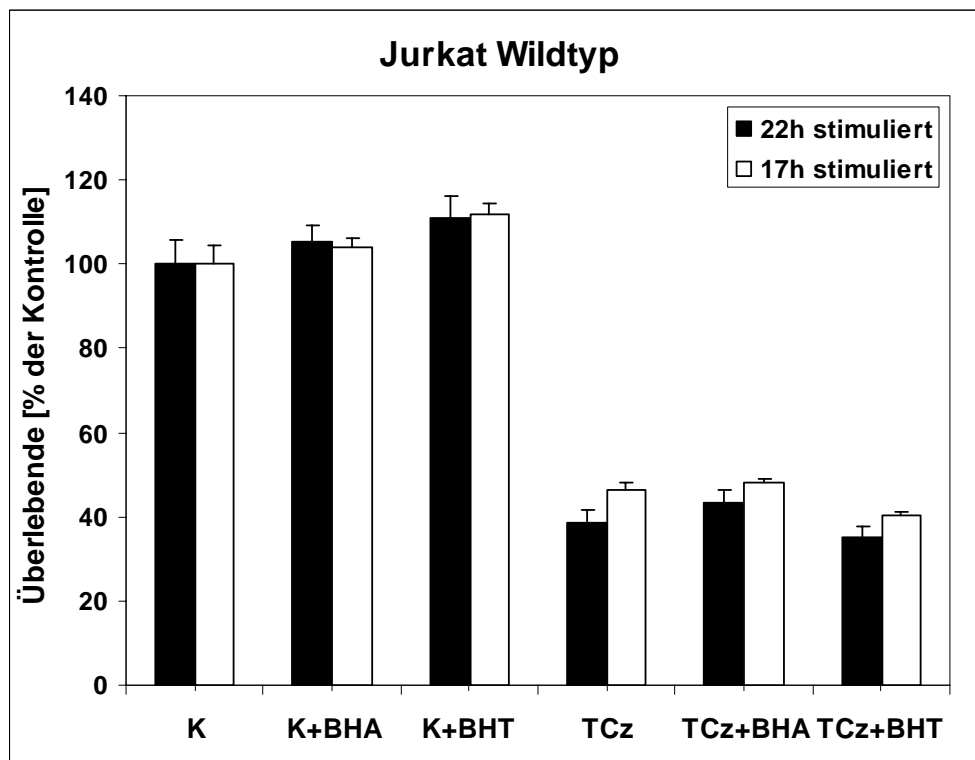


Abbildung 36: **Zytotoxizitätsassay Jurkat Wildtyp mit TNF/CHX/zVAD + BHA oder BHT.** Jurkat Wildtyp Zellen wurden für 22 h oder 17 h mit 100 ng TNF/ml (T), 5 µg CHX/ml (C) und 50 µM zVAD (z) inkubiert. Kontrollzellen wurden nicht stimuliert (K) oder mit BHA (K+BHA) oder BHT (K+BHT) stimuliert. BHA und BHT wurden mit 150 µM in die Versuche eingesetzt.

Überraschenderweise war weder BHA noch BHT in der Lage Jurkat Wildtyp Zellen vor einem Caspase-unabhängigen Zelltod zu schützen (Abbildung 36).

Um ein Artefakt durch die Stimulation mit TNF/CHX/zVAD auszuschließen, wurde der gleiche Versuch mit Jurkat FADD defizienten Zellen wiederholt. Bei den FADD defizienten Zellen wird kein funktionsfähiges FADD Protein mehr exprimiert, was die Signaltransduktion durch Todesrezeptoren unterbindet. Zur Auslösung eines Caspase-unabhängigen Zelltodes ist daher bei dieser Zelllinie die Stimulation mit TNF ausreichend.

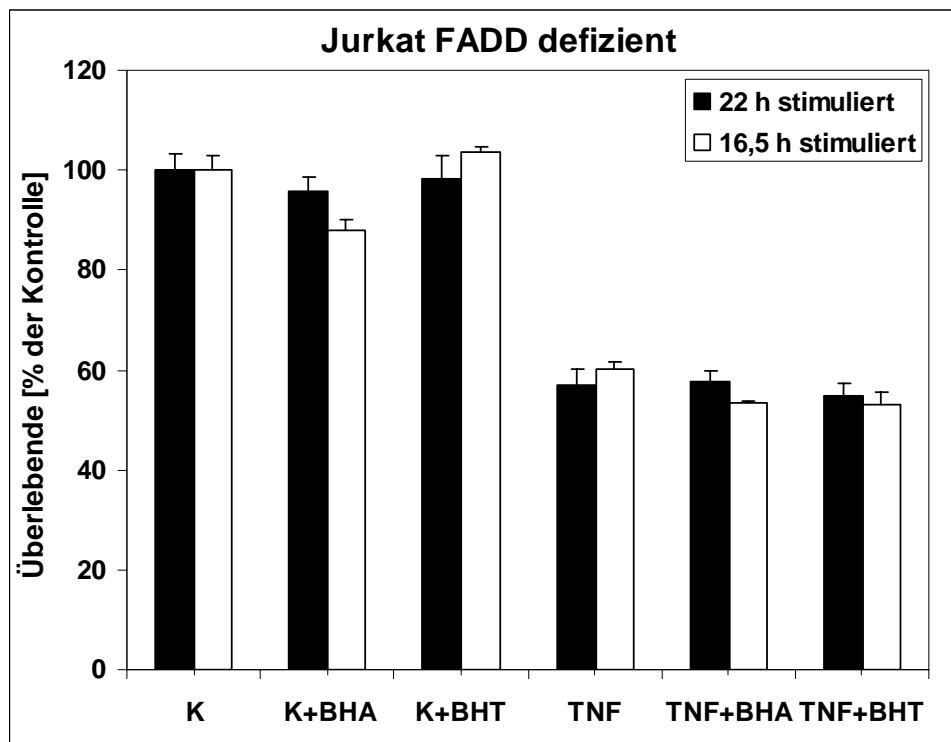


Abbildung 37: **Zytotoxizitätsassay Jurkat FADD defiziente Zellen mit TNF + BHA oder BHT.** Jurkat FADD defiziente Zellen wurden für 22 h oder 16,5 h mit 100 ng TNF/ml inkubiert (mit oder ohne BHA oder BHT). Kontrollzellen wurden nicht stimuliert (K) oder für 22 h oder 16,5 h mit BHA (K+BHA) oder BHT (K+BHT) stimuliert. BHA und BHT wurden mit 150 μ M in die Versuche eingesetzt.

Auch die Jurkat FADD defizienten Zellen (Abbildung 37) konnten wie die Jurkat Wildtyp Zellen nicht durch BHA oder BHT vor einem Caspase-unabhängigen Zelltod geschützt werden.

Durch diese Experimente ist in Frage gestellt, dass der gezeigte Schutz von L929 Zelllinien vor TNF-induziertem Zelltod durch BHA auf einem Schutz vor reaktiven Sauerstoffintermediaten beruht. Wie später (Abbildung 38 und Abbildung 39) gezeigt, können BHA und BHT reaktive Sauerstoffintermediate abfangen.

Sollte TNF in allen Zelllinien zur Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten führen, so hätte die Wirkung von BHA auch bei den Jurkat Zellen zum Schutz vor Zelltod führen müssen. Führt TNF aber nicht zur Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten, so könnte der Schutz von BHA in L929 und NIH3T3 Zelllinien auch auf eine andere Wirkungsweise zurückzuführen sein und nicht auf den Schutz vor reaktiven Sauerstoffintermediaten.

Bei beiden Varianten blieb die Frage offen, warum strukturell so ähnliche Reagenzien wie BHA und BHT nicht gleich oder ähnlich reagierten.

Um diese Fragen zu klären, bedurfte es des direkten Nachweises von reaktiven Sauerstoffintermediaten nach entsprechenden Stimuli in den untersuchten Zelllinien.

3.2 Messung von reaktiven Sauerstoffintermediaten mit DHR 123 im FACS

Zur Messung der Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten wurde Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) benutzt. DHR 123 ist ein selektiver Mitochondrienfarbstoff, der vor allem durch H_2O_2 in Anwesenheit von Peroxidase, Cytochrom c oder Fe^{2+} zum fluoreszierenden Farbstoff oxidiert wird.

Die Messung erfolgte wie beschrieben im FACS. Die FACS Daten wurden aufbereitet und die Durchschnittswerte wurden in eine Tabelle eingetragen und gegen die mit DHR 123 behandelte Kontrolle (Kontrolle + DHR 123) verglichen. Das relative Verhältnis der Fluoreszenz im Vergleich zur Negativ- (Kontrolle ohne DHR 123, Kontrolle) und Positivkontrolle (Kontrolle + DHR 123) wurde als Maß für die Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten gewertet.

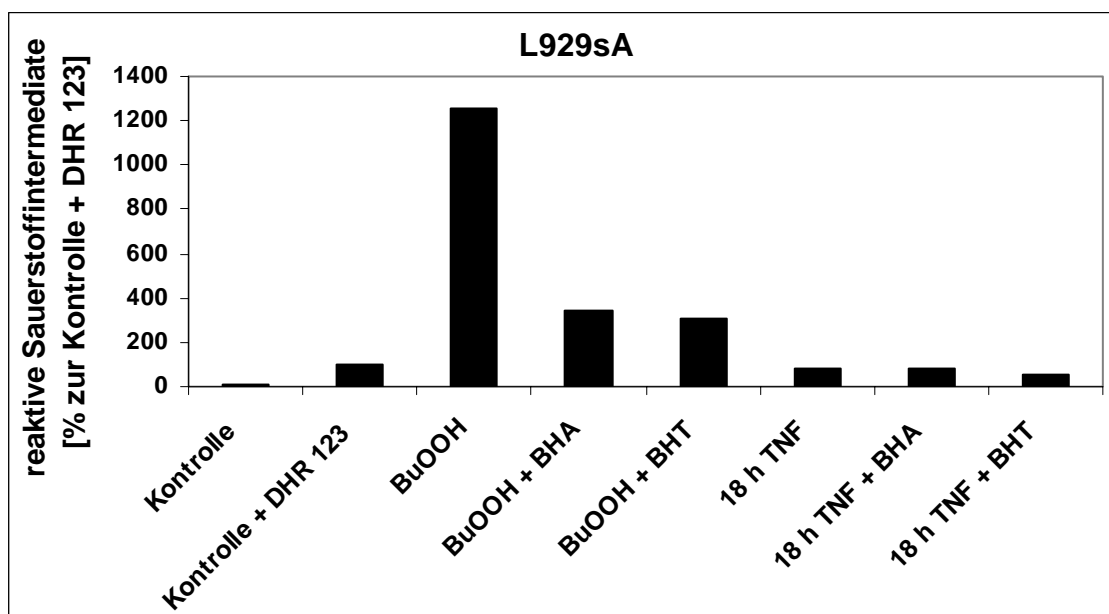


Abbildung 38: **FACS Messung der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in L929sA.** L929sA Zellen wurden mit 1 mM BuOOH für 1 h stimuliert (allein oder mit BHA oder BHT) oder mit 100 ng TNF/ml für 18 h (allein oder mit BHA oder BHT) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). BHA und BHT wurden mit 150 μM die gesamte Stimulationszeit eingesetzt. 1 h vor Ende der Inkubation wurde in jede Probe (außer Kontrolle) 1 μM DHR 123 zugegeben. Im FACS wurden 10.000 Ereignisse in Fluoreszenz 1 betrachtet und die Durchschnittswerte dargestellt.

Wie die L929sA Zellen (Abbildung 38), so zeigten auch die L929 und L929ATCC Zelllinien ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Durch den starken Induktor der reaktiven Sauerstoffintermediaten tert-Butyl hydroperoxide (BuOOH) war ein bedeutender Anstieg der reaktiven Sauerstoffintermediate induzierbar. Durch die beiden Radikalfänger BHA und BHT war es möglich diese Radikalbildung zumindest teilweise zu unterdrücken. Obwohl BHT keine Protektion vor TNF-induziertem Zelltod bot, schützte es doch vor der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten. TNF induzierte keine reaktiven Sauerstoffintermediate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit DHR 123 (Kontrolle + DHR 123). Eine Wirkung von BHA oder BHT war bei Stimulation mit TNF nicht zu erkennen.

Um diese Messungen abzusichern, wurden als weitere Zelllinie die Jurkat Wildtyp Zellen betrachtet und die selben Stimuli wie bei den L929sA eingesetzt.

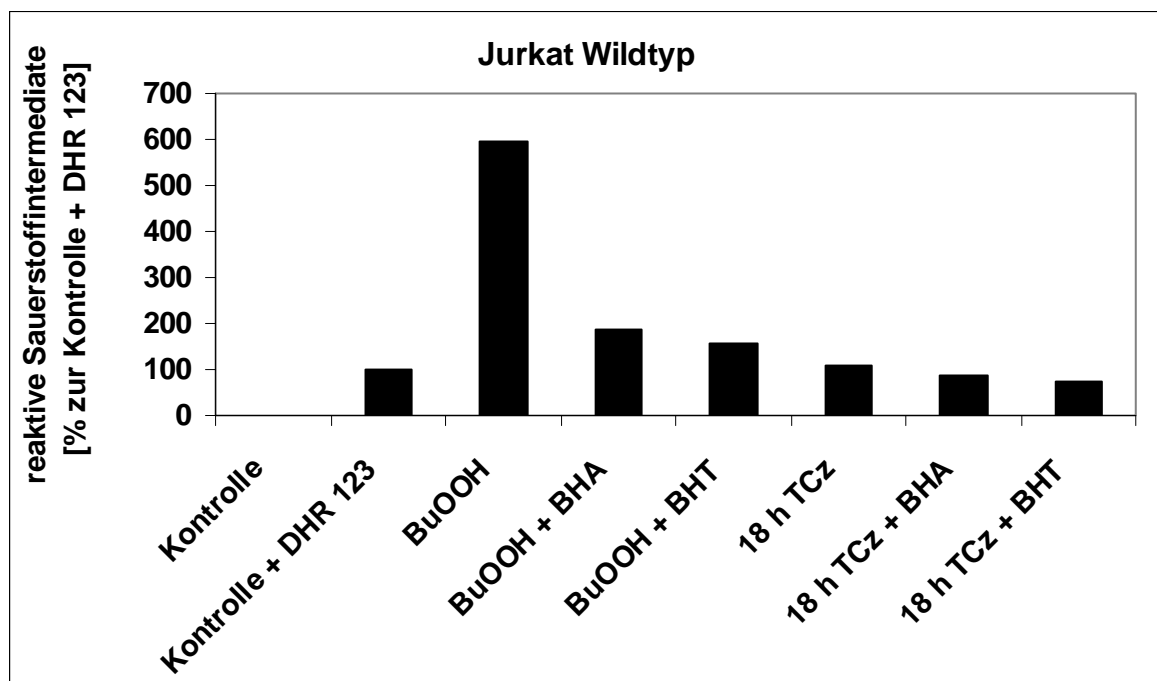


Abbildung 39: **FACS Messung der Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in Jurkat Wildtyp Zellen.** Jurkat Wildtyp Zellen wurden mit 1 mM BuOOH für 1 h stimuliert (allein oder mit BHA oder BHT) oder mit 100 ng TNF/ml (T), 5 µg CHX/ml (C) und 50 µM zVAD (z) für 18 h (allein oder mit BHA oder BHT) oder unstimuliert gelassen (Kontrolle). BHA und BHT wurden mit 150 µM die gesamte Stimulationszeit eingesetzt. 1 h vor Ende der Inkubation wurde in jede Probe (außer Kontrolle) 1 µM DHR 123 zugegeben. Im FACS wurden 10.000 Ereignisse in Fluoreszenz 1 betrachtet und die Durchschnittswerte dargestellt.

Wie für die L929sA (Abbildung 38) so waren sowohl BHA als auch BHT in der Lage den durch BuOOH in den Jurkat Wildtyp Zellen induzierten Level an reaktiven Sauerstoffintermediaten effektiv zu erniedrigen (Abbildung 39). Und auch in den Jurkat Wildtyp Zellen war

TNF in Kombination mit CHX und zVAD kein Induktor von reaktiven Sauerstoffintermediaten.

Hier zeigte sich, dass der Schutz von L929 und NIH3T3 Zelllinien vor TNF-induziertem Zelltod wahrscheinlich nicht auf einem Schutz vor reaktiven Sauerstoffintermediaten durch BHA beruhte, sondern vermutlich auf einer unspezifischen Schutzwirkung innerhalb der Zelle.

4 Generierung von TNF resistenten FE65like überexprimierenden L929 Zellen

Beschrieben wurde ein FE65like Protein, das durch Überexpression in Zellen gegen TNF-induzierten Zelltod Resistenz bietet (Cao *et al.*, 2000). Die DNA dieses Proteins (GenBank Accession No. AF133665) wurde stabil in den Labor L929 Zellen überexprimiert.

Von den erhaltenen FE65like Protein überexprimierenden Klonen (10 unterschiedliche Klone) wurde Klon 4 exemplarisch herausgegriffen und dargestellt.

Um die beschriebene Funktion des überexprimierten Proteins zu überprüfen, wurden zunächst Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Dazu wurde eine TNF Stimulationsreihe mit ansteigenden Mengen TNF und unterschiedlichen Zeiten angesetzt.

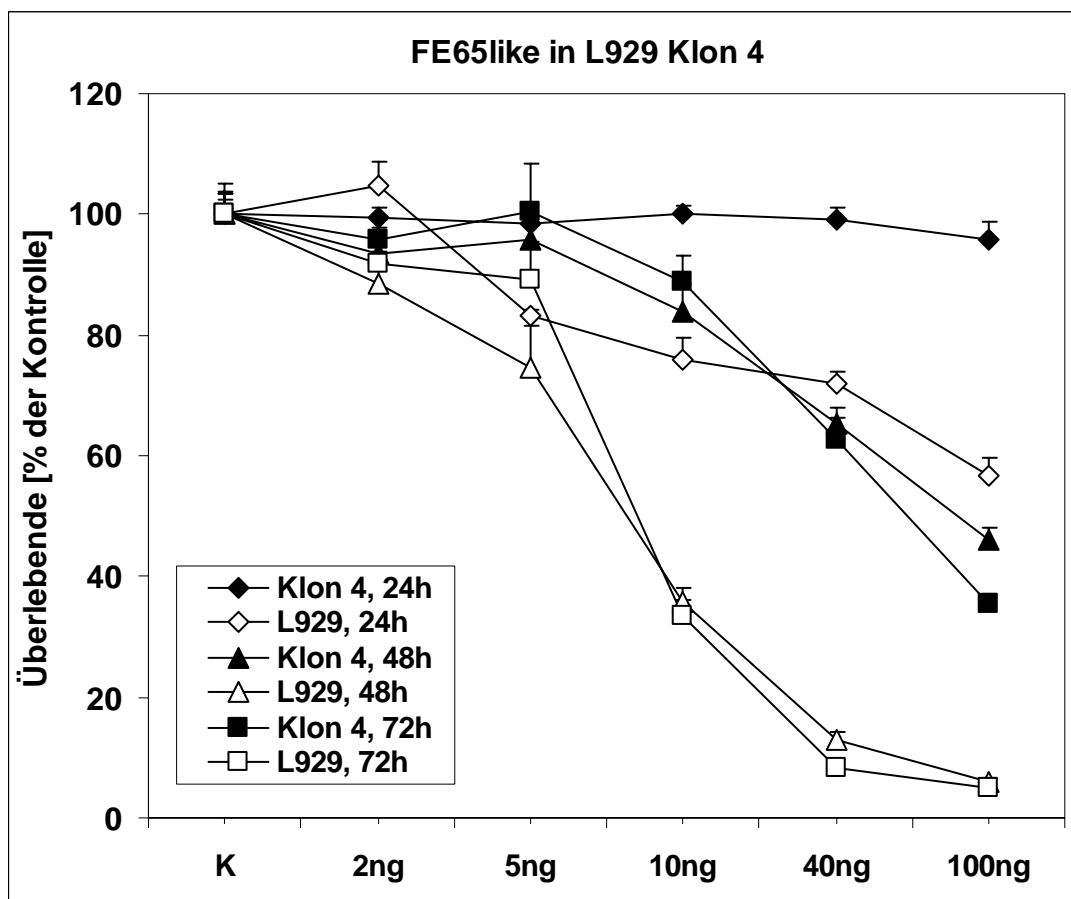


Abbildung 40: **Zytotoxizitätsassay FE65like in L929 Klon 4 nach TNF Stimulation.** FE65like in L929 Klon 4 Zellen oder L929 Zellen wurden mit den angegebenen Mengen TNF/ml für die angegebenen Zeiten stimuliert. Anschließend wurde ein Kristallviolett Zytotoxizitätsassay durchgeführt.

Deutlich zu erkennen war die stark erhöhte Resistenz des Klon 4 im Vergleich zu den L929 Zellen gegenüber TNF. Selbst nach 72 h Inkubation mit 100 ng TNF/ml lebten noch etwa 40 % der FE65like überexprimierenden Zellen.

In zwei weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied in der Resistenz von FE65like überexprimierenden Zellen gegen Caspase-abhängigen oder Caspase-unabhängigen Zelltod gab. Dazu wurden die FE65like überexprimierenden Zellen für einen Caspase-abhängigen Zelltod mit TNF/CHX und für die Untersuchung des Caspase-unabhängigen Zelltodes mit TNF/zVAD inkubiert.

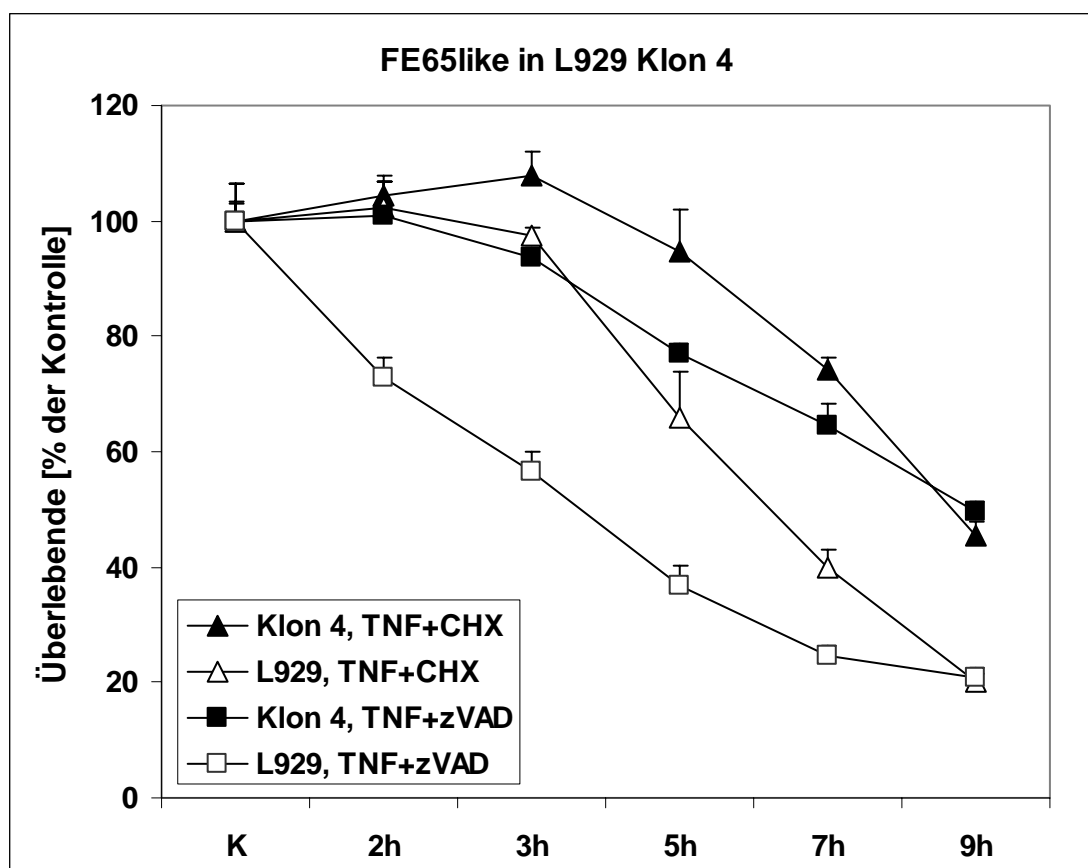


Abbildung 41: Zytotoxizitätsassay FE65like in L929 Klon 4 nach TNF/zVAD oder TNF/CHX Zeitkinetik. FE65like in L929 Klon 4 Zellen oder L929 Zellen wurden mit 100 ng TNF/ml und 5 µg CHX/ml oder mit 100 ng TNF/ml und 50 µM zVAD für die angegebenen Zeiten stimuliert. Anschließend wurde ein Kristallviolett Zytotoxizitätsassay durchgeführt.

Auch bei diesen beiden unterschiedlichen Stimulationsarten zeigten sich die FE65like in L929 Klon 4 Zellen deutlich resistenter gegenüber den normalen Labor L929 Zellen.

Um zeigen zu können, dass FE65 spezifisch vor einem TNF-induzierten Zelltod schützt, wurde eine MNNG Stimulation durchgeführt, die wie weiter oben ausgeführt, die Induktion des Zelltodes auf einen anderen Weg einleitet.

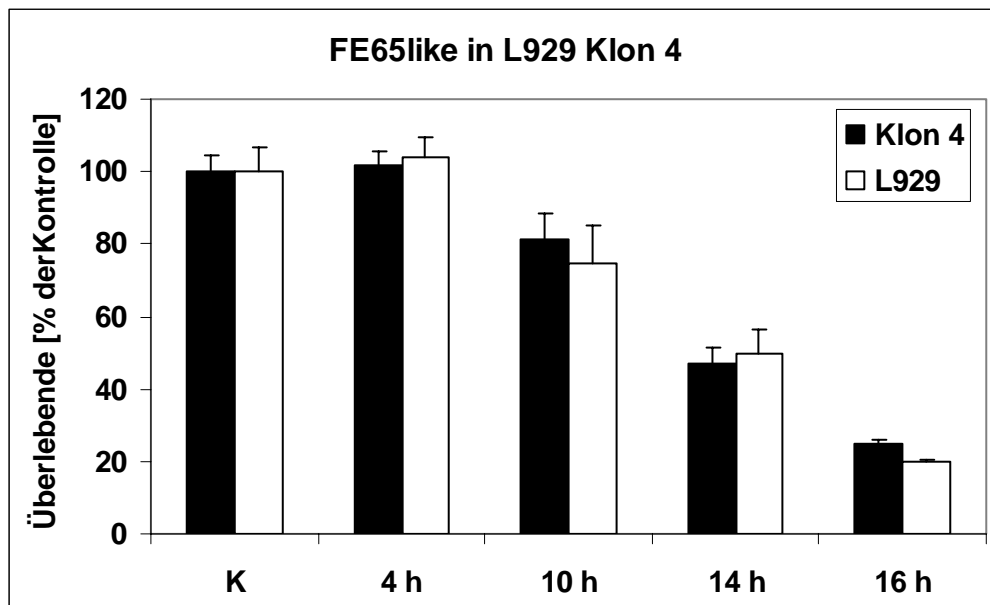


Abbildung 42: **Zytotoxizitätsassay FE65like in L929 Klon 4 nach MNNG Stimulation.** FE65like in L929 Klon 4 Zellen oder L929 Zellen wurden für 15 min mit 1 mM MNNG stimuliert und die angegebenen Zeiten inkubiert oder unstimuliert gelassen (K). Anschließend wurde ein Kristallviolett Zytotoxizitätsassay durchgeführt.

Die Schutzwirkung von FE65like Protein schien auf den TNF-induzierten Zelltod begrenzt zu sein, da gegenüber einer MNNG Stimulation (Abbildung 42) keinerlei Protektion gemessen werden konnte.

Aufgrund der Möglichkeit L929 Zellen durch den Radikalfänger BHA vor Ceramid-vermittelten TNF-induziertem Zelltod zu schützen, wurden diese Versuche in den FE65like Protein überexprimierenden Zellen ebenfalls durchgeführt. Die Frage war, ob sich die Schutzwirkung des FE65like Proteins mit der Schutzwirkung von BHA addiert.

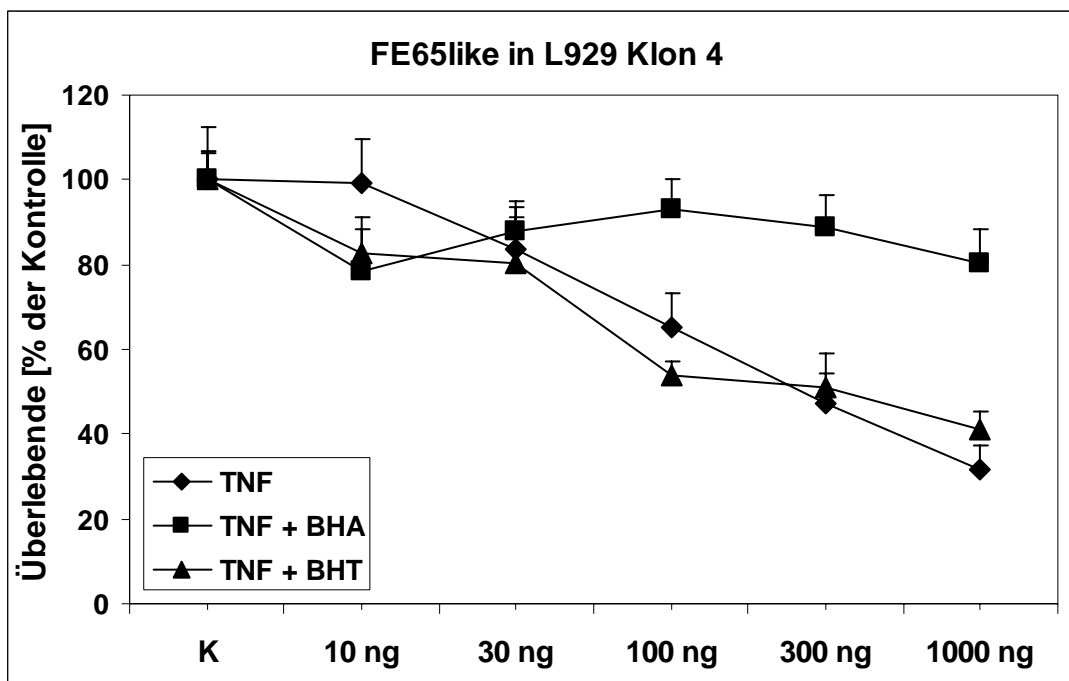


Abbildung 43: Zytotoxizitätsassay FE65like in L929 Klon 4 nach TNF Stimulation und BHA oder BHT Schutzwirkung. FE65like in L929 Klon 4 Zellen wurden mit den angegebenen Mengen TNF/ml für 48 h Zeiten stimuliert. BHA und BHT wurden mit jeweils 150 μ M eingesetzt. Anschließend wurde ein Kristallviolett Zytotoxizitätsassay durchgeführt.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, konnten auch die FE65like Protein überexprimierenden Zellen durch BHA noch weiter vor TNF geschützt werden. Eine Addition der Schutzwirkung war somit möglich.

Die weiteren FE65like in L929 Zellen überexprimierenden Klone waren ähnlich resistent wie der gezeigte FE65like in L929 Klon 4.

Die Überexpression von FE65like Protein ist eine Möglichkeit Zellen gegenüber TNF sehr resistent werden zu lassen. Der Mechanismus dieser Resistenz bedarf aber noch weitere Untersuchungen. Auch sind keine weiteren Literaturdaten außerhalb der Erstbeschreibung (Cao *et al.*, 2000) und einer Vorgängerarbeit vom gleichen Autor (Cao *et al.*, 1996) bekannt.

DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle Mitochondrien im Ceramid-vermittelten TNF-induzierten programmierten Zelltod spielen. Bekannt war, dass Ceramid ein wichtiger Faktor im TNF-induzierten programmierten Zelltod ist, da u.a. sein vermehrter Abbau zum erhöhten Schutz vor TNF führt (Strelow *et al.*, 2000). Da auch nachgewiesen wurde, dass Ceramid Wirkung auf Mitochondrien entfaltet, u.a. durch Induktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997) nach Störung der Elektronentransportkette am Komplex III (Gudz *et al.*, 1997), sollte dieser Einfluss in dem L929 Zellsystem charakterisiert werden.

Dazu wurde zunächst die Cytochrom c-Freisetzung untersucht, um diesen bekannten Caspase-aktivierenden Faktor zu charakterisieren. Da unbekannt war, wie sich dieser Faktor im L929 Zellsystem verhält, wurde als Positivkontrolle das HeLa Zellsystem etabliert, da hier die zur Freisetzung von Cytochrom c führenden Stimuli bekannt und publiziert sind.

1 Untersuchungen zur Signaltransduktion von Cytochrom c

1.1 Freisetzung von Cytochrom c in HeLa Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HeLa Zellen auf UV-Bestrahlung oder MNNG Stimulation mit Cytochrom c-Freisetzung reagierten und somit den klassischen apoptotischen Signalweg einschlugen, bei dem im späteren Verlauf Caspasen aktiviert werden und PARP-Spaltung eintritt. Die Cytochrom c-Freisetzung erfolgte jedoch nicht nach TNF Stimulation. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Literaturdaten, in denen nach TNF Stimulation bei HeLa Zellen keine Cytochrom c-Freisetzung eingeleitet wird, sondern eher proliferative Signale aktiviert werden (Ferry *et al.*, 2002). Allerdings wurden auch gegensätzliche Ergebnisse von anderen Gruppen publiziert, in denen gezeigt wurde, dass TNF Stimulation zur Cytochrom c-Freisetzung in HeLa Zellen führt (Tafani *et al.*, 2002; Shchepina *et al.*, 2002).

Eine andere Gruppe konnte mit TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), einem anderen Stimulus aus der TNF-Superfamilie, eine Cytochrom c-Freisetzung und damit Apoptose auslösen (charakterisiert durch PARP-Spaltung, Caspase-3/-7 Aktivierung, Phosphatidylserin Externalisierung) (Harper *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse decken sich mit publizierten Daten, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass HeLa Zellen nach UV Bestrahlung mit Apoptose und

damit mit Cytochrom c-Freisetzung reagierten. Diese Art der Freisetzung konnte ebenfalls nach MNNG Stimulation gezeigt werden, so dass diese Ergebnisse durch Kontrolle mit der UV-Bestrahlung glaubwürdig erschienen.

Warum die Freisetzung von Cytochrom c von unterschiedlichen Gruppen auf unterschiedliche Weise gezeigt werden konnte, bleibt offen. In dieser Arbeit konnte jedoch anhand der beschriebenen Positivkontrollen gezeigt werden, dass HeLa Zellen auf Stimulation mit TNF oder MNNG in Hinblick auf eine Cytochrom c-Freisetzung eine differenzierte Antwort zeigten.

1.2 Freisetzung von Cytochrom c in L929 Zellen

Die Ergebnisse der vorgestellten Experimente zeigten, dass im Gegensatz zu vielen anderen Zellsystemen in L929 Zellen die Cytochrom c-Freisetzung im TNF-induzierten Ceramid-vermittelten programmierten Zelltod keine Rolle spielt. Während die als Positivkontrolle eingesetzten NIH3T3 Zellen nach TNF/CHX Stimulation im LSM eine Cytochrom c-Freisetzung zeigten, konnte bei L929 Zellen diese Freisetzung nicht beobachtet werden. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse im Western-Blot zeigte die gleichen Ergebnisse: Die Stimuli, die bei HeLa zu Cytochrom c-Freisetzung im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz führten (Positivkontrollen), führten zu keiner Cytochrom c-Freisetzung in L929 Zelllinien. Auch eine Stimulation mit MNNG zeigte keine Cytochrom c-Freisetzung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit publizierten Daten, in denen der TNF-induzierte Zelltod ohne Cytochrom c-Freisetzung stattfinden kann (Vancompernelle *et al.*, 2000), also in Übereinstimmung mit der Caspase-unabhängigen Natur des Ceramid-vermittelten TNF-induzierten Zelltodes ist.

Die Cytochrom c-Freisetzung bleibt jedoch in anderen Zellsystemen bei den meisten Autoren der entscheidende Schritt bei der Caspase Aktivierung und der Einleitung des Zelltodes (Luo *et al.*, 1998; Shchepina *et al.*, 2002; Munoz-Pinedo *et al.*, 2003).

Die Freisetzung von Cytochrom c in L929 Zellen kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit keine Rolle im TNF-induzierten Zelltod spielen.

2 Untersuchungen zur Signaltransduktion von AIF in HeLa Zellen

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob die AIF-Translokation wichtig für den TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Zelltod ist. Auch hier sollten die HeLa Zellen wieder als Positivkontrolle dienen, indem versucht wurde die Freisetzung von Cytochrom c und AIF voneinander abzugrenzen. Gezeigt werden konnte, dass AIF im Gegensatz zu Cytochrom c in HeLa Zellen nicht bei den Stimuli UV-Bestrahlung, mehrstündige TNF und MNNG Stimulation freigesetzt wurde.

Dass AIF nicht immer unter den gleichen Bedingungen wie Cytochrom c freigesetzt wird, wurde von Arnoult *et al.* (Arnoult *et al.*, 2003a) an isolierten Nuklei und Zellen gezeigt, die bei Stimulation mit pro-apoptotischen Bcl-2 Familien Mitgliedern nur Cytochrom c und keine AIF-Freisetzung zeigten. Es gibt also einen Unterschied in den Signalwegen, die zum Zelltod führen. Die Mitochondrien sind in der Lage je nach „Bedarf“ die entsprechenden Proteine zu entlassen (Springs *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Ruchalski *et al.*, 2003).

In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HeLa Zellen Cytochrom c oder AIF gezielt und voneinander unabhängig aus den Mitochondrien freisetzen können.

3 Untersuchungen zur Signaltransduktion von AIF in L929 Zellen

Nachdem TNF in HeLa Zellen nicht zur Translokation von AIF in den Nukleus führte, musste ein anderer sicherer und beschriebener Stimulus gefunden werden, der eine AIF-Freisetzung aus den Mitochondrien und Translokation in den Nukleus bewirken konnte, um diesen Stimulus mit TNF vergleichen zu können.

In der Literatur war bisher wenig beschrieben, wie TNF AIF-Freisetzung induzieren kann. Es wurde aber für kultivierte HCAEC (*human coronary artery endothelial cells*) Zellen eine Freisetzung und Translokation von AIF nach TNF Stimulation nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2003). Erkenntnisse über L929 Zelllinien lagen bisher nicht vor.

Yu *et al.* konnten zeigen, dass MNNG durch DNA Alkylierung eine starke PARP Aktivierung anregt und über NAD^+ - und ATP-Depletion in Konsequenz zur AIF-Freisetzung und Translokation in den Zellkern führt (Yu *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in dieser Arbeit für L929 Zelllinien der Mechanismus der MNNG-induzierten AIF Translokation als Positivkontrolle genau nachvollzogen werden. MNNG Stimulation führte innerhalb von 30 min zu einer starken Aktivierung von PARP und weiter zum Verlust von zellulärem NAD^+ und als Konsequenz zum Absinken des ATP-Spiegels in der Zelle. Dieses führte zur Freisetzung und Translokation von AIF. Wie in dieser Arbeit für L929 Zelllinien, konnten Yu *et al.*

an Maus Embryonal-Fibroblasten zeigen, dass Inhibitoren der PARP Aktivierung (z.B. 3-Aminobenzamid, 3-AB) die MNNG-induzierte AIF Translokation ebenso wie die Zytotoxizität oder die Erniedrigung des ATP-Spiegels deutlich verringern konnten. Andere Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass MNNG Stimulation zu einer PARP Aktivierung und zum NAD⁺ Verbrauch führt (Pogrebniak *et al.*, 2003; Ying *et al.*, 2003) und ein damit verbundenes Absinken des ATP-Spiegels zur AIF-Freisetzung ausreichen könnte (Gorman *et al.*, 2000; Daugas *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002).

Die Versuche mit MNNG dienten dazu, die notwendigen Assays und Nachweissysteme zu etablieren, um sie nachfolgend bei der Untersuchung von TNF anwenden zu können.

3.1 Nachweis der AIF Translokation in L929 Zelllinien durch Immunfluoreszenz

Der Nachweis der AIF Translokation aus den Mitochondrien in den Nukleus erschien nach Literaturstudium mit Hilfe des LSM am einfachsten nachweisbar, weshalb mit dieser Methode zunächst begonnen wurde.

So wie die AIF Translokation beschrieben war (Loeffler *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2002b) konnte im Laser-Scanning-Mikroskop bei allen drei hier untersuchten Antikörpern gegen AIF kein eindeutiger Beleg zur Translokation in den Nukleus gefunden werden. Es konnte jedoch eine Translokation an den Rand des Zellkerns gezeigt werden. Diese Translokation war für die Positivkontrolle MNNG und für die Stimulation mit TNF erkennbar. Hierbei konnte allerdings nicht unterschieden werden, ob diese Translokation in oder an den Zellkern erfolgte. Dass es nicht möglich war, in dieser Arbeit einen eindeutigen bildlichen Nachweis für eine direkte Translokation von AIF in den Zellkern zu zeigen, kann aber auch an der Überexpression von AIF (Loeffler *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2003b) in anderen Arbeiten liegen und dessen daher möglicherweise artifiziellen bildlichen Nachweis oder im Benutzen eines polyklonalen Antikörpers, der gegen ein Gemenge aus 3 unterschiedlichen Peptiden gewonnen wurde (Susin *et al.*, 1999; Daugas *et al.*, 2000; Joza *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2002b). Alle in der Literatur eindeutigen bildlichen Daten zur Translokation von AIF wurden auf die beiden vorgestellten Weisen gewonnen. Die Spezifität des oben beschriebenen polyklonalen AIF-Antikörpers wurde bei Arnoult *et al.* (Arnoult *et al.*, 2002b) getestet und zeigte schon in der Kontrolle eine deutliche Färbung von AIF im Kern, die nach Stimulation nicht überzeugend weiter gesteigert werden konnte. Dadurch muss die als Tatsache dargestellte direkte Translokation von AIF in den Zellkern in Frage gestellt werden. Generell war unklar, ob AIF

zur Induktion seiner propagierten Funktionen direkt in den Zellkern transloziert oder ob nicht wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Translokation an die Kernperipherie (innen oder außen) dafür ausreichend wäre.

Die in dieser Arbeit mit zwei monoklonalen und einem polyklonalen Antikörper erzielten Ergebnisse unterstützen diese Interpretation. Ebenfalls zeigten alle drei Antikörper keine Hintergrundfärbung im Kern und eine gleiche Verteilung von AIF, so dass von einer richtigen Darstellung ausgegangen werden konnte: AIF transloziert nach Stimulation mit TNF und MNNG aus den Mitochondrien an die Kernperipherie.

3.2 Nachweis der AIF Translokation in L929 Zelllinien durch Western-Blot

Die Translokation von AIF an die Kernperipherie reicht aus, um die Ergebnisse aus den Western-Blots zu erklären. Selbst wenn AIF nur an die Kernperipherie transloziert, so wird AIF während der Nukleuspräparation trotzdem in der entsprechenden Fraktion angereichert und später dargestellt.

Die Stimulationen, die zur Freisetzung von AIF in L929 Zelllinien führten, lassen sich in 2 Kategorien einteilen: zum einen der beschriebene AIF Translokation auslösende Stimulus MNNG und der in L929 Zelllinien Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod auslösende Faktor TNF.

Die Experimente der MNNG Stimulation bei L929 Zelllinien konnten die vorherigen erwähnten Arbeiten bestätigen und erweitern sie zum Teil. So konnte gezeigt werden, dass eine Induktion des Abbaus der A-SMase (und eine dadurch bedingte Verringerung der Ceramid Akkumulation) durch Imipramin keinen Einfluss auf die PARP Aktivierung und die AIF Translokation durch MNNG hatte. Ebenso hatte Imipramin keinerlei protektiven Einfluss auf die durch MNNG-induzierte Zytotoxizität. Das bedeutet, dass Ceramid und die damit verbundenen Enzyme den Zelltod über andere Signalkaskaden induzieren als MNNG.

Der Signalweg der TNF-induzierten Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien und die Translokation in den Nukleus war vom Signalweg der MNNG-induzierten Translokation grundlegend unterschiedlich.

Gezeigt werden konnte eine Abhängigkeit der AIF Translokation von der verwendeten L929 Zelllinie und dem zu TNF eingesetzten Kostimulus. Während TNF/CHX keine AIF Translokation auslöste, konnte dies für TNF/zVAD oder TNF allein gezeigt werden.

So ist die PARP Spaltung in ein 89 kDa (siehe Abbildung 12) und 25 kDa (hier nicht gezeigt) Fragment als Zeichen von Apoptose (Los *et al.*, 2002) nach Stimulation mit TNF/CHX sichtbar. Wie erwartet war diese Art der Caspase Aktivierung unabhängig von der Blockade der PARP Aktivierung durch 3-AB. Diese Kontrolle für die prinzipielle Möglichkeit in L929 Zelllinien Caspasen zu aktivieren konnte in allen drei untersuchten L929 Zelllinien immer gezeigt werden. Dieser Stimulus führte nie zu einer AIF-Freisetzung. Auch die Zytotoxizität und der ATP Gehalt in der Zelle waren mit und ohne 3-AB gleich.

Bei der Caspase-unabhängigen Stimulation mit TNF/zVAD zeigte sich bei der sensitiven Zelllinie L929sA eine deutliche Translokation von AIF. Obwohl zumindest für HeLa Zellen eine Beobachtung gegen die Freisetzung von AIF nach Stimulation mit TNF/zVAD sprach (Arnoult *et al.*, 2003b), konnten doch andere Autoren (in T-Lymphocyten und Neuronen) eine Caspase-unabhängige Freisetzung von AIF zeigen (Dumont *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003). Diese Art der AIF-Freisetzung scheint also sehr Zelllinien spezifisch zu sein.

In den L929 und L929ATCC Zellen konnte die Translokation von AIF nach TNF/zVAD Stimulation für 5 h dagegen noch nicht nachgewiesen werden, obwohl alle drei Zelllinien einen ähnlichen Level bei der Messung von Zelltod und ATP-Gehalt hatten. Dies könnte an der stark erhöhten Sensitivität der L929sA Zellen gegenüber TNF liegen.

Bei einem Vergleich der Stimulationen von TNF/CHX und TNF/zVAD bei L929sA Zellen war auffällig, dass, obwohl beide Stimuli einen ähnlichen Level bei der Zytotoxizität und dem ATP-Spiegel aufweisen, nur TNF/zVAD Stimulation zu AIF-Freisetzung führte. Dass deutet darauf hin, dass der durch beide Stimuli massiv ausgelöste Zelltod nicht automatisch zur AIF Translokation führte, sondern dass trotz der relativ späten Translokation dafür ein geordneter (programmierter) Prozess verantwortlich sein könnte.

Nach einer kurzen (5 h) Stimulation mit TNF allein zeigten sich noch keine Unterschiede zwischen den drei L929 Zelllinien. In keiner der Zelllinien konnte eine AIF-Freisetzung oder PARP Aktivierung beobachtet werden. Auch waren keine Unterschiede beim ATP-Gehalt in der Zelle oder bei der Zytotoxizität mit oder ohne 3-AB messbar.

Erst nach einer längeren TNF Stimulation (16 h) in den L929sA Zellen konnte eine deutliche AIF Translokation festgestellt werden; diese war unabhängig von 3-AB und damit von PARP. Wurde Imipramin zusammen mit TNF als Stimulus eingesetzt, konnte die PARP Aktivierung und die AIF Translokation noch deutlich stärker reduziert werden. Auch die Zytotoxizität war

deutlich erniedrigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ceramid im TNF Signalweg „oberhalb“ der PARP Aktivierung und AIF Translokation eingeordnet werden muss.

Diese Wirkung von Imipramin stellte somit den deutlichen Unterschied zwischen TNF und MNNG-induziertem Zelltod klar heraus.

Die längeren TNF Stimulationen bei L929 und L929ATCC Zellen zeigten prinzipiell ein einheitliches Bild. AIF Translokation war mit einem erhöhten Zelltod und erniedrigten ATP-Spiegel gekoppelt. 3-AB zeigte bei diesen Stimulationen niemals eine Schutzwirkung.

In der Zusammenfassung der Signaltransduktion von TNF und MNNG-induzierter Zytotoxizität durch AIF Translokation aus den Mitochondrien in den Nukleus (wie gezeigt in Abbildung 44) zeigte sich prinzipiell der wichtige Einfluss von PARP bei der MNNG Stimulation und der von Ceramid (durch den Einfluss von Imipramin) bei der TNF Stimulation.

AIF scheint ein Mediator der späten Phasen des Zelltodes zu sein, zu Zeiten, an denen das Schicksal der Zelle schon feststehen muss. Während die L929sA Zellen schon nach 17 h AIF Translokation zeigten, trat dieser Effekt bei den L929 und L929ATCC Zellen erst nach 24 h bzw. 48 h deutlich auf. Zu diesem Zeitpunkten hatten alle drei Zelllinien einen ähnlichen Level an Zelltod erreicht.

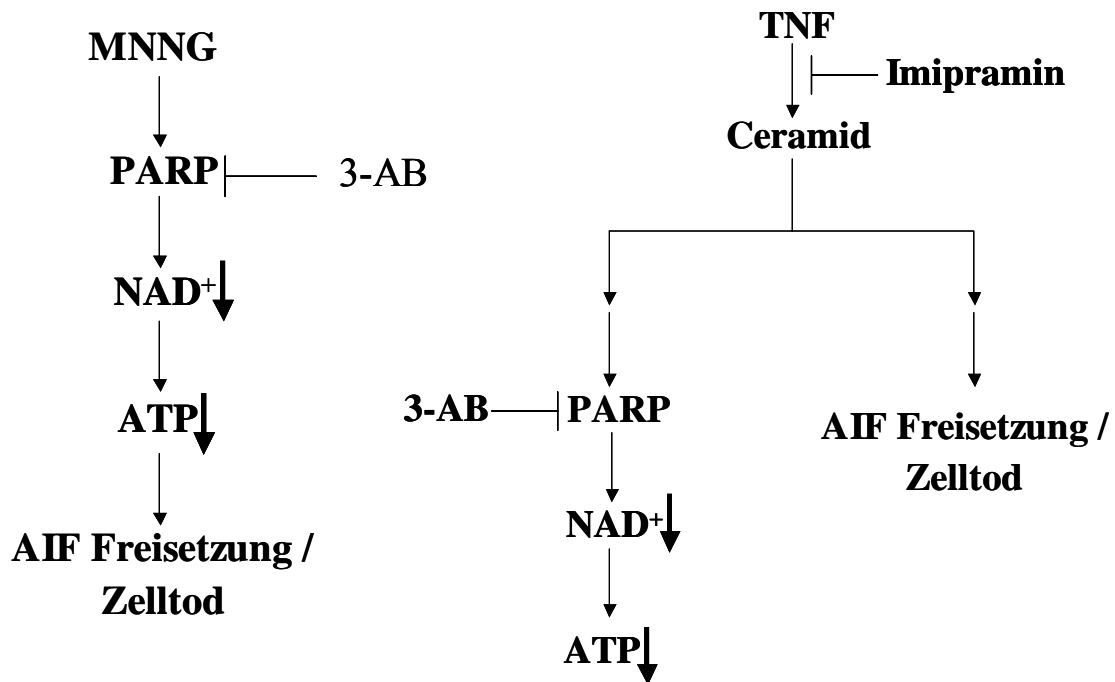


Abbildung 44: **Modelle der AIF Signaltransduktion nach TNF und MNNG Stimulation.** Das Modell der Freisetzung von AIF nach MNNG Stimulation basiert auf den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen und den bekannten Literaturdaten (Yu *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2003). Das hypothetische Modell der AIF Translokation nach TNF Stimulation wurde allein nach den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen aufgestellt.

4 Die Rolle von reaktiven Sauerstoffintermediaten im TNF vermittelten Zelltod

In Übereinstimmung mit vielen anderen Autoren konnte die protektive Wirkung des Radikalfängers BHA vor dem TNF oder TNF/zVAD induzierten Zelltod in L929 Zelllinien gezeigt werden (Brekke *et al.*, 1992; Brekke *et al.*, 1994; Goossens *et al.*, 1995; Lidbury *et al.*, 1995; Vercammen *et al.*, 1998a; Los *et al.*, 2002). In allen drei untersuchten L929 Zelllinien konnte BHA die Zellen vor TNF allein oder in Verbindung mit zVAD protektieren. Bei NIH3T3 Zellen wirkte TNF alleine nicht toxisch, daher wurde in Kombination mit BHA kein Schutz, sondern eher eine geringe Toxizität (bedingt durch BHA alleine) beobachtet. Bei der Stimulation mit TNF/zVAD konnte ein protektiver Einfluss nachgewiesen werden, wie er bereits vorher beschrieben wurde (Lüschen *et al.*, 2000).

Allerdings zeigten die gleichen Stimuli bei Jurkat Zellen (bei Jurkat Wildtyp Zellen wie bei Jurkat FADD defizienten Zellen) keinen Schutz vor einem Caspase-unabhängigem Zelltod. Ebenfalls in Übereinstimmung mit anderen Autoren konnte eine Schutzwirkung von BHT nicht nachgewiesen werden (Brekke *et al.*, 1992; Brekke *et al.*, 1994). Auffallend im Hinblick

auf die weiteren Ergebnisse war, dass BHT in kaum anderen Untersuchungen als den oben zitierten eingesetzt wurde.

Allerdings konnte im Gegensatz zu vielen der oben erwähnten Autoren in FACS Analysen keine Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten nach der Stimulation mit TNF mit oder ohne Kostimulation mit BHA oder BHT nachgewiesen werden, obwohl die Positivkontrolle BuOOH immer einwandfrei funktionierte und einen vergleichbaren Anstieg wie in den zitierten Arbeiten der reaktiven Sauerstoffintermediate anzeigte. Andere Autoren zeigten nur einen geringen Anstieg der reaktiven Sauerstoffintermediate nach TNF Stimulation, der aber für eine Induktion von Zelltod ausreichen soll (Goossens *et al.*, 1995).

Einen wichtigen Hinweis für die Interpretation der Zytotoxizitätsassays lieferten die FACS Untersuchungen. In den FACS Analysen zeigte sich bei der Kostimulation des Sauerstoffradikalinduktors BuOOH mit BHA oder BHT für beide Radikalfänger die gleiche reduzierende Wirkung.

Das bedeutete für die Zytotoxizitätsassays, dass der Grund für die Schutzwirkung von BHA in dem L929 Zellsystem nicht die Protektion vor reaktiven Sauerstoffintermediaten sein konnte, da sonst entweder BHT ebenfalls vor TNF-induziertem Zelltod schützen müsste oder aber BHT nicht die durch BuOOH induzierten reaktiven Sauerstoffintermediate neutralisieren dürfte. Für die Rolle der reaktiven Sauerstoffintermediate in diesem Zellsystem bedeutet das, dass sie als Ursache des TNF-induziertem Ceramid-vermittelten Zelltodes keine Rolle spielen können. Da BHA Jurkat Zellen nicht schützen kann, ist dieses ein starker Beleg dafür, dass reaktive Sauerstoffintermediate für den TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod nicht essentiell sein können.

Die Auswertung beider Versuchsfelder dieser Arbeit zum TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod in L929 Zellen zeigte, dass weder der mitochondriale Faktor AIF noch die Induktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten eine ursächliche Wirkung zum Auslösen des Zelltodes haben konnten.

L929 Zelllinien aktivieren nach TNF Stimulation keine Caspasen, so dass zur Ausführung und Signaltransduktion des Zelltodes noch weitere Faktoren (abseits von Caspasen, AIF und Reaktiven Sauerstoffintermediaten) nötig erscheinen. Dabei ist der generelle Mediator des TNF-induzierten Zelltodes Ceramid ein wichtiger Faktor. Auch muss die Untersuchung auf weitere mitochondriale Faktoren, auf das Endoplasmatische Reticulum sowie auf neue Schutzproteine wie FE65like ausgeweitet werden.

5 FE65like als Mediator des TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Zelltodes?

Durch Cao *et al.* (Cao *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2000) wurde beschrieben, dass der C-Terminus eines FE65like Proteins eine TNF-induzierte Zytotoxizität blockieren kann. Dieses FE65like Protein (GenBank Accession No. AF133665) beinhaltet (im Gegensatz zum bekannten FE65, das aus 4 Proteindomänen besteht) nur 2 Proteindomänen: einer PTB Domäne (*phosphotyrosine-binding domain*), die eine mögliche Bindung an APP (*Amyloid precursor protein*) vermittelt, und einer TR2_L Domäne, die eine TNF-induzierte Zytotoxizität blockieren konnte.

5'	GAC	GAC	ACC	CAC	APG	GAG	GAC	TGG	CCT	TGG	GIG	AAC	ATG	AAC	GTG	GCC	GAC	GCC	18	54
	D	D	T	H	K	E	D	W	P	S	V	N	M	N	V	A	D	A		
	ACT	GIG	ACT	GTC	AIC	AGT	GAA	AAG	AAT	GAA	GAG	GAG	GTC	TIG	GTG	GAG	TGT	CGA	36	108
	T	V	T	V	I	S	E	K	N	E	E	E	V	L	V	E	C	R		
	GTG	CGG	TTC	CTG	TCC	TTC	ATG	GGT	GTC	GGG	AAG	GAT	GTC	CAC	ACA	TTC	GCC	TTC	54	162
	V	R	F	L	S	F	M	G	V	G	K	D	V	H	T	F	A	F		
	ATC	ATG	GAC	ACT	GGG	AAC	CAG	CGC	TTT	GAG	TGC	CAT	GTG	TTC	TGG	TGT	GAG	CCT	72	216
	I	M	D	T	G	N	Q	R	F	E	C	H	V	F	W	C	E	P		
	AAC	GCA	GCC	AAT	GIG	TCA	GAA	GCT	GTC	CAG	GCT	GCC	TGC	ATG	TTG	CGG	TAT	CAG	90	270
	N	A	A	N	V	S	E	A	V	Q	A	A	C	M	L	R	Y	Q		
	AAG	TGC	TTG	GTT	GCC	AGG	CCA	CCT	TGG	CAG	AAA	GTC	CGG	CCC	CCG	CCC	CCG	CCA	108	324
	K	C	L	V	A	R	P	P	S	Q	K	V	R	P	P	P	P	P		
	GCA	GAT	TCA	GIG	ACC	CGA	AGA	GTC	ACG	ACC	AAC	CGG	AAA	CGA	GGG	GTC	TTA	TCC	126	378
	A	D	S	V	T	R	R	V	T	T	N	A	K	R	G	V	L	S		
	CTC	ATT	GAC	ACT	TTG	AAA	CAG	AAG	CGG	CCG	GTC	ACA	GAG	ACT	CCC	TAG	cag	ccc	141	432
	L	I	D	T	L	K	Q	K	R	P	V	T	E	T	P	*				

Abbildung 45: **DNA- und Aminosäure-Sequenz des FE65like Proteins.** Im N-Terminalen Bereich der Sequenz befindet sich die PTB-Domäne; die TR2_L-Domäne wird durch die unterstrichene Sequenz angezeigt. Die fehlende 5' Sequenz ist nicht bekannt. Das Stop-Codon TAG wird durch einen Stern (*) markiert.

In dieser Arbeit konnte durch eine Überexpression von FE65like Protein gezeigt werden, dass L929 Zellen effektiv vor einem Ceramid-vermittelten TNF-induzierten Zelltod geschützt werden konnten. Ebenso waren diese überexprimierenden Zellen vor dem Caspase-abhängigen Stimulus TNF/CHX und vor dem Caspase-unabhängigen Stimulus TNF/zVAD geschützt. Auch konnte gezeigt werden, dass der Schutz dieser FE65like überexprimierenden Zellen vor TNF-induziertem Zelltod durch den Radikalfänger BHA weiter gesteigert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass der Schutz, der durch FE65like vermittelt wird, über einen weiteren unterschiedlichen Signalweg geht. Die Spezifität dieses Schutzes vor TNF konnte durch eine Stimulation mit MNNG gezeigt werden, bei dem FE65like keine Protektion vermittelte.

Über welchen Signalweg und welche Faktoren dieser Schutz vor TNF genau vermittelt wird, bleibt noch aufzuklären. Für das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell der Freisetzung und Translokation von AIF durch TNF-induziertes Ceramid könnte untersucht werden, ob in den

überexprimierenden Zellen während der TNF Stimulation noch ein Anstieg der Ceramid Spiegel zu beobachten ist.

Da immer noch unbekannt ist, über welchen Signalweg L929 Zelllinien nach TNF Stimulation den programmierten Zelltod einleiten, könnte diese Kenntnis über einen weiteren spezifischen Schutzmechanismus möglicherweise dazu führen diese Signalwege besser zu verstehen und im Hinblick auf eine verbesserte Tumorthherapie zu manipulieren.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Mitochondrien im Ceramid-vermittelten TNF-induzierten Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod untersucht werden. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Ceramid in vielfältiger Weise auf Mitochondrien Einfluss nimmt (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurden drei mitochondrialen Faktoren untersucht: die Freisetzung von Cytochrom c und AIF (*apoptosis-inducing-factor*) sowie die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (*reactive oxygen intermediates*) nach TNF Stimulation.

Die Cytochrom c-Freisetzung konnte in HeLa Zellen nach UV Stimulation gezeigt werden, während bei L929 Zellen keine Freisetzung von Cytochrom c nach UV, TNF oder MNNG Stimulation zu beobachten war. Diese Beobachtung stand im Einklang mit der Caspase-unabhängigen Natur des TNF-induzierten Zelltodes in L929 Zellen.

Für die Freisetzung von mitochondrialem AIF konnte im Vergleich zu einer etablierten Positivkontrolle (MNNG) gezeigt werden, dass TNF Stimulation, im kompletten Gegensatz zu einer MNNG Stimulation, zu einer PARP-unabhängigen Ceramid-abhängigen Freisetzung von AIF führt. Auch scheint AIF ein Faktor im späteren Verlauf des Zelltodes zu sein.

Die Untersuchungen zur Rolle der reaktiven Sauerstoffintermediate zeigten, dass diese nach den Ergebnissen dieser Arbeit keine entscheidende Rolle in einem TNF-induzierten Ceramid-vermittelten programmierten Zelltod spielen. Die korrekte Funktion der benutzten Radikalfänger BHA und BHT konnte dadurch gezeigt werden, dass eine Induktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten durch beide Radikalfänger vermindert wird. Allerdings konnte nur BHA einen Schutz vor TNF-induziertem Zelltod in murinen L929 Zelllinien vermitteln. In humanen Jurkat Zelllinien konnte auch durch BHA kein Schutz vor einem durch TNF-induziertem Caspase-unabhängigen Zelltod gezeigt werden. Das bedeutet, dass der Schutz von L929 Zelllinien durch BHA nicht auf einem Schutz vor reaktiven Sauerstoffintermediaten sondern auf einem anderen Wirkmechanismus beruht.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten mitochondrialen Faktoren keine bestimmende Rolle im TNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod in L929 Zelllinien spielen.

Zusätzlich wurde ein vor TNF-induziertem Caspase-unabhängigen Zelltod schützender Faktor (FE65like) charakterisiert. Hierbei konnten L929 Zellen durch Überexpression eines FE65like Proteins vor einem TNF-induziertem Caspase-unabhängigen aber auch vor einem Caspase-abhängigen Zelltod geschützt werden. Das FE65 Protein scheint einen sehr effektiven protek-

tiven Signalweg einzuschalten, dessen Kenntnis für weitere Studien der TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen TNF Resistenz von Zellen wichtig sein könnte.

The intention of this work was to determine the role of mitochondria in the ceramide-mediated TNF-induced caspase-independent programmed cell death. Previous studies showed that ceramide exerts influence on mitochondria in various ways (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997) In this work three mitochondrial factors were examined: the release of cytochrome c and AIF (apoptosis inducing factor) as well as the formation of reactive oxygen intermediates (ROI) after TNF stimulation.

The cytochrome c-release could be demonstrated in HeLa cells after UV stimulation, whereas L929 cells showed no release of cytochrome c after UV, TNF or MNNG stimulation. This observation stood in conformity with the caspase-independent nature of TNF-induced cell death in L929 cells.

For the release of mitochondrial AIF it could be shown that TNF stimulation, compared with an established positive control (MNNG) which showed different results, leads to a PARP-independent ceramide-dependent release of AIF from the mitochondria and translocation to the nucleus. AIF seems to be a factor in the late process of cell death.

The results of this work for the role of ROI showed no participation of ROI in a TNF-induced ceramide-mediated programmed cell death. The correct function of the radical inhibitors BHA and BHT could be shown. The induction of ROI is decreased by both radical inhibitors. However only BHA exhibits a protection against TNF-induced cell death in murine L929 cell lines. In human Jurkat cell lines no protection by BHA from a TNF-induced caspase-independent cell death could be shown. That means that the protection of L929 cell lines is not due to scavenged ROI by BHA but depends on a different mechanism.

Altogether it could be demonstrated that all examined mitochondrial factors did not play a determining role in a TNF-induced caspase-independent cell death in L929 cell lines.

Additionally a factor (FE65like) protecting against TNF-induced caspase-independent cell death was characterized. Here L929 cells could be protected by overexpression of a FE65like protein against a TNF-induced caspase-independent but also against a TNF-induced caspase-dependent cell death. The FE65 protein seems to activate a very efficient protective signaling pathway, whose knowledge for further studies of the TNF-induced ceramide-mediated caspase-independent cell death could be important to enhance the understanding of cell death signaling pathways with respect to cancer treatment.

LITERATUR

- Alam A., Cohen L.Y., Aouad S., & Sekaly R.P. (1999) Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J.Exp.Med.* **190**, 1879-1890.
- Arnoult D., Akarid K., Grodet A., Petit P.X., Estaquier J., & Ameisen J.C. (2002a) On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death.Differ.* **9**, 65-81.
- Arnoult D., Gaume B., Karbowski M., Sharpe J.C., Cecconi F., & Youle R.J. (2003a) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* **22**, 4385-4399.
- Arnoult D., Karbowski M., & Youle R.J. (2003b) Caspase inhibition prevents the mitochondrial release of apoptosis-inducing factor. *Cell Death.Differ.* **10**, 845-849.
- Arnoult D., Parone P., Martinou J.C., Antonsson B., Estaquier J., & Ameisen J.C. (2002b) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J.Cell Biol.* **159**, 923-929.
- Ausubel F.M. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc.
- 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., & 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.
- Boone E., Vanden Berghe T., van Loo G., De Wilde G., De Wael N., Vercammen D., Fiers W., Haegeman G., & Vandenabeele P. (2000) Structure/Function analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 37596-37603.
- Brekke O.L., Espevik T., & Bjerve K.S. (1994) Butylated hydroxyanisole inhibits tumor necrosis factor-induced cytotoxicity and arachidonic acid release. *Lipids* **29**, 91-102.
- Brekke O.L., Shalaby M.R., Sundan A., Espevik T., & Bjerve K.S. (1992) Butylated hydroxyanisole specifically inhibits tumor necrosis factor-induced cytotoxicity and growth enhancement. *Cytokine* **4**, 269-280.
- Brennan F.M., Maini R.N., & Feldmann M. (1998) Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin.Immunopathol.* **20**, 133-147.
- Brockhaus M., Schoenfeld H.J., Schlaeger E.J., Hunziker W., Lesslauer W., & Loetscher H. (1990) Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 3127-3131.
- Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I., & Stoppani A.O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* **180**, 248-257.

- Cande C., Cecconi F., Dessen P., & Kroemer G. (2002a) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J.Cell Sci.* **115**, 4727-4734.
- Cande C., Cohen I., Daugas E., Ravagnan L., Larochette N., Zamzami N., & Kroemer G. (2002b) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-222.
- Cao H., Mattison J., Zhao Y., Joki N., Grasso M., & Chang N.S. (1996) Regulation of tumor necrosis factor-and Fas-mediated apoptotic cell death by a novel cDNA TR2L. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **227**, 266-272.
- Cao H., Pratt N., Mattison J., Zhao Y., & Chang N.S. (2000) Characterization of an apoptosis inhibitory domain at the C-termini of FE65-like protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **276**, 843-850.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., & Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**, 3666-3670.
- 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., & Lenardo M.J. (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395-399.
- Cikala M., Wilm B., Hobmayer E., Bottger A., & David C.N. (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr.Biol.* **9**, 959-962.
- Cino M. & Del Maestro R.F. (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch.Biochem.Biophys.* **269**, 623-638.
- Das M., Mukherjee S.B., & Shaha C. (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J.Cell Sci.* **114**, 2461-2469.
- Daugas E., Susin S.A., Zamzami N., Ferri K.F., Irinopoulou T., Larochette N., Prevost M.C., Leber B., Andrews D., Penninger J., & Kroemer G. (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **14**, 729-739.
- Dumont C., Durrbach A., Bidere N., Rouleau M., Kroemer G., Bernard G., Hirsch F., Charpentier B., Susin S.A., & Senik A. (2000) Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood* **96**, 1030-1038.
- Fadeel B., Gleiss B., Hogstrand K., Chandra J., Wiedmer T., Sims P.J., Henter J.I., Orrenius S., & Samali A. (1999) Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **266**, 504-511.
- Ferri K.F. & Kroemer G. (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat.Cell Biol.* **3**, E255-E263.

- Ferry S., Matsuda M., Yoshida H., & Hirata M. (2002) Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFkappaB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis* **23**, 2031-2041.
- Fiers W., Beyaert R., Declercq W., & Vandenabeele P. (1999) More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **18**, 7719-7730.
- Firestein G.S. & Zvaifler N.J. (1997) Anticytokine therapy in rheumatoid arthritis. *N.Engl.J.Med.* **337**, 195-197.
- Fischer U., Janicke R.U., & Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death.Differ.* **10**, 76-100.
- Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D., Lademann U., Bastholm L., Boes M., Elling F., Leist M., & Jäättelä M. (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J.Cell Biol.* **153**, 999-1010.
- Friesen C., Lubatschowski A., Kotzerke J., Buchmann I., Reske S.N., & Debatin K.M. (2003) Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging* **30**, 1251-1261.
- Garcia-Ruiz C., Colell A., Mari M., Morales A., & Fernandez-Checa J.C. (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J.Biol.Chem.* **272**, 11369-11377.
- Goossens V., De Vos K., Vercammen D., Steemans M., Vancompernelle K., Fiers W., Vandenabeele P., & Grooten J. (1999) Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors* **10**, 145-156.
- Goossens V., Grooten J., De Vos K., & Fiers W. (1995) Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 8115-8119.
- Gorman A.M., Ceccatelli S., & Orrenius S. (2000) Role of mitochondria in neuronal apoptosis. *Dev.Neurosci.* **22**, 348-358.
- Gosden R. & Spears N. (1997) Programmed cell death in the reproductive system. *Br.Med.Bull.* **53**, 644-661.
- Gudz T.I., Tserng K.Y., & Hoppel C.L. (1997) Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J.Biol.Chem.* **272**, 24154-24158.
- Hannun Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859.
- Harper N., Hughes M.A., Farrow S.N., Cohen G.M., & MacFarlane M. (2003) Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J.Biol.Chem.* **278**, 44338-44347.
- Higuchi M., Higashi N., Taki H., & Osawa T. (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J.Immunol.* **144**, 1425-1431.

- Jäättelä M. & Tschopp J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat.Immunol.* **4**, 416-423.
- Jacobsen M.D., Weil M., & Raff M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.
- Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Pflucker J.C., Kroemer G., & Penninger J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554.
- Kennedy N.J., Kataoka T., Tschopp J., & Budd R.C. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *J.Exp.Med.* **190**, 1891-1896.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., & Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* **26**, 239-257.
- Kim G.T., Chun Y.S., Park J.W., & Kim M.S. (2003) Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **309**, 619-624.
- Krammer P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- Kroemer G., Dallaporta B., & Resche-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu.Rev.Physiol* **60**, 619-642.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamkanfi M., Declercq W., Kalai M., Saelens X., & Vandenabeele P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death.Differ.* **9**, 358-361.
- Leist M. & Jäättelä M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 589-598.
- Li F., Mao H.P., Ruchalski K.L., Wang Y.H., Choy W., Schwartz J.H., & Borkan S.C. (2002) Heat stress prevents mitochondrial injury in ATP-depleted renal epithelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **283**, C917-C926.
- Li L.Y., Luo X., & Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
- Lidbury B.A., Ramshaw I.A., Rolph M.S., & Cowden W.B. (1995) The antiviral activity of tumour necrosis factor on herpes simplex virus type 1: role for a butylated hydroxyanisole sensitive factor. *Arch.Virol.* **140**, 703-719.
- Lipton S.A. & Bossy-Wetzel E. (2002) Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* **111**, 147-150.
- Liu Y., Fiskum G., & Schubert D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J.Neurochem.* **80**, 780-787.

- Loeffler M., Daugas E., Susin S.A., Zamzami N., Metivier D., Nieminen A.L., Brothers G., Penninger J.M., & Kroemer G. (2001) Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J.* **15**, 758-767.
- Loeffler M. & Kroemer G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp.Cell Res.* **256**, 19-26.
- Lorenzo H.K., Susin S.A., Penninger J., & Kroemer G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death.Differ.* **6**, 516-524.
- Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z.Q., & Schulze-Osthoff K. (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol.Biol.Cell* **13**, 978-988.
- Los M., Wesselborg S., & 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., & 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.
- Lüschen S., Ussat S., Scherer G., Kabelitz D., & Adam-Klages S. (2000) Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of fas-associated death domain protein (FADD)/caspase signaling. Requirement of cell cycle progression. *J.Biol.Chem.* **275**, 24670-24678.
- Martin S.J., Finucane D.M., Amarante-Mendes G.P., O'Brien G.A., & Green D.R. (1996) Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J.Biol.Chem.* **271**, 28753-28756.
- Mate M.J., Ortiz-Lombardia M., Boitel B., Haouz A., Tello D., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G., & Alzari P.M. (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat.Struct.Biol.* **9**, 442-446.
- McLaughlin R., Kelly C.J., Kay E., & Bouchier-Hayes D. (2001) The role of apoptotic cell death in cardiovascular disease. *Ir.J.Med.Sci.* **170**, 132-140.
- Meier P., Finch A., & Evan G. (2000) Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
- Mignatti P. & Rifkin D.B. (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* **73**, 161-195.
- Miura M., Friedlander R.M., & Yuan J. (1995) Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 8318-8322.
- Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwig E.A., & Yuan J. (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* **75**, 653-660.

- Munoz-Pinedo C., Ruiz-Ruiz C., Ruiz d.A., Palacios C., & Lopez-Rivas A. (2003) Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J.Biol.Chem.* **278**, 12759-12768.
- Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., & Dixit V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J.Biol.Chem.* **273**, 2926-2930.
- Nicholson D.W. & Thornberry N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 299-306.
- Ohiro Y., Garkavtsev I., Kobayashi S., Sreekumar K.R., Nantz R., Higashikubo B.T., Duffy S.L., Higashikubo R., Usheva A., Gius D., Kley N., & Horikoshi N. (2002) A novel p53-inducible apoptogenic gene, PRG3, encodes a homologue of the apoptosis-inducing factor (AIF). *FEBS Lett.* **524**, 163-171.
- Pardo J., Perez-Galan P., Gamen S., Marzo I., Monleon I., Kaspar A.A., Susin S.A., Kroemer G., Krensky A.M., Naval J., & Anel A. (2001) A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J.Immunol.* **167**, 1222-1229.
- Pogrebniak A., Schemainda I., Pelka-Fleischer R., Nussler V., & Hasmann M. (2003) Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors transiently protect leukemia cells from alkylating agent induced cell death by three different effects. *Eur.J.Med.Res.* **8**, 438-450.
- Poyton R.O. & McEwen J.E. (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu.Rev.Biochem.* **65**, 563-607.
- Quillet-Mary A., Jaffrezou J.P., Mansat V., Bordier C., Naval J., & Laurent G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 21388-21395.
- Ruchalski K., Mao H., Singh S.K., Wang Y., Mosser D.D., Li F., Schwartz J.H., & Borkan S.C. (2003) HSP72 inhibits apoptosis-inducing factor release in ATP-depleted renal epithelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **285**, C1483-C1493.
- Sambrook J. & Russel D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Alcazar J.A., Ruiz-Cabello J., Hernandez-Munoz I., Pobre P.S., de la T.P., Siles-Rivas E., Garcia I., Kaplan O., Munoz-Yague M.T., & Solis-Herruzo J.A. (1997) Tumor necrosis factor-alpha increases ATP content in metabolically inhibited L929 cells preceding cell death. *J.Biol.Chem.* **272**, 30167-30177.
- Schall T.J., Lewis M., Koller K.J., Lee A., Rice G.C., Wong G.H., Gatanaga T., Granger G.A., Lentz R., Raab H., & . (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61**, 361-370.
- Schulze-Osthoff K., Bakker A.C., Vanhaesebroeck B., Beyaert R., Jacob W.A., & Fiers W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J.Biol.Chem.* **267**, 5317-5323.

- Shchepina L.A., Pletjushkina O.Y., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Fetisova E.K., Izyumov D.S., Saprunova V.B., Vyssokikh M.Y., Chernyak B.V., & Skulachev V.P. (2002) Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* **21**, 8149-8157.
- Skaper S.D. (2003) Poly(ADP-ribosyl)ation enzyme-1 as a target for neuroprotection in acute central nervous system injury. *Curr. Drug Target CNS. Neurol. Disord.* **2**, 279-291.
- Springs S.L., Diavolitsis V.M., Goodhouse J., & McLendon G.L. (2002) The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 45715-45718.
- Staniek K., Gille L., Kozlov A.V., & Nohl H. (2002) Mitochondrial superoxide radical formation is controlled by electron bifurcation to the high and low potential pathways. *Free Radic. Res.* **36**, 381-387.
- Stennicke H.R. & Salvesen G.S. (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death. Differ.* **6**, 1054-1059.
- Strelow A., Bernardo K., Adam-Klages S., Linke T., Sandhoff K., Kronke M., & Adam D. (2000) Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J. Exp. Med.* **192**, 601-612.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., & Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., & Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* **184**, 1331-1341.
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., & Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* **8**, 613-621.
- Suzuki Y., Takahashi-Niki K., Akagi T., Hashikawa T., & Takahashi R. (2003) Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death. Differ.*
- Tafani M., Cohn J.A., Karpnich N.O., Rothman R.J., Russo M.A., & Farber J.L. (2002) Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 49569-49576.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J., & . (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774.

- Toyoshima F., Moriguchi T., & Nishida E. (1997) Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. *J.Cell Biol.* **139**, 1005-1015.
- Ullrich O., Ciftci O., & Hass R. (2000) Proteasome activation by poly-ADP-ribose-polymerase in human myelomonocytic cells after oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* **29**, 995-1004.
- Ullrich O., Diestel A., Bechmann I., Homberg M., Grune T., Hass R., & Nitsch R. (2001) Turnover of oxidatively damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to their activation state by poly-ADP-ribose polymerase. *FASEB J.* **15**, 1460-1462.
- Ullrich O., Reinheckel T., Sitte N., Hass R., Grune T., & Davies K.J. (1999) Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 6223-6228.
- Vancompernelle K., Boonefaes T., Mann M., Fiers W., & Grooten J. (2000) Tumor necrosis factor-induced microtubule stabilization mediated by hyperphosphorylated oncoprotein 18 promotes cell death. *J.Biol.Chem.* **275**, 33876-33882.
- Vanhaesebroeck B., Decoster E., Van O., X, Van Bladel S., Lenaerts A., Van Roy F., & Fiers W. (1992) Expression of an exogenous tumor necrosis factor (TNF) gene in TNF-sensitive cell lines confers resistance to TNF-mediated cell lysis. *J.Immunol.* **148**, 2785-2794.
- Vassalli P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu.Rev.Immunol.* **10**, 411-452.
- Vaux D.L. & Korsmeyer S.J. (1999) Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.
- Vercammen D., Beyaert R., Denecker G., Goossens V., van Loo G., Declercq W., Grooten J., Fiers W., & Vandenameele P. (1998a) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* **187**, 1477-1485.
- Vercammen D., Brouckaert G., Denecker G., Van de C.M., Declercq W., Fiers W., & Vandenameele P. (1998b) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J.Exp.Med.* **188**, 919-930.
- von Ahsen O., Renken C., Perkins G., Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., & Newmeyer D.D. (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J.Cell Biol.* **150**, 1027-1036.
- Wang K.K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**, 20-26.
- Wiegmann K., Schutze S., Machleidt T., Witte D., & Kronke M. (1994) Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* **78**, 1005-1015.
- Wolf B.B. & Green D.R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J.Biol.Chem.* **274**, 20049-20052.

- Wu M., Xu L.G., Li X., Zhai Z., & Shu H.B. (2002) AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J.Biol.Chem.* **277**, 25617-25623.
- Ye H., Cande C., Stephanou N.C., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., Kroemer G., & Wu H. (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat.Struct.Biol.* **9**, 680-684.
- Ying W., Garnier P., & Swanson R.A. (2003) NAD⁺ repletion prevents PARP-1-induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **308**, 809-813.
- Yu S.W., Wang H., Dawson T.M., & Dawson V.L. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol.Dis.* **14**, 303-317.
- Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., & Dawson V.L. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**, 259-263.
- Zhang J., Dawson V.L., Dawson T.M., & Snyder S.H. (1994) Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* **263**, 687-689.
- Zhang W., Shokeen M., Li D., & Mehta J.L. (2003) Identification of apoptosis-inducing factor in human coronary artery endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **301**, 147-151.
- Zhu C., Qiu L., Wang X., Hallin U., Cande C., Kroemer G., Hagberg H., & Blomgren K. (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J.Neurochem.* **86**, 306-317.

DANKSAGUNG

Herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Kabelitz sagen für die Möglichkeit in seinem Institut meine Doktorarbeit anzufertigen. Ebenfalls sollen die tollen Sommer- und Weihnachtsfeiern unter seiner Regie nicht unerwähnt bleiben.

Vielen Dank an Prof. Dr. Dieter Adam für das Thema meiner Doktorarbeit und die echt gelungene Betreuung! Seine täglichen Nachfragen zum „Stand der Dinge“ waren zugegebenerweise praktisch.

Ganz herzlichen Dank an Sabine Mathieu für die Einarbeitung in die Methodik und zusammen mit Susan, Eva, Heike, Ulrike und Lutz für eine schöne und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre! Mit Heike und Lutz war das „eigene“ Labor auch nett...

Martina für den Cappuccino am Morgen. Und dafür das erste Jahr mein Schnorren zu unterstützen. Das werde ich echt vermissen!

Dem gesamte Institut für Immunologie für seine tolle Atmosphäre!

Vielen vielen⁶ Dank an Katrin für die bisherigen schönen, unterhaltsamen, tollen, superschönen 2 Jahre und einige Monate. Ohne dich wäre ich längst nicht so ausgeglichen über die vergangenen Jahre gewesen. DANKE!!!!

Allen meinen Freunden (ich zähle jetzt keinen auf, da ich befürchte jemanden zu vergessen) vielen Dank für die Abwechslung von der zum Teil frustreichen Arbeit. Danke!

Meinen Eltern danke ich dieses Mal nicht für die finanzielle Unterstützung (weil ich bin ja schon groß und verdiene eigenes Geld ☺), aber vielen Dank für jede andere Art der Unterstützung und Hilfe. Hier möchte ich auch meiner Schwester Birgit danken!

Vielen Dank dem Labor 247d; bei dir war es immer gemütlich, auch wenn einige es für unaufräumt und vollgestopft hielten!

Insgesamt war es eine tolle Zeit. Danke!

LEBENS LAUF

Name: Arne Lange
Anschrift: Scharnhorststr. 13
24105 Kiel
Geburtsdatum: 12.04.1974
Geburtsort: Kiel
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Allgemeine Hochschulreife, Heinrich-Heine-Gymnasium Heikendorf 1993

Beginn des Studiums der Biologie an der
Christian-Albrecht-Universität (CAU) Kiel 1994

Diplomprüfung in Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie, Zoologie 03 / 2000

Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der CAU Kiel 2000 - 2001

Dissertation am Institut für Immunologie
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel 2001 - 2004

Abschluss des Studiums nach 19 Semestern 2004

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer - und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Arne Lange