

**Mechanismen der Regulation  
des Caspase-unabhängigen Zelltods durch  
Sphingolipidmediatoren**

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

vorgelegt von

**Lutz Thon**

Kiel

2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>1</b>
<b>Einleitung</b>		<b>3</b>
1	Programmierter Zelltod	3
1.1	Nekrose	3
1.2	Apoptose	4
1.2.1	Typ I-Apoptose	5
1.2.2	Typ II-Apoptose	6
1.3	Caspase-unabhängiger programmierter Zelltod	7
1.4	Inhibition von Caspasen	10
1.5	Das „Rezeptor interagierende Protein“ (RIP) ist ein Faktor im Caspase-unabhängigen Zelltod	11
2	TNF- und Ceramid-vermittelte Signalwege	11
2.1	Ceramid-vermittelte Signalwege	14
3	Fragestellung	16
<b>Material und Methoden</b>		<b>18</b>
1	Geräte und Materialien	18
2	Chemikalien, Enzyme und Reagenzien	19
3	Biologische Reagenzien	20
4	Antikörper	20
5	Zelllinien und Zellkultur	20
6	Agarose-Gelelektrophorese	21
7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot-Analyse	21
8	Proteindepletion ( <i>knock-down</i> ) des Proteins RIP	22
8.1	Transfektionen mit Antisense-Oligonukleotiden (Morpholino Oligos)	22
8.2	Herstellung von siRNA	23
8.3	Herstellung des RNAi-Vektors pSHAG-shRIP	23
9	Transfektion eukaryotischer Zellen	24
9.1	Transiente Transfektion	24
9.2	Herstellung stabil transfizierter Zellen durch Elektroporation	24
10	Zytotoxizitätsanalysen	25

10.1	Färbung von adhärenenten Zellen mit Kristallviolett	25
10.2	Lebendfärbung von Suspensionszellen mit MTT	25
11	Untersuchungen von Zell- und Zellkernmorphologien	25
11.1	DAPI-Färbung von Zellen	25
11.2	Fotodokumentation lebender Zellen	26
12	Messung der Enzymaktivitäten von Caspasen	26
12.1	Aktivitätsbestimmung mittels fluorogener Enzymsubstrate	26
12.2	Aktivitätsbestimmung mittels Durchflußzytometrie	27
13	Messung der enzymatischen Aktivität der sauren Ceramidase	28
14	Ceramid-Quantifizierung	28
15	Messung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Gelretardations-Analysen	28
15.1	Markierung des Oligonukleotids	28
15.2	Herstellung von nukleären Extrakten	29
15.3	Gelretardations-Analyse	29
	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
1	Bedeutung des Sphingolipids Ceramid im Caspase-unabhängigen Zelltod	30
1.1	Untersuchungen der Signalwege des hTNF/zVAD-induzierten Zelltods im L929 Zellsystem	30
1.1.1	Der pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk verstärkt den hTNF-induzierten Zelltod in L929 Zellen	32
1.1.2	Der hTNF- und hTNF/zVAD-induzierte Zelltod von L929 Zellen verläuft ohne die Aktivierung der Caspasen-8 und -3	32
1.1.3	Die Stimulation von L929 Zellen mit hTNF oder hTNF/zVAD induziert einen Anstieg des intrazellulären Gehalts an Ceramid	33
1.1.4	Die Überexpression der sauren Ceramidase (AC) in L929 Zellen bewirkt eine erhöhte Resistenz gegenüber dem hTNF/zVAD-induzierten Zelltod	34
1.1.5	Die Inhibition oder der Abbau der sauren Sphingomyelinase schützen L929 Zellen vor dem hTNF/zVAD induzierten Zelltod	36
1.2	Bedeutung des Sphingolipids Ceramid als Mediator des Zelltods im NIH3T3 Zellsystem	37
1.2.1	NIH3T3 Zellen zeigen erhöhte Ceramidspiegel im hTNF/zVAD-induzierten Zelltod	38
1.2.2	Die Inhibition, aber nicht der Abbau der sauren Sphingomyelinase	

	schützen NIH3T3 Zellen vor hTNF/zVAD induziertem Zelltod	39
1.3	Bedeutung des Sphingolipids Ceramid als Mediator des Zelltods im Jurkat T-Zellsystem	39
1.3.1	Caspase-unabhängiger Zelltod in Jurkat T-Zellen	40
1.3.2	Zelltod führt in Jurkat T-Zellen zu steigenden Ceramidspiegeln	42
1.3.3	Die Inhibition der sauren Sphingomyelinase schützt Jurkat T-Zellen vor Caspase-unabhängigem Zelltod	45
2	Rolle des Proteins RIP in der Signalkaskade des Caspase-unabhängigen Zelltodes	46
2.1	RIP-defiziente Jurkat T-Zellen sind gegen Caspase-unabhängigen Zelltod resistent	46
2.1.1	RIP-defiziente Jurkat T-Zellen zeigen keine erhöhten Ceramidspiegel im Verlauf des Caspase-unabhängigen Zelltods	48
2.1.2	RIP-defiziente Jurkat T-Zellen zeigen ausschließlich apoptotische Morphologien	49
2.2	Rolle des Proteins RIP im Caspase-unabhängigen Zelltod von L929 Zellen	51
2.2.1	RIP-Depletion in L929 und NIH3T3 Zellen durch Antisense-Oligonukletide, siRNA und shRNA-Konstrukte	51
2.2.2	RIP-Depletion durch pharmakologische Inhibition der HSP90-Funktion	53
2.2.3	Geldanamycin und Radicicol schützten L929 Zelllinien vor Caspase-unabhängigem Zelltod	55
2.2.4	Störung des HSP90-Komplexes verändert den hTNF-induzierten nekrotischen Zelltod von L929 Zellen in Richtung Apoptose	58
2.2.5	Geldanamycin verändert nicht die Expression anderer wichtiger Proteine des TNF-Signalwegs	59
2.2.6	Messungen der Ceramidspiegel in L929 Zellen nach RIP-Depletion	60
3	Charakterisierungen des Caspase-abhängigen und -unabhängigen Zelltods von L929 Zelllinien	62
3.1	Charakterisierung des hTNF- und hTNF/zVAD-induzierten Zelltods in L929 Zelllinien	62
3.1.1	hTNF- und hTNF/zVAD-induzierte Veränderungen der Zell- und Zellkernmorphologie	62
3.1.2	Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen vor dem Nekrose-artigen programmierten Zelltod	65
3.2	Charakterisierung des TRAIL-induzierten Zelltods in L929 Zelllinien	66

3.2.1	hTRAIL-induzierte Veränderungen der Morphologie von L929 Zelllinien	67
3.2.2	hTRAIL aktiviert in L929 Zellen die Caspase-Kaskade	68
3.2.3	hTRAIL-induzierte Veränderungen der Zellkerne von L929 Zellen	73
3.2.4	Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen nicht vor hTRAIL-induzierter Apoptose	75
3.2.5	Inhibition der hTRAIL-induzierten Caspase-Aktivierung durch zVAD-fmk verhindert nicht den Zelltod von L929 Zelllinien	77
<b>Diskussion</b>		<b>82</b>
1	Ceramid als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods	82
2	Bedeutung der Kinase RIP im Caspase-unabhängigen Zelltod	85
3	Charakterisierungen des Caspase-abhängigen und- unabhängigen Zelltods	87
4	Ausblicke	91
<b>Zusammenfassung</b>		<b>92</b>
<b>Summary</b>		<b>93</b>
<b>Literatur</b>		<b>94</b>
<b>Danksagung</b>		<b>106</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>107</b>
<b>Erklärung</b>		<b>108</b>

## Abkürzungsverzeichnis

× g	-faches der Erdbeschleunigung
AC	saure Ceramidase; <i>acid ceramidase</i>
Apaf-1	Apoptotische Protease Aktivierungsfaktor 1
A-SMase	saure Sphingomyelinase, <i>acid sphingomyelinase</i>
BCA	Bicinchoninsäure, <i>bicinchoninic acid</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
C <sub>16</sub> -Ceramid	N-Palmitylsphingosin
CAPK	Ceramid-aktivierte Protein Kinase
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CrmA	<i>cytokine response modifier A</i>
CHX	Cycloheximid
D609	Tricyclodecan-9-yl-Xanthogenat
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DD	Todesdomäne, <i>death domain</i>
DED	Todeseffektordomäne, <i>death effector domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat, <i>deoxynucleotide-triphosphate</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence light</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne, <i>Fas-associating protein with death domain</i>
FAN	Faktor assoziiert mit neutraler Sphingomyelinase Aktivierung
FCS	fötales Kälberserum
h/mTNF	humaner/muriner Tumor Nekrose Faktor
kDa	Kilodalton
MTT	3,(4,5-Dimethyl-Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B

---

NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NSD	N-SMase aktivierende Domäne
N-SMase	neutrale Sphingomyelinase
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
POD	Peroxidase des Meerrettichs
RIP	Rezeptor interagierendes Protein, <i>receptor-interacting serine-threonine kinase 1</i>
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TNF-R55	55 kDa TNF-Rezeptor
TNF-R75	75 kDa TNF-Rezeptor
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne, <i>tumor necrosis factor receptor-1-associated protein</i>
TRAF2	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2, <i>TNF receptor-associated factor 2</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
zDEVD-afc	Benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminotrifluoromethyl-Coumarin
zIETD-afc	Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-Aminotrifluoromethyl-Coumarin
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon

# Einleitung

## 1 Programmierter Zelltod

Die Proliferation und der programmierte Tod von Zellen sind für die Homöostase eines mehrzelligen Organismus unabdingbar. Störungen des geordneten Zusammenwirkens von Zellproliferation und -tod, z.B. ein Ausfall oder eine Verminderung des programmierten Zelltods kann zur Tumorbildung führen. Aber auch eine verstärkte Zelltodrate kann negative Auswirkungen haben, z.B. durch die Ausbildung degenerativer Erkrankungen wie z. B. Chorea Huntington (HD) oder Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Speziell im Immunsystem spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. So eliminieren zytotoxische T-Zellen virusinfizierte oder entartete Zellen durch die Induktion von programmiertem Zelltod. Auch bei der Reifung von T- und B-Zellen werden im Thymus bzw. im Knochenmark potenziell autoreaktive Zellen durch programmierten Zelltod beseitigt. Dabei auftretende Fehler können Autoimmunkrankheiten wie z.B. Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis zur Folge haben. Des Weiteren werden nach einer erfolgreichen Immunantwort aktivierte T-Zellen, die nicht mehr benötigt werden, durch programmierten Zelltod entfernt. Der programmierte Zelltod wurde 1842 bei der Beobachtung der Ontogenese von Wirbeltieren zum ersten Mal beschrieben (Vogt, 1842). Vogt beobachtete, dass während der Entwicklung von Amphibien unerwünschte Gewebe (Schwanz, Schwimmhäute) durch Zelltod gezielt abgebaut werden. Dieser „normale“ Zelltod wurde bald auch in der Ontogenese anderer Wirbeltiere und bei Wirbellosen nachgewiesen. Der oft benutzte Begriff „Apoptose“ wurde 1972 eingeführt (Kerr et al., 1972) und sollte den „natürlichen“ Zelltod während der Ontogenese vom Unfalltod einer Zelle (Nekrose) abgrenzen.

### 1.1 Nekrose

Bei der Nekrose von Zellen (ausgelöst z.B. durch Detergenzien, Oxidantien, Ischämien, Traumata, Pathogene) kommt es durch einen Ausfall der zellulären Ionenpumpen zu einem Einstrom von Kalzium- und Natriumionen. Der daraus resultierende osmotische Einstrom von Wasser führt zur Schwellung der Zelle und der Organellen und schließlich zum Platzen der Zelle. Durch den hierbei austretenden Zellinhalt werden Zellen des Immunsystems aktiviert, die eine entzündliche Reaktion auslösen. Die Nekrose kann nur durch die Entfernung des auslösenden Stimulus verhindert werden und nicht wie bei der im folgenden beschriebenen Apoptose durch eine Blockierung eines Signals (Leist et al., 2001).

## 1.2 Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose kommt es bei der Apoptose nicht zum Zerplatzen der Zelle, sondern zu einem Schrumpfen von Zytoplasma und Zellkern. Dazu pumpen die Zellen aktiv Ionen, vor allem Kaliumionen, nach außen und kontrahieren ihr Zytoskelett. Das Chromatin kondensiert und zerfällt in Fragmente. Es kommt zu keiner Schwellung der Organellen und diese verlieren erst spät ihre Integrität. Des Weiteren bilden sich Ausstülpungen der Plasma- und der Kernmembran, die sich als sogenannte „apoptotische Körperchen“ abschnüren. Diese durch sogenanntes „blebbing“ abgeschnürten Vesikel und die geschrumpften Zellkörper werden dann von phagozytierenden Zellen beseitigt. Durch diese Vorgänge werden die Zellen gerichtet degradiert und es kommt im Gegensatz zur Nekrose nicht zur Freisetzung des Zellinhalts, so dass keine entzündliche Reaktion induziert wird. Durch das Zerfallen und Schrumpfen der sterbenden Zelle ist es leichter für phagozytierende Zellen, deren Reste aufzunehmen. Die Phagozyten erkennen ihre Ziele an Membranveränderungen, wie z.B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran („eat me“-Marker). Die Zellfragmente werden dann von den Phagozyten innerhalb von Vesikeln, den Phagolysosomen, abgebaut.

Apoptose kann durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden. So können z.B. Chemikalien je nach Konzentration und Zelltyp Apoptose induzieren. Glukokortikoide binden an intrazelluläre Rezeptoren und induzieren in Thymozyten Apoptose. Die Schädigung der DNA durch Strahlung oder Chemikalien führt in vielen Fällen zu apoptotischem Zelltod. Auch ein Entzug von Überlebens-, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die an Oberflächenrezeptoren binden und Signale zum Überleben geben, kann Apoptose auslösen. Todesfaktoren bewirken dagegen das Gegenteil. Wenn sie an ihre Rezeptoren binden, lösen sie Apoptose aus. In der Zelle werden durch die obengenannten Stimuli die Caspasen (Cystein Aspartat-spezifische Proteasen) aktiviert. Diese für die Apoptose bedeutsame Proteinfamilie wurde Anfang der 90er Jahre beschrieben (Miura et al., 1993) und stellt den zentralen Teil der Apoptose-Maschinerie dar (Lamkanfi et al., 2002). Die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren führt in einer Zelle zur Aktivierung der Caspase-Kaskade wobei Initiator-Caspasen nachgeschaltete Effektor-Caspasen aktivieren, die dann durch die Spaltung wichtiger Zellproteine den Tod und die Degradation der Zelle herbeiführen. Zur Zeit sind 280 Proteine bekannt, die durch Caspasen gespalten werden (Fischer et al., 2003). Dazu gehören u.a. Regulatoren der Apoptose, Rezeptoren und Proteine vieler Signalwege, Zelladhäsionsproteine, Proteine des Kern- und Zytoskeletts, Regulatoren des Zellzyklus und der DNA-Synthese, -Degradation und -Reparatur, Zytokine, Proteine und Regulatoren der Transkription und Translation.

Anhand des Ortes ihrer Initiation lässt sich die Apoptose in zwei Typen einteilen. Die Apoptose des Typs I ist durch die Todesrezeptor-vermittelte Initiation der Caspase-Kaskade und die direkte Aktivierung der Caspase-3 durch die Caspase-8 charakterisiert (Stennicke et al., 1998). Die Typ II-Apoptose wird dagegen mitochondrial vermittelt und führt zur Aktivierung der Caspase-9.

### 1.2.1 Typ I-Apoptose

Bei der Initiation der Typ-I Apoptose (in Abb. 1 am Beispiel des „55 kDa Rezeptors für Tumor Nekrose Faktor“ dargestellt) bindet ein Ligand an den entsprechenden Todesrezeptor, der in seinem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne (DD, „*death domain*“) besitzt. Durch die induzierte Trimerisierung des Rezeptors bilden die Todesdomänen eine Struktur, an welche nun Adaptormoleküle mit eigener Todesdomäne durch homotypische Interaktionen binden können. In einem ersten Schritt wird das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ (TRADD) rekrutiert. Anschließend bindet an die DD des TRADD das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). FADD besitzt neben der DD auch eine Todeseffektordomäne (DED, „*death effector domain*“), über die die Pro-Caspase-8 mit ihrer DED an den Komplex bindet. Durch autolytische Spaltung wird die Pro-Caspase-8 aktiviert und die freigesetzte Caspase-8 aktiviert ihrerseits direkt die Effektor-Caspase-3. Diese ist nicht nur der Hauptmediator zur Spaltung vieler Substratproteine, welche an dem zellulären und nukleären Zusammenbruch wesentlich beteiligt sind (Nicholson et al., 1997; Wolf et al., 1999), sie aktiviert ihrerseits auch andere ausführende Caspasen, wie die Caspase-6 und -7. Durch diese wird in einer Signal-verstärkenden Rückkopplung Caspase-8 aktiviert.

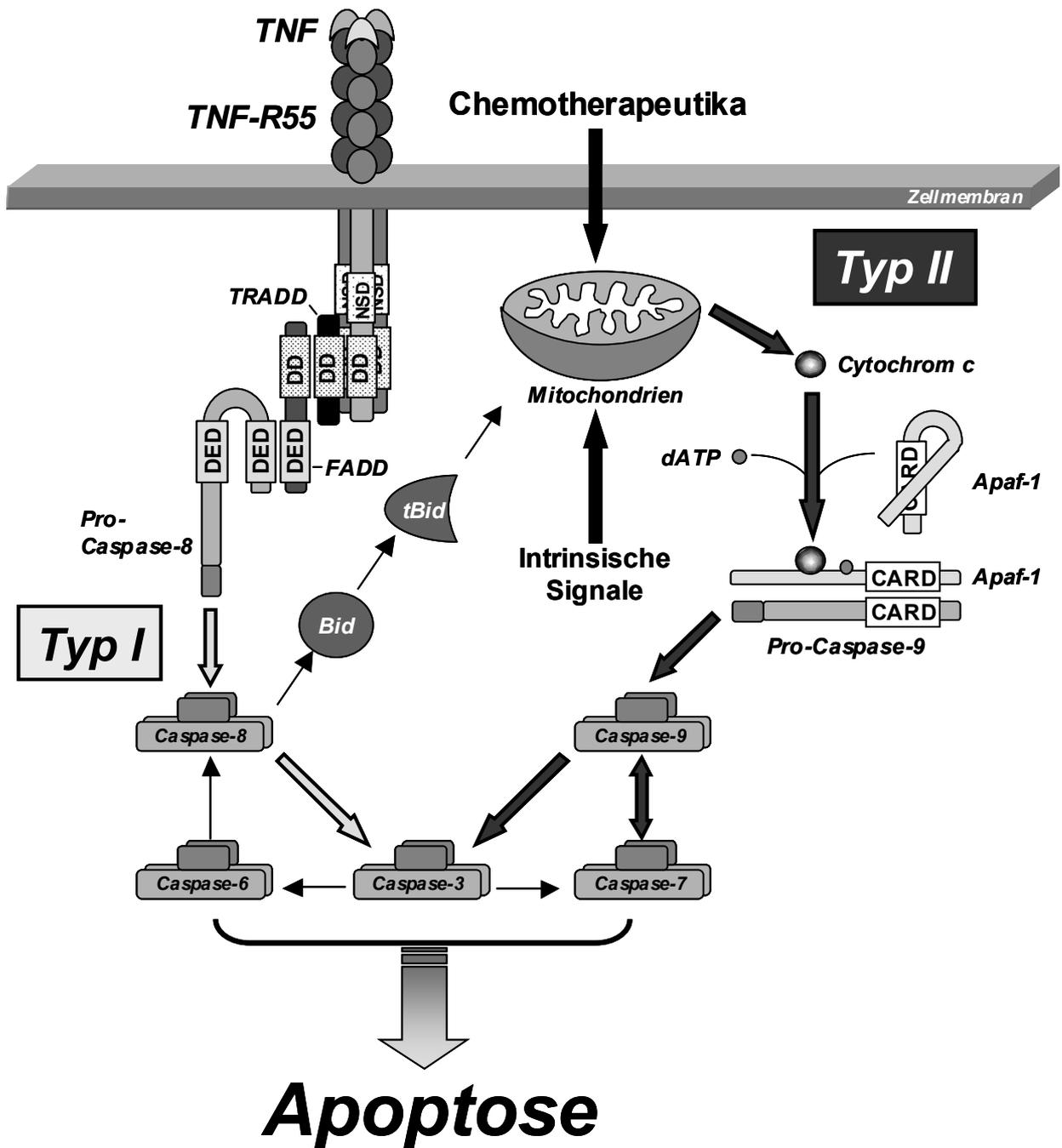


Abb. 1: Die Typ I und II Apoptose. Erläuterungen siehe Text.

### 1.2.2 Typ II-Apoptose

Viele toxische Substanzen wie z. B. Chemotherapeutika wirken direkt auf die Mitochondrien und induzieren so Typ-II Apoptose (Ferrari et al., 1998). Durch noch nicht genau bekannte Mechanismen wird die Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren (siehe auch 1.3 unten) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma induziert (Luo et al., 1998). Die Bindung von Cytochrom c und dATP an Apaf-1 (Apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1)

verursacht eine Konformationsänderung des Proteins. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die CARD Domäne der Pro-Caspase-9 binden kann. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt. Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase-9 (Li et al., 1997; Wolf et al., 1999). Sie aktiviert dann ihrerseits analog zu der Caspase-8 in der Typ I-Apoptose die Effektor-Caspasen Caspase-3 und -7. Eine Signalverstärkung wird durch die Caspase-7 vermittelt, welche nicht nur Substrate spaltet, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, sondern ihrerseits auch die Caspase-9 aktiviert.

Zellen, die vielleicht aufgrund einer zu geringen intrazellulären Menge an Caspase-8 nicht die Typ-I Apoptose zu initiieren vermögen, können den mitochondrialen Weg zur Signalverstärkung aktivieren. Dazu spaltet die Caspase-8 das zytosolische Protein Bid („*BH3 interacting domain death agonist*“). Das entstehende C-terminale Spaltprodukt tBid („*truncated Bid*“) vermittelt nach der Translokation an die Mitochondrien die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren und führt zur Aktivierung der Caspase-9 (siehe oben).

### 1.3 Caspase-unabhängiger programmierter Zelltod

Im Verlauf der Evolution haben sich aufgrund der zunehmenden Komplexität und Lebensspanne der Organismen möglicherweise mehrere den programmierten Zelltod vermittelnde Signalwege entwickelt. Die Beteiligung von Caspasen im programmierten Zelltod konnte bis jetzt nur bei höher entwickelten tierischen Organismen wie den Wirbeltieren, Insekten und Nematoden sicher nachgewiesen werden. In Pflanzen, Pilzen und Protozoen wurden die sogenannten Metacaspasen und in den Metazoen und dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* die Paracaspasen beschrieben (Lamkanfi et al., 2002). Ob diese zur Caspase-Familie gehörenden Proteine auch in den Signalwegen des programmierten Zelltods eine Bedeutung haben ist noch Gegenstand der Forschung. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich die Caspasen aus den Paracaspasen entwickelt haben (Koonin et al., 2002). In *Hydra*, einem Angehörigen des basal stehenden Stamms der Nesseltiere (*Cnidaria*), konnte Apoptose (Kuznetsov et al., 2002) und die Expression zweier Caspase-3 homologer Gene gezeigt werden (Cikala et al., 1999).

Alternative Caspase-unabhängige Formen des programmierten Zelltods findet man noch heute in primitiveren Organismen. So wird z.B. bei dem Bakterium *Bacillus subtilis* nach der Sporenbildung die Mutterzelle aktiv lysiert (Smith et al., 1995; Nugroho et al., 1999). *Escherichia coli* reagiert auf zu starke Schädigung der DNA mit einer Degradation der DNA

(Cairns, 2002) und zeigt wie *Streptococcus pneumoniae* eine programmierte Zelllyse (Moyed et al., 1983; Novak et al., 1998).

Auch in eukaryotischen Einzellern konnte programmierter Zelltod beschrieben werden. So zeigen *Trypanosoma cruzi* und *T. brucei rhodesiense*, *D. discoideum* und *Tetrahymena thermophila* einige „apoptotische“ Merkmale wie zytoplasmatisches „blebbing“ und Vakuolisierung, DNA-Fragmentation und Chromatin-Kondensation als Antwort auf Umweltstress oder extrazelluläre Signale (Ameisen, 1996; Ameisen, 2002).

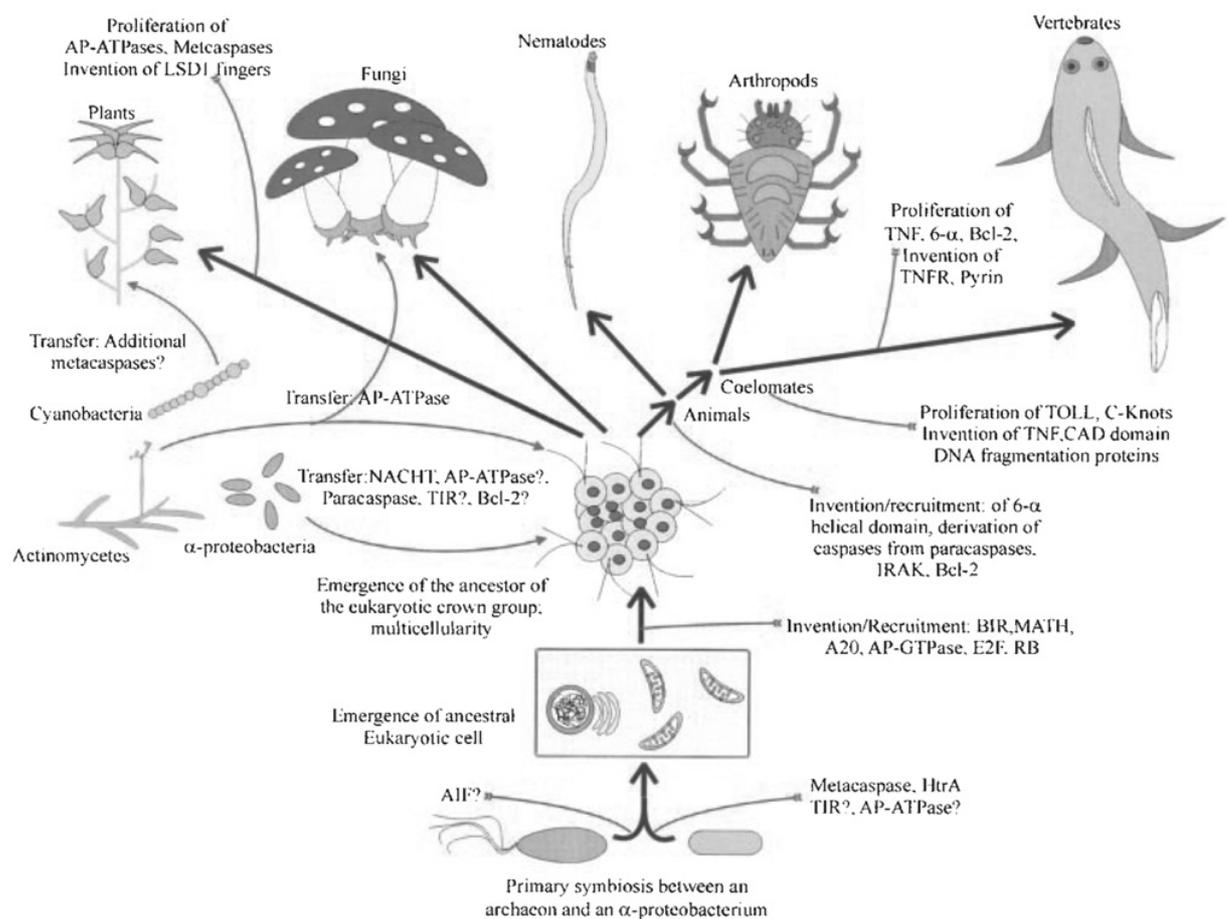
In Hefen konnte ein Protein der Familie der Metacaspasen (Madeo et al., 2002) aber keine homologen Proteine zu den im Caspase-System wichtigen Proteinen der Bcl-2, CARD-, DD- oder DED-Familien gefunden werden. Aber auch ohne diese Proteine wurde programmierter Zelltod in diesen Zellen nachgewiesen. Dabei zeigen die Hefen „apoptoseartige“ Merkmale wie DNA-Fragmentierung und -Kondensation, Zeiose („blebbing“) und die Externalisierung von Phosphatidylserin (Fröhlich et al., 2000; Jin et al., 2002). Diese Merkmale konnten selektiv durch Bax-artige Proteine ausgelöst oder zu CED-9 verwandte Genprodukte blockiert werden.

Die Befunde aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten zeigen, dass es schon vor der Entwicklung des Caspase-Systems entwicklungsgeschichtlich ältere Signalwege des Zelltods gegeben haben muss. Diese könnten in modernen Eukaryoten neben dem dominierenden Caspase-System existieren und im Falle dessen Versagens als Absicherung den programmierten Zelltod garantieren.

Nach der Endosymbionten-Theorie zur Entstehung der eukaryotischen Zelle wurden ein Urahn der Bakterien (oder mehrere) von anderen ursprünglichen Einzellern aufgenommen und entwickelte sich im Verlauf der Evolution zu den heutigen Mitochondrien und anderen Organellen (Abb. 2). Moderne Bakterien können Substanzen ausscheiden, die in den Zellmembranen anderer Zellen Poren bilden und diese dadurch abtöten (Colicin K, Colicine 5 und 10) oder die ribosomale RNA der Zielzellen angreifen (Colicin E<sub>3</sub>). Für viele Proteine und Proteindomänen, die in modernen Zellen eine Funktion im Zelltod haben, konnten in Bakterien homologe Proteine gefunden werden (Koonin et al., 2002). Es ist bezeichnend, dass in den Mitochondrien pro-apoptotische Faktoren (z.B. Cytochrom c, AIF, Endonuklease G, Smac/DIABLO und Omi/HtrA2) lokalisiert sind, die auf bestimmte Signale ins Zytoplasma gelangen und Zelltod auslösen (van Loo et al., 2002; van Gurp et al., 2003).

Für das mitochondriale Protein AIF (Apoptose induzierender Faktor) wird beschrieben, dass seine Überexpression eine Caspase-unabhängige DNA-Degradation auslöst (Susin et al., 1999).

Auch die Endonuklease G soll wie AIF im Zusammenspiel mit anderen DNAsen für den Caspase-unabhängigen Abbau der DNA verantwortlich sein (Widlak et al., 2001). Einen anderen Wirkmechanismus haben Smac/DIABLO (Verhagen et al., 2000; Du et al., 2000) und die Serin-Protease Omi/HtrA2 (Gray et al., 2000; Faccio et al., 2000; Martins et al., 2002). Sie inhibieren anti-apoptotische Proteine wie XIAP und andere IAP Proteine und erlauben dadurch die Aktivierung des Apaf/Cytochrom c-Komplexes (Apoptosom, siehe 1.2.2 oben) und der Caspase-3. Die Serin-Protease Omi/HtrA2 verstärkt den Zelltod auch durch deren Protease-Aktivität. Omi/HtrA2 ist homolog zur bakteriellen Hitzchock-Protease HtrA2 und zeigt, dass in den heutigen Eukaryoten immer noch Komponenten ursprünglicher prokaryotischer Zellproteine vorhanden sind.



**Abb. 2: Ursprung und Evolution des eukaryotischen programmierten Zelltods.** Das Schema zeigt die hypothetische vertikale Evolution (dicke Pfeile), Ereignisse horizontalen Gentransfers (dünne Pfeile) und Zeitpunkte der Rekrutierung und Abwandlung von eukaryotischen Proteinen und Proteindomänen (dünne Linien) (Quelle: Koonin & Aravind, Cell Death Differ. 9:394-404, 2002)

Programmierter Zelltod ohne Beteiligung der „modernen“ Caspasen ist auch in heutigen Organismen von Bedeutung. Er wurde im Säugetier *in vivo* bei der negativen Selektion von

Lymphozyten (Smith et al., 1996; Doerfler et al., 2000), beim Abbau der embryonalen interdigitalen Häute (Chautan et al., 1999), bei der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-vermittelten Leberschädigung (Künstle et al., 1999) und beim Zelltod von Chondrozyten (Roach et al., 2000) beobachtet. Auch im Nervensystem wurde neuronaler Caspase-unabhängiger Zelltod beschrieben (Cregan et al., 2002; Lang-Rollin et al., 2003).

Die unterschiedlichen Ausprägungen des Caspase-unabhängige Zelltods sind aufgrund ihrer Zelltodmorphologien nicht mehr der klassischen Apoptose zuzuordnen. Aufgrund morphologischer Veränderungen lassen sich drei Typen des programmierten Zelltods unterscheiden (Leist et al., 2001):

- (1) Bei der klassischen Apoptose kondensiert das Chromatin zu kompakten und geometrischen Formen (kugelförmig, sichelförmig). Andere typische Merkmale sind die Phosphatidylserin-Externalisierung („*eat me*“-Signal für Makrophagen), Schrumpfung des Zytoplasmas und die aktive als „Zeiose“ oder „*blebbing*“ bezeichnete Abschnürung von Membranvesikeln. Diese typischen Merkmale werden fast ausschließlich beobachtet wenn Caspasen, insbesondere die Caspase-3, aktiviert werden.
- (2) Der Begriff „Apoptose-artiger programmierter Zelltod“ wird benutzt, um Formen des Caspase-unabhängigen Zelltods mit einer Chromatin-Kondensation zu beschreiben, die in ihrem Grad geringer ausgeprägt ist und weniger komplexe geometrische Formen hervorbringt als die klassische Apoptose. Die Zelle zeigt apoptotische Merkmale wie z.B. die Externalisierung von Phosphatidylserin oder eine Schrumpfung des Zytoplasmas.
- (3) Der Nekrose-artige programmierte Zelltod beschreibt Formen, bei denen keine oder im besten Falle eine „fleckige“ Chromatin-Kondensation ohne geometrische Strukturen zu beobachten ist. Andere Merkmale des Apoptose-artigen Zelltods wie z.B. eine Externalisierung von Phagozytose-Markern können in variablen Ausmaßen auftreten. Einige Formen des Nekrose-artigen programmierten Zelltods werden auch als „abgebrochene Apoptose“ bezeichnet. Dabei wird die klassische Apoptose initiiert aber auf Ebene der Caspase-Aktivierung blockiert. Anschließend werden Caspase-unabhängige Signalwege besritten, um die Zelle zu töten.

#### 1.4 Inhibition von Caspasen

Bei der Untersuchung des Caspase-unabhängigen Zelltods ist es in manchen Fällen nötig die „dominanten“ Caspase-abhängigen Wege durch die Inhibition der Caspasen zu blockieren. Dies lässt sich durch eine Überexpression von viralen (z.B. CrmA oder p35), zellulären (z.B. IAP oder

Survivin) oder durch die Behandlung mit synthetischen Caspase-Inhibitoren erreichen (Ekert et al., 1999; Stennicke et al., 2002). Eine Gruppe von synthetischen Inhibitoren sind die kompetitiv wirkenden Peptidinhibitoren. Sie bestehen aus einer Peptidkette von 3 bis 4 Aminosäuren, die mit der Erkennungssequenz der zu inhibierenden Caspase übereinstimmen und als Pseudosubstrat an das aktive Zentrum der Caspase binden. Zusätzlich können diese Inhibitoren reaktive Gruppen tragen (z.B. eine Fluoromethylketon-Gruppe, -fmk) und durch diese kovalent an das aktive Zentrum binden und somit die Caspase irreversibel inaktivieren. Ein irreversibler pan-Caspase-Inhibitor ist das Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluoromethylketon (zVAD-fmk). zVAD-fmk inhibiert nahezu alle Caspasen und ist Zellmembran-permeabel. Durch die Verwendung dieser Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass es auch Zelltodmechanismen gibt, die keine Caspasen benötigen (siehe 1.3 oben).

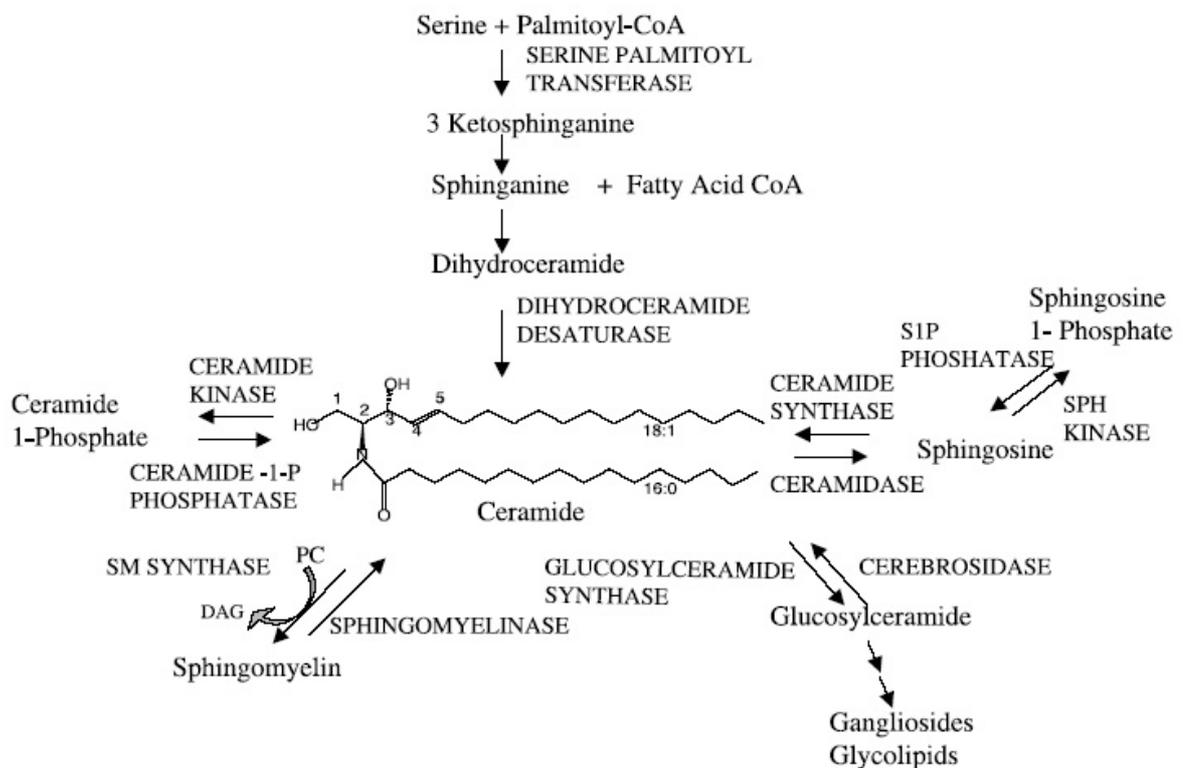
### 1.5 Das „Rezeptor interagierende Protein“ (RIP) ist ein Faktor im Caspase-unabhängigen Zelltod

Das Rezeptor interagierende Protein (RIP/RIPK1) ist an der TNF-R55-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt (Kelliher et al., 1998). RIP besitzt drei Proteindomänen; eine N-terminale Kinase-Domäne (KD), eine intermediäre Domäne und eine C-terminale Todesdomäne (DD). Für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B werden nur die intermediäre und die Todesdomäne benötigt. Nach neueren Erkenntnissen ist RIP auch an der Signaltransduktion des Caspase-unabhängigen Zelltods beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass in leukämischen Jurkat T-Zellen das Protein RIP für den Fas-, TNF- und TRAIL (Tumor Nekrose Faktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod essentiell ist (Holler et al., 2000). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität des RIP für die Vermittlung des Caspase-unabhängigen Zelltods benötigt wird. Obwohl der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, ist es wahrscheinlich, dass von RIP ein Protein phosphoryliert wird, das den Caspase-unabhängigen Zelltod vermittelt.

## 2 TNF- und Ceramid-vermittelte Signalwege

TNF kann über den TNF-R55 die Caspase-Kaskade aktivieren (siehe 1.2 oben). Schon bevor die Caspasen beschrieben waren, konnte gezeigt werden, dass bei der Vermittlung der TNF-induzierten Apoptose andere Enzyme und Mediatoren entscheidend sein können (Schütze et al., 1992), so z.B. das Sphingolipid Ceramid, das durch die Aktivität von Sphingomyelinasen

(SMasen) oder durch *de novo* Synthese gebildet werden kann (Abb. 3). Die SMasen spalten membranständiges Sphingomyelin zu Phosphocholin und Ceramid. Verschiedene apoptotische Stimuli wie ionisierende Strahlung, UV-Licht, Hitzeschock oder oxidativer Stress induzieren ebenfalls über die Aktivierung von SMasen die Generierung von Ceramid. Dieses ist als ein sogenanntes Botenmolekül (Mediator / „*second messenger*“) in die Vermittlung von Zelltod aber wohl auch bei der Regulation des Zellzyklus und der Seneszenz (Hannun, 1996) und in T-Zellen bei deren Aktivierung, Proliferation und Tod involviert (Adam et al., 2002).



**Abb. 3: Der Ceramidstoffwechsel.** Die Struktur des Sphingolipids Ceramid ist dargestellt. Ceramid kann durch die Aktivität von Sphingomyelinasen (SMasen) und Cerebrosidasen oder durch *de novo* Synthese gebildet und durch die Aktivität der Ceramidase, Sphingomyelin Synthase (SM Synthase) oder Glucosylceramid Synthase wieder entfernt werden. (Quelle: Pettus B.J., Chalfant C.E., & Hannun Y.A. (2002) *Biochim.Biophys.Acta* 1585, 114-125)

Wie in Abb. 4 dargestellt, induziert die Aktivierung des TNF-R55 über die Rekrutierung von TRADD und FADD an die Todesdomäne des Rezeptors die Aktivierung einer im endolysosomalen Kompartiment lokalisierten bei saurem pH-Wert aktiven „sauren“ Sphingomyelinase (A-SMase) (Schütze et al., 1992; Wiegmann et al., 1994; Schwandner et al., 1998). Der genaue Signalweg, der zur Aktivierung der A-SMase führt, ist bis heute nicht bekannt. Eine membranständige Phosphorylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC)

scheint über die Freisetzung des Signalmoleküls Diacylglycerol (DAG) die A-SMase zu aktivieren und so die Ceramidfreisetzung zu induzieren (Schütze et al., 1992).

Ein weiterer Signalweg des TNF-R55 bewirkt über die Aktivierung einer bei neutralem pH-Wert aktiven „neutralen“ Sphingomyelinase (N-SMase) ebenfalls die Freisetzung von Ceramid. Die Bedeutung dieses Signalwegs für die Induktion von Zelltod ist noch unzureichend geklärt (Levade et al., 1999). Es ist aber bekannt, dass für die Aktivierung der N-SMase die von der DD distinkte „N-SMase Aktivierungs-Domäne“ (NSD) des TNF-R55 benötigt wird (Adam et al., 1996).

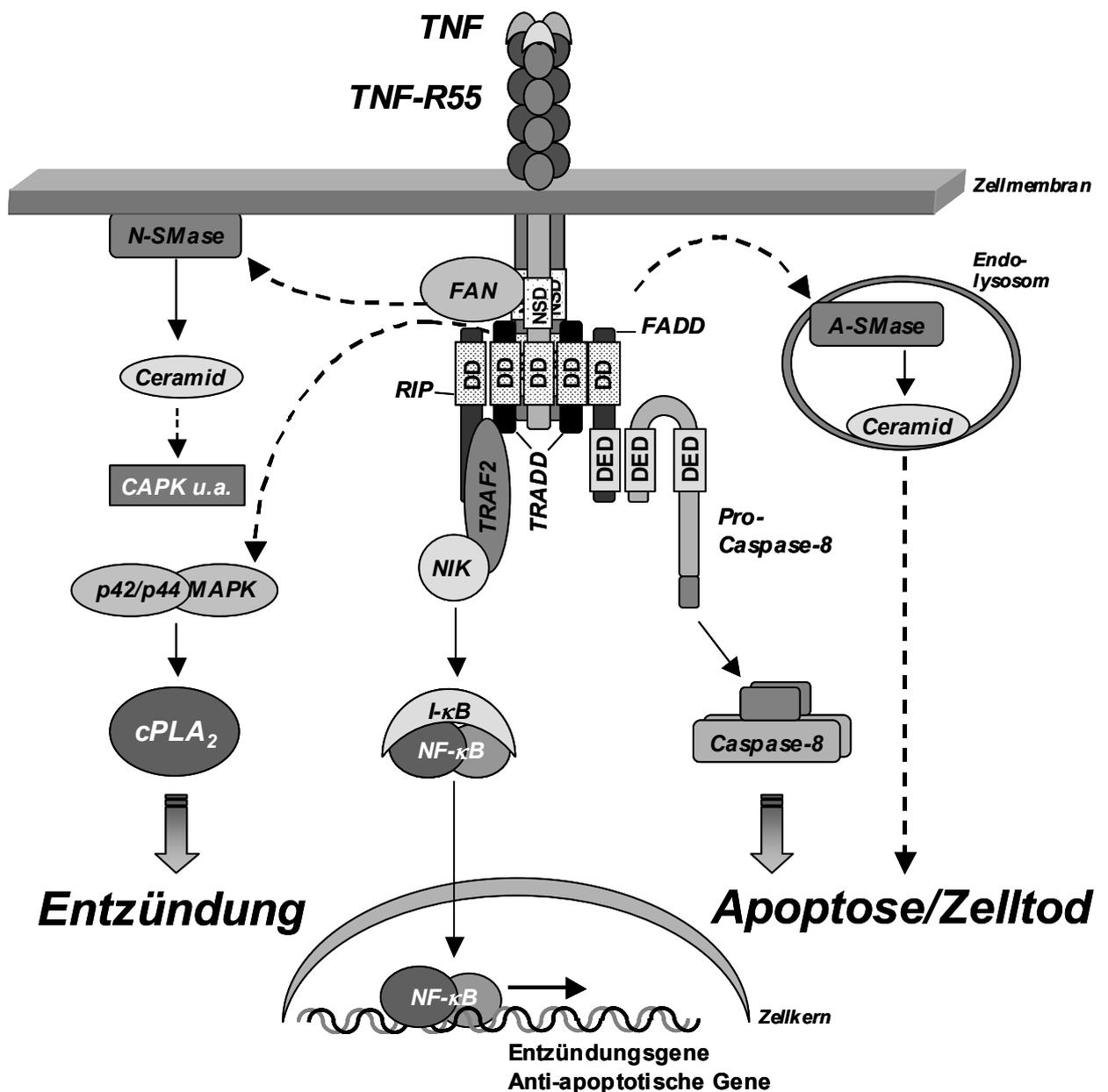


Abb. 4: Die Signalwege des TNF-R55. Erläuterungen siehe Text. Auf die Bedeutung der CAPK und anderer Ceramid-vermittelter Signalwege wird im Abschnitt 2.1 eingegangen.

## 2.1 Ceramid-vermittelte Signalwege

Die molekularen Mechanismen, über die Ceramid seine Wirkungen entfaltet, sind bislang nur unzureichend untersucht. Beispiele für mögliche Wirkmechanismen von Ceramid sind nachfolgend aufgeführt (siehe auch Abb. 5).

Die endolysosomal lokalisierte Protease Cathepsin D bindet von der A-SMase generiertes Ceramid und diese Interaktion induziert die autokatalytische Proteolyse des Proenzym (52 kDa) zur aktiven Form (48/32 kDa) (Heinrich et al., 1999; Heinrich et al., 2000; Heinrich et al., 2004). Das aktivierte Cathepsin D kann dann Apoptose induzieren und als Protease auch selbst zur Proteindegradation beitragen.

Ein weiteres mögliches Ziel von Ceramid stellt die „Ceramid-aktivierte Protein Kinase“ (CAPK) dar. Die CAPK wurde als „Kinase Suppressor von RAS“ (KSR) beschrieben. Es wird postuliert, dass KSR eine Rolle bei der TNF-induzierten entzündlichen Antwort spielt, indem Raf-1 durch Phosphorylierung aktiviert wird und die folgende Aktivierung der JNKs (c-Jun N-terminale Kinase) zum Zelltod führt (Basu et al., 1998b; Xing et al., 2001) (Abb. 5). Aus zwei Laboratorien wurde von einer direkten Interaktion von Raf-1 mit Ceramid berichtet, die aber unterschiedliche Konsequenzen dieser Interaktion beschreiben. Eine Gruppe zeigte, dass die Bindung von Ceramid keinen Effekt auf die Kinaseaktivität von Raf-1 hatte. Sie postulierte aber, dass Ceramid die Interaktion zwischen Raf-1 und KSR ermöglicht oder die Bindung von MEK (MAPK/ERK Kinase, Mitogen-aktivierte durch extrazelluläres Signal regulierte Protein-Kinase Kinase) verstärkt (Müller et al., 1998). Die andere Gruppe zeigte einen Ceramid-induzierten Anstieg der Kinaseaktivität von Raf-1 und postulierte, dass Ceramid KSR und ebenso cRaf aktiviert und dadurch die Aktivierung des MAP Kinase Signalwegs weiter verstärkt (Huwiler et al., 1996). Wie in Abb. 5 gezeigt, kann diese Aktivierung Apoptose auslösen.

Für die Proteinkinase C zeta (PKC $\zeta$ ) wurde eine direkte Aktivierung durch Ceramid gezeigt (Lozano et al., 1994). Von der PKC $\zeta$  ist beschrieben, dass sie den Faktor hnRNPA1 phosphoryliert und so alternative Splicing-Vorgänge beeinflussen könnte (Municio et al., 1995) durch die pro-apoptische Varianten von Proteinen entstehen könnten, wie z.B. das pro-apoptische Bcl-X(short) anstatt Bcl-X(long).

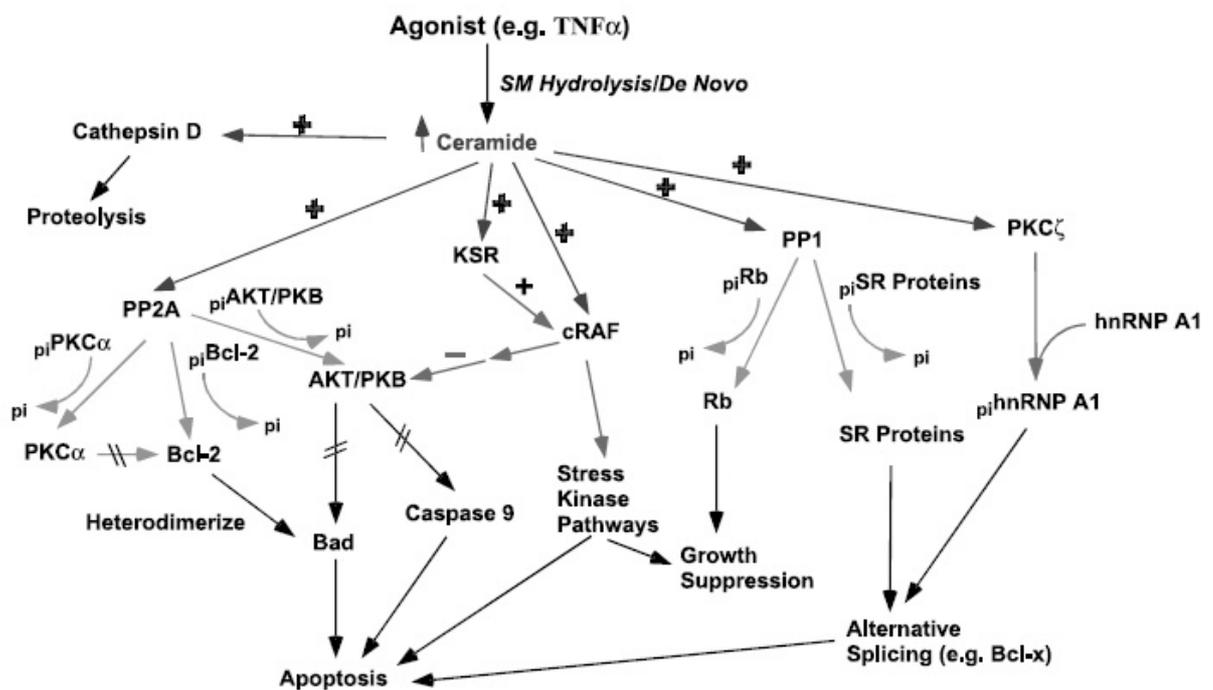
Weitere potentielle Ceramid-Bindungspartner sind die „Ceramid aktivierten Protein Phosphatasen“ (CAPP). Für die Serin/Threonin Protein Phosphatasen PP1 und PP2A konnte *in vitro* gezeigt werden, dass diese durch Ceramid aktiviert werden (Dobrowsky et al., 1993; Wolff et al., 1994). Mehrere Substrate der CAPP wurden entdeckt, die einen Einfluss auf den Zelltod haben könnten. Zu diesen gehören c-Jun, Bcl-2, Akt/PKB, Rb, PKC $\alpha$  und SR-Proteine (Black et al., 1991; Deng et al., 1998; Sato et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass Ceramid einerseits die mitochondriale Phosphatase PP2A aktiviert und parallel das mitochondriale Bcl-2 dephosphoryliert wird (Ruvolo et al., 1998; Ruvolo et al., 1999). Durch diese Dephosphorylierung verliert Bcl-2 seine anti-apoptotische Wirkung und der Zelltod wird gefördert.

Ein anderes Substrat der PP2A ist Akt/PKB (Basu et al., 1998a). Die Inaktivierung der anti-apoptotischen Funktionen des Akt/PKB erlaubt die Aktivierung der pro-apoptotischen Faktoren Bad und Caspase-9.

Von PP1 wird des weiteren berichtet, dass sie das „Retinoblastoma Genprodukt“ (Rb) (Chao et al., 1992; Obeid et al., 1993; Wolff et al., 1994; Dbaiibo et al., 1995) und „Serin/Arginin-reiche Proteine“ (SR Proteine) dephosphorylieren (Chalfant et al., 2001). Dadurch werden einerseits alternative Splicing-Vorgänge induziert, welche die Apoptose fördern können (siehe oben) und andererseits wird das Zellwachstum gehemmt (Abb. 5).

Die Vielzahl der hier angeführten Interaktionen zeigt die Komplexität der durch Ceramid beeinflussten Signalwege. Die Frage, ob Ceramid ein relevanter Mediator des programmierten Zelltod ist, ist noch nicht ausreichend untersucht.



**Abb. 5: Ceramid-vermittelte Signalwege des Zelltods.** Zur Erläuterung siehe Text (Quelle: Pettus B.J., Chalfant C.E., & Hannun Y.A. (2002) *Biochim.Biophys.Acta* 1585, 114-125)

Es gibt mehrere Hinweise, dass Ceramid eine Funktion als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods wahrnimmt. Für die murine Fibrosarkomzelllinie L929 wurde gezeigt, dass es möglich ist, Zellen vor dem TNF-induzierten Zelltod zu schützen, indem man die TNF-induzierte

Generierung von Ceramid (siehe Abb. 4) durch die Inhibition der A-SMase oder durch die Überexpression des Ceramid-degradierenden Enzyms „saure Ceramidase“ (AC, *acid ceramidase*) stört. Der TNF-induzierte Ceramid-vermittelte Zelltod von L929 Zellen ist Caspase-unabhängig, weist aber einige apoptotische Merkmale auf. So konnte in TNF-behandelten Zellen ein nukleärer und zellulärer Kollaps, DNA-Fragmentation und eine atypische Degradation der Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP) beobachtet werden (Strelow et al., 2000).

Es wurde beobachtet, dass die Zugabe von Caspase-Inhibitoren wie z.B. zVAD-fmk oder die Expression des viralen Proteins CrmA L929 Zellen für den TNF-induzierten Zelltod sensibilisiert (Vercammen et al., 1998; Strelow et al., 2000). Diese Sensibilisierung konnte auch *in vivo* im Mausmodell gezeigt werden (Cauwels et al., 2003). Dort verstärkte die generelle Caspase-Inhibition mit zVAD-fmk die zytotoxische Wirkung von TNF mit der Folge von hyperakutem hämodynamischem Kollaps, Leberversagen und Tod der Versuchstiere. Auch für die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 (Lüschen et al., 2000), für aktivierte Makrophagen (Kim et al., 2001a; Kim et al., 2001b) und für Neutrophile Granulozyten (Liu et al., 2003) konnte diese Sensibilisierung gezeigt werden.

Dieses Phänomen könnte darauf beruhen, dass durch die Caspase-Inhibition Signalwege, die ohne Caspasen als Effektoren den Zelltod vermitteln, verstärkt aktiviert werden. Für den Organismus hätte das Vorhandensein dieser Caspase-unabhängigen Signalwege den Vorteil, dass durch diese ein Ausfall des Caspase-Systems z.B. verursacht durch Viren oder Mutationen, kompensiert werden könnte. Caspase-unabhängige Signalwege könnten also zur Absicherung der effektiven Eliminierung von schädlichen Zellen dienen oder die Effektivität des programmierten Zelltods durch parallele Wege erhöhen.

### **3 Fragestellung**

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Ceramid als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods untersucht und die Frage beantwortet werden, über welche Signalwege die Generierung von Ceramid induziert wird. Im L929 Zellsystem konnte gezeigt werden, dass Ceramid den hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod vermittelt (Strelow et al., 2000). Von diesen Ergebnissen ausgehend sollte untersucht werden, ob auch der zVAD-beschleunigte hTNF-induzierte Caspase-unabhängige Zelltod von L929 Zellen durch Ceramid vermittelt wird.

Weiterführende Experimente sollten die Frage beantworten, ob Ceramid auch in anderen Zellsystemen bei der Vermittlung des Zelltods eine Rolle spielt. Dazu sollte zum einen untersucht werden, ob Caspase-unabhängiger Zelltod in anderen Zellsystemen auftritt und ob

dabei außerdem eine verstärkte Generierung von Ceramid ausschlaggebend für den Tod der Zelle ist.

Eine weitere Frage war, wie durch Todesrezeptoren neben Caspase-abhängigen auch Caspase-unabhängige Zelltodsignale vermittelt werden. Dazu sollten die bei der Signaltransduktion des Caspase-unabhängigen Zelltods beteiligten Faktoren charakterisiert werden und es sollte untersucht werden welches Ceramid-generierende Enzym aktiviert wird.

Durch die Untersuchungen von Zell- und Zellkernmorphologien, Caspase-Aktivitäten und Analyse der Spaltung von Caspase-Substraten sollte der Tod der untersuchten Zellen näher charakterisiert und so genauer zwischen Apoptose und Nekrose eingeordnet werden.

## Material und Methoden

### 1 Geräte und Materialien

BD Biosciences, USA	FACSCalibur Analyser, 100 mm-Zellkultur-schalen (Falcon)
Beckman Instruments, Palo Alto, USA	Szintillationszähler (LS 6000 LL)
Biometra, Göttingen	Thermocycler Trio Thermoblock, Standard Power Pack P25
Bio-Rad, München	Gene Pulser, Elektroporationsküvetten, Mini-PROTEAN II Gelelektrophoresekammern, Gelrockner
Dynex, Denkendorf	Mikrotiterplattenlesegerät
Eppendorf, Hamburg	Tischzentrifuge (5415R), Kühlzentrifuge (4517R), Thermomixer 5436
Forma Scientific, Marietta, USA	Zellkulturbrutschrank
INTAS Imaging Instruments, Göttingen	Geldokumentation
Invitrogen, Karlsruhe	HORIZON 58, HORIZON 11•14 Agarosegel-elektrophoresekammern
Heraeus, Osterode	LaminAir HB 2448K, Megafuge 1.0, Minifuge RF
Labsystems, Frankfurt	FluoroskanII Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät
Merck, Darmstadt	Kieselgelplatten für Dünnschichtchromatographie
Nunc, Nalge Nunc Int., Dänemark	Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten mit sechs, zwölf und sechsundneunzig Kavitäten
Raytest, Straubenhardt	Phosphoimager Fujix BAS 1000, Software PCBAS
Roche, Mannheim	Lightcycler PCR-Gerät
Schleicher & Schüll, Dassel	Gel Blotting Papier GB002
Stratagene, La Jolla, USA	NUC-Trap Push-Column
Tecan Deutschland, Crailsheim	Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer
Zeiss, Oberkochen	Axioskop Fluoreszenzmikroskop

## 2 Chemikalien, Enzyme 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:

Ambion, Huntingdon	<i>Silencer</i> <sup>TM</sup> siRNA Construction Kit
Amersham Life Science, Braunschweig	ECL-Detektions-Kit, <i>sn</i> -1,2-Diacylglycerol (DAG) assay reagent system, [ <sup>32</sup> P]- $\gamma$ -ATP
Bachem, Heidelberg	zVAD-fmk
BD Biosciences, Heidelberg	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Hefe-Extrakt, Antikörper
Biochrom, Berlin	Click's/RPMI 1640-Zellkulturmedium, fötales Kälberserum, Trypsin/EDTA, Glutamin, PBS
Biomol, Hamburg	Deoxynucleotide Set
Bio-Rad, München	TEMED, Nitrozellulosemembran 0,45 $\mu$ M, Protein-Massenstandard
Calbiochem, Bad Soden	zDEVD-afc, zIETD-afc
Dharmacon, Lafayette	chemisch synthetisierte siRNA
Eastman Kodak, USA	Biomax Röntgenfilme
Gene Tools, Philomath, USA	Antisense-Oligonukleotide (Morpholino Oligos)
Intergen, Oxford	CaspaTag <sup>TM</sup> Fluorescein Caspase (VAD) Activity Kit
Invitrogen, Karlsruhe	DNA-Polymerase, T4 DNA Ligase, Restriktionsenzyme, 100 bp DNA-Längenstandard, Protein-Massenstandard, Lipofectamin <sup>TM</sup> 2000, Oligofectamin <sup>TM</sup> , OptiMEM Medium
MBI Fermentas, St.Leon-Rot	Restriktionsenzyme
Molecular Probes, Leiden, Niederlande	D609
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, Heidelberg	Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1 40%)
TIB MolBiol, Berlin	Oligonukleotide (Sequenzierprimer, PCR-Primer, Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen)

### 3 Biologische Reagenzien

Rekombinantes, humanes TNF (hTNF, spezifische Aktivität  $5 \times 10^7$  Units/mg) und rekombinantes, murines TNF (mTNF, spezifische Aktivität  $1,2 \times 10^7$  Units/mg) wurden von Dr. G. Adolf (Bender Med Systems, Wien) zur Verfügung gestellt.

### 4 Antikörper

BD Biosciences / Pharmingen, Heidelberg	PARP (C2-10) RIP	65196E R41220
Santa Cruz Biotechnology, USA	$\beta$ -Aktin (C-11) Caspase-3 (H-277) Caspase-3 p20 (L-18) Caspase-8 p20 (H-134) Lamin (M-20) TNF-R1 (H-5) TRADD (H-278) TRAF2 (N-19) FADD (S-18) Caspase-8 (T-16)	sc-1615 sc-7148 sc-1225 sc-7890 sc-6217 sc-8436 sc-7868 sc-877 sc-6035 sc-6134
Alexis Biochemicals, Grünberg	FADD (7B5)	804-302-C100
Upstate / BIOMOL, Hamburg	Caspase-8 (5F7)	05-477
NEB, Frankfurt	Caspase-3	#9662
Research Diagnostics, USA	GAPDH (6C5)	RDI-TRK-5G4-6C5
Jackson ImmunoResearch Lab., USA	POD-gekoppelte sekundäre Antikörper Ziege anti-Maus, Maus anti- Ziege, Ziege anti-Kaninchen, Ziege anti-Ratte)	

### 5 Zelllinien und Zellkultur

Die murine Fibrosarkomzelllinie L929, die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3, die humane leukämische Jurkat T-Zelllinie und die humane Cervixkarzinomzelllinie HeLa wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC Rockville, USA) bezogen.

Die saure Ceramidase (AC) überexprimierenden L929 Zellen wurden von Strelow et al. hergestellt (Strelow et al., 2000). Die L929 Subzelllinie L929sA wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Walter Fiers zur Verfügung gestellt (Vanhaesebroeck et al., 1992; Fiers et al., 1995). Die FADD-, RIP-, Caspase-8-defizienten und Bcl-2-überexprimierenden Jurkat T-Zellen wurden freundlicherweise von J. Blenis, B. Seed und S. Korsmeyer (Harvard Medical School, Boston USA) zur Verfügung gestellt. Alle Zelllinien wurden in einer Mixtur aus Click's/RPMI 1640 Medium (50:50, v/v) gehalten. Den Medien wurden jeweils 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 10 mM Glutamin, je 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin und 0,5 % (v/v) einer β-Mercaptoethanol-Lösung (0,07 % (v/v) in 0,9 % (w/v) NaCl) zugesetzt. Die Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen oder -schalen bei 37°C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem mit 5 % (w/v) CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank gehalten und alle 3 Tage passagiert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in FCS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bei -150°C gelagert.

## 6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Separation von verschieden großen DNA-Fragmenten wurden horizontale TAE-Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 30 ml (100 ml für präparative Gele) 1 x TAE-Puffer (50fach: 2 M Tris (pH 7,4), 2 M Essigsäure, 50 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst und das Gel gegossen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 10 x Auftragspuffer (50 % (v/v) Glycerin, 100 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch mit einer konstanten Spannung von 5 V/cm separiert und nach einer Ethidiumbromidfärbung (4 µg/ml) unter langwelligen UV-Licht (312 nm) detektiert und mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

## 7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot-Analyse

Die Zellen wurden nach der gewünschten Behandlung gesammelt und nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde das Zellsediment in eiskaltem TNE-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 1 % (v/v) NP40, 2 mM EDTA) mit 10 µg/ml Pepstatin/Aprotinin/Leupeptin, 1 mM Na-Orthovanadat und 5 mM NaF resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 20800 × g, 4°C) wurden die Zellextrakte aus dem Überstand gewonnen.

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Proteinbestimmungs-Reagenz gegen eine Albumin-Eichreihe (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/ml BSA) ermittelt.

Zur Darstellung von endogen und rekombinant exprimierten Proteinen wurden die Proteinextrakte zunächst mittels SDS-PAGE in Anlehnung an Laemmli (Laemmli, 1970) durch Gelelektrophorese getrennt. Dazu wurden die Proteinproben mit fünffach konzentriertem SDS-Probenpuffer (125 mM Tris pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau) in einem maximalen Endvolumen von 30  $\mu$ l versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel für ca. 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierten Proteine wurden aus den Gelen im Naß-Transfer-Verfahren (Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h unter Kühlung auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der Transfer wurde durch eine reversible Färbung der Membran mit Ponceau-Rot (0,5 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure) kontrolliert. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen unter andauerndem Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS/0,1% (v/v) Tween 20) inkubiert. Danach wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit einer Primär-Antikörper Lösung 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 60 min bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden nachfolgend dreimal für 10 min mit PBS/0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen. Es wurde ein Chemilumineszenz Reagenz nach Anleitung des Herstellers verwendet, um reaktive Proteine nachzuweisen.

## 8 Proteindepletion (*knock-down*) des Proteins RIP

### 8.1 Transfektionen mit Antisense-Oligonukleotiden (Morpholino Oligos)

L929 und NIH3T3 Zellen wurden mit Antisense-Oligonukleotiden (Morpholino Oligos, Sequenz ATT GCT CAG AAT CTC CAA CAC ACC A) behandelt, die gegen die RIP mRNA gerichtet waren. Dazu wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in einer Zellkulturschale mit 6 Kavitäten ausgesät und nach erfolgter Adhärenz (24 h) mit Antisense-Oligonukleotiden behandelt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers (Gene Tools, USA) vorgegangen und das EPEI-System verwendet. Dieses transportiert die Antisense-Oligonukleotide in die Zelle. Außerdem wurde die „Kratz“-Methode (*scrape delivery*) angewendet. Dabei wurden die Antisense-Oligonukleotide zu den

Zellen gegeben und diese anschließend mit einem weichen Gummi vom Schalenboden abgekratzt und neu ausgesät. Durch die dabei entstehenden Mikroverletzungen sollen die Antisense-Oligonukleotide in die Zellen eindringen. Nach der Behandlung wurden die Zellen 24 bis 72 h im Brutschrank inkubiert und anschließend wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot-Analyse die Expression des Proteins RIP überprüft.

## 8.2 Herstellung von siRNA

Die siRNA wurden mit dem *Silencer*<sup>TM</sup> siRNA Construction Kit nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die dabei verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms „*siRNA Target Finder*“ von Ambion ausgesucht. Es wurden vier siRNA gegen die mRNA des RIP-Proteins hergestellt (genannt RIP28, RIP51, RIP126, RIP135). Des Weiteren wurde zur Kontrolle eine siRNA gegen die mRNA des GAPDH-Proteins mit den im Kit enthaltenen Oligonukleotiden hergestellt. Die Qualität und Konzentration der siRNA wurde spektrometrisch überprüft. Die Präparationen wurden bei -20 gelagert.

Die siRNA wurde gegen folgende Zielsequenzen generiert:

RIP28 (5'-AATATCCTCGTTGATCGTGAC-3')

RIP51 (5'-AATGTCATCTGTAAGGAGCAG-3')

RIP126 (5'-AAACTGTGCCCGCAAGCTGGG-3')

RIP135 (5'-AAAGGGGCCACAGTGGGAAAG-3')

Zusätzlich zu der synthetisierten siRNA wurde zur Kontrolle eine chemisch synthetisierte kommerziell bezogene siRNA gegen RIP (Dharmacon) eingesetzt. Diese siRNA wurde durch Zusammenlagerung zweier Einzelstränge nach Angaben des Herstellers generiert.

(Strang 1: 5'-UAUCCUCGUUGAUCGUGAC-dTdT-3', Strang 2: 3'-dTdT-AUAGGAGCAACUAGCACUG-5').

## 8.3 Herstellung des RNAi-Vektors pSHAG-shRIP

Der RNAi-Vektor pSHAG wurde von der Arbeitsgruppe um G.J. Hannon konstruiert (Paddison et al., 2002) und mit deren Genehmigung freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von H. Kalthoff zur Verfügung gestellt. Der Vektor wird so konstruiert, dass er für eine shRNA (*short hairpin RNA*) kodiert, die in der Zelle RNA-Interferenz (RNAi) auslösen soll. Bei der Konstruktion des Vektor pSHAG-shRIP wurde das „BseRI-BamHI Protokoll“ verwendet (siehe <http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html>). Das Insert für den Vektor wurde durch die Zusammenlagerung der Oligonukleotide (TIB Molbiol) generiert und in den vorbereiteten

Vektor (Restriktion mit den Enzymen BseRI und BamHI) ligiert und anschließend in *E. coli* DH10B transformiert. Die korrekte Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Um die Sequenzierung zu erleichtern, wurde die Haarnadelstruktur des Inserts durch eine Restriktion mit Hind III zerstört.

shRIP Oligo A: (Ph-ACC CAT CTG GAG CCC CTG GGA ACT GTG CGA AGC TTG GCA CAG TTC CCA GGG GCT CCA GAT GGG TCC TTT TTT T)

shRIP Oligo B: (Ph-GAT CAA AAA AAG GAC CCA TCT GGA GCC CCT GGG AAC TGT GCC AAG CTT CGC ACA GTT CCC AGG GGC TCC AGA TGG GTC G)

## 9 Transfektion eukaryotischer Zellen

### 9.1 Transiente Transfektion

L929 und NIH3T3 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät (je 0,5 oder  $1 \times 10^5$  Zellen pro Zellkulturschale mit 6 Kavitäten). Zur Transfektion wurden die kommerziell erhältlichen Reagenzien Oligofectamine™, Lipofectamine 2000™ (Invitrogen), RiboJuice™ (Novagen), Fugene™ (Roche) oder siPORT™ (Ambion) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 9.2 Herstellung stabil transfizierter Zellen durch Elektroporation

Es wurden pro Ansatz  $0,85 \times 10^7$  L929 Zellen in 0,8 ml eiskaltem Medium resuspendiert und mit 2 µg des Geneticin-Resistenzplasmides BMGNeo (Karasuyama et al., 1988) und 20 µg des gewünschten Plasmides (pSHAG-1 oder pSHAG-shRIP) in Elektroporationsküvetten vermischt und die Ansätze für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden kurz vor der Elektroporation aufgewirbelt und sofort elektroporiert (960 µF/280 V, Gene Pulser). Die Zellen wurden dann in den Küvetten für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend wurde der Inhalt jeder Küvette auf fünf 150 mm Zellkulturschalen mit Zellkulturmedium verteilt. Die Schalen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert bevor das Medium gewechselt und mit Geneticin (1 mg/ml) versetzt wurde. Alle vier Tage wurde vorsichtig das Geneticin-versetzte Medium erneuert und 10 Tage nach der Transfektion wurde begonnen, resistente Klone zu selektionieren.

## 10 Zytotoxizitätsanalysen

### 10.1 Färbung von adhärenenten Zellen mit Kristallviolett

$10^4$  Zellen wurden pro Kavität in fünffachen Ansätzen (100  $\mu$ l) in Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) ausgesät. Nach einer eintägigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit frischem Medium mit den entsprechenden Zusätzen weiter bei 37°C inkubiert. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen zweimal mit je 200  $\mu$ l PBS gewaschen und für 10 min mit 50  $\mu$ l einer Kristallviolett-Färbelösung (0,5 % (w/v) Kristallviolett, 4 % (w/v) Formaldehyd, 30% (v/v) Ethanol, 0,17 % (w/v) NaCl) bei 37°C gefärbt und fixiert. Die Färbelösung wurde mit Leitungswasser vorsichtig abgewaschen und die Platten bei 50°C getrocknet. Der an die (vor der Fixierung überlebenden) Zellen gebundene blaue Farbstoff wurde mit je 200  $\mu$ l 33 % (v/v) Essigsäure pro Kavität gelöst und durch die Absorptionmessung bei 570 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät quantifiziert.

### 10.2 Lebendfärbung von Suspensionszellen mit MTT

$10^5$  Zellen wurden pro Kavität in fünffachen Ansätzen (50 bis 100  $\mu$ l) in Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) ausgesät. Zu den Zellen wurden die entsprechenden Zusätze gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach der Behandlungszeit wurden 25  $\mu$ l MTT-Lösung (2,5 mg/ml in PBS) zugefügt und für 2 bis 5 h weiter inkubiert, wobei das MTT an intakten Mitochondrien zu blauen MTT-Formazan umgesetzt wurde. Durch die Zugabe von 125  $\mu$ l Isopropanol-HCl (24:1) wurde das MTT-Formazan gelöst und anschließend durch die Absorptionmessung bei 570 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät quantifiziert.

## 11 Untersuchungen von Zell- und Zellkernmorphologien

### 11.1 DAPI-Färbung von Zellen

Zur morphologischen Untersuchung von Zellkernen durch DAPI-Färbung wurden  $3,5 \times 10^4$  Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten runden Deckgläsern aus Glas ausgesät. Die Zellen wurden am folgenden Tag stimuliert und der Versuch zu gewünschten Zeitpunkten gestoppt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit Paraformaldehyd (2,5 % (w/v) in PBS) bei Raumtemperatur fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Kerne 30 min bei 37°C im Dunkeln mit DAPI (0,5  $\mu$ g/ml in PBS) gefärbt.

Die Färbelösung wurde aus einer DAPI-Stammlösung (10 mg/ml) durch Verdünnung mit Methanol (1:200 (v/v)) und anschließender Zugabe von PBS (1:100 (v/v)) hergestellt. Die gefärbten Zellen wurden dreimal mit PBS und zwei Sekunden in entionisiertem Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden dann auf Objektträger mit Eindeckmittel gelegt und mit Nagellack versiegelt. Zur Analyse wurden die Zellen und Zellkerne an einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 359 nm und einer Emission von 441 nm fotografiert oder mittels konfokaler Mikroskopie betrachtet.

## 11.2 Fotodokumentation lebender Zellen

Unfixierte, lebende Zellen wurden in der Kulturschale mit Medium an dem Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss) mit der Kamera KR10M (Ricoh) fotografiert.

## 12 Messung der Enzymaktivitäten von Caspasen

### 12.1 Aktivitätsbestimmung mittels fluorogener Enzymsubstrate

Die Messung der Enzymaktivitäten der Caspase-3 und -8 und wurde im wesentlichen nach der Methode von Stennicke et al. (1997) durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden gesammelt, sedimentiert, und nach einmaligem Waschen mit eiskaltem PBS in einem möglichst kleinen Volumen (20 bis 50  $\mu\text{l}$  pro  $10^6$  Zellen) Lysispuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 142 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 0,2 % (v/v) NP40, 2 mM Pefabloc™, 1 mM DTT) resuspendiert und zur Lyse für 20 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde zwischendurch erneut mehrere Male gemischt.

Durch Zentrifugation (10 min,  $20800 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) wurden die Zellextrakte aus dem Überstand gewonnen. Die Proteinkonzentration wurde mit Coomassie Proteinbestimmungs-Reagenz gegen eine Albumin-Eichreihe ermittelt. Zur Herstellung der Positivkontrolle wurden ca. 100  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt mit 1 mM dATP und 10  $\mu\text{M}$  Cytochrom c versetzt und 1 h bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert, wodurch die Caspasen *in vitro* aktiviert werden. Die Enzymaktivitätsmessung erfolgte mit 50  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt in 100  $\mu\text{l}$  Caspasepuffer (20 mM PIPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) CHAPS, 10 % (w/v) Sucrose, pH 7,2). Dem Puffer wurden für eine Caspase-3 Aktivitätsmessung 100  $\mu\text{M}$  zDEVD-afc und für eine Caspase-8 Aktivitätsmessung 100  $\mu\text{M}$  zIETD-afc zugesetzt. In einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät wurde bei  $37^\circ\text{C}$  die Freisetzung des fluorogenen Spaltproduktes (AFC) bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emission bei 505 nm in einem Zeittakt von 1 min über 2 h quantifiziert.

## 12.2 Aktivitätsbestimmung mittels Durchflußzytometrie

Zur Messung der Enzymaktivität von Caspasen mittels Durchflußzytometrie wurde das „CaspaTag™ Fluorescein Caspase (VAD) Activity Kit“ verwendet. Für jede Messung wurden  $10^5$  Zellen in Zellkulturschalen mit 6 Kavitäten ausgesät. Nach Adhärenz wurden die Zellen behandelt und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurde auf den Zellrasen 2 ml Trypsin/EDTA gegeben, das sofort wieder entfernt wurde. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wurden die Zellen in 300 µl frischem Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurde nach Vorschrift des Hersteller ein fluoreszenzmarkiertes irreversibel bindendes Caspase-Substrat (FAM-VAD-FMK) hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 1 h dunkel und ohne Gasabschluss im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden dann nach Angaben des Herstellers gewaschen und die Fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

## 13 Messung der enzymatischen Aktivität der sauren Ceramidase

$4 \times 10^6$  Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 200 µl Lysispuffer (0,2 % (v/v) Triton X-100 in H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch mehrmalige Passagen durch eine 25-Gauge Kanüle homogenisiert. Nach Zentrifugation (10 min,  $20800 \times g$ , 4°C) wurde im Überstand die Proteinkonzentration mittels BCA Proteinbestimmungs-Reagenz gemessen. Pro Versuchsansatz wurden 100 µg Protein zu einem Endvolumen von 100 µl mit einer Substratmischung versetzt. Diese enthielt 150 µM N-Laurylsphingosin und 2 µM N-[1-<sup>14</sup>C]-Laurylsphingosin in 0,05 % (v/v) Triton X-100, 0,02 % (v/v) Tween 20, 0,04 % (v/v) Nonidet P-40 und 0,08 % (v/v) Natrium-Cholat in Natriumacetatpuffer (250 mM, pH 4,5) und 5 µM EDTA. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Enzymreaktion nachfolgend durch die Zugabe von 250 µl H<sub>2</sub>O und 750 µl CHCl<sub>3</sub>/Methanol (2:1 (v/v)) gestoppt. Durch kräftiges Mischen und anschließende (5 min,  $13200 \times g$ ) wurden die Lipide in der organischen Phase angereichert. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase durch erneutes Mischen mit 250 µl H<sub>2</sub>O/Methanol/CHCl<sub>3</sub> (47:48:3 (v/v/v)) und anschließende Zentrifugieren entsalzt. Die Lipide in der organischen Phase wurden unter Stickstoff evaporiert, in 40 µl CHCl<sub>3</sub>/Methanol (2:1 (v/v)) aufgenommen und nach Auftragen auf eine Kieselgelplatte (Vorlauf in CHCl<sub>3</sub>/Methanol (2:1 (v/v))) über Dünnschichtchromatographie in CHCl<sub>3</sub>/Methanol/Eisessig (94:5:1 (v/v/v)) in einem

40-minütigen Lauf getrennt. Das N-[1-<sup>14</sup>C]-Laurylsphingosin und die durch die Enzymreaktion freigesetzte [1-<sup>14</sup>C]-Laurinsäure wurden mittels Autoradiographie detektiert und mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert.

## 14 Ceramid-Quantifizierung

Die quantitative Messung endogener Ceramide erfolgte im wesentlichen wie beschrieben (Dressler et al., 1990). Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet, mit eiskaltem PBS gewaschen und gezählt. Die Zellzahlen wurden normalisiert und die Zellsedimente in je 1,825 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden in Glasspitzbodenröhrchen transferiert. Durch die Zugabe von 6 ml CHCl<sub>3</sub>/Methanol/1N HCl (100:100:1 (v/v/v)), fünfminütige Ultraschallbehandlung und anschließendes kräftiges Mischen wurden die Lipide aus den Zellen extrahiert. Nach der Phasentrennung, die durch 10 min Zentrifugation bei 1500 × g unterstützt wurde, wurden die Lipide in der organischen Phase unter Stickstoff evaporiert und einer milden alkalischen Hydrolyse (2 ml 0,1 N methanolische KOH, 1 h bei 37°C) unterzogen, wodurch Glycerophospholipide entfernt wurden. Durch die Zugabe von 6 ml CHCl<sub>3</sub>/Methanol/1N HCl (100:100:1 (v/v/v)), 2,25 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml CHCl<sub>3</sub> wurden die Lipide erneut extrahiert und unter Stickstoff eingedampft. Die radioaktive Markierung der Ceramide erfolgte durch das „*sn*-1,2-Diacylglycerol (DAG) assay reagent system“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Das durch die Kinasereaktion entstandene radioaktiv markierte Ceramid-1-Phosphat wurde von den restlichen Lipiden mittels Dünnschichtchromatographie in CHCl<sub>3</sub>/Methanol/Eisessig (65:15:5 (v/v/v)) in einem 30-minütigem Lauf getrennt, über Autoradiographie detektiert und mit Hilfe eines Phosphoimagers und der Software PCBAS quantifiziert. Für jeden Versuchsansatz wurde hierzu eine Standardkurve erstellt, indem in Doppelwerten 0-1000 pmol C<sub>16</sub>-Ceramid in die Kinasereaktion eingesetzt wurden.

## 15 Messung der NF-κB-Aktivierung durch Gelretardations-Analysen

### 15.1 Markierung des Oligonukleotids

20 pmol des benötigten Oligonukleotides (5'-ATC AGG GAC TTT CCG CTG GGG ACT TTC CG-3') wurden mit 75 μCi [<sup>32</sup>P]-γ-ATP in T4-Kinasepuffer in zwei Wiederholungen mit 10 Enzymeinheiten T4-Polynukleotid-Kinase versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert, wodurch die 5'-OH Enden mit [<sup>32</sup>P]-γ-ATP phosphoryliert wurden. Nicht eingebautes [<sup>32</sup>P]-γ-ATP wurde über eine „NUCTRAP™ Push-Column“ (Stratagene) nach Vorschrift des Herstellers abgetrennt,

und anschließend wurde die Aktivität der markierten Oligonukleotid-DNA im Szintillationszähler gemessen. Das [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP markierte Oligonukleotid wurde mit der 10fachen molare Menge eines komplementären Oligonukleotides bei 100°C inkubiert. Durch eine dreistündige Abkühlungsphase auf Raumtemperatur wurden die komplementären DNA-Stränge hybridisiert. Für die nachfolgenden Gelretardations-Experimente wurde die Oligonukleotid-Lösung auf eine spezifische Aktivität von 20000 bis 50000 cpm/ $\mu\text{l}$  mit STE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) eingestellt.

## 15.2 Herstellung von nukleären Extrakten

Von L929 Zellen wurden nukleäre Extrakte hergestellt, indem  $2 \times 10^5$  Zellen nach der Behandlung mit PBS gewaschen und aus der Zellkulturschale in 1 ml PBS abgeschabt wurden. Nach Zentrifugation wurde das Zellsediment in 400  $\mu\text{l}$  Puffer A (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  10 % (v/v) NP-40 wurden die Zellen 2 min bei 4°C geschüttelt und durch Zentrifugation (2 min,  $20800 \times g$  und 4°C) die Kerne sedimentiert. Die Zellkerne wurden nachfolgend in 30  $\mu\text{l}$  Puffer C (20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) resuspendiert und durch 30-minütiges Schütteln bei 4°C lysiert, wodurch chromatingebundene Proteine freigesetzt wurden.

Durch Zentrifugation (5 min,  $20800 \times g$ , 4°C) wurden die nukleären Extrakte aus dem Überstand gewonnen und die Proteinkonzentration mittels BCA-Proteinbestimmungs Reagenz bestimmt.

## 15.3 Gelretardations-Analyse

6  $\mu\text{g}$  nukleäre Proteine wurden in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  mit 2  $\mu\text{g}$  unspezifischer Kompetitor-DNA (poly dI:dC in Bindungspuffer; fünffach konzentrierter Bindungspuffer: 25 mM HEPES pH 7,8, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerin, 25 mM DTT) für 15 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Danach wurde 1 ng [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP markiertes Oligonukleotid zugegeben, die Ansätze für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend mit 4  $\mu\text{l}$  Gelladepuffer (90 mM EDTA, 30 % (w/v) Glycerin, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau) versehen. Die Proben wurden über ein 6 % TBE-Polyacrylamidgel in  $0,25 \times \text{TBE}$  ( $1 \times \text{TBE}$ : 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) bei 7,5 V/cm getrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographisch analysiert.

## Ergebnisse

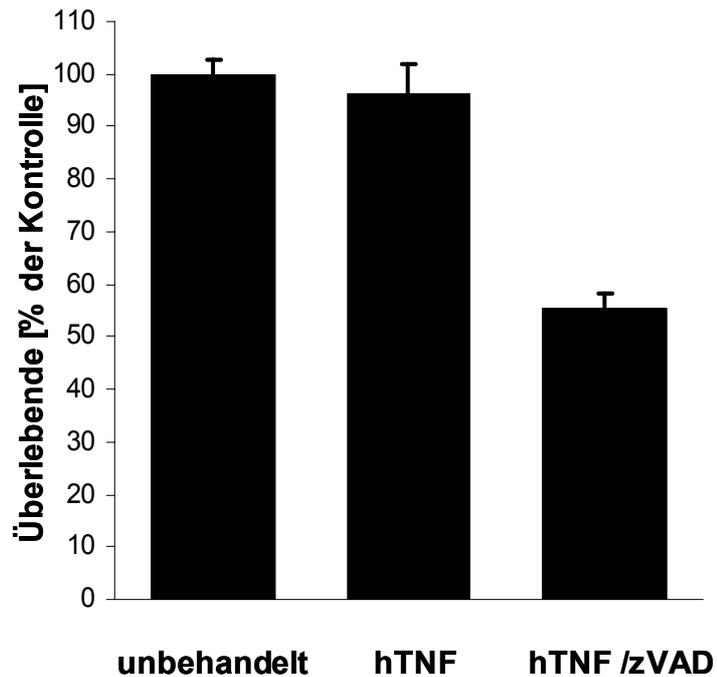
### 1 Bedeutung des Sphingolipids Ceramid im Caspase-unabhängigen Zelltod

Für die murine Fibrosarkomzelllinie L929 konnte zuvor gezeigt werden, dass der hTNF-induzierte Zelltod ohne Aktivierung von Caspasen durch die Generierung des Sphingolipids Ceramid vermittelt wird (Strelow et al., 2000). Es sollte nun die Relevanz von Ceramid als ein genereller Mediator des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltods untersucht werden. Im Gegensatz zu L929 Zellen, in denen die Stimulation mit TNF keine Caspasen aktiviert, erfordert die Analyse des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltods in den meisten anderen Zellsystemen die aktive Inhibition der interferierenden Caspase-abhängigen Signalwege. Deshalb wurde zuerst in dem etablierten L929 Zellsystem untersucht, ob Ceramid auch in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk eine entscheidende Rolle im TNF-induzierten Zelltod dieser Zellen spielt. In folgenden Versuchen wurde dann untersucht, ob Ceramid auch im Caspase-unabhängigen Zelltod der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 und in humanen leukämischen Jurkat T-Zellen als Mediator des Zelltods fungiert.

#### 1.1 Untersuchungen der Signalwege des hTNF/zVAD-induzierten Zelltods im L929 Zellsystem

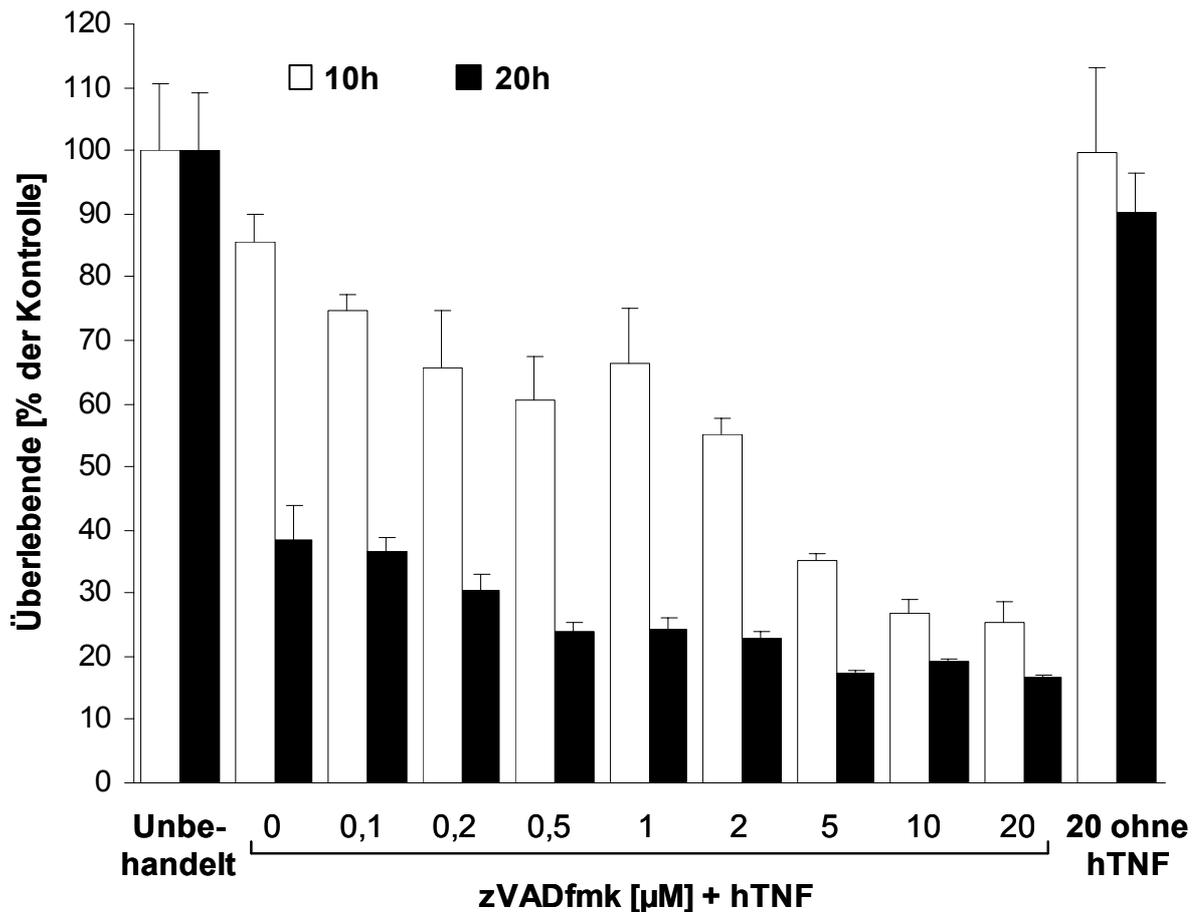
##### 1.1.1 Der pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk verstärkt den hTNF-induzierten Zelltod in L929 Zellen

Die Inhibition von Caspasen kann den Caspase-abhängigen Zelltod verhindern. Diese Inhibition ist z.B. durch die Behandlung mit dem Peptidinhibitor zVAD-fmk oder anderen pan-Caspase-Inhibitoren zu erreichen. Sie bedeutet aber nicht in jedem Fall einen kompletten Schutz vor der Induktion des programmierten Zelltods. So wird der hTNF-induzierte Zelltod in L929 und NIH3T3 Zellen sogar durch zVAD-fmk erheblich verstärkt (siehe Einleitung 1.4). In Abb. 6 ist diese drastische Sensitivierung durch zVAD-fmk in L929 Zellen gezeigt. Nach einer vierstündigen Stimulation mit hTNF (100 ng/ml) und zVAD-fmk (20  $\mu$ M) war der Zelltod deutlich ausgeprägter (55% Überlebende) als mit hTNF allein (95% Überlebende).



**Abb. 6: zVAD-fmk sensitiviert L929 Zellen für hTNF-induzierten Zelltod.** L929 Zellen wurden mit Medium, hTNF (100 ng/ml) oder hTNF und zVAD-fmk (20  $\mu$ M) für 4 h inkubiert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurden. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

Diese Sensitivierung ist zeit- und dosisabhängig (Abb. 7). Höhere Konzentrationen an zVAD-fmk im Medium und längere Wirkzeiten führen zu einer stärkeren zytotoxischen Wirkung des hTNF auf die Zellen. Die alleinige Inkubation mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk für 10 bzw. 20 h hat keine zytotoxische Wirkung (rechte Säulen).

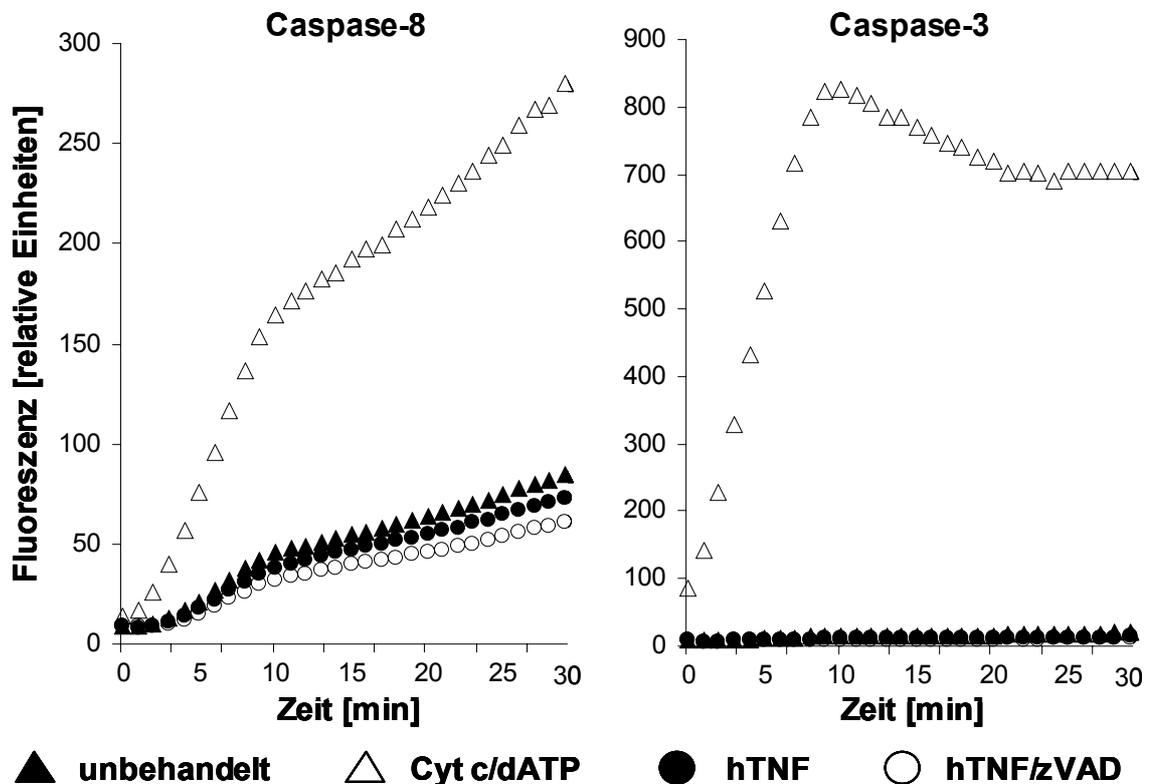


**Abb. 7: Die Sensitivierung für hTNF-induzierten Zelltod durch zVAD-fmk in L929 Zellen ist dosis- und zeitabhängig.** L929 Zellen wurden mit Medium (unbehandelt), hTNF (100 ng/ml), hTNF in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen zVAD-fmk (0,1 - 20 µM) oder 20 µM zVAD-fmk ohne hTNF für 10 h oder 20 h inkubiert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurden. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

### 1.1.2 Der hTNF- und hTNF/zVAD-induzierte Zelltod von L929 Zellen verläuft ohne die Aktivierung der Caspasen-8 und -3

Um zu verifizieren, dass der hTNF/zVAD-induzierte Zelltod Caspase-unabhängig verläuft, wurden die Aktivitäten der Caspasen-8 und -3 bestimmt. Dazu wurden L929 Zellen für 3 h mit hTNF (100 ng/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) stimuliert und anschließend in Zellextrakten die Aktivitäten der Caspasen durch Messungen der Spaltung von fluorogenen Enzymsubstraten bestimmt. In Abb. 8 ist gezeigt, dass weder die Stimulation mit hTNF noch mit hTNF/zVAD eine Caspase-Aktivität induzierte. Weder das Substrat für Caspase-8 (zIETD-afc) noch für Caspase-3 (zDEVD-afc) wurde stärker umgesetzt als durch den Extrakt aus unbehandelten Zellen. Durch eine *in vitro* Aktivierung der Caspasen mit Cytochrom c und dATP (Cyt c/dATP) konnte aber gezeigt werden, dass die Zellextrakte potenziell aktive Caspasen enthielten. Diese Untersuchungen zeigen, dass der hTNF- und der hTNF/zVAD-

induzierte Zelltod in L929 Zellen ohne die Beteiligung von Caspasen als Effektoren des Zelltods verläuft, obwohl in L929 Zellen prinzipiell aktivierbare Caspasen nachweisbar sind.



**Abb. 8:** hTNF und hTNF /zVAD induzieren in L929 Zellen keine Aktivierung der Caspasen-8 und -3. L929 Zellen wurden 3 h mit Medium, hTNF (100 ng/ml) oder mit hTNF in Gegenwart von zVAD-fmk (20µM) stimuliert. Anschließend wurde in den Zellextrakten die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Substrate (zIETD-afc bzw. zDEVD-afc) über 120 min bestimmt (hier nur die ersten 30 min abgebildet). Als Positivkontrolle dienen Zellextrakte unstimulierter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade in vitro aktiviert wurde (Cyt c/dATP).

### 1.1.3 Die Stimulation von L929 Zellen mit hTNF oder hTNF/zVAD induziert einen Anstieg des intrazellulären Gehalts an Ceramid

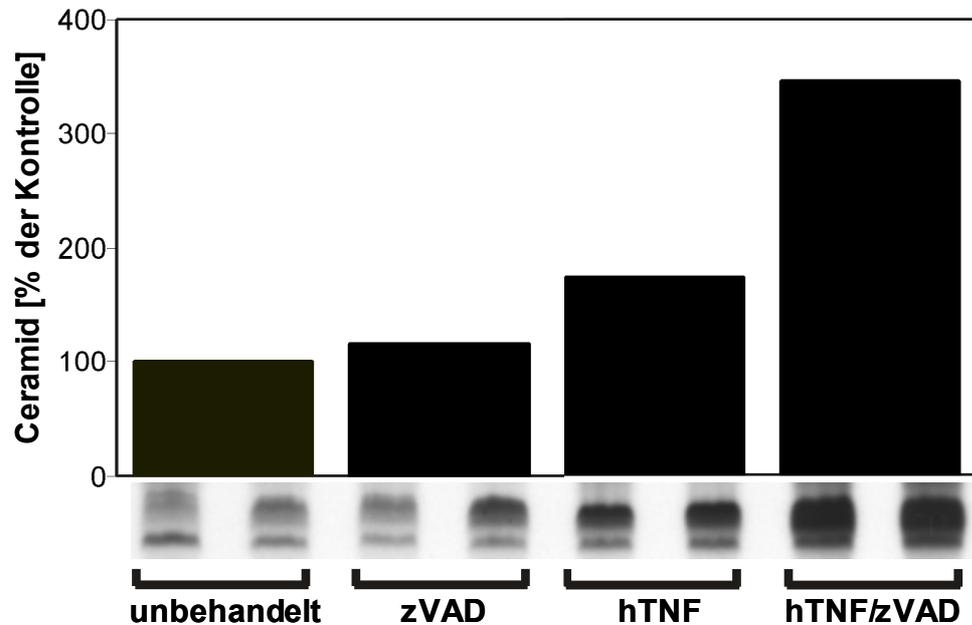
Das Sphingolipid Ceramid ist ein Mediator im hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod von L929 Zellen (Strelow et al., 2000). Ob Ceramid auch im zVAD-beschleunigten Zelltod eine Rolle spielt, wurde zunächst durch Messungen der intrazellulären Ceramidspiegel untersucht.

Dazu wurden Zellen stimuliert und nach einer Extraktion der Lipide die in dieser Fraktion enthaltenen Ceramide durch die DAG-Kinase radioaktiv markiert. Nach einer anschließenden Dünnschicht-Chromatographie wurden das markierte Ceramid mit Hilfe der Autoradiographie nachgewiesen und quantifiziert.

Nach der Stimulation von L929 Zellen für 3 h mit hTNF (100 ng/ml) allein wie auch in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) wurden erhöhte Ceramidspiegel gemessen (Abb. 9).

Zellen, die zur Kontrolle allein mit zVAD-fmk behandelt wurden, wiesen nur eine marginale Steigerung der Ceramidspiegel gegenüber unbehandelten Zellen auf.

Diese Versuche zeigen, dass die verstärkende Wirkung des zVAD-fmk auf den hTNF-induzierten Zelltod von L929 Zellen auch eine steigernde Wirkung auf die intrazellulären Ceramidspiegel besitzt.



**Abb. 9: hTNF und hTNF/zVAD-behandelte L929 Zellen zeigen erhöhte intrazelluläre Ceramidspiegel.** L929 Zellen wurden für 3 h mit Medium, zVAD-fmk (20  $\mu$ M), hTNF (100 ng/ml) oder hTNF in Kombination mit zVAD-fmk stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt. Unter den Säulen sind die Originaldaten der Autoradiographie gezeigt.

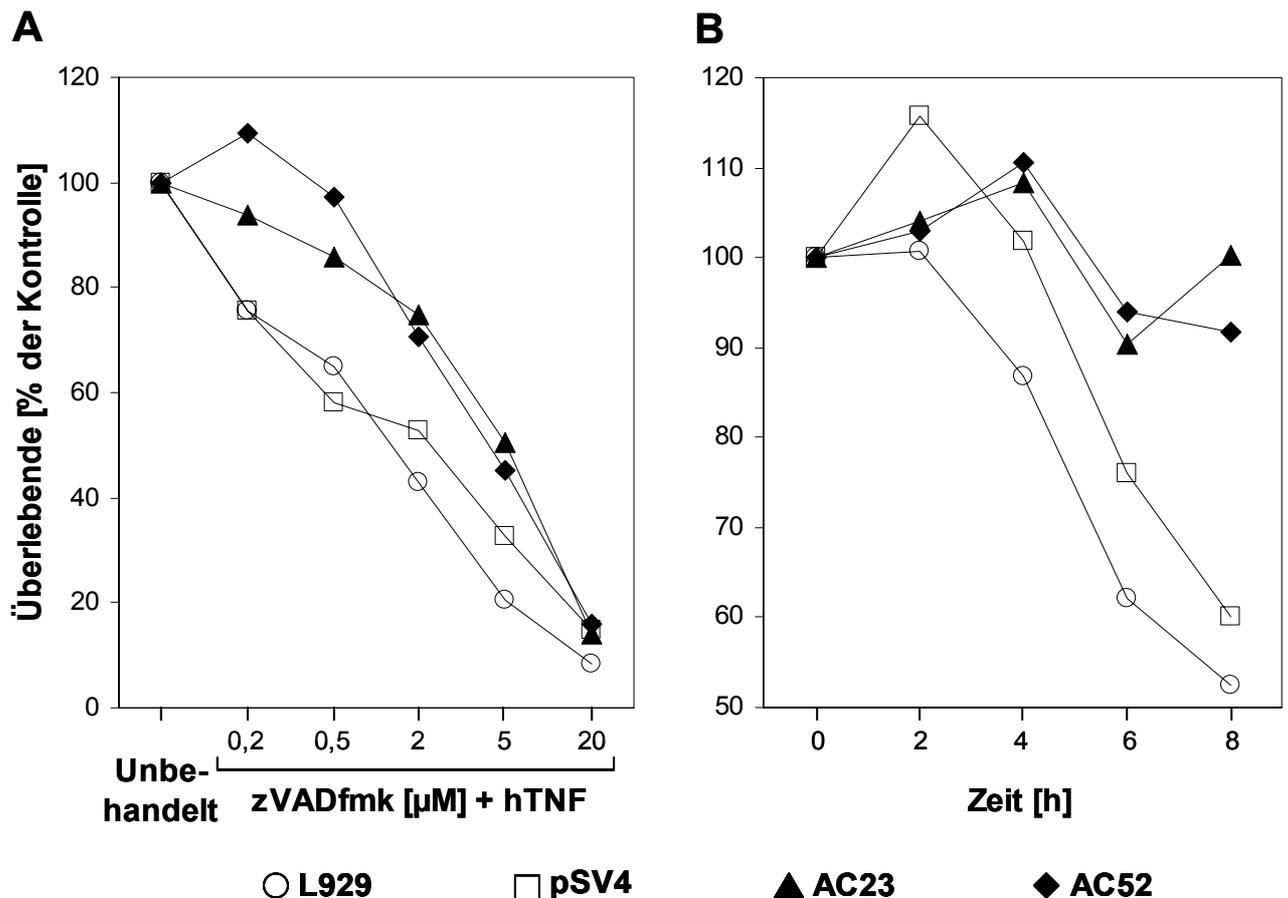
#### 1.1.4 Die Überexpression der sauren Ceramidase (AC) in L929 Zellen bewirkt eine erhöhte Resistenz gegenüber dem hTNF/zVAD-induzierten Zelltod

Um zu klären, ob die verstärkte Generierung von Ceramid in hTNF/zVAD-behandelten L929 Zellen als ursächlicher Mediator des Zelltods fungiert oder nur auf sekundäre Effekte zurückzuführen ist, wurden Versuche mit L929 Zellen durchgeführt, die das Ceramid-degradierende Enzym saure Ceramidase (AC) stabil überexprimieren. Diese Zellen (AC-Klone) zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber der Wirkung von hTNF (Strelow et al., 2000).

Parentale L929 Zellen, Kontrollzellen (pSV4, Leervektorkontrolle) und die AC-überexprimierenden Zelllinien (AC23, AC52) wurden für 16 h mit hTNF (10 ng/ml) oder mit hTNF und verschiedenen Konzentrationen von zVAD-fmk (0,5 - 20  $\mu$ M) behandelt. Die AC-Klone besaßen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem hTNF/zVAD-induzierten Zelltod. Die Resistenz war am deutlichsten im Bereich von 0,5 bis 5  $\mu$ M zVAD-fmk ausgeprägt (Abb. 10A).

Um die Zeitabhängigkeit dieser Resistenz zu untersuchen, wurden die Zellen für 0 bis 8 h mit hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) stimuliert. Es zeigte sich, dass in den AC-Klonen der Zelltod im Vergleich mit den parentalen und den Kontrollzellen verzögert war (Abb. 10B).

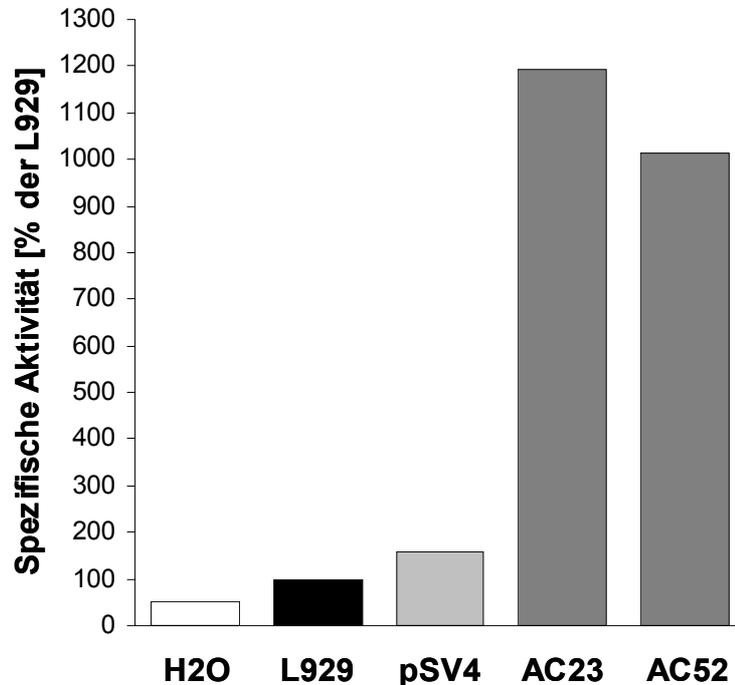
Diese Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Beteiligung von Ceramid als Mediator des Caspase-unabhängigen hTNF/zVAD-induzierten Zelltods hin.



**Abb. 10: Stabile Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen (AC-Klone) vor der zytotoxischen Wirkung von hTNF/zVAD.** (A) Dosisabhängigkeit: Parentale L929 Zellen (L929), Kontrollzellen (pSV4) und AC-überexprimierende L929 Zellen (AC23 und AC52) wurden mit Medium, oder mit hTNF (10 ng/ml) in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen zVAD-fmk (0,2 - 20  $\mu$ M) für 16 h inkubiert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurden. (B) Zeitabhängigkeit: Parentale L929 Zellen (L929), Kontrollzellen (pSV4) und AC-überexprimierende L929 Zellen (AC23 und AC52) wurden für verschiedene Zeiten (0 – 8 h) mit hTNF (100 ng/ml) und zVAD-fmk (20  $\mu$ M) stimuliert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurde. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Bestimmungen und die Standardabweichungen überschritten nicht 15 %.

Trotz der protektierenden Funktion der AC wiesen die AC-Klone aber keine totale Resistenz auf. Daher wurden in allen verwendeten Zellen die Basalaktivitäten der AC noch einmal überprüft. Dazu wurden Extrakte von unstimulierten Zellen hergestellt und auf die Fähigkeit zur Spaltung eines radioaktiv markierten Substrates (N-[1- $^{14}$ C]-Laurylsphingosin) überprüft. Die AC-Klone

zeigten eine ungefähr zehnfach erhöhte Aktivität der AC gegenüber den parentalen und Kontrollzellen (Abb. 11), so dass eine fehlende Aktivität der AC in den AC-Klonen als Ursache der inkompletten Resistenz ausgeschlossen werden konnte.



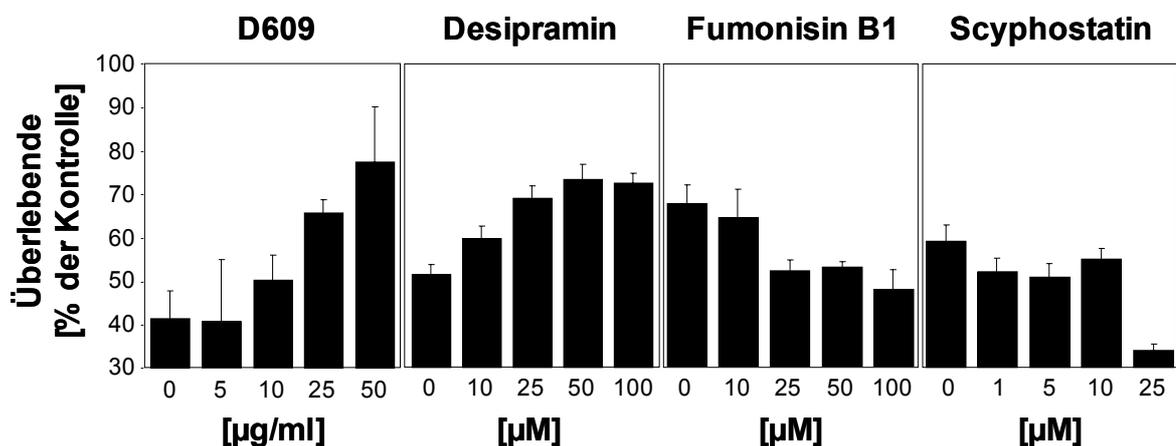
**Abb. 11: Überprüfung der Basalaktivitäten der sauren Ceramidase (AC) in parentalen L929 Zellen, pSV4-Kontrollzellen und in AC-überexprimierenden Zellen.** Die basale Aktivität der sauren Ceramidase in Zellextrakten wurde durch die Spaltung eines radioaktiv markierten Substrates (N-[1-<sup>14</sup>C]-Laurylsphingosin) und anschließender autoradiographischer Quantifizierung in Doppelwerten bestimmt. Als Negativkontrolle wurde anstatt eines Zellextraktes Wasser eingesetzt.

### 1.1.5 Die Inhibition oder der Abbau der sauren Sphingomyelinase schützen L929 Zellen vor dem hTNF/zVAD induzierten Zelltod

In Zusammenarbeit mit S. Mathieu wurde untersucht, welche Enzyme des Ceramidstoffwechsels eine Bedeutung im Signalweg des hTNF/zVAD-induzierten Zelltods besitzen. Dazu wurden verschiedene pharmakologische Inhibitoren eingesetzt. L929 Zellen wurden mit D609 (verhindert die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) durch TNF) oder Desipramin (induziert den Abbau der A-SMase im Lysosom), Fumonisin B1 (FB1, Inhibitor der Ceramidsynthase) oder Scyphostatin (Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase)) für 2 h vorbehandelt und anschließend zusätzlich für 5 h mit hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) stimuliert.

Die Inhibition der Ceramidsynthase und der N-SMase konnte die L929 Zellen nicht vor dem hTNF/zVAD-induzierten Zelltod schützen (Abb. 12). Somit kann eine *de novo* Synthese von

Ceramid und eine Freisetzung von Ceramid durch die Aktivität der N-SMase als Ursache der erhöhten Ceramidspiegel ausgeschlossen werden. Die Inhibition der A-SMase-vermittelten Generierung von Ceramid durch die Behandlung der Zellen mit D609 oder Desipramin resultierte dagegen in einem Schutz der Zellen vor dem hTNF/zVAD-induzierten Zelltod (Abb. 12).



**Abb. 12: Einfluss der pharmakologischen Inhibition der A-SMase, Ceramidsynthese oder N-SMase auf den hTNF/zVAD-induzierten Zelltod von L929 Zellen.** L929 Zellen wurden für 2 h mit den angegebenen Konzentrationen von D609, Desipramin, Fumonisin B1 und Scyphostatin vorbehandelt, bevor hTNF (100 ng/ml) und zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) zugegeben wurden. Nach weiteren 5 h wurden die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Bestimmungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anstiege der Ceramidspiegel in den L929 Zellen nach einer Stimulation mit hTNF/zVAD durch eine Aktivierung der A-SMase verursacht werden.

Der Befund, dass L929 Zellen sowohl durch die pharmakologische Inhibition der Aktivität der A-SMase als auch durch die Überexpression der sauren Ceramidase, vor der zytotoxischen Wirkung von hTNF/zVAD geschützt werden können, spricht dafür, dass Ceramid eine funktionelle Bedeutung als Mediator auch im hTNF/zVAD-induzierten Zelltod hat und schließt aus, dass der Anstieg der Ceramidspiegel ein Sekundäreffekt des Zelltodes ist.

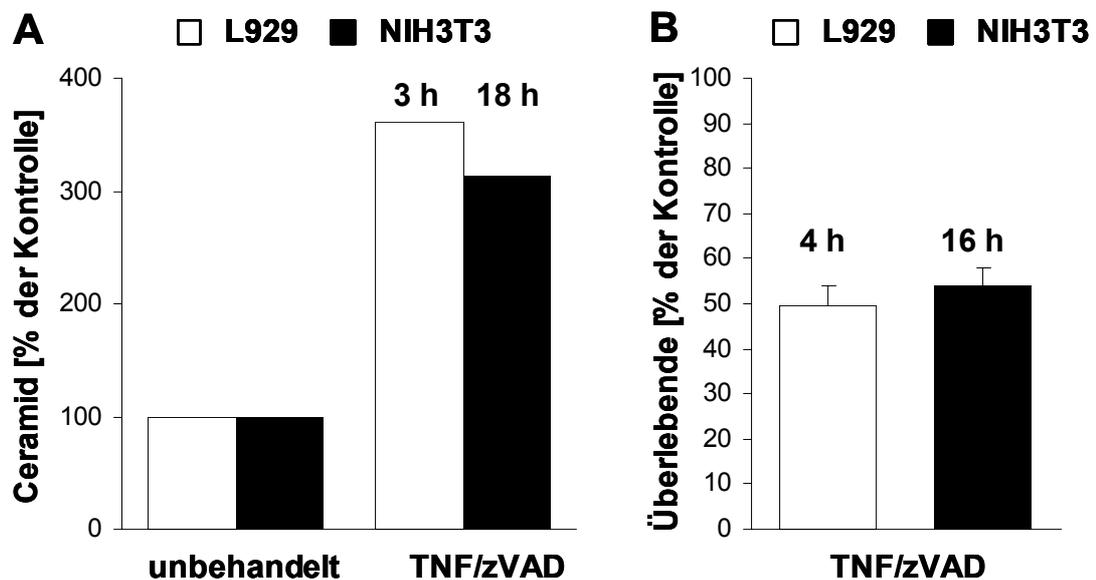
## 1.2 Bedeutung des Sphingolipids Ceramid als Mediator des Zelltods im NIH3T3 Zellsystem

Auch in NIH3T3 Zellen führt die Inhibition der Caspasen mittels zVAD-fmk zu einer Beschleunigung des hTNF-induzierten Zelltods (Lüschen et al., 2000). Auch in diesem Zellsystem wurde untersucht, ob der hTNF/zVAD-induzierte Caspase-unabhängige Zelltod von

einem Anstieg der Ceramidspiegel begleitet wird und ob sich die Zellen durch die pharmakologische Inhibition von Ceramid-freisetzenden Enzymen schützen lassen.

### 1.2.1 NIH3T3 Zellen zeigen erhöhte Ceramidspiegel im hTNF/zVAD-induzierten Zelltod

NIH3T3 und L929 Zellen (zur Kontrolle) wurden für 18 bzw. 3 h mit hTNF (100 ng/ml) und zVAD-fmk (20  $\mu$ M) stimuliert und anschließend die Ceramidspiegel bestimmt. Auch in den NIH3T3 Zellen waren die Ceramidspiegel nach einer Stimulation mit hTNF/zVAD erhöht (Abb. 13A). Da die NIH3T3 Zellen langsamer auf die Stimulation mit hTNF/zVAD reagierten, mussten für die beiden Zelllinien verschieden Stimulationszeiten verwendet werden. Parallele Versuche mit NIH3T3 und L929 Zellen zur Zytotoxizität von hTNF/zVAD zeigten, dass nach einer Stimulation für 4 bzw. 16 h mit hTNF (100 ng/ml) und zVAD-fmk (20  $\mu$ M) beide Zelllinien eine Überlebensrate von ungefähr 50% aufwiesen (Abb. 13B). Somit war sichergestellt, dass die Ceramid-Quantifizierungen zu vergleichbaren Zeitpunkten stattfanden.

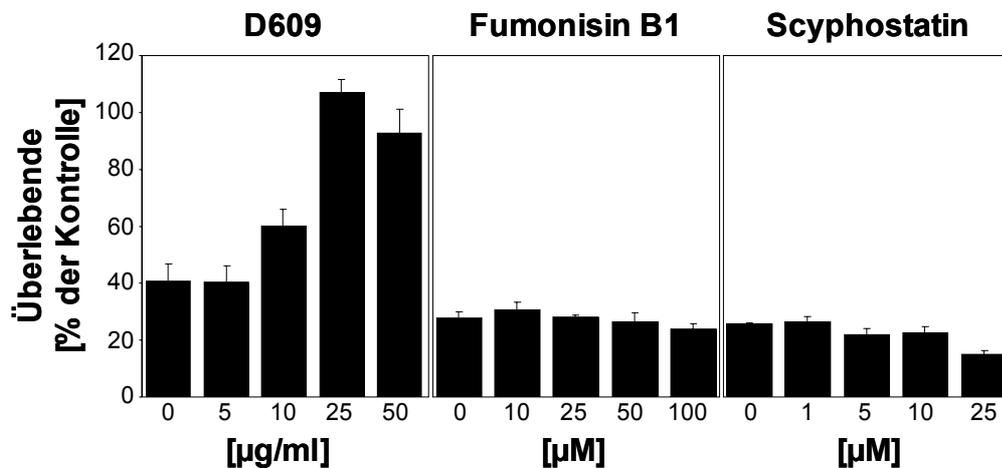


**Abb. 13: L929 und NIH3T3 Zellen zeigen erhöhte Ceramidspiegel nach Stimulation mit hTNF/zVAD.** (A) L929 und NIH3T3 Zellen wurden für 3 bzw. 18 h mit Medium oder hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt. (B) L929 und NIH3T3 Zellen wurden mit hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) für 4 bzw. 16 h stimuliert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurden. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

### 1.2.2 Die Inhibition, aber nicht der Abbau der sauren Sphingomyelinase schützen NIH3T3 Zellen vor hTNF/zVAD induziertem Zelltod

In Zusammenarbeit mit S. Mathieu durchgeführte Versuche zur pharmakologischen Inhibition der Enzyme des Ceramidstoffwechsels (siehe dazu 1.1.5) zeigten, dass durch die Inhibition der A-SMase mittels D609 auch die NIH3T3 Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von hTNF/zVAD geschützt werden konnten (Abb. 14). Die Inhibition der A-SMase durch Desipramin konnte NIH3T3 Zellen dagegen nicht schützen (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise auf dem unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden Inhibitoren beruht. Wie schon im Abschnitt 1.1.5 für das L929 Zellsystem gezeigt werden konnte, wurden auch die NIH3T3 Zellen durch eine Inhibition der Ceramidsynthase mit Fumonisin B1 oder der neutralen Sphingomyelinase mit Scyphostatin nicht geschützt.

Diese Ergebnisse zeigen auch für das NIH3T3 Zellsystem eine mögliche Rolle des Sphingolipids Ceramid als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods. Auch hier wird das Ceramid wahrscheinlich durch die Aktivität der A-SMase generiert.



**Abb. 14: Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition der A-SMase, Ceramidsynthase oder N-SMase auf den hTNF/zVAD-induzierten Zelltod von NIH3T3 Zellen.** NIH3T3 Zellen wurden für 2 h mit den angegebenen Konzentrationen von D609, Fumonisin B1 und Scyphostatin behandelt, bevor hTNF (100 ng/ml) und zVAD-fmk (20  $\mu$ M) zugegeben wurden. Nach 16 h wurden die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Bestimmungen.

### 1.3 Bedeutung des Sphingolipids Ceramid als Mediator des Zelltods im Jurkat T-Zellsystem

Es konnte gezeigt werden, dass in lymphoiden Zellen Caspase-unabhängiger Zelltod auftritt (Holler et al., 2000; Jäättelä et al., 2003) und dass Ceramid in deren Zelltod involviert ist

(Andrieu-Abadie et al., 2001; Cremesti et al., 2001; Adam et al., 2002; Jaffrezou et al., 2002). So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des Fas-Rezeptors, TRAIL-Rezeptors 2 (TRAILR2) und TNF-R55 neben einem Caspase-abhängigen auch einen zweiten Caspase-unabhängigen Todessignalweg aktivieren kann (siehe Einleitung 1.5).

Mit Hilfe des Jurkat T-Zellsystems sollte untersucht werden, ob im Verlauf des hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltods von Jurkat T-Zellen die Ceramidspiegel beeinflusst werden und ob Ceramid dabei als Mediator des Zelltods fungiert.

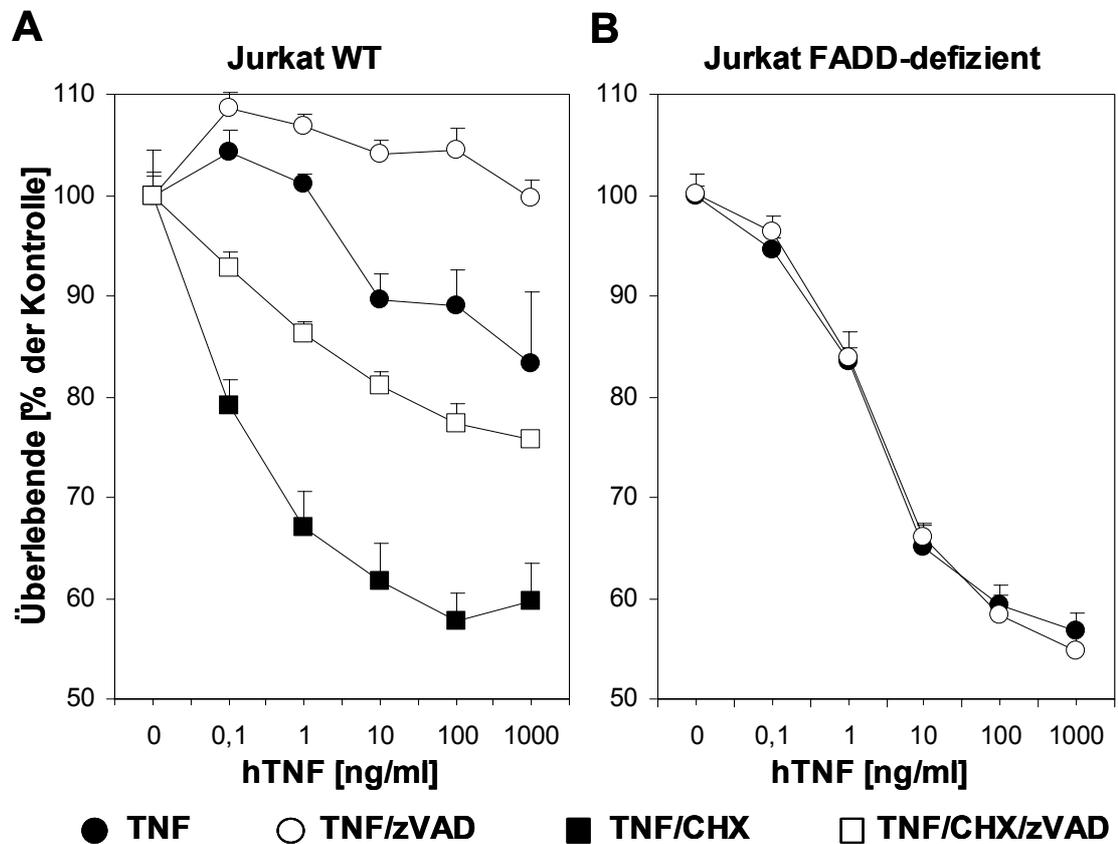
### 1.3.1 Caspase-unabhängiger Zelltod in Jurkat T-Zellen

Wildtyp und FADD-defiziente Jurkat T-Zellen wurden für 20 h mit steigenden Mengen hTNF (0-1000 ng/ml) allein oder in Kombination mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX, 2 µg/ml) und/oder dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (50µM) inkubiert. In Abb. 15A ist zu sehen, dass der hTNF-induzierte Zelltod von Wildtyp Jurkat T-Zellen durch die Behandlung mit zVAD-fmk inhibiert wurde und somit durch Caspasen vermittelt wird. Die Unterdrückung der proliferativen, anti-apoptotischen Signale des TNF-Signalwegs, wie z.B. der NF-κB-abhängigen protektiven Signale durch die Inhibition der Proteinbiosynthese mittels Cycloheximid (CHX), sensitivierte die Jurkat T-Zellen für die zytotoxische Wirkung des hTNF. Dieser verstärkte Zelltod konnte durch die Inhibition von Caspasen mittels zVAD-fmk zwar reduziert, aber nicht vollständig verhindert werden. Daher kann der unter Caspase-Inhibition verbleibende Zelltod somit als Caspase-unabhängig angesehen werden.

Die Beobachtung, dass der durch hTNF und CHX induzierte Zelltod in Jurkat T-Zellen wohl aus einer Caspase-abhängigen und einer Caspase-unabhängigen Komponente zusammengesetzt ist, wurde durch Versuche mit FADD-defizienten Jurkat T-Zellen unterstützt. Die FADD-defiziente Zelllinie kann aufgrund des fehlenden Apoptorproteins FADD nach Stimulation des TNF-, Fas- oder TRAIL-Rezeptors keinen funktionellen DISC (*death inducing signaling complex*) ausbilden. Daher wird die Initiator-Caspase-8 und die nachfolgende Caspase-Kaskade nicht aktiviert (Chinnaiyan et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1996) und beobachteter Zelltod erfolgt somit Caspase-unabhängig auch ohne Zugabe von zVAD-fmk.

In Abb. 15B ist gezeigt, dass diese Zellen trotz der Unfähigkeit zur Rezeptor-vermittelten Caspase-Aktivierung sensitiv gegenüber einer Stimulation mit hTNF waren und starben. Die gleichzeitige Inhibition von Caspasen durch zVAD-fmk konnte den hTNF-induzierten Zelltod nicht verhindern. Dies zeigt, dass der hTNF-induzierte Zelltod in FADD-defizienten Jurkat Zellen Caspase-unabhängig ist. Aufgrund der ausgeprägteren Sensitivität der FADD-defizienten

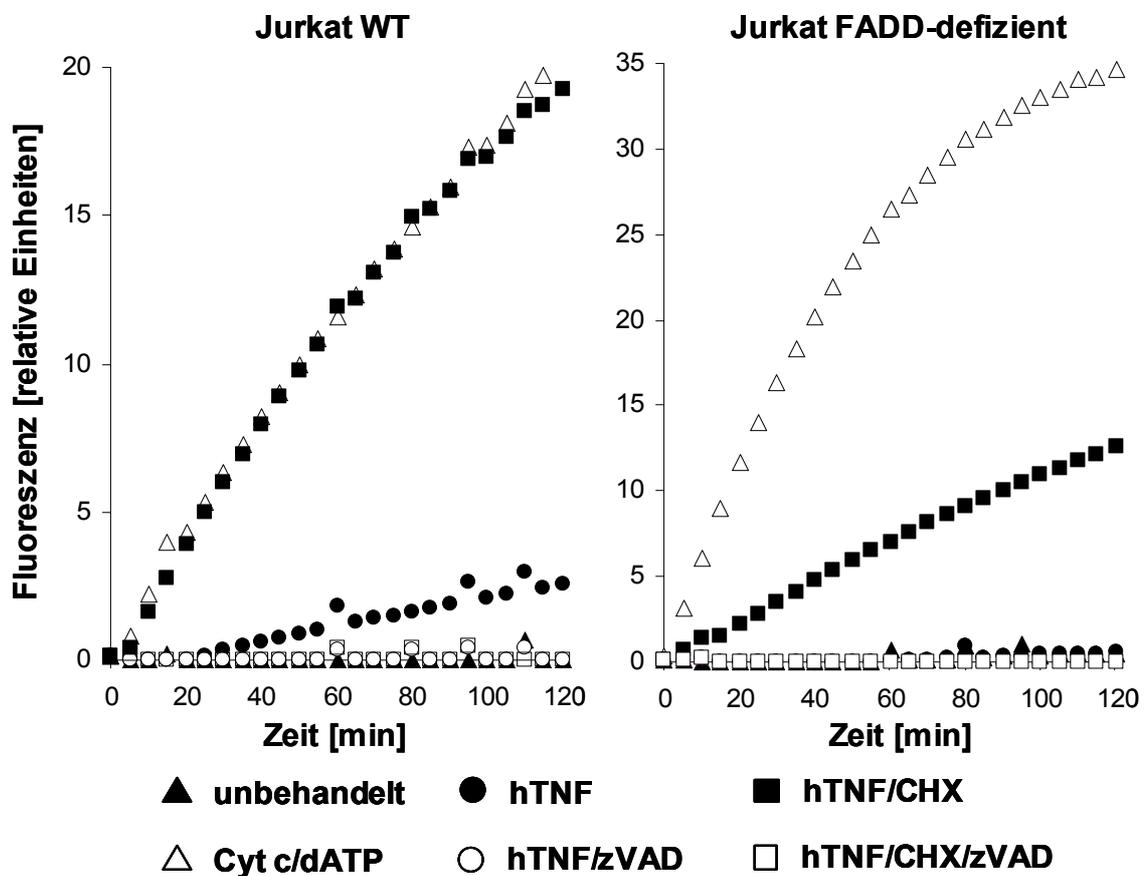
Jurkat T-Zellen gegenüber TNF (Holler et al., 2000) war es nicht nötig, die Zellen durch die Zugabe von CHX zu sensibilisieren. Dies ist daher in Abb. 15B nicht gezeigt.



**Abb. 15: Caspase-abhängiger und -unabhängiger Zelltod von Jurkat T-Zellen.** Wildtyp (A) und FADD-defiziente (B) Jurkat T-Zellen wurden für 20 h mit den angegebenen Konzentrationen hTNF (0 - 1000 ng/ml) allein oder in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (50 µM) behandelt, bevor die Überlebensraten mittels MTT-Färbung bestimmt wurden. Um eine mögliche schnelle Aktivierung von Caspasen vollständig zu verhindern, wurden vor der Stimulation die Zellen, die später mit TNF/zVAD oder TNF/CHX/zVAD behandelt wurden für 30 min mit zVAD-fmk präinkubiert. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

Anschließende Messungen der Aktivitäten der Caspase-8 (nicht gezeigt) und der Caspase-3 bestätigten dies. Nur in den Wildtyp und nicht in den FADD-defizienten Jurkat T-Zellen konnte eine 4 h-Stimulation mit hTNF (100 ng/ml) die Caspase-Kaskade aktivieren (Abb. 16). Eine *in vitro* Aktivierung der Caspasen durch die Inkubation von Zellextrakten mit Cytochrom c und dATP (Cyt c/dATP) zeigte die potenzielle Aktivierbarkeit einer funktionellen Caspase-Kaskade. Die Stimulation mit hTNF/CHX führte auch in FADD-defizienten Jurkat T-Zellen zu einer Aktivierung der Caspasen. Da die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Caspase-Kaskade in FADD-defizienten Zellen unterbunden ist, ist zu vermuten, dass ein intrinsisches Signal zur TypII-Apoptose führt. Die induzierten Caspase-Aktivitäten ließen sich durch die parallele Inkubation mit zVAD-fmk vollständig unterdrücken bzw. verhindern. Somit war sichergestellt,

dass der in Abb. 15 dargestellte, unter gleichzeitiger Behandlung mit zVAD-fmk induzierte Zelltod Caspase-unabhängig war.



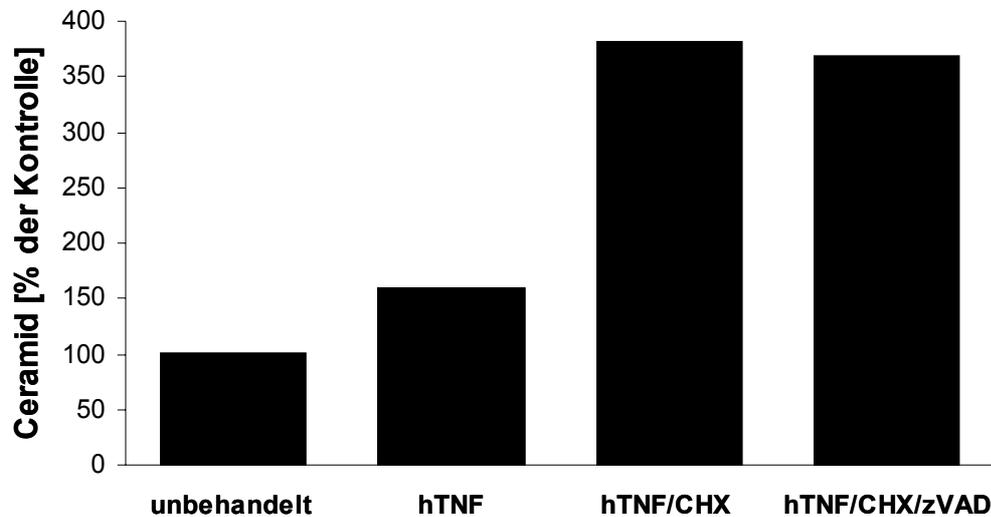
**Abb. 16: Aktivität der Caspase-3 in Jurkat T-Zelllinien.** Jurkat T-Zellen wurden 4 h mit Medium, hTNF (100 ng/ml und hTNF/CHX (2 µg/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (50 µM) stimuliert. Anschließend wurde in den Zellextrakten die Aktivierung der Caspase-3 durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Substrate (zDEVD-afc) über 120 min bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte unstimulierter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade *in vitro* aktiviert wurde (Cyt c/dATP).

### 1.3.2 Zelltod führt in Jurkat T-Zellen zu steigenden Ceramidspiegeln

Um aufzuklären, ob der zuvor beschriebene Caspase-unabhängige Zelltod auch in Jurkat T-Zellen mit einer Generierung und Akkumulation von Ceramid einhergeht, wurden die Veränderungen der intrazellulären Ceramidspiegel untersucht.

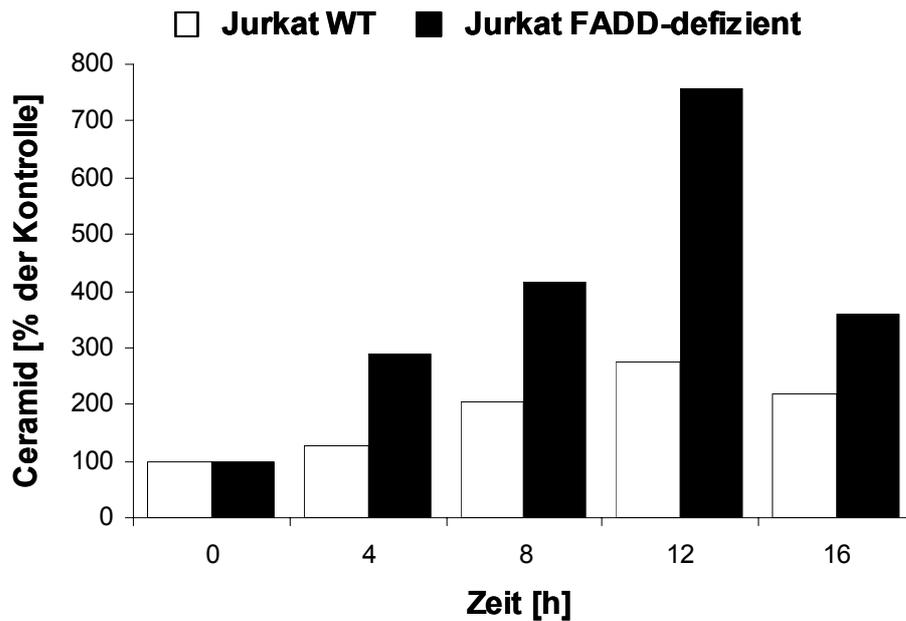
In einem ersten Versuch wurden Jurkat T-Zellen für 16 h mit hTNF (100 ng/ml) allein oder in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (50 µM) stimuliert und anschließend die intrazellulären Ceramidspiegel wie im Abschnitt 1.1.3 erläutert bestimmt. Diese Versuche zeigten, dass der intrazelluläre Ceramidgehalt durch die verschiedenen Stimulationen verändert wurde (Abb. 17). In den Jurkat T-Zellen konnte unter Caspase-unabhängigen

(hTNF/CHX/zVAD) aber auch unter Caspase-abhängigen Bedingungen (hTNF, hTNF/CHX) ein Anstieg der Ceramidspiegel beobachtet werden.



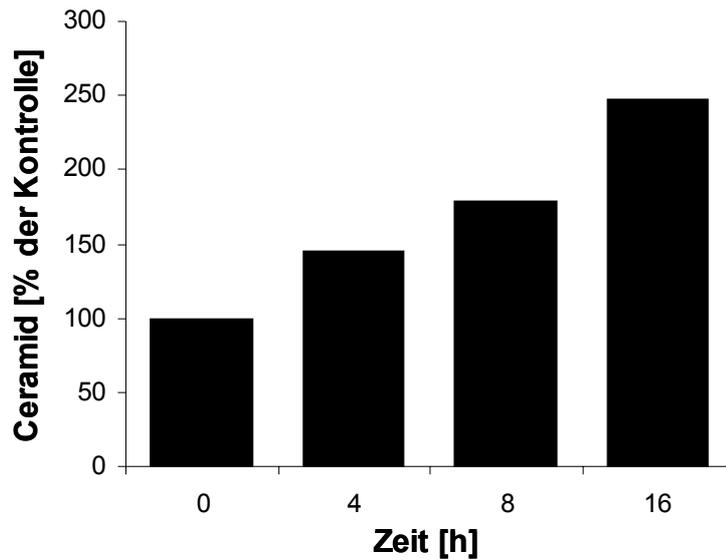
**Abb. 17: Veränderungen der intrazellulären Ceramidspiegel bei Caspase-abhängigem und unabhängigem Zelltod in Jurkat T-Zellen.** Jurkat T-Zellen wurden für 16 h mit Medium, hTNF (100 ng/ml), hTNF in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und hTNF/CHX in Kombination mit zVAD-fmk (50 µM) stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt.

Um diese ersten Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurden die Ceramidspiegel nicht durch eine Endpunktmessung sondern zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dazu wurden Wildtyp und FADD-defiziente Jurkat T-Zellen für 0 bis 16 h mit hTNF (100ng/ml) und CHX (2 µg/ml) in Kombination mit zVAD-fmk (50 µM) behandelt und anschließend die Ceramidspiegel bestimmt (Abb. 18). Es wird deutlich, dass die Ceramidspiegel in den FADD-defizienten Jurkat T-Zellen über die Zeit der Stimulation stark anstiegen. Die Wildtyp Jurkat T-Zellen zeigten zwar einen geringeren aber noch deutlichen Anstieg der Ceramidspiegel. Der Abfall der Ceramidspiegel zum Ende einer Stimulationsreihe bis 16 h wurde mehrmals beobachtet und ist wahrscheinlich durch den Integritätsverlust der Zellen aufgrund fortgeschrittener Stadien des Zelltods bedingt.



**Abb. 18: Veränderungen der intrazellulären Ceramidspiegel in Wildtyp und FADD-defizienten Jurkat T-Zellen im hTNF/CHX/zVAD-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod.** Wildtyp und FADD-defiziente Jurkat T-Zellen wurden für 0 bis 16 h mit hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und zVAD-fmk (50 µM) stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt.

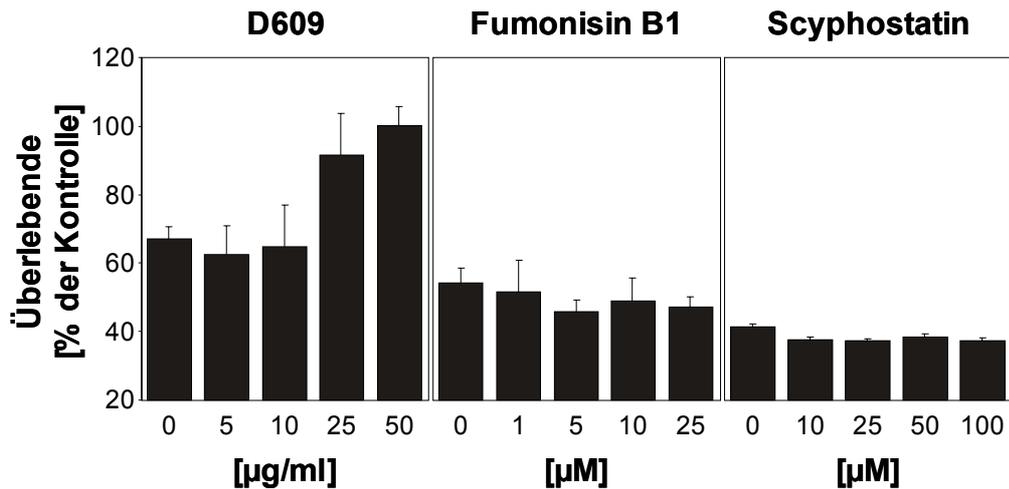
Wie zuvor beschrieben, induziert hTNF in FADD-defizienten Jurkat T-Zellen aufgrund des Fehlens von FADD einen reinen Caspase-unabhängig verlaufenden Zelltod, so dass keine Inhibition der Caspasen nötig ist, um Caspase-unabhängige Prozesse zu beobachten. Um sicherzustellen, dass die beobachteten Anstiege der Ceramidspiegel keine Effekte der aktiven Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk oder der Sensitivierung durch CHX waren, wurden FADD-defiziente Jurkat T-Zellen für 0 bis 16 h nur mit hTNF (100 ng/ml) stimuliert und anschließend die Ceramidspiegel bestimmt. Diese Versuche zeigen, dass in FADD-defizienten Jurkat T-Zellen die alleinige Stimulation mit hTNF eine Akkumulation von Ceramid verursacht (Abb. 19) und schließt einen Nebeneffekt durch die Zugabe von zVAD-fmk oder CHX aus. Die hTNF-induzierten Anstiege der Ceramidspiegel zeigen, dass möglicherweise auch im Jurkat T-Zellsystem das Sphingolipid Ceramid eine Rolle als Vermittler des Caspase-unabhängigen Zelltods spielt.



**Abb. 19: Anstieg des intrazellulären Ceramidspiegels in FADD-defizienten Jurkat T-Zellen im hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod.** FADD-defiziente Jurkat T-Zellen wurden für 0 bis 16 h mit hTNF (100 ng/ml) stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt.

### 1.3.3 Die Inhibition der sauren Sphingomyelinase schützt Jurkat T-Zellen vor Caspase-unabhängigem Zelltod

Um zu untersuchen, ob die in Jurkat T-Zellen gezeigte hTNF-induzierte Akkumulation von Ceramid ursächlich für den Caspase-unabhängigen Zelltod verantwortlich ist, wurde in Zusammenarbeit mit S. Mathieu wie zuvor beschrieben (siehe 1.1.5) versucht, die Jurkat T-Zellen durch die pharmakologische Inhibition von Enzymen des Ceramid-Stoffwechsels vor dem Zelltod zu bewahren. Wie schon zuvor in L929 und NIH3T3 Zellen beobachtet (siehe 1.2.2 und 1.1.5), konnten auch Jurkat T-Zellen durch die Inhibition der A-SMase mittels D609 vor dem Zelltod geschützt werden. Dies war nicht durch die Hemmung der Ceramidsynthese oder N-SMase möglich (Abb. 20). Die beobachteten hTNF-induzierten Veränderungen der Ceramidspiegel (siehe 1.3.2) und die Möglichkeit, die Jurkat T-Zellen durch die Inhibition der A-SMase vor dem Zelltod zu schützen, weisen auf einen durch Ceramid vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod hin, wobei das Ceramid durch eine Aktivierung der A-SMase generiert wird.



**Abb. 20: Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition der A-SMase, Ceramidsynthase oder N-SMase auf den hTNF/CHX/zVAD-induzierten Zelltod von Jurkat T-Zellen.** Jurkat T-Zellen wurden für 2 h mit den angegebenen Konzentrationen von D609, Fumonisin B1 und Scyphostatin behandelt bevor hTNF (100 ng/ml), CHX (2 µg/ml) und zVAD-fmk (50 µM) zugegeben wurden. Nach 20 h wurden die Überlebensraten mittels MTT-Färbung bestimmt. Die Säulen und die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Bestimmungen.

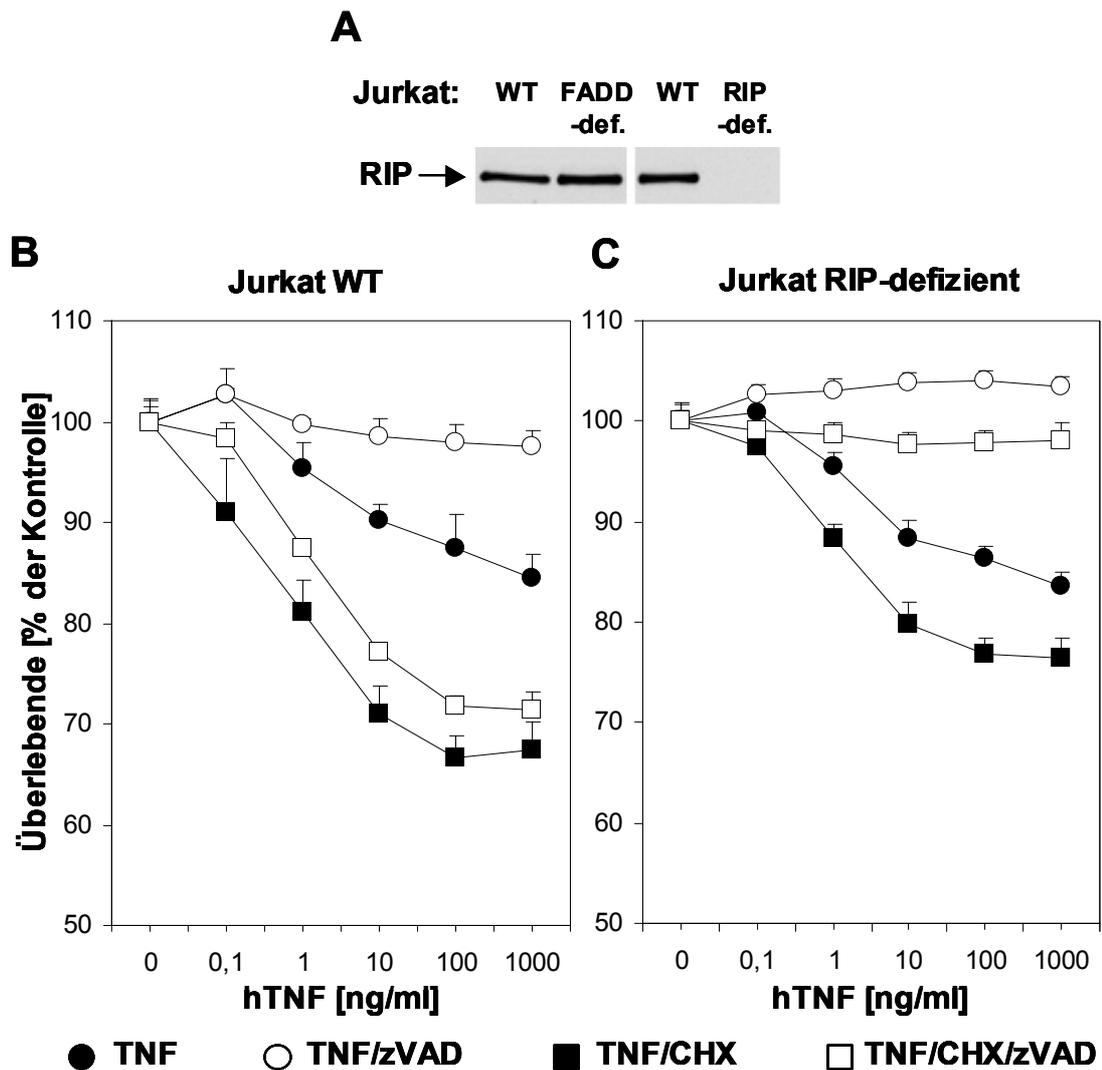
## 2 Rolle des Proteins RIP in der Signalkaskade des Caspase-unabhängigen Zelltodes

Die Beteiligung des Proteins RIP in Caspase-unabhängigen Todessignalwegen wurde für verschiedene Todesrezeptoren gezeigt (siehe Einleitung 1.5). Es stellte sich die Frage, ob RIP in die Signalkette involviert ist, über die die zuvor gezeigte Generierung von Ceramid induziert wird, und wo RIP in der Signalkaskade einzuordnen ist. Wie von Holler et al. (2000) beschrieben, wurden RIP-defiziente Jurkat T-Zellen auf ihre Resistenz gegenüber dem Caspase-unabhängigen TNF-induzierten Zelltod getestet. Anschließend wurde untersucht, ob RIP-defiziente Jurkat T-Zellen immer noch zur hTNF-induzierten Akkumulation von Ceramid (siehe 1.3.2) in der Lage waren. Der Frage einer möglichen Beteiligung von RIP in Caspase-unabhängigen Todessignalwegen wurde dann auch im etablierten L929 Zellsystem nachgegangen.

### 2.1 RIP-defiziente Jurkat T-Zellen sind gegen Caspase-unabhängigen Zelltod resistent

Die Expression von RIP wurde in den verwendeten Jurkat T-Zelllinien durch eine Westernblot-Analyse überprüft. Es zeigte sich, dass in den RIP-defizienten Zellen mit einem monoklonalen Antikörper kein RIP nachgewiesen werden kann (Abb. 21A).

Anschließend wurden Wildtyp und RIP-defiziente Jurkat T-Zellen wie zuvor im Abschnitt 1.3.1 beschrieben für 20 h mit steigenden Konzentrationen hTNF (0 – 1000 ng/ml) allein oder in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (50 µM) stimuliert und die Überlebensraten bestimmt. Wie in Abb. 21B dargestellt, konnte in Wildtyp Jurkat T-Zellen Caspase-unabhängiger Zelltod durch die Stimulation mit hTNF/CHX/zVAD induziert werden. Die RIP-defizienten Jurkat T-Zellen waren hingegen vollständig vor hTNF/CHX/zVAD geschützt (Abb. 21C). In den RIP-defizienten Zellen ist die Induktion von Caspase-unabhängigen Zelltod also blockiert. Durch die Behandlung mit hTNF und hTNF/CHX konnte in beiden Zelllinien aber immer noch Caspase-abhängiger Zelltod ausgelöst werden. Diese Daten bestätigten die Ergebnisse von Holler et al. (2000) und zeigen, dass das Protein RIP in Jurkat T-Zellen eine essentielle Funktion für den Caspase-unabhängigen hTNF-induzierten Zelltod besitzt. Da die RIP-defizienten Zellen gegenüber dem hTNF- und hTNF/CHX-induziertem Zelltod nicht resistent sind (siehe Abb. 21C) ist es sehr wahrscheinlich, dass RIP dagegen nicht in Caspase-abhängige Signalwege involviert ist.

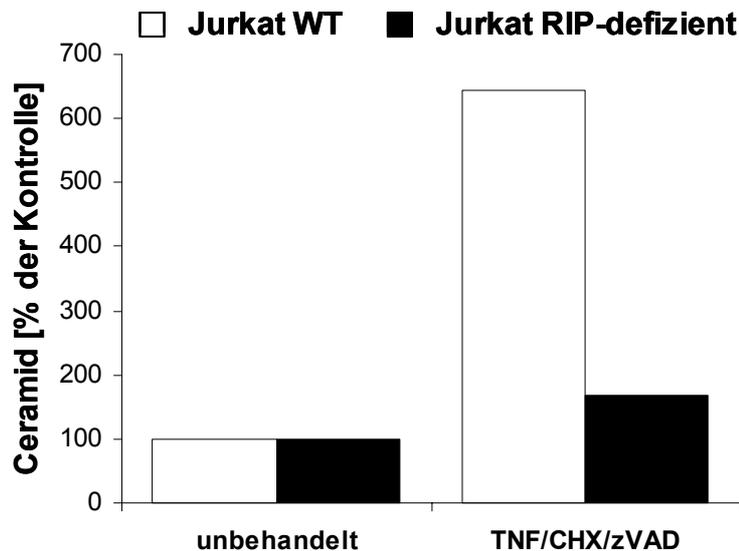


**Abb. 21: RIP-defiziente Jurkat T-Zellen sind gegen Caspase-unabhängigen, aber nicht Caspase-abhängigen Zelltod resistent.** (A) Die Expression von RIP wurde in Wildtyp, FADD-defizienten und RIP-defizienten Jurkat T-Zellen durch eine Westernblot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper überprüft. Wildtyp (B) und RIP-defiziente (C) Jurkat T-Zellen wurden für 20 h mit den angegebenen Konzentrationen hTNF (0 - 1000 ng/ml) allein oder in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und/oder zVAD-fmk (50 µM) behandelt, bevor die Überlebensraten mittels MTT-Färbung bestimmt wurden. Vor der Stimulation mit TNF/zVAD und TNF/CHX/zVAD wurden die Zellen 30 min mit zVAD-fmk (50 µM) präinkubiert. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

### 2.1.1 RIP-defiziente Jurkat T-Zellen zeigen keine erhöhten Ceramidspiegel im Verlauf des Caspase-unabhängigen Zelltods

Um zu untersuchen, ob die RIP-Defizienz in Jurkat T-Zellen deren Fähigkeit zur hTNF-induzierten Akkumulation von intrazellulärem Ceramid beeinflusst, wurden Wildtyp und RIP-defiziente Jurkat T-Zellen für 20 h mit Medium oder hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und zVAD-fmk (50 µM) stimuliert und dann die Ceramidspiegel bestimmt. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu den Wildtyp Zellen sich in den RIP-defizienten Jurkat T-

Zellen kein Ceramid anreichert (Abb. 22). Diese Beobachtung war ein Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins RIP in dem Signalweg, der zur Generierung von Ceramid führt. Der zuvor im Jurkat T-Zellsystem beschriebene Schutz vor dem hTNF/CHX/zVAD-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod durch die Inhibition der A-SMase (siehe 1.3.3) lässt vermuten, dass RIP eine Funktion im Signalweg zur Aktivierung der A-SMase besitzt.

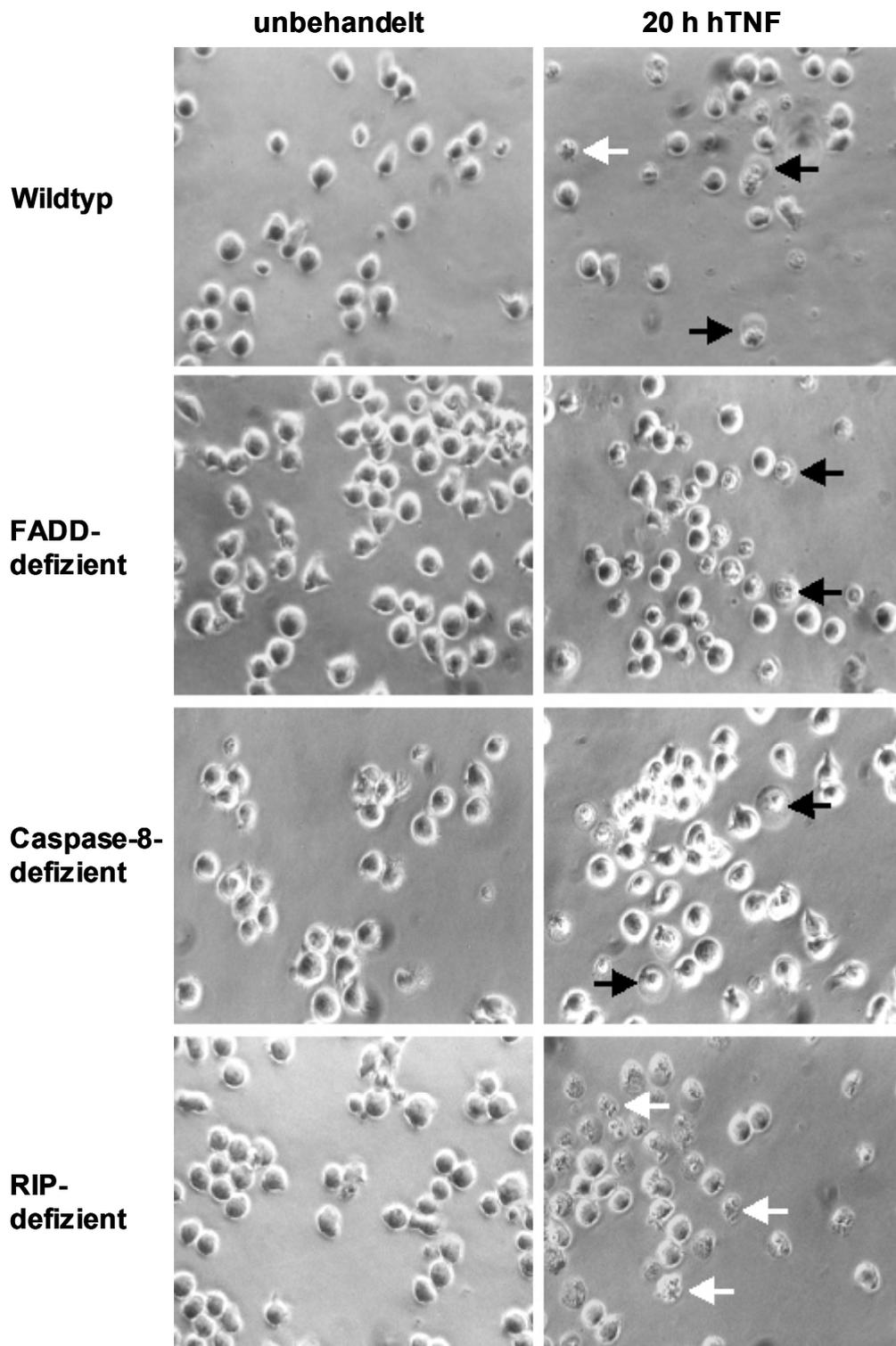


**Abb. 22: In RIP-defizienten Jurkat T-Zellen ist die Generierung von Ceramid blockiert.** Wildtyp und RIP-defiziente Jurkat T-Zellen wurden für 20 h mit hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit CHX (2 µg/ml) und zVAD-fmk (50 µM) stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt.

### 2.1.2 RIP-defiziente Jurkat T-Zellen zeigen ausschließlich apoptotische Morphologien

Um den Zelltod in RIP-defizienten Jurkat T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurden morphologische Kennzeichen mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass nach einer 20-stündigen Stimulation mit hTNF (100 ng/ml) die RIP-defizienten Zellen fast ausschließlich apoptotische Morphologien zeigten (Abb. 23). Dieser Befund steht im Einklang mit der zuvor gezeigten Resistenz gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod (siehe 2.1). Bei der Untersuchung von Wildtyp Zellen wurden dagegen apoptotische (weiße Pfeile) und nekrotische Morphologien (schwarze Pfeile) beobachtet. Die FADD-defizienten Jurkat T-Zellen zeigen dagegen einen Zelltod mit ausschließlich nekrotischer Morphologie. Dies wurde auch für Jurkat T-Zellen beobachtet, die Caspase-8-defizient sind und in denen TNF ebenfalls keinen apoptotischen Zelltod auslösen kann. Die Beobachtung, dass RIP-defiziente Zellen nach Stimulation mit hTNF nur noch Caspase-abhängige Morphologien zeigen, stützt die Vermutung,

dass RIP für den Caspase-unabhängigen, aber nicht für den Caspase-abhängigen Zelltod essentiell ist.



**Abb. 23: Morphologien des Zelltods von Jurkat T-Zelllinien nach Stimulation mit hTNF.** Wildtyp, FADD-defiziente, Caspase-8-defiziente und RIP-defiziente Jurkat T-Zellen wurden für 20 h mit Medium oder hTNF (100 ng/ml) behandelt und anschließend im unfixierten Zustand an einem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Zellen mit apoptotischer (weiße Pfeile) und nekrotischer (schwarze Pfeile) Morphologie sind markiert.

## 2.2 Rolle des Proteins RIP im Caspase-unabhängigen Zelltod von L929 Zellen

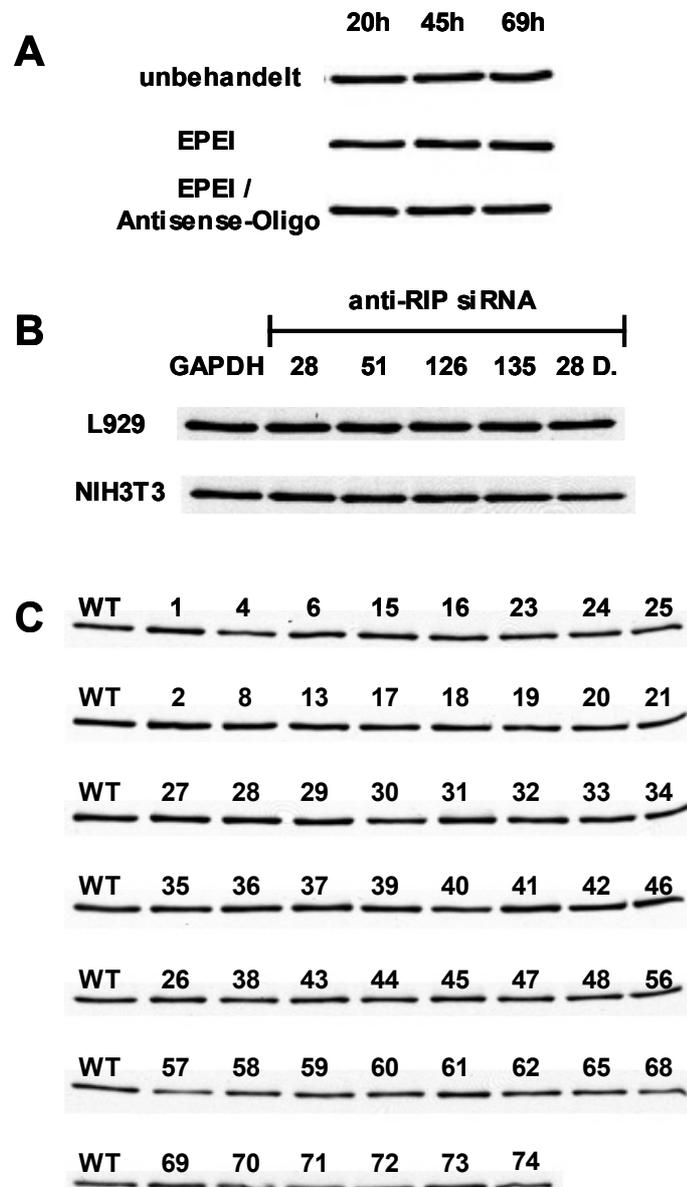
Da für das Jurkat T-Zellsystem eine essentielle Funktion des Proteins RIP im Caspase-unabhängigen Zelltod gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob RIP auch im hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod von L929 Zellen involviert ist. Da keine RIP-defizienten L929 Zellen zur Verfügung standen, wurde versucht, die RIP-Expression zu blockieren. Dazu wurden zum einen Versuche mit Antisense-Oligonukleotiden und Induktion von RNA-Interferenz durchgeführt und alternativ wurde versucht die RIP-Expression pharmakologisch zu stören. Anschließend wurde der Einfluss der RIP-Depletion in L929 Zellen auf den Caspase-unabhängigen Zelltod untersucht.

### 2.2.1 RIP-Depletion in L929 und NIH3T3 Zellen durch Antisense-Oligonukleotide, siRNA und shRNA-Konstrukte

Es wurde versucht, die Expression von RIP in L929 und NIH3T3 Zellen über die Störung der Translation mittels Antisense-Oligonukleotiden (Morpholino Oligos, Gene Tools) und durch Induktion des Abbaus der mRNA mittels siRNA (*short interfering RNA*) und shRNA-Konstrukten (*short hairpin RNA*) zu verhindern. Dazu wurden L929 Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden, die gegen die RIP-mRNA gerichtet waren, durch das EPEI-System transfiziert. Nach einer Inkubation für 20, 45 oder 69 h wurde die RIP-Expression überprüft. Durch die Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden konnte keine RIP-Depletion erreicht werden (Abb. 24A). Des weiteren wurde versucht, RIP durch die Auslösung von siRNA-induzierter RNA-Interferenz (RNAi) zu depletieren. Dazu wurden L929 und (zur Kontrolle) NIH3T3 Zellen mit verschiedenen gegen die RIP-mRNA gerichteten siRNA transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h wurde die RIP-Expression überprüft. Wie in Abb. 24B dargestellt ist, konnte RIP durch die Verwendung von siRNA ebenfalls nicht depletiert werden (24 h- und 72 h-Werte sind nicht gezeigt).

Da die Methoden mit transienten Transfektionen keine RIP-Depletion induzierten, wurden L929 Zellen stabil mit einem shRNA-Konstrukt transfiziert. Dieses Konstrukt kodierte für eine shRNA, die durch RNAi den Abbau der RIP-mRNA hervorrufen sollte. Es wurden 74 Klone isoliert, von denen 54 Klone kultiviert werden konnten. Von diesen zeigte keiner eine verminderte RIP-Expression (Abb. 24C). Somit war es mit keiner dieser Methoden möglich, im L929 oder NIH3T3 Zellsystem die Expression von RIP zu inhibieren. Aufgrund einer fehlenden Positivkontrolle konnten dabei experimentelle Probleme nicht ausgeschlossen werden. Gemeinsam mit der AG von Fr. Prof. Dr. S. Bulfone-Paus wurden jedoch Versuche mit siRNA

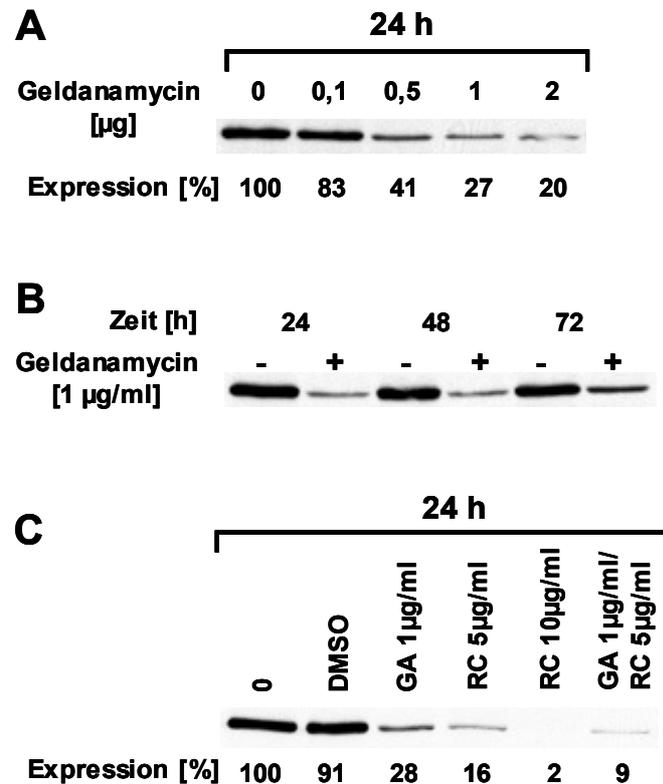
durchgeführt, die zeigten, dass sich bei funktionierender Positivkontrolle (Depletion von TRAF2) auch hier das RIP nicht depletieren ließ (nicht gezeigt).



**Abb. 24: RIP lässt sich nicht durch Abbau oder Blockierung seiner mRNA depletieren.** (A, B, C) Die Expression von RIP wurden in L929 und NIH3T3 Zellen durch Westernblot-Analysen mittels anti-RIP-Antikörper untersucht. (A) L929 Zellen wurden mit Medium, dem Transfektionsagenz EPEI (5,7  $\mu$ M) und mit EPEI in Kombination mit dem Antisense-Oligonukleotid (Morpholino Oligo, 14  $\mu$ M) für 3 h inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch gegen Medium ausgetauscht und die Zellen für die angegebene Zeit inkubiert. (B) L929 und NIH3T3 Zellen wurden mit einer siRNA gegen GAPDH, vier siRNA gegen RIP (RIP28, RIP51, RIP126, RIP135; hergestellt mit *Silencer*<sup>TM</sup> siRNA Construction Kit von Ambion) und einer siRNA gegen RIP (RIP28D, Dharmacon) mit dem Transfektionsagenz Lipofectamin 2000 transfiziert und anschließend 48 h weiter inkubiert. (C) L929 Zellen wurden stabil mit einem Vektor transfiziert, der für ein RIP-spezifisches shRNA-Konstrukt kodierte. Die generierten stabilen Klone (1 – 74) wurden im Vergleich zu parentalen Zellen (WT) auf ihre RIP-Expression untersucht.

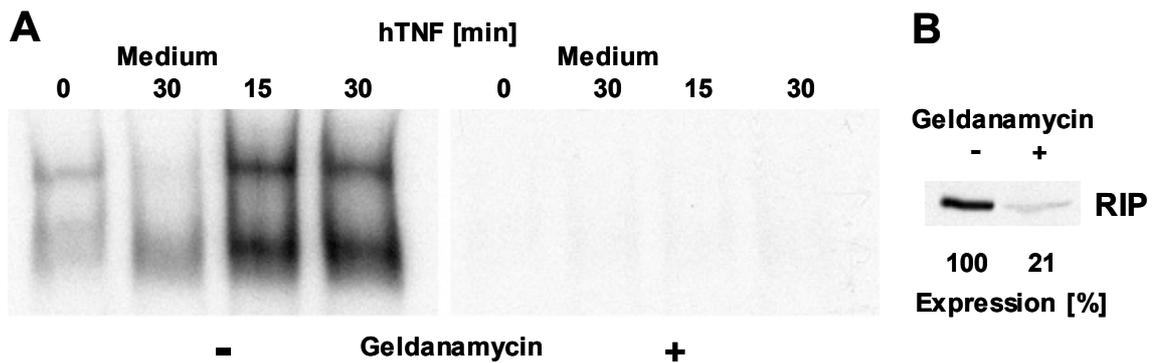
### 2.2.2 RIP-Depletion durch pharmakologische Inhibition der HSP90-Funktion

Das Protein RIP kann in Zellen nur mit Hilfe des Chaperons HSP90 in einer funktionalen Konformation verbleiben (Lewis et al., 2000). Durch die Inhibition dieses Chaperons mit Geldanamycin (Whitesell et al., 1994) oder Radicicol (Schulte et al., 1998; Schulte et al., 1999) wurde versucht, RIP in L929 Zellen zu depletieren. Dazu wurden L929 Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Geldanamycin (GA, 0 – 2 µg/ml) behandelt und anschließend durch eine Westernblot-Analyse die Expression von RIP kontrolliert. Wie in Abb. 25A dargestellt, konnte GA das Protein RIP in den Zellen depletieren. Das Ausmaß der Depletion war von der Konzentration des GA abhängig. Die Konzentration von 1 µg/ml GA im Medium wurde in folgenden Versuchen weiterverwendet, da diese eine deutliche RIP-Depletion ohne zytotoxische Nebenwirkungen verursachte. Wie in Abb. 25B gezeigt, konnten auch längere Inkubationszeiten als 24 h mit 1 µg/ml GA die RIP-Depletion nicht verbessern und wurden somit in folgenden Versuchen nicht verwendet. Der zu GA strukturell unverwandte HSP90-Inhibitor Radicicol (RC) war bei einer Konzentration von 5 µg/ml bei der RIP-Depletion ähnlich effektiv (Abb. 25C), wurde aber aufgrund seiner leichten bis mittleren zytotoxischen Nebenwirkungen nur für Kontrollexperimente verwendet.



**Abb. 25: Depletion des Proteins RIP durch Störung der HSP90-Funktion.** (A, B, C) Die Expression von RIP wurden in L929 Zellen durch Westernblot-Analyse mittels anti-RIP-Antikörper untersucht. (A) L929 Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Geldanamycin (GA, 0 – 2 µg/ml) behandelt bevor die RIP-Expression analysiert wurde (angegeben in % der unbehandelten Kontrolle). (B) L929 Zellen wurden für 24, 48 oder 72 h mit GA (1 µg/ml) behandelt und die RIP-Expression analysiert. (C) L929 Zellen wurden 24 h mit Medium, DMSO, GA (1 µg/ml), Radicol (RC, 5 oder 10 µg/ml) oder GA in Kombination mit RC behandelt bevor die RIP-Expression analysiert wurde (angegeben in % der unbehandelten Kontrolle).

Die Effektivität der RIP-Depletion wurde auch auf funktioneller Ebene durch die Analyse der RIP-vermittelten TNF-induzierten NF-κB-Aktivierung mittels NF-κB-Bandshift-Versuchen untersucht. Dazu wurden L929 Zellen für 24 h mit GA (1 µg/ml) oder Medium vorbehandelt und anschließend für 15 oder 30 min mit hTNF (100 ng/ml) oder für 30 min mit Medium stimuliert. Danach wurde mit Kernextrakten der NF-κB-Bandshift durchgeführt, der zeigte, dass die nukleäre Translokation von NF-κB durch GA komplett inhibiert wurde (Abb. 26A). Dies war ein Hinweis, dass das im Westernblot noch nachweisbare verbleibende RIP (Abb. 26B) keine NF-κB-Aktivierung mehr bewirken konnte und durch die Inhibition des Chaperons HSP90 vermutlich falsch gefaltet vorlag.



**Abb. 26: Geldanamycin verhindert die hTNF-induzierte TNF-R55-vermittelte Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs.** (A) L929 Zellen wurden 24 h mit Medium oder Geldanamycin (GA, 1  $\mu$ g/ml) behandelt bevor die Zellen für 30 min mit Medium oder für 15 oder 30 min mit hTNF (100 ng/ml) stimuliert wurden. Kernextrakte wurden auf aktiviertes NF- $\kappa$ B mittels EMSA untersucht. (B) L929 Zellen wurden parallel zu (A) 24 h mit Medium inkubiert (unbehandelt) oder mit GA (1  $\mu$ g/ml) behandelt bevor die RIP-Expression analysiert wurde (angegeben in % der unbehandelten Kontrolle).

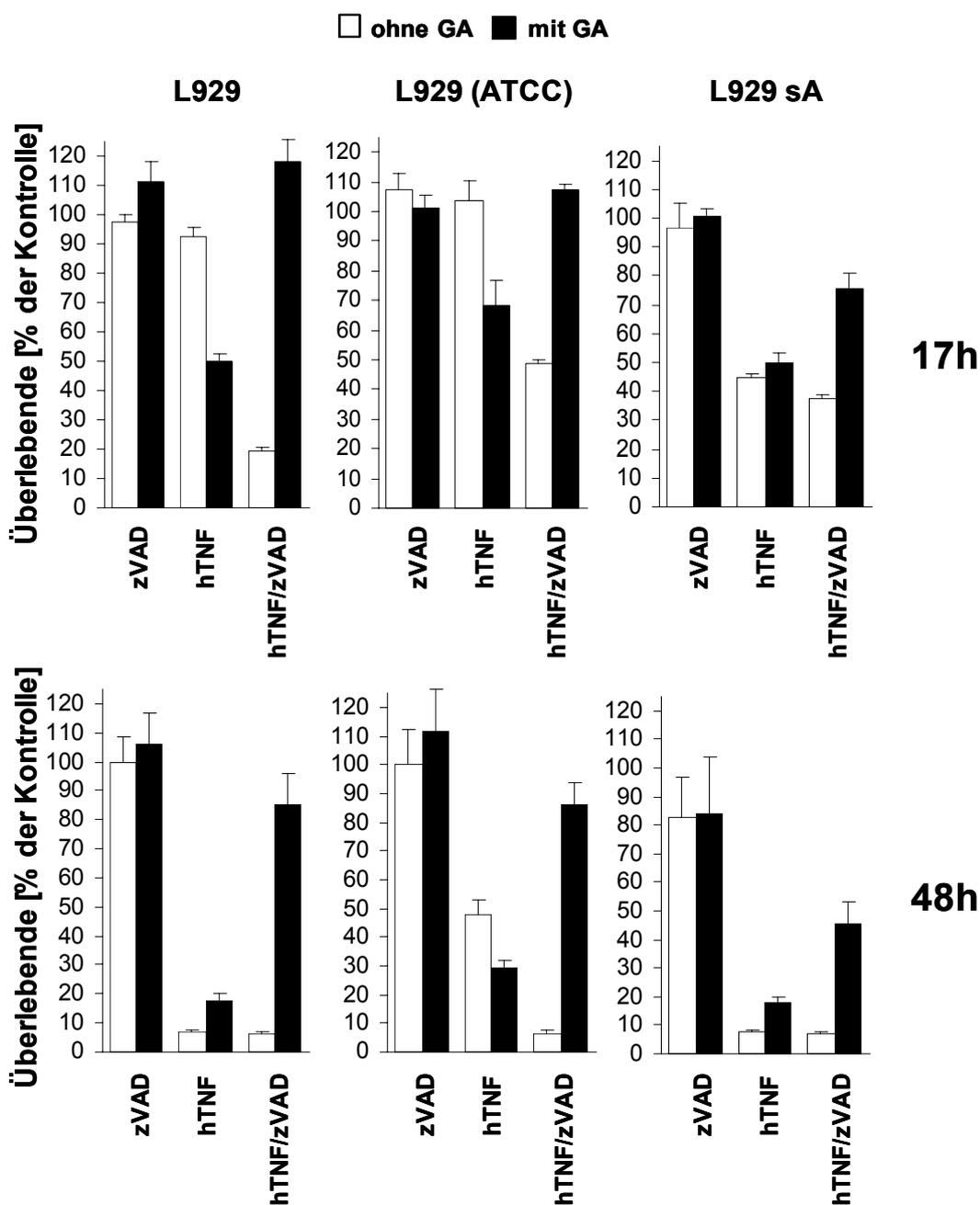
### 2.2.3 Geldanamycin und Radicicol schützten L929 Zelllinien vor Caspase-unabhängigem Zelltod

Um zu untersuchen, ob die zuvor beschriebene GA-induzierte RIP-Depletion in L929 Zellen Auswirkungen auf den Caspase-unabhängigen Zelltod hat, wurden L929 Zellen nach einer 24-stündigen Vorbehandlung mit GA (1  $\mu$ g/ml) für 17 h oder 48 h mit hTNF (100 ng/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) oder nur mit zVAD-fmk stimuliert (Zellen die mit GA vorbehandelt waren wurden zusätzlich weiterhin mit GA behandelt). Wie in Abb. 27 (oben links) dargestellt, waren die L929 Zellen durch die Vorbehandlung mit GA vor der starken zytotoxischen Wirkung von hTNF/zVAD für 17 h komplett geschützt, während ohne GA-Behandlung nur 20 % der Zellen überlebten. Dieser Schutz durch GA war sogar nach 48 h immer noch deutlich zu zeigen (Abb. 27 unten links). Zu diesem Zeitpunkt waren ohne die Behandlung mit GA durch die Stimulation mit hTNF/zVAD über 90 % der Zellen gestorben, während durch die Behandlung mit GA noch ca. 85 % der Zellen überlebten.

Um auszuschließen, dass die verwendeten L929 Zellen aufgrund einer langen Zeit der Kultivierung im Labor Zellkulturartefakte aufwiesen, wurden parallel auch L929 Zellen untersucht, die frisch von der „American Type Culture Collection“ (ATCC, Manassas, USA) bezogen wurden (L929 ATCC genannt). Auch diese noch „ursprünglichen“ L929 waren durch eine GA-Behandlung vor hTNF/zVAD geschützt (Abb. 27 Mitte).

Eine weitere sehr hTNF-sensitive Zelllinie ist die Zelllinie L929sA aus der Arbeitsgruppe von W. Fiers (Vanhaesebroeck et al., 1992; Fiers et al., 1995). Bei der Herstellung dieser Zelllinie wurde auf eine besonders starke TNF-Sensitivität selektioniert. Deshalb führt die Stimulation

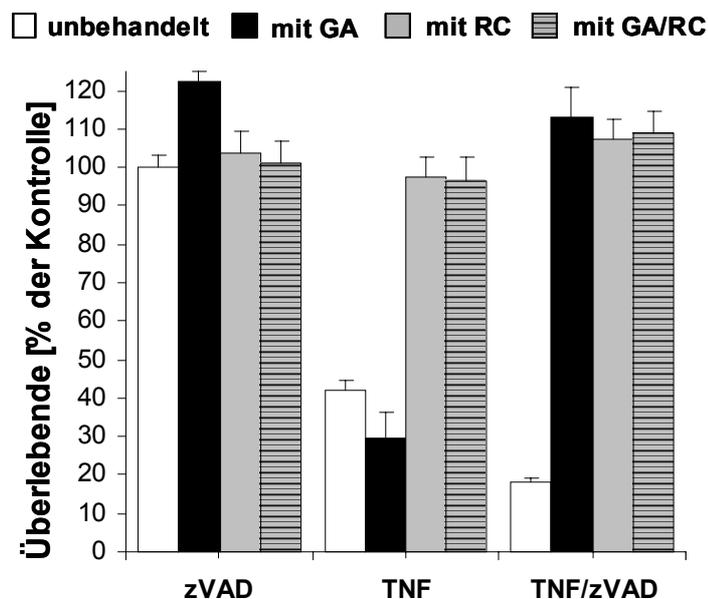
von L929sA Zellen mit hTNF im Vergleich zu den L929 und L929 ATCC Zellen zu einem weit schnelleren Zelltod. Wie in Abb. 27 (rechts) gezeigt, konnte diese Zelllinie im Gegensatz zu den L929 und L929 ATCC durch die Vorbehandlung mit GA nicht in dem Maße geschützt werden. Dieser Unterschied lässt vermuten, dass der hTNF/zVAD-induzierte Zelltod in L929sA Zellen aufgrund der Art ihrer Generierung etwas anders verläuft als in den geschützten L929 und L929 ATCC. Die Behandlung mit GA konnte die L929 Zelllinien dagegen nicht vor dem hTNF-induzierten Zelltod schützen (siehe dazu 2.2.4 unten).



**Abb. 27: Geldanamycin schützt L929 Zelllinien vor Caspase-unabhängigem Zelltod.** L929, L929 ATCC und L929sA Zellen wurden für 24 h mit Geldanamycin (GA, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Medium behandelt, bevor zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ), hTNF (100 ng/ml) oder hTNF in Kombination mit zVAD-fmk zugegeben wurden. Nach 17 h oder 48 h wurden die Überlebensraten mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

Um auszuschließen, dass der GA-vermittelte Schutz ein Nebeneffekt des GA ist und nicht auf der Störung des HSP90-Komplexes beruht, wurde zur Kontrolle zusätzlich RC (5  $\mu\text{g/ml}$ ) zur RIP-Depletion eingesetzt. Anschließend wurden die L929 Zellen für 24 h mit hTNF (100 ng/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) und zVAD-fmk allein stimuliert, bevor die Überlebensraten bestimmt wurden. Es zeigte sich, dass auch die Verwendung von RC die L929

Zellen für 24 h vor der zytotoxischen Wirkung des hTNF/zVAD schützen konnte (Abb. 28). Dies zeigte, dass der schützende Einfluss von GA und RC höchstwahrscheinlich auf der Störung der Funktion des HSP90-Komplexes und der dadurch induzierten RIP-Depletion beruht. Dieser Befund war ein deutlicher Hinweis, dass RIP auch in L929 Zellen bei der Vermittlung des Caspase-unabhängigen Zelltods beteiligt ist.

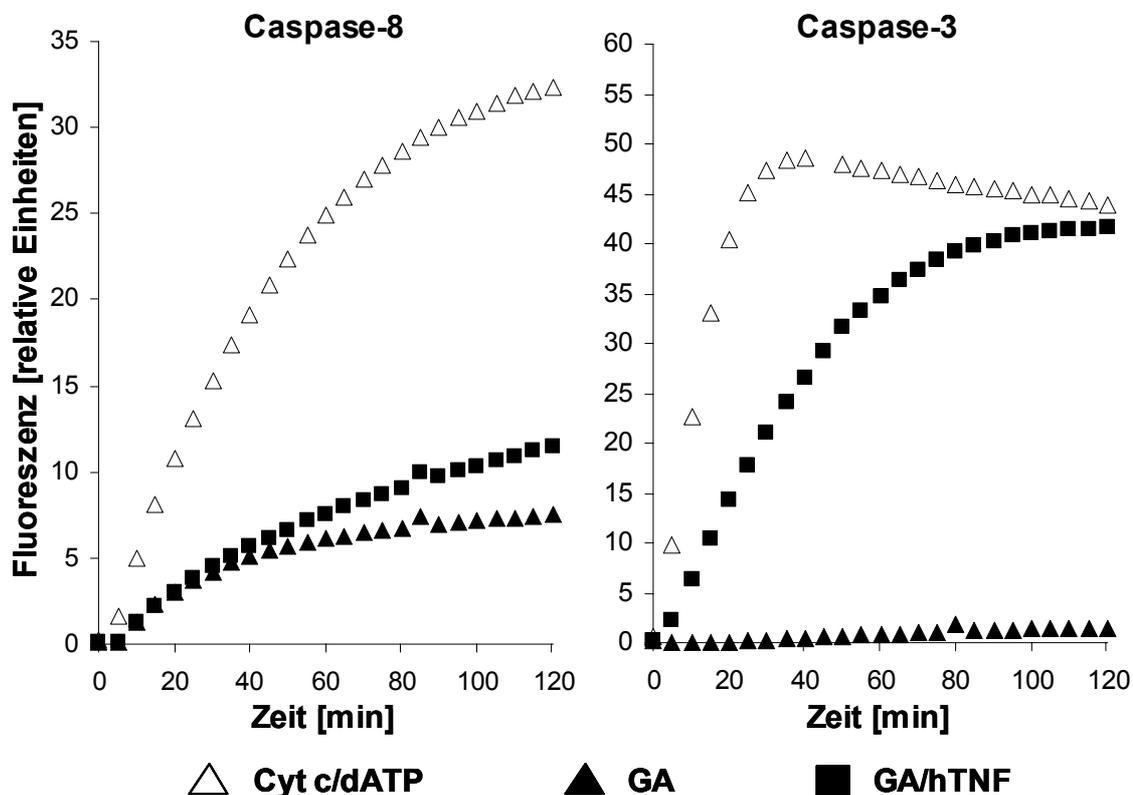


**Abb. 28: Radicol schützt wie Geldanamycin L929 Zellen vor Caspase-unabhängigen Zelltod.** L929 Zellen wurden (wo angegeben) für 24 h mit GA (1 µg/ml), RC (5 µg/ml) oder GA und RC in Kombination behandelt, bevor zVAD-fmk (20 µM), hTNF (100 ng/ml) oder hTNF in Kombination mit zVAD-fmk zugegeben wurden. Nach 24 h wurden die Überlebensraten mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

#### 2.2.4 Störung des HSP90-Komplexes verändert den hTNF-induzierten nekrotischen Zelltod von L929 Zellen in Richtung Apoptose

Eine Nebenbeobachtung war, dass L929 Zellen durch die Vorbehandlung mit GA nicht gegen die zytotoxische Wirkung von hTNF geschützt werden konnten, sondern im Gegenteil die Zellen sensitiviert wurden (Abb. 27 und Abb. 28). Dies konnte durch die Beobachtung erklärt werden, dass im Falle einer Vorbehandlung mit GA (1 µg/ml) eine Stimulation mit hTNF zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade (Abb. 29) und außerdem zu einer apoptotischen Morphologie führte (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der Behandlung mit GA schützte RC (5 µg/ml) und die kombinierte Behandlung mit RC und GA die L929 Zellen vor dem hTNF-induzierten Zelltod (Abb. 28). Bei der Verwendung einer niedrigeren Konzentration von RC (0,1 µg/ml), bei der aber die RIP-Depletion noch nicht ausgeprägt ist (nicht gezeigt), wurde aber auch eine

Sensitivierung für den hTNF-induzierten Zelltod beobachtet (nicht gezeigt). Somit scheint die Sensitivierung nicht auf der RIP-Depletion zu beruhen sondern muss durch einen anderen Effekt der Inhibitoren auf HSP90 verursacht werden.

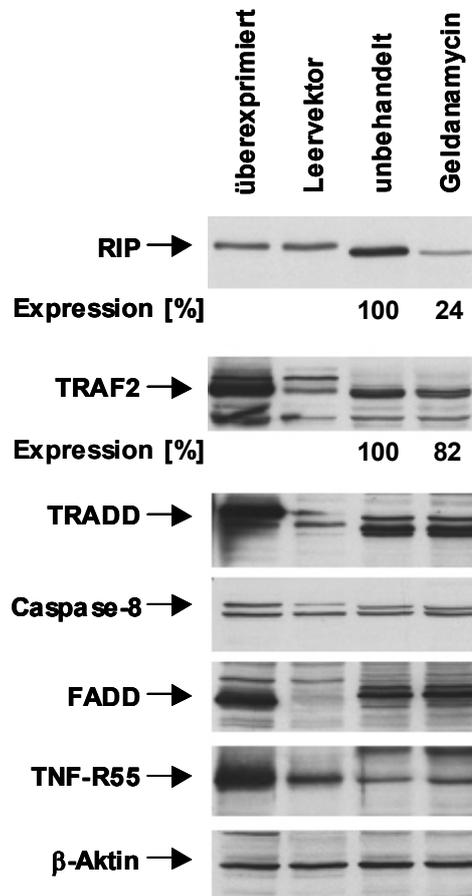


**Abb. 29:** Vorbehandlung mit Geldanamycin führt in L929 Zellen zu einer durch hTNF induzierbaren Aktivierung von Caspasen. L929 Zellen wurden 24 h mit GA (1µg/ml) behandelt, bevor die Zellen für 4 h mit GA oder GA und hTNF (100 ng/ml) stimuliert wurden. Anschließend wurde in den Zellextrakten die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Substrate (zIETD-afc bzw. zDEVD-afc) über 120 min bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte GA-behandelter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade *in vitro* aktiviert wurde (Cyt c/dATP).

### 2.2.5 Geldanamycin verändert nicht die Expression anderer wichtiger Proteine des TNF-Signalwegs

Um zu untersuchen, ob die Störung der Funktion des HSP90-Komplexes neben der RIP-Depletion die Expression anderer bekannter Apoptormoleküle des TNF-R55-Signalwegs beeinflusst und dadurch eventuell die Signaltransduktion unterbindet, wurde deren Expression nach einer GA-Behandlung durch Westernblot-Analysen überprüft. In Abb. 30 ist gezeigt, dass die Behandlung von L929 Zellen mit GA neben einer geringen Verminderung des Proteins TRAF2 nur die Expression des Proteins RIP beeinflusst. Die Expression des TNF-Rezeptors, der

Adaptorproteine TRADD und FADD sowie der Caspase-8 waren dagegen unbeeinflusst. Der GA-vermittelte Schutz gegenüber dem Caspase-unabhängigen Zelltod ist somit nicht durch eine unspezifische Depletion dieser Proteinen bedingt.

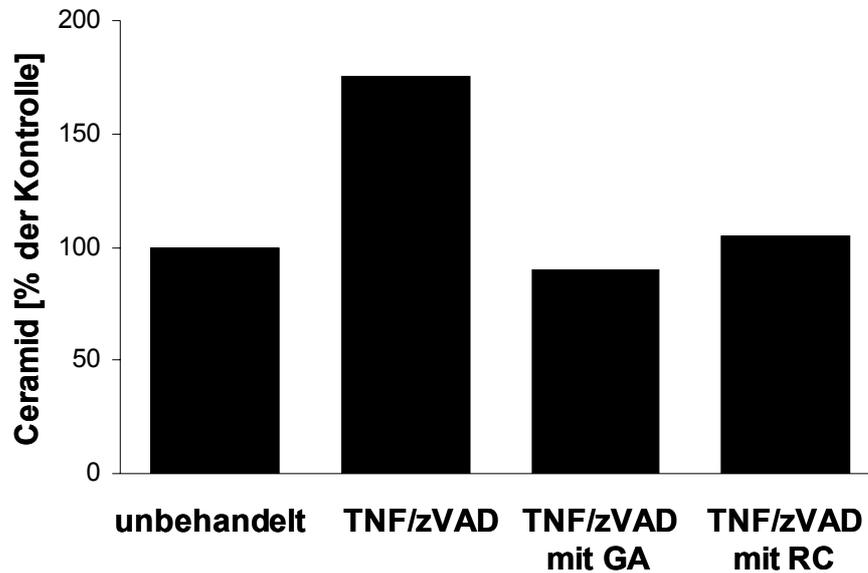


**Abb. 30: Geldanamycin beeinflusst nicht die Expression anderer Proteine des TNF-R55 DISC.** L929 Zellen wurden 24 h mit Medium oder Geldanamycin (GA, 1 µg/ml) behandelt bevor die Expression der angegebenen Proteine analysiert wurde (für RIP und TRAF2 angegeben in % der unbehandelten Kontrolle). Zur Kontrolle sind Lysate aus 293 Zellen, die mit Expressionskonstrukten für die untersuchten Proteine oder dem Leervektor transfiziert waren, mit angegeben. Die leicht unterschiedlichen Bandenhöhen zwischen den Kontrollen und den untersuchten Lysaten (murine L929 Zellen) sind durch die Verwendung des humanen 293 Zellsystem mit humanen Proteinvarianten bedingt.

### 2.2.6 Messungen der Ceramidspiegel in L929 Zellen nach RIP-Depletion

Nachdem in den L929 Zellen gezeigt werden konnte, dass die Depletion von RIP eine Resistenz gegen Caspase-unabhängigen Zelltod induziert, wurde untersucht, ob die RIP-Depletion auch die zuvor gezeigte Generierung von Ceramid beeinflusst. Dazu wurden L929 Zellen für 24 h mit GA (1 µg/ml), RC (5 µg/ml) oder Medium vorbehandelt und anschließend für 3 h mit hTNF/zVAD stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden dann wie im Abschnitt 1.1.3 beschrieben quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass wie in den RIP-defizienten Jurkat T-Zellen auch die RIP-

depletierten Zellen nicht mehr zur verstärkten Generierung von Ceramid in der Lage waren (Abb. 31). Diese Ergebnisse sind aber noch vorläufig und müssen noch weiter verifiziert werden.



**Abb. 31: RIP-Depletion schützt L929 Zellen möglicherweise vor hTNF/zVAD-induziertem Anstieg der intrazellulären Ceramidspiegel.** L929 Zellen wurden wie angegeben für 24 h mit Geldanamycin (GA, 1 µg/ml) oder Radicol (RC, 5 µg/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h mit Medium oder hTNF (100 ng/ml) unter Caspase-Inhibition mit zVAD-fmk (20 µM) allein oder in Kombination mit GA oder RC stimuliert. Die intrazellulären Ceramidspiegel wurden in Doppelwerten mit dem DAG-Kinase Assay bestimmt.

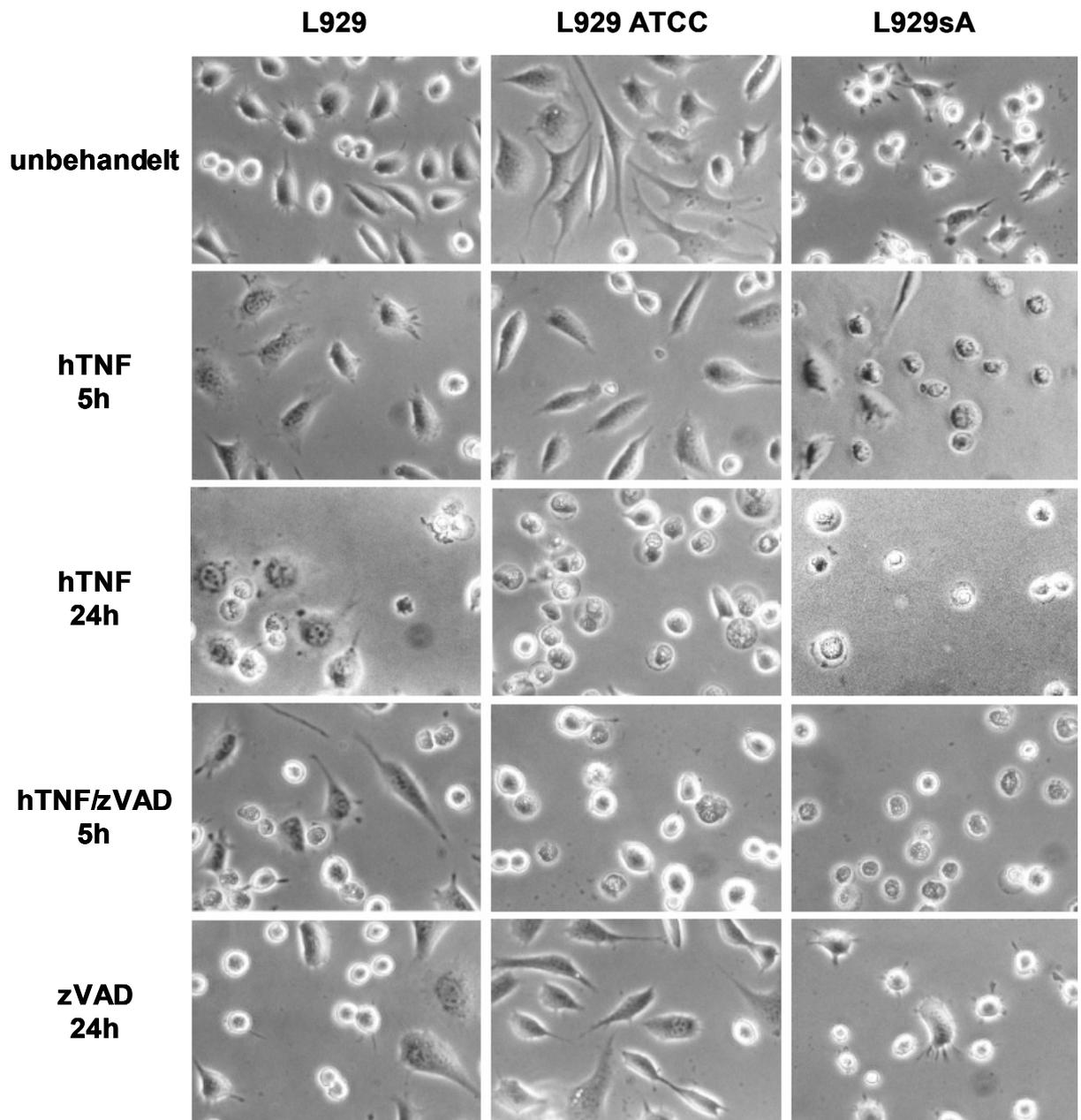
### **3 Charakterisierungen des Caspase-abhängigen und -unabhängigen Zelltods von L929 Zelllinien**

Parallel zu den Versuchen zur Aufklärung der Signaltransduktionswege wurde untersucht, inwieweit der Caspase-unabhängige Zelltod von L929 Zellen Merkmale von Apoptose oder Nekrose aufwies. Dazu wurden die Zell- und Zellkernmorphologien von L929 Zelllinien im Caspase-abhängigen und -unabhängigen Zelltod dokumentiert. Ebenso wurde die Aktivierung der Caspase-Kaskade und die Spaltung von Caspase-Substraten (PARP, Lamin B, Caspase-3) untersucht. Neben den im Hause kultivierten L929 Zellen wurden zur Kontrolle auch L929 ATCC und L929sA Zellen verwendet (siehe dazu auch 2.2.3 oben).

#### **3.1 Charakterisierung des hTNF- und hTNF/zVAD-induzierten Zelltods in L929 Zelllinien**

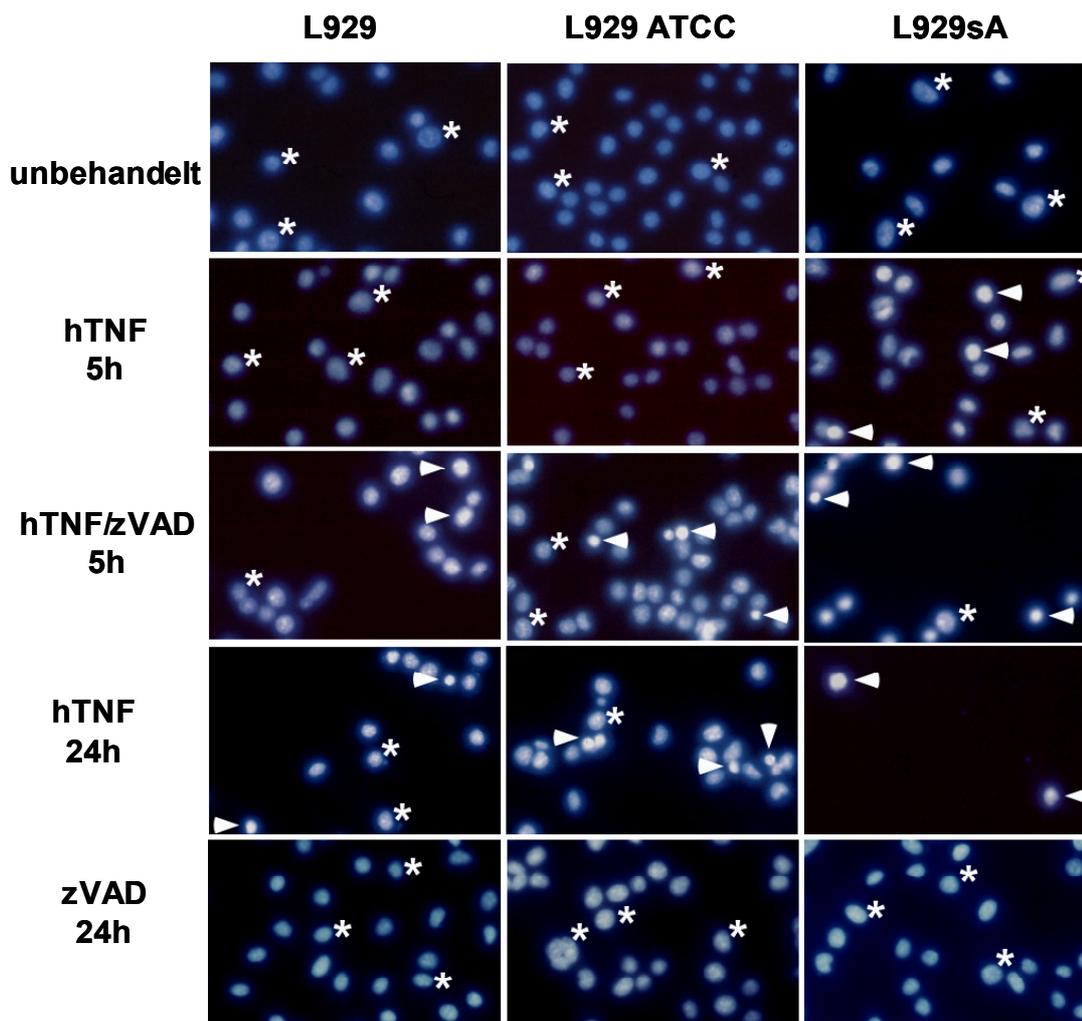
##### **3.1.1 hTNF- und hTNF/zVAD-induzierte Veränderungen der Zell- und Zellkernmorphologie**

Zur morphologischen Untersuchung der drei Zelllinien L929, L929 ATCC und L929sA wurden die Zellen für 5 und 24 h mit hTNF (100 ng/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) stimuliert. Anschließend wurden die Morphologien der unfixierten Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert. Diese Studien zeigten, dass die Stimulation mit hTNF oder hTNF/zVAD in den drei L929 Zelllinien einen Zelltod mit ähnlicher Morphologie auslöst (Abb. 32) und die Zugabe von zVAD-fmk das Auftreten dieser Morphologien zeitlich beschleunigt (siehe dazu auch 1.1.1). Durch die Behandlung mit hTNF oder hTNF/zVAD kugelten sich die Zellen ab und lösten sich mit intakter Zellbegrenzung von der Zellkulturschale. Ein Zerfallen der Zellen durch die aktive Abschnürung von Vesikeln („*blebbing*“) wurde nicht beobachtet, konnte aber durch andere Stimulationen (siehe 3.2 unten) ausgelöst werden. Die Behandlung mit zVAD-fmk allein löste keinen Zelltod aus. Die Stimulation mit hTNF oder hTNF/zVAD führte auch zu Veränderungen der Zellkerne. Schon durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen (Phasenkontrast) konnte eine Veränderung der Brechungseigenschaften und eine Kompaktierung der Kerne beobachtet werden.



**Abb. 32: hTNF und hTNF/zVAD induzieren in verschiedenen L929 Zelllinien gleiche morphologische Veränderungen, aber mit verschiedenen Kinetiken.** L929, L929 ATCC und L929sA Zellen wurden mit Medium, hTNF (100 ng/ml) alleine oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) oder zVAD-fmk allein für 5 oder 24 h (wie angegeben) behandelt und anschließend im unfixierten Zustand an einem Phasenkontrastmikroskop fotografiert.

Um diese Veränderung der Zellkerne zu untersuchen, wurden die L929 Zellen wie zuvor stimuliert und nach der Fixierung der Zellen die Zellkern-DNA mittels DAPI angefärbt. Diese Färbungen bestätigten, dass die Stimulation mit hTNF oder hTNF/zVAD zu einer Chromatin-Kondensation führte. In der Abb. 33 ist zu sehen, dass im Vergleich zu den Kernen der Kontrollzellen durch die Stimulationen mit hTNF oder hTNF/zVAD die Leuchtstärke der mit DAPI gefärbten Zellkerne zunimmt (weiße Pfeile). Es wurde aber keine für die Apoptose typische geometrische Kondensation oder Fragmentation des Chromatins beobachtet.



**Abb. 33: hTNF- und hTNF/zVAD-induzierte Kernveränderungen in verschiedenen L929 Zelllinien.** L929, L929 ATCC und L929sA Zellen wurden mit Medium, hTNF (100 ng/ml) alleine oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) oder zVAD-fmk allein für 5 oder 24 h (wie angegeben) behandelt, bevor die Zellen fixiert und nach anschließender DAPI-Färbung die gefärbten Zellkerne an einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert wurden. DAPI-gefärbte DNA ist blau dargestellt. Einige der kondensierten und somit kleineren und/oder heller leuchtenden Zellkerne (Pfeile) und normale Zellkerne (Sterne) sind markiert.

Im Vergleich zu den L929 und L929 ATCC Zellen reagierte die hypersensible Zelllinie L929sA mit einer beschleunigten Kinetik auf die Stimulationen mit hTNF bzw. hTNF/zVAD. So zeigten die L929sA nach einer fünfstündigen Stimulation mit hTNF Effekte (Zelltod, Chromatin-Kondensation) wie die L929 und L929 ATCC nach ungefähr 24 h. Die drei L929 Zelllinien zeigten aber alle vergleichbare morphologische Veränderungen. Dies war ein Hinweis darauf, dass der hypersensible L929sA-Klon zwar rascher reagiert, aber hTNF bzw. hTNF/zVAD in den drei L929 Zelllinien den gleichen Caspase-unabhängigen Zelltod induziert.

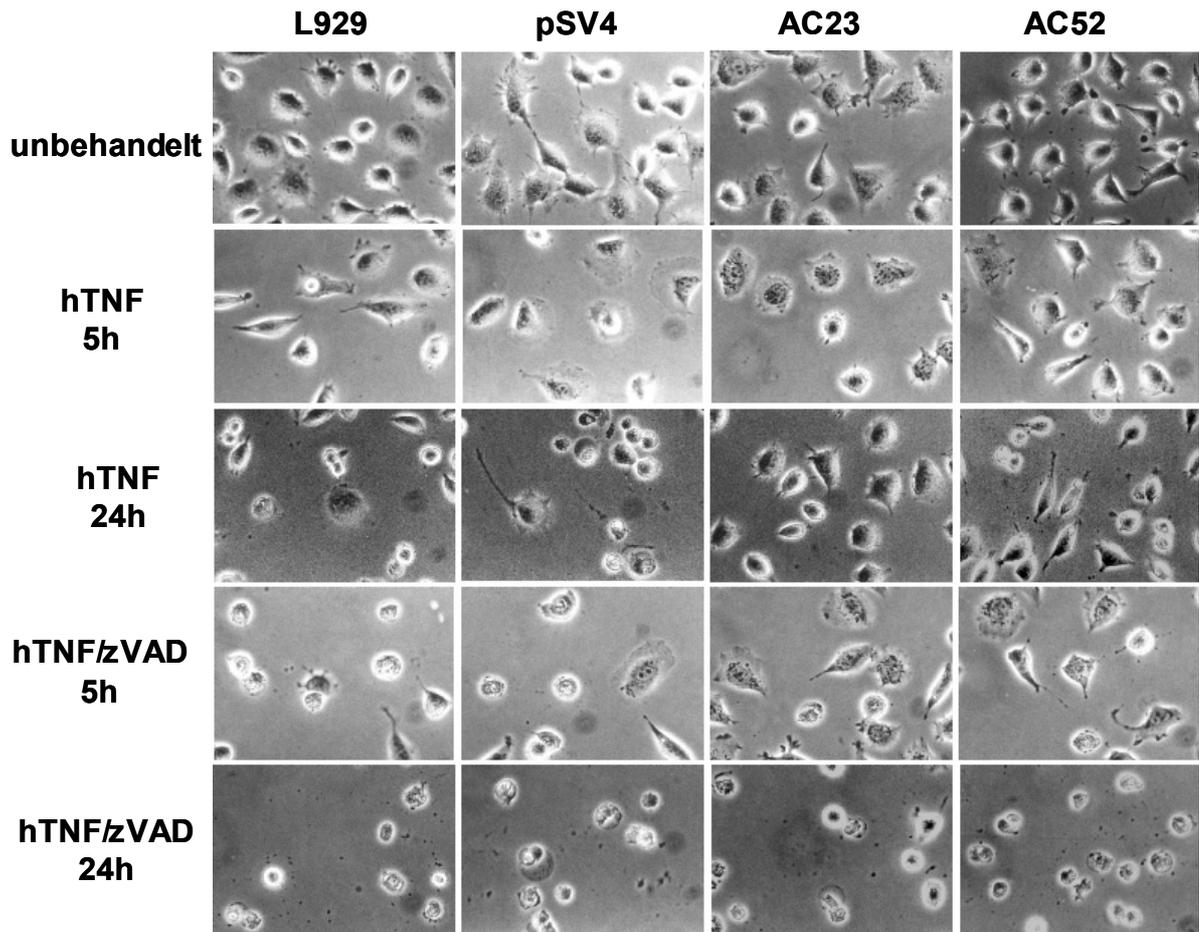
Im Einklang mit der zuvor gezeigten funktionellen Bedeutung von Ceramid als Mediator des hTNF- und hTNF/zVAD-induzierten Zelltods (siehe 1.1.3) wurden durch beide Stimuli auch vergleichbare morphologische Veränderungen ausgelöst. Die zuvor gezeigte, durch zVAD-fmk

verstärkte hTNF-induzierte Generierung von Ceramid korrelierte mit einer beschleunigten Ausbildung morphologischer Veränderungen. Die hier dargestellten morphologischen Ähnlichkeiten des hTNF- und hTNF/zVAD-induzierten Zelltods waren ein Hinweis darauf, dass zVAD-fmk den hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod nur verstärkt und keine grundsätzlich anderen Signalwege aktiviert.

Aufgrund dieser morphologischen Untersuchungen und dem Fehlen einer Phosphatidylserin-Externalisierung (Strelow et al., 2000) konnte der durch hTNF oder hTNF/zVAD-induzierte Zelltod von L929 Zellen dem Nekrose-artigen programmierten Zelltod mit ausgeprägter Chromatin-Kondensation zugeordnet werden.

### 3.1.2 Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen vor dem Nekrose-artigen programmierten Zelltod

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass die Überexpression der Ceramid degradierenden sauren Ceramidase (AC) L929 Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von hTNF (Strelow et al., 2000) und hTNF/zVAD (siehe 1.1.4) schützen kann, da die AC die Akkumulation von Ceramid verhindert bzw. verzögert. Um zu untersuchen, ob dieser Schutz auch auf Ebene der Zell- und Zellkernveränderung besteht wurden die parentalen L929, die Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (pSV4) und die AC-überexprimierenden Zellen (AC23, AC52) für 5 und 24 h mit hTNF (100 ng/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) stimuliert und im unfixierten Zustand fotografiert. Der Schutz durch die Überexpression der AC war auch auf Ebene der Zellmorphologie nachweisbar (Abb. 34). So zeigten die AC-überexprimierenden Zellen (AC23, AC52) weniger Veränderungen nach einer 24-stündigen Inkubation mit hTNF oder einer 5-stündigen Inkubation mit hTNF/zVAD als die parentalen L929 und die Kontrollzellen. Dies war wiederum ein Beleg für die funktionelle Bedeutung des Sphingolipids Ceramid bei der Ausbildung der Morphologien des Nekrose-artigen programmierten Zelltods. Wie zuvor gezeigt wurde (siehe 1.1.4) konnte die AC-Überexpression die Zellen aber nicht dauerhaft vor dem zVAD-beschleunigten hTNF-induzierten Zelltod schützen sondern ihn nur verzögern. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit hTNF/zVAD waren auch die AC-überexprimierenden Zellen im großen Ausmaß gestorben.



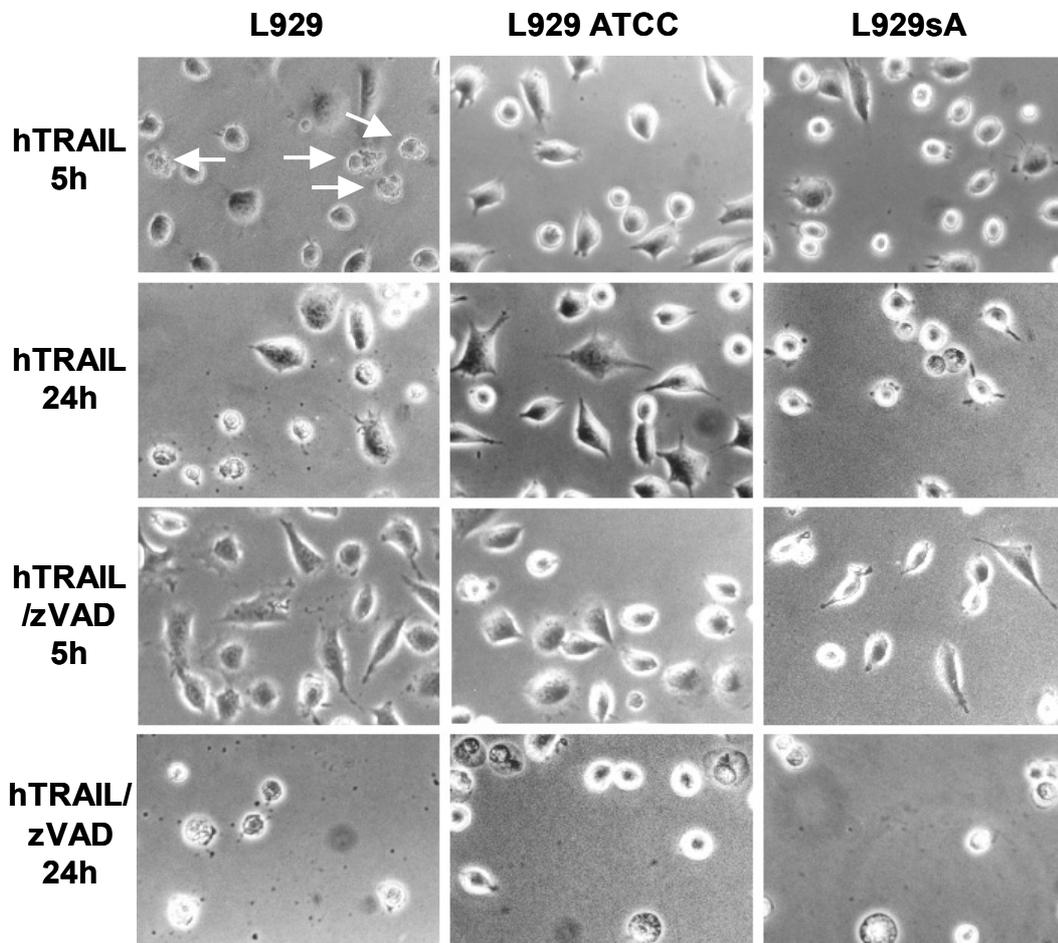
**Abb. 34:** Die hTNF- und hTNF/zVAD-induzierte Nekrose-artige Morphologie ist in AC-überexprimierenden Zellen reduziert. Parentale L929 Zellen, die Leervektor-transfizierte Kontrollzelllinie (pSV4) und die AC-überexprimierenden L929 Zelllinien (AC23, AC52) wurden mit Medium, hTNF (100 ng/ml) alleine oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu$ M) für 5 und 24 h behandelt und anschließend im unfixierten Zustand an einem Phasenkontrastmikroskop fotografiert.

### 3.2 Charakterisierung des TRAIL-induzierten Zelltods in L929 Zelllinien

Im Rahmen der Untersuchung des hTNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltods von L929 Zelllinien zeigte sich, dass hTRAIL (humaner Tumor Nekrose Faktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand) in L929 Zellen typische Apoptose auslöst. Der hTRAIL-induzierte Zelltod wurde im Hinblick auf Zell- und Zellkernmorphologien, Caspase-Aktivierung und Spaltung von Caspase-Substraten charakterisiert. Anschließend wurde überprüft, ob hTRAIL auch Caspase-unabhängige Signalwege aktiviert und es wurde begonnen, eine eventuelle Bedeutung von Ceramid im Caspase-unabhängigen hTRAIL/zVAD-induzierten Zelltod zu untersuchen.

### 3.2.1 hTRAIL-induzierte Veränderungen der Morphologie von L929 Zelllinien

In der Abb. 35 sind Fotos von verschiedenen unfixierten L929 Zelllinien (Erläuterung siehe 2.2.3) gezeigt, die für 5 h oder 24 h mit hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder zusätzlich mit zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden. In den L929 Zellen war nach hTRAIL-Stimulation ein Zelltod mit begleitenden apoptotischen „blebbing“ der Zellmembran (weiße Pfeile) zu beobachten (siehe dazu auch Abb. 40). Die Zelllinien L929 ATCC und L929sA zeigten dagegen nach einer Stimulation mit hTRAIL für 5 h keine und nach 24 h kaum Zelltod und es war keine Häufung apoptotischer Zellen zu beobachten (Abb. 35). Messungen der Überlebensrate der Zellen zeigten, dass die L929 ATCC und L929sA Zellen auch gegenüber einer 48-stündigen Behandlung mit hTRAIL resistent waren (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 35: hTRAIL induziert (nur) in L929 Zellen typische Apoptose.** L929, L929 ATCC und L929sA Zellen wurden mit Medium, hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) alleine oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) für 5 oder 24 h behandelt und anschließend im unfixierten Zustand an einem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Apoptotische Zellen, die „blebbing“ zeigen, sind markiert (Pfeile).

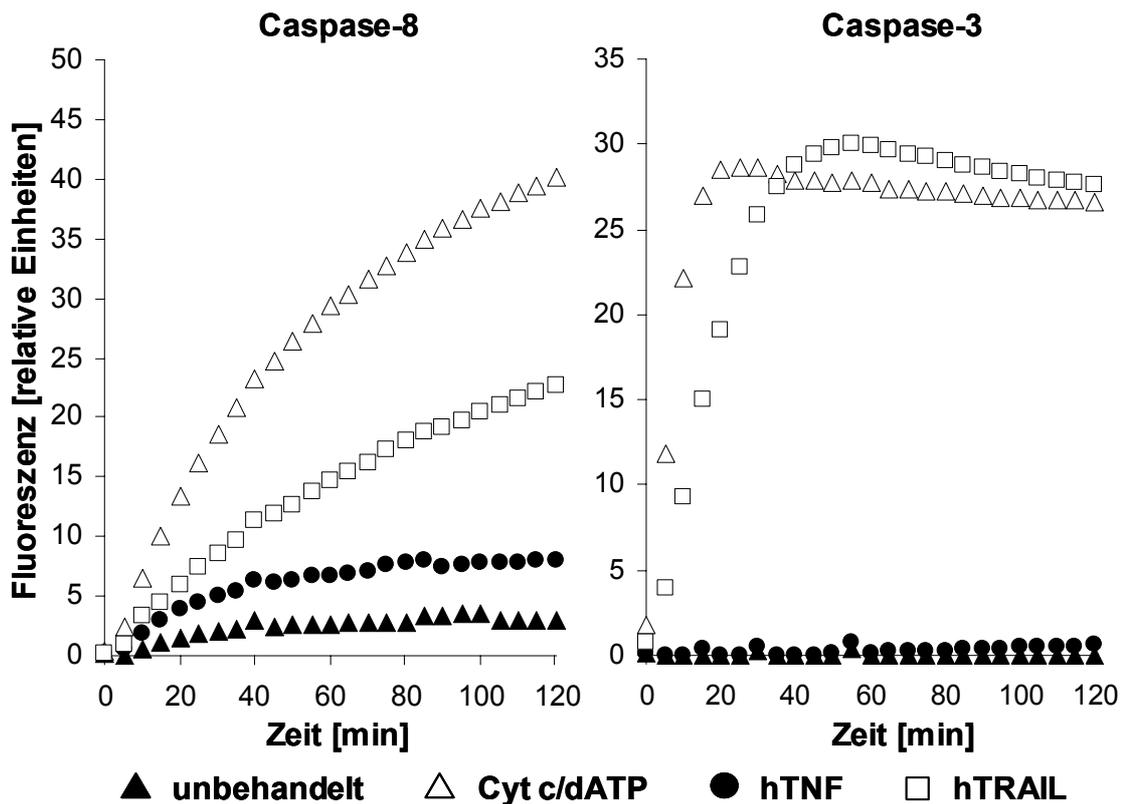
Die Zugabe des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk konnte die L929 Zellen vor dem hTRAIL-induzierten Zelltod und dem „blebbing“ schützen (siehe Abb. 35, hTRAIL/zVAD 5 h) und war

ein erster Hinweis auf einen Caspase-abhängigen Mechanismus. Interessanterweise konnte die Inhibition der Caspasen die Zellen nicht dauerhaft vor dem hTRAIL-induzierten Zelltod bewahren (siehe Abb. 35 hTRAIL/zVAD 24 h). Dies war ein Hinweis, dass auch der hTRAIL-induzierte Zelltod in L929 Zellen eine Caspase-unabhängige Komponente besitzt. Auf diesen Punkt wird im Abschnitt 3.2.5 näher eingegangen.

Auch die Apoptose-resistenten Zelllinien L929 ATCC und L929sA waren sensitiv gegenüber dieser Caspase-unabhängigen Komponente (Abb. 35 24 h TRAIL/zVAD). Diese Beobachtung zeigt einerseits, dass die Resistenz dieser Zelllinien somit nicht auf dem Fehlen des TRAIL-Rezeptors beruht und andererseits, dass auch von dem TRAIL-Rezeptor zwei völlig verschiedene Signalwege ausgehen, die unabhängig voneinander zur Induktion von Zelltod führen (siehe dazu 3.2.5).

### 3.2.2 hTRAIL aktiviert in L929 Zellen die Caspase-Kaskade

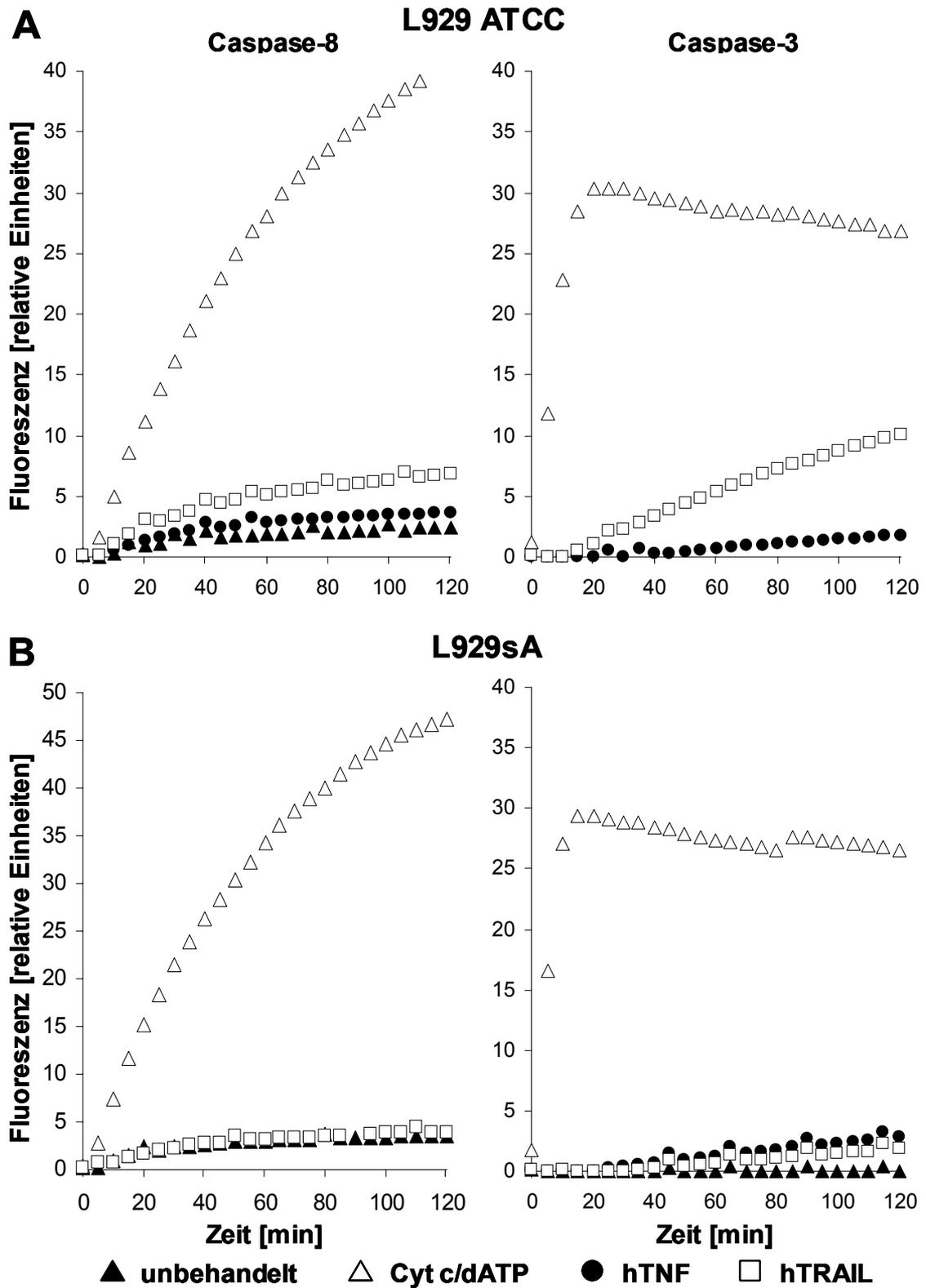
Die Zugabe von zVAD-fmk kann wie zuvor gezeigt L929 Zellen kurzzeitig vor dem hTRAIL-induzierten Zelltod schützen. Dieser Hinweis auf einen Caspase-abhängigen Zelltod wurde durch Messungen von Caspase-Aktivitäten bestätigt. Die Stimulation von L929 Zellen mit hTRAIL (1 µg/ml) für 4 h induzierte eine deutliche Aktivierung der Caspasen-8 und -3 (Abb. 36). Dagegen konnte die Behandlung mit hTNF (100 ng/ml) die Caspase-Kaskade nicht aktivieren. Auch längere Stimulationszeiten mit hTNF zeigten keine signifikante Aktivierung der Caspase-Kaskade (Daten nicht gezeigt).



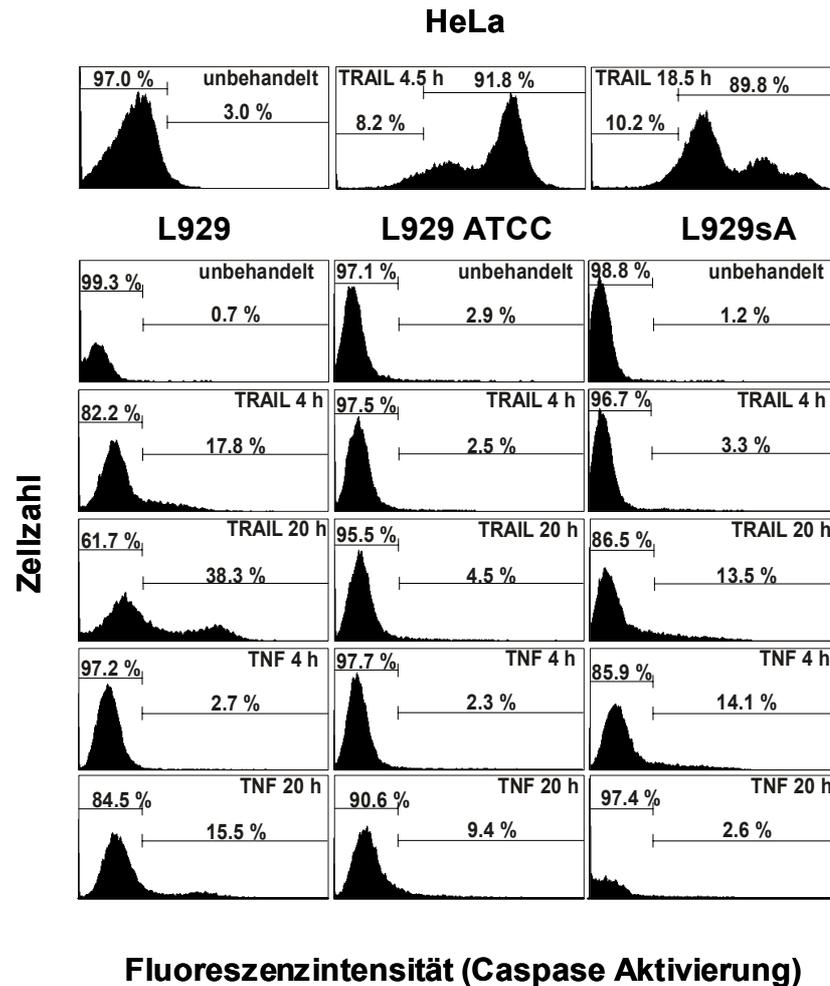
**Abb. 36: hTRAIL, aber nicht hTNF aktiviert die Caspase-Kaskade in L929 Zellen.** L929 Zellen wurden 4 h mit Medium, hTNF (100 ng/ml) oder mit hTRAIL (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Anschließend wurde in den Zellextrakten die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Substrate (zIETD-afc bzw. zDEVD-afc) über 120 min bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte unstimulierter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade *in vitro* aktiviert wurde (Cyt c/dATP).

Die in L929 Zellen gezeigte starke Caspase-Aktivierung durch hTRAIL war in L929 ATCC Zellen auch nach einer 20-stündigen Stimulation deutlich geringer und eventuell für die Induktion von Apoptose nicht ausreichend (Abb. 37A) während in L929sA Zellen keine Aktivität messbar war (Abb. 37B). Die Verwendung einer FACS-basierten Methode zur Messung der Caspase-Aktivitäten bestätigte diesen grundsätzlichen Unterschied. Es konnten nur in L929 Zellen und nicht in den L929 ATCC und L929sA Zellen aktivierte Caspasen nach einer hTRAIL Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 38). Als Positivkontrolle wurde parallel die hTRAIL-sensitive humane Cervix-Karzinom Zelllinie HeLa mit hTRAIL stimuliert. Diese zeigte ebenfalls eine deutliche Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Die beobachtete Resistenz der L929 ATCC und L929sA Zellen gegenüber der Stimulation mit hTRAIL resultiert somit aus einer unzureichenden Caspase-Aktivierung.



**Abb. 37: hTRAIL aktiviert in L929 ATCC Zellen kaum und in L929sA Zellen nicht die Caspase-Kaskade.** L929 ATCC (A) und L929sA (B) Zellen wurden 20 h mit Medium, hTNF (100 ng/ml) oder mit hTRAIL (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Anschließend wurde in den Zellextrakten die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Substrate (zIETD-afc bzw. zDEVD-afc) über 120 min bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte unstimulierter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade *in vitro* aktiviert wurde (Cyt c/dATP).

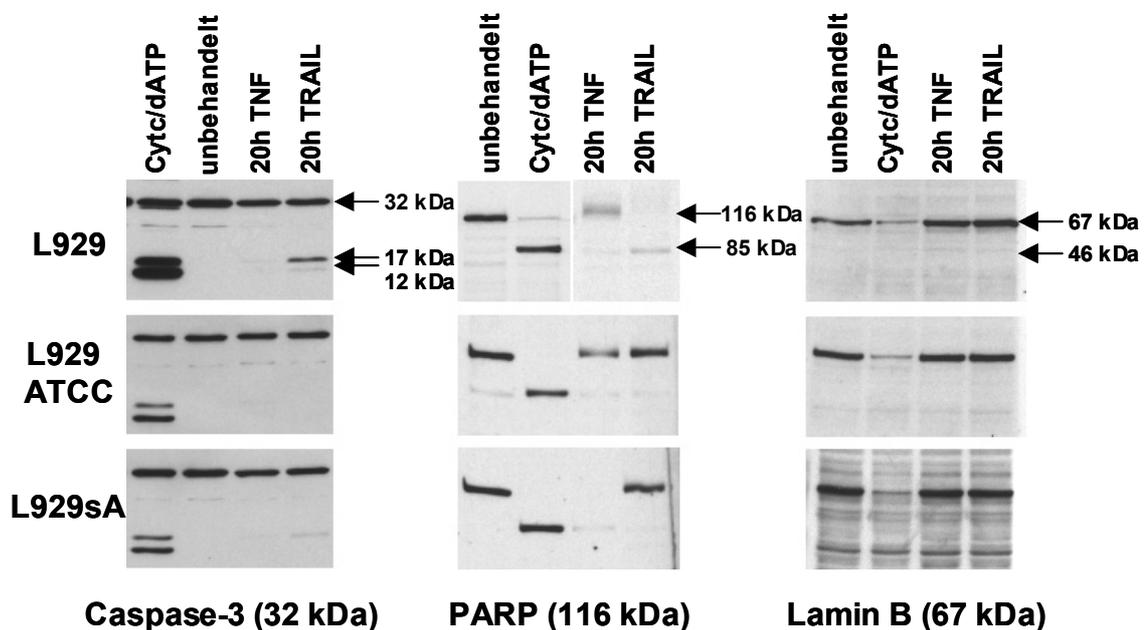


**Abb. 38: hTRAIL aktiviert die Caspase-Kaskade nur in L929 Zellen, aber nicht in L929 ATCC und L929sA Zellen.** L929, L929 ATCC und L929sA Zellen wurden für 20 h mit Medium oder 4 h und 20 h mit hTNF (100 ng/ml) oder mit hTRAIL (1 µg/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurden HeLa Zellen für 18,5 h mit Medium (unbehandelt) oder 4,5 h und 18,5 h mit hTRAIL (1 µg/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in Suspension mit einem fluoreszenzmarkierten membrangängigen Caspase-Inhibitor (fam-VAD-fmk, CaspaTag™) gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Die Analysen sind als Histogramme dargestellt. Der prozentuale Anteil an Zellen ohne (links) oder mit aktivierten Caspasen (rechts) ist in den jeweiligen Histogrammen angegeben.

Die hTRAIL-induzierte Caspase-Aktivierung wurde zusätzlich durch Westernblot-Analysen untersucht. Diese zeigten, dass in hTRAIL- aber nicht in hTNF-stimulierten L929 Zellen die Untereinheiten p17 und p12 der aktivierten Caspase-3 nachweisbar waren (Abb. 39 links). Die Resistenz der L929 ATCC und L929sA Zellen gegen hTRAIL wurde wiederum dadurch erklärbar, dass keine Untereinheiten der aktiven Caspase-3 nachweisbar waren. Die in Abb. 37 gezeigte leichte hTRAIL-induzierte Aktivierung der Caspase-Kaskade in L929 ATCC ist eventuell zu gering, um auch durch eine Westernblot-Analyse oder durch eine FACS-basierte Methode nachgewiesen zu werden.

In allen drei Zelllinien führte die Stimulation mit hTNF zu einer Degradation des Caspase-Substrates PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase). Der Abbau des PARP verlief aber ohne das

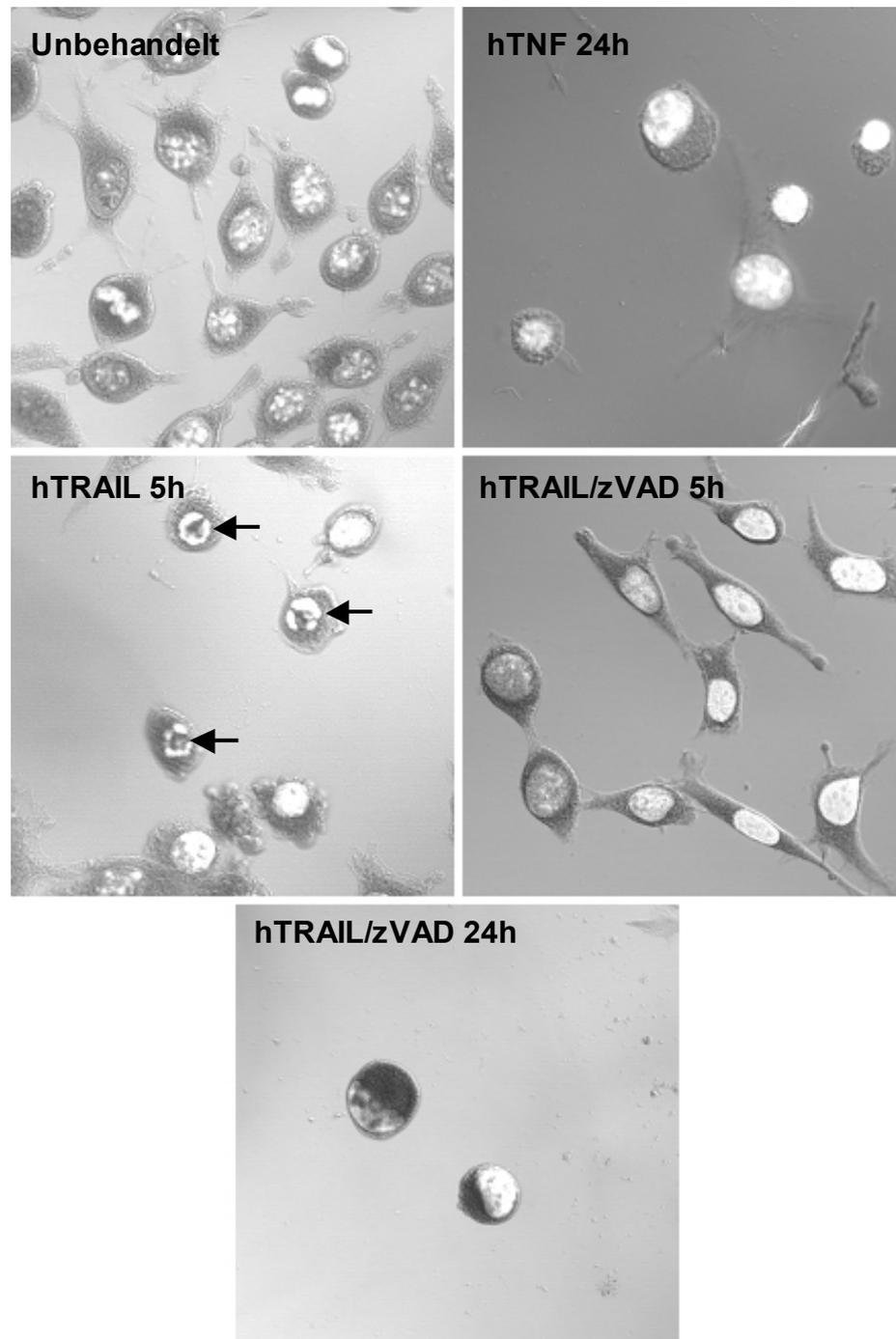
Auftreten des Spaltproduktes von 85 kDa, welches durch die gerichtete Proteaseaktivität der Caspase-3 entsteht. Die hTRAIL-induzierte Aktivierung der Caspase-3 in L929 Zellen hatte dagegen ein vollständiges Verschwinden des PARP zur Folge und es entstand das für die Spaltaktivität der Caspase-3 spezifische 85 kDa-Fragment (Abb. 39 Mitte). Das Caspase-6 Substrat Lamin B wurde trotz der durch hTRAIL aktivierten Caspase-Kaskade in den L929 Zellen scheinbar nicht abgebaut. Durch die Inkubation mit Cytochrom c und dATP und die daraus folgende Aktivierung der Caspase-Kaskade konnte dagegen *in vitro* das Lamin B degradiert werden. Die für Caspase-Aktivität spezifischen Spaltprodukte konnten aber nicht detektiert werden (Abb. 39 rechts).



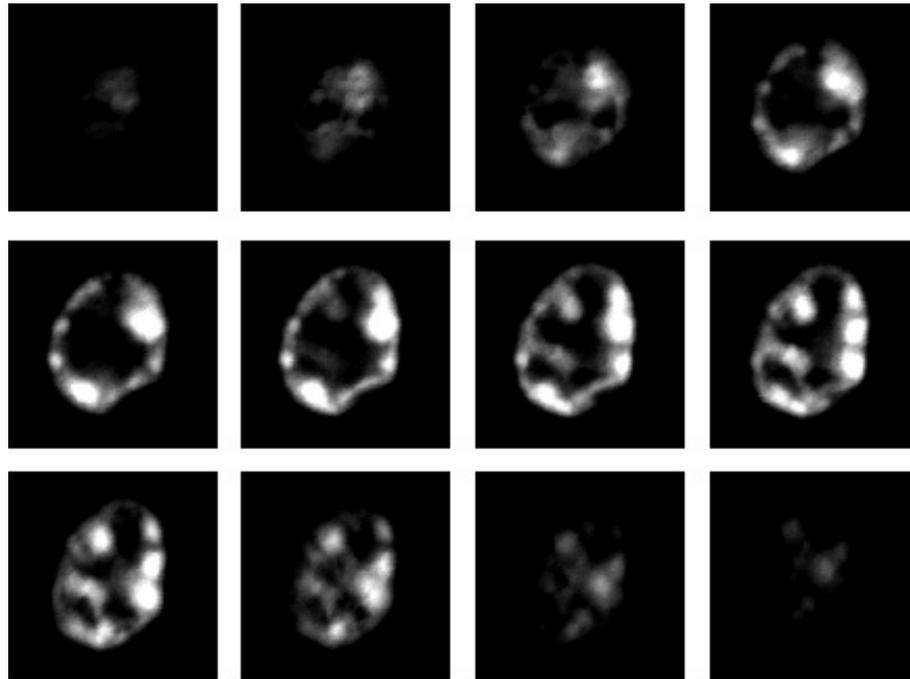
**Abb. 39: hTNF- und TRAIL-induzierte Degradation von Caspase-Substraten.** L929, L929 ATCC und L929sA Zellen wurden mit Medium, hTNF (100 ng/ml) oder hTRAIL (1 µg/ml) für 20 h behandelt, bevor die Expression der angegebenen Proteine durch Westernblot-Analysen untersucht wurden. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte unbehandelter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade *in vitro* aktiviert wurde (Cyt c/dATP).

### 3.2.3 hTRAIL-induzierte Veränderungen der Zellkerne von L929 Zellen

Untersuchungen der Zellkernmorphologien durch DAPI-Färbungen und anschließender konventioneller Lichtmikroskopie ergaben, dass die Stimulation mit hTRAIL Kernkondensation auslöste (nicht gezeigt). Die Zellkernmorphologie wurde anschließend durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie näher untersucht. In Abb. 40 ist gezeigt, dass die Behandlung mit hTNF eine Kondensation des Chromatins verursacht, ohne dass bestimmte geometrische Strukturen entstehen, die für eine Apoptose typisch wären. Im Gegensatz dazu zeigen die Kerne von Zellen, die mit hTRAIL behandelt wurden eine heterogene Chromatin-Kondensation und eine Fragmentation (Pfeile). Wie für die Apoptose beschrieben, wurde das in der Abbildung weiß dargestellte DAPI-gefärbte Chromatin häufig an der Kernperipherie vorgefunden, so dass hohlkugelartige Strukturen entstanden. In der Abb. 41 ist diese Struktur anhand von Schnittbildern eines Kernes dargestellt und es ist auch zu erkennen, dass das Chromatin kondensiert und in „Pakete“ zerfallen ist. Die Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk kann die Ausbildung dieser Chromatinstrukturen verhindern. Dies zeigt, dass die hTRAIL-induzierten Kernveränderungen Caspase-abhängig sind.



**Abb. 40: hTRAIL induziert „blebbing“ der Zellmembran und Veränderungen des Zellkerns in L929 Zellen.** L929 Zellen wurden mit Medium (unbehandelt), hTNF (100 ng/ml), hTRAIL (1 µg/ml) alleine oder in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) für 5 h oder 24 h behandelt, bevor die Zellen fixiert und nach anschließender DAPI-Färbung die gefärbten Zellkerne an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop dokumentiert wurden. Die DAPI-gefärbte DNA ist weiß dargestellt. Kerne mit apoptotischen Merkmalen sind markiert (Pfeile).



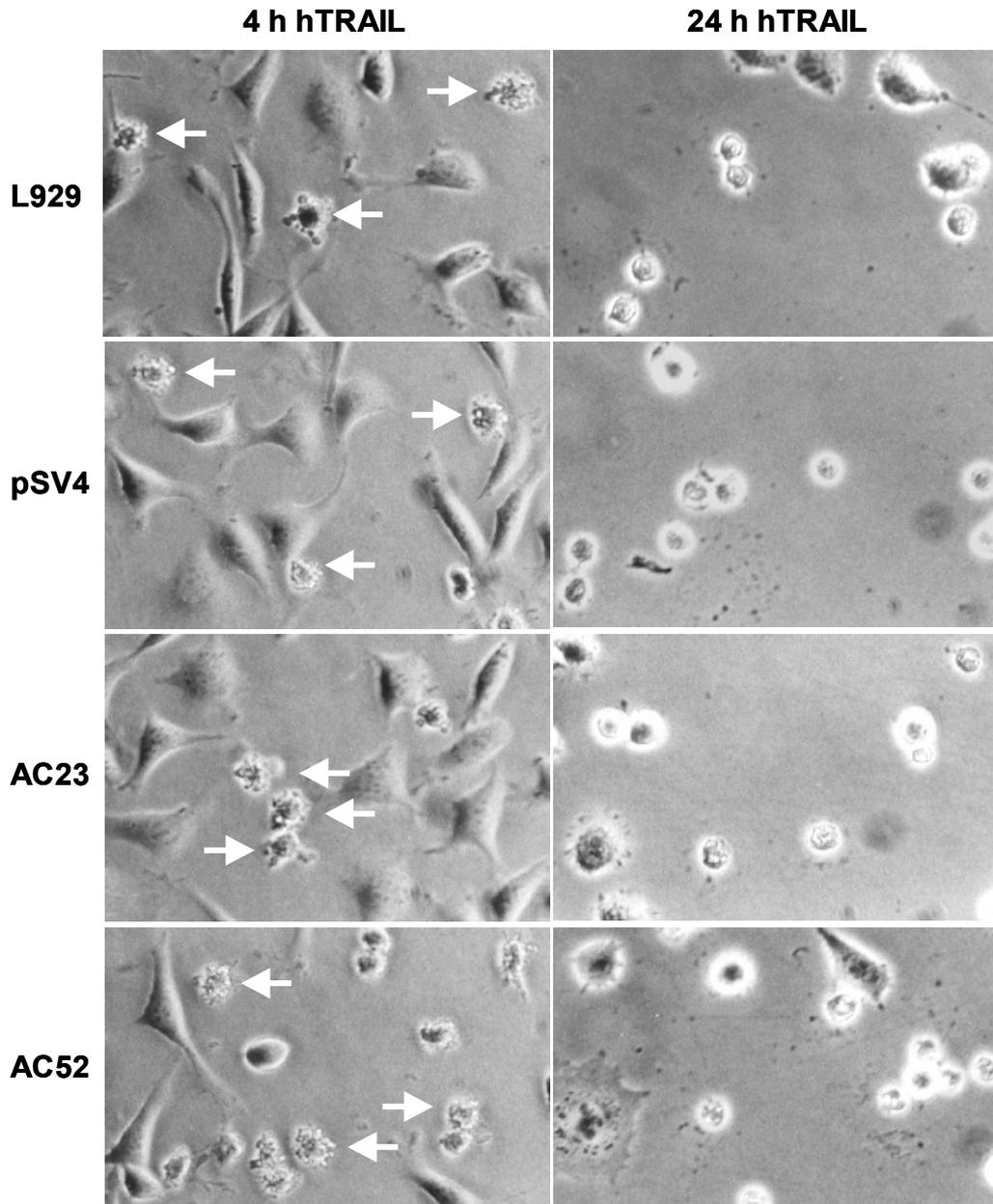
**Abb. 41: hTRAIL-induzierte Verlagerung des Chromatins zur Zellkernperipherie.** L929 Zellen wurden mit hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 5 h behandelt, bevor die Zellen fixiert und nach anschließender DAPI-Färbung die gefärbten Zellkerne an einem konfokalen Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskop in optischen Schnitten dokumentiert wurden (Reihenfolge von links oben nach rechts unten). Die DAPI-gefärbte DNA ist weiß dargestellt.

Durch die hier gezeigten Untersuchungen der hTRAIL-induzierten Zell- und Zellkernveränderungen, der Aktivierung der Caspase-Kaskade und der Spaltung von PARP, konnte der hTRAIL-induzierte Tod von L929 Zellen als Apoptose charakterisiert werden.

### 3.2.4 Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen nicht vor hTRAIL-induzierter Apoptose

Um zu untersuchen, ob Ceramid ein Mediator der hTRAIL-induzierten Apoptose ist, wurden AC-überexprimierende L929 Zellen (siehe 1.1.4) untersucht. Dazu wurden parentale L929 Zellen, Kontrollzellen (pSV4, Leervektorkontrolle) und die AC-überexprimierenden L929 Zelllinien (AC23, AC52) für 4 h und 24 h mit hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Anschließend wurden die Zellmorphologien im unfixierten Zustand an einem Fotomikroskop dokumentiert. In der Abb. 42 ist zu sehen, dass die parentalen sowie die Kontrollzellen aber auch die AC-überexprimierenden Zellen nach einer vierstündigen Stimulation mit hTRAIL apoptotisches „blebbing“ zeigten. Nach einer 24 h-Inkubation war der Zelltod sehr ausgeprägt und es war kein deutlicher Schutz der AC-überexprimierenden Zellen zu beobachten. Auch quantitative Messungen der Überlebensrate zeigten, dass die AC-Überexpression keinen Schutz vor der

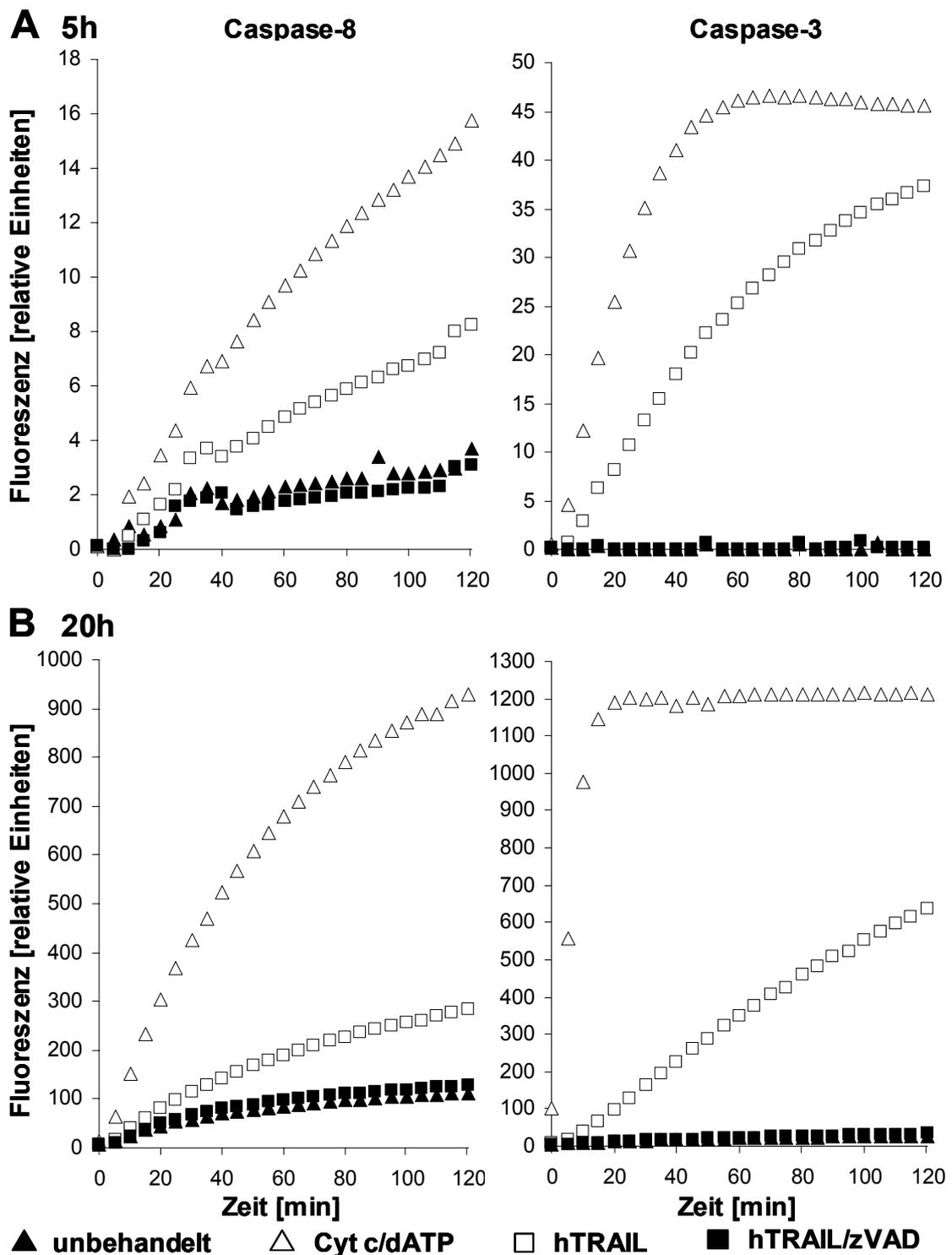
hTRAIL-induzierten Apoptose bewirkt (Daten nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass Ceramid keine ursächliche Rolle in der Vermittlung der hTRAIL-induzierten Apoptose in L929 Zellen innehat.



**Abb. 42: Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen nicht vor hTRAIL-induzierter Apoptose.** Parentale L929 Zellen, die Leervektor-transfizierte Kontrollzelllinie (pSV4) und die AC-überexprimierenden L929 Zelllinien (AC23, AC52) wurden mit hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 4 und 24 h behandelt und anschließend im unfixierten Zustand an einem Phasenkontrastmikroskop fotografiert. Apoptotische Zellen, die „blebbing“ zeigen, sind markiert (Pfeile).

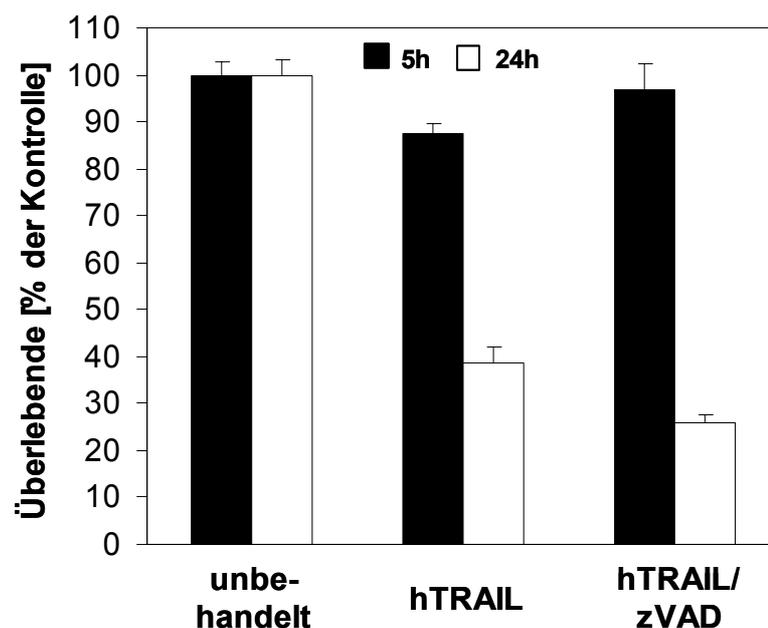
### 3.2.5 Inhibition der hTRAIL-induzierten Caspase-Aktivierung durch zVAD-fmk verhindert nicht den Zelltod von L929 Zelllinien

Da der hTRAIL-induzierte Zelltod von L929 Zellen als Caspase-abhängig charakterisiert werden konnte, sollte die Inhibition der Caspasen mittels zVAD-fmk die Zellen vor dem Tod schützen. In Abb. 35 ist aber schon im mikroskopischen Bild deutlich zu sehen, dass nach einer 24-stündigen Stimulation mit hTRAIL/zVAD der Zelltod in L929 Zellen sogar noch ausgeprägter als mit hTRAIL allein war. Auch die hTRAIL-resistenten L929 ATCC und L929sA Zellen waren sensitiv gegenüber dem hTRAIL/zVAD-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod (Abb. 35). Um sicherzustellen, dass die Zugabe von zVAD-fmk die hTRAIL-induzierte Caspase-Aktivierung vollständig verhindert, wurden L929 Zellen für 5 oder 20 h mit hTRAIL (1 µg/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) stimuliert. Anschließend wurde durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Caspase-Substrate die Caspase-Aktivitäten bestimmt. Diese Messungen zeigten, dass durch die Zugabe von zVAD-fmk die hTRAIL-induzierte Caspase-Aktivierung vollständig verhindert wird bzw. bereits aktivierte Caspasen vollständig inhibiert werden (Abb. 43).



**Abb. 43: zVAD-fmk inhibiert die hTRAIL-induzierte Caspase-Aktivierung.** L929 Zellen wurden 5 h (A) oder 20 h (B) mit Medium, hTNF (100 ng/ml), hTRAIL (1 µg/ml) oder für 30 min mit zVAD-fmk (20 µM) und anschließend mit hTRAIL/zVAD (20 µM) stimuliert. Anschließend wurde in den Zellextrakten die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 durch die Quantifizierung der Spaltung fluorogener Substrate (zIETD-afc bzw. zDEVD-afc) über 120 min bestimmt. Als Positivkontrolle dienten Zellextrakte unstimulierter Zellen, in denen durch die Zugabe von Cytochrom c und dATP die Caspase-Kaskade *in vitro* aktiviert wurde (Cyt c/dATP). (Anmerkung: Die Unterschiede in der Skalierung der Fluoreszenz-Achse zwischen A und B beruhen auf einem Wechsel der verwendeten Mikrotiterplatten.)

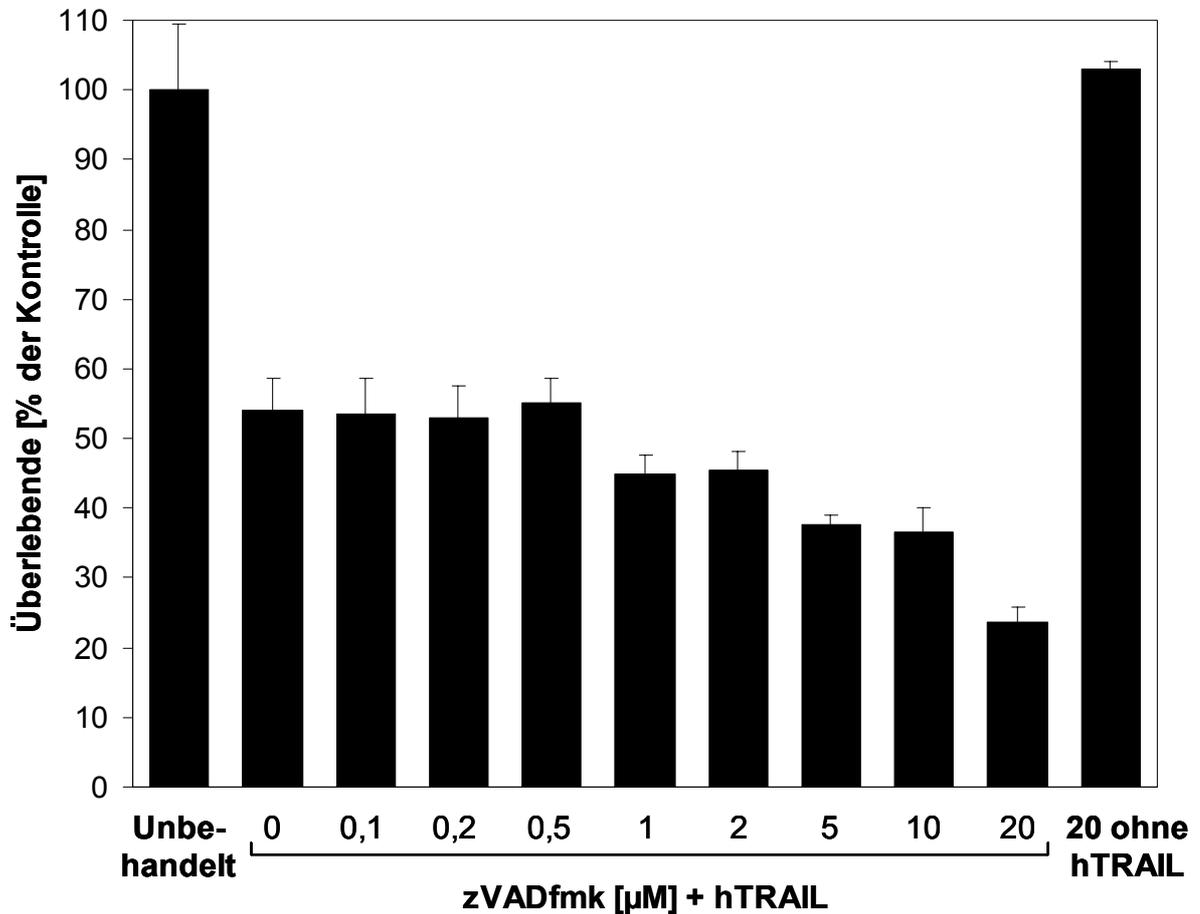
Diese Caspase-Inhibition war aber nicht ausreichend, um die L929 Zellen auf Dauer vor dem hTRAIL-induzierten Zelltod zu bewahren. Dies konnte durch morphologische Untersuchungen (siehe Abb. 35 und Abb. 40, 24 h hTRAIL/zVAD) und durch quantitative Bestimmungen von Überlebensraten gezeigt werden (siehe Abb. 44, 24 h). So führt eine 24-stündige Stimulation mit hTRAIL/zVAD trotz Caspase-Inhibition zu einem deutlichen Zelltod, der aufgrund der vollständig unterdrückten Caspase-Aktivität (siehe Abb. 43) als Caspase-unabhängig anzusehen ist. Durch die Caspase-Inhibition ist es nur möglich die Zellen für 5 h vor der apoptotischen Komponente des hTRAIL-induzierten Zelltod schützen (Abb. 44, 5 h). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass in hTRAIL-behandelten L929 Zellen zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Caspase-abhängiger apoptotischer Zelltod zu beobachten ist (siehe Abb. 35 und Abb. 42). Weitere Versuche zeigten, dass nach 7 h unter Caspase-Inhibition die Caspase-unabhängige Komponente des hTRAIL-induzierten Zelltods die Zellen tötet (siehe unten Abb. 46, hTRAIL/zVAD).



**Abb. 44: zVAD-fmk schützt L929 Zellen vor hTRAIL-induzierter Apoptose, induziert aber dann Caspase-unabhängigen Zelltod.** L929 Zellen wurden mit Medium, hTRAIL (1 µg/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) für 5 oder 24 h inkubiert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurde. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen

Es wurde genauer untersucht, wie sich steigende Mengen zVAD-fmk auf den hTRAIL-induzierten Zelltod auswirken. Dazu wurden L929 Zellen für 20 h mit hTRAIL (1 µg/ml) allein oder in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen zVAD-fmk (0,1 - 20 µM) behandelt und dann die Überlebensraten bestimmt. Dabei konnte, wie schon zuvor für den hTNF-

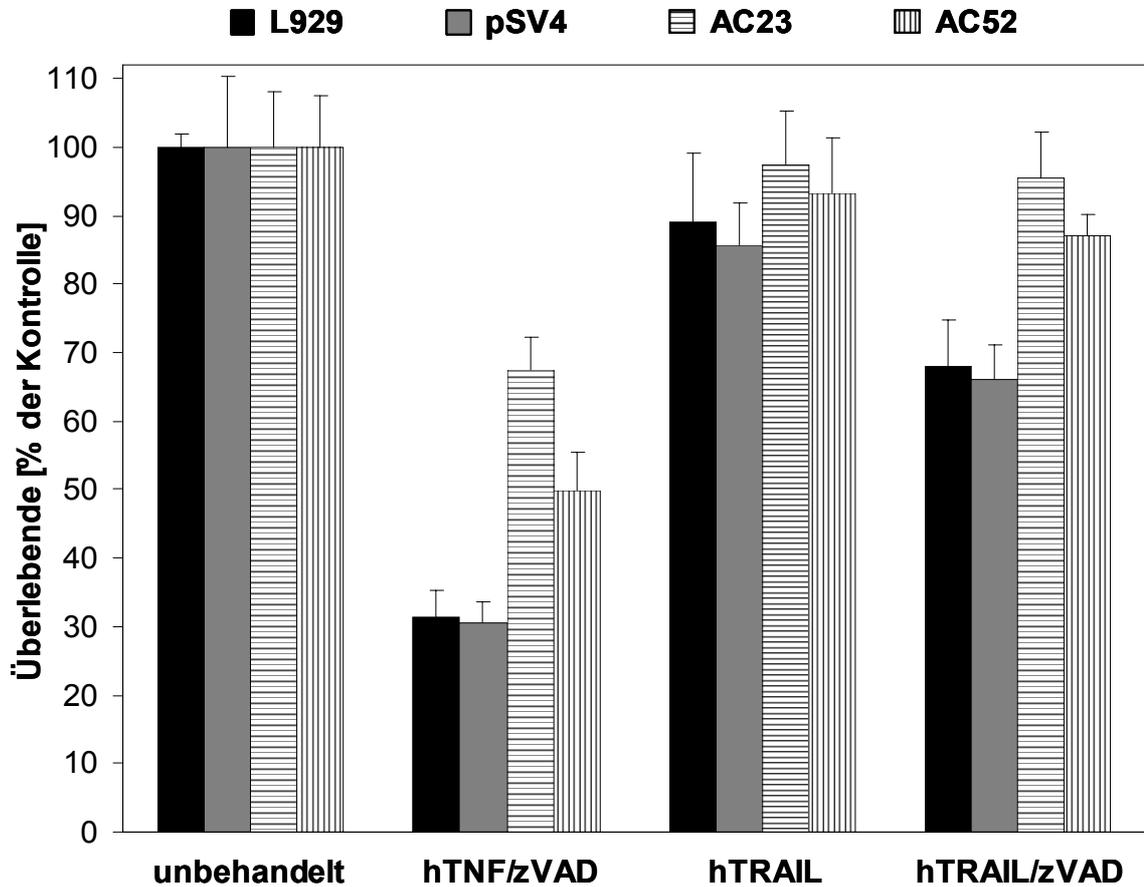
induzierten Zelltod gezeigt (siehe 1.1.1), auch für den hTRAIL-induzierten Zelltod eine Sensitivierung durch zVAD-fmk beobachtet werden, wobei das Ausmaß der Sensitivierung von der Konzentration des zVAD-fmk abhängig ist (siehe Abb. 45). Die Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk allein war nicht toxisch für die Zellen.



**Abb. 45: zVAD-fmk schützt trotz Caspase-Inhibition nicht dauerhaft vor hTRAIL-induziertem Zelltod.** L929 Zellen wurden mit Medium (unbehandelt), hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), hTRAIL in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen zVAD-fmk (0,1 - 20  $\mu\text{M}$ ) oder 20  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk ohne hTRAIL für 20 h inkubiert, bevor die Überlebensraten mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt wurden. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

Es stellte sich die Frage, ob auch der hTRAIL/zVAD-induzierte Caspase-unabhängige Zelltod Ceramid als Mediator verwendet. Um erste Hinweise zu erhalten, wurde untersucht, ob AC-überexprimierende L929 Zellen gegenüber dem hTRAIL/zVAD-induzierten Zelltod resistenter sind. Dazu wurden parentale L929 Zellen, Kontrollzellen (pSV4, Leervektorkontrolle) und die AC-überexprimierenden Zelllinien (AC23, AC52) für 7 h mit hTNF (100 ng/ml) in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) oder mit hTRAIL (1  $\mu\text{g/ml}$ ) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Diese Versuche zeigten, dass die AC-überexprimierenden L929, wie schon zuvor für hTNF/zVAD gezeigt (1.1.4), auch gegenüber dem Caspase-unabhängigen

hTRAIL/zVAD-induzierten Zelltod resistenter waren als die parentalen L929 und die Kontrollzellen (Abb. 46). Diese Versuche sind ein erster Hinweis darauf, dass auch die Caspase-unabhängige Komponente des hTRAIL-induzierten Zelltods durch Ceramid vermittelt wird.



**Abb. 46: Überexpression der sauren Ceramidase schützt L929 Zellen (AC-Klone) vor der zytotoxischen Wirkung des hTRAIL/zVAD-induzierten Zelltods.** Parentale L929 Zellen (L929), Kontrollzellen (pSV4) und AC-überexprimierende L929 Zellen (AC23 und AC52) wurden mit Medium (unbehandelt), mit hTNF (100 ng/ml), hTRAIL (1 µg/ml) allein oder in Kombination mit zVAD-fmk (20 µM) für 7 h inkubiert, bevor die Überlebensraten durch Kristallviolett-Färbung ermittelt wurden. Zellen, die mit hTRAIL/zVAD behandelt wurden, wurden zuvor für 30 min mit zVAD-fmk (20 µM) präinkubiert.

## Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die Signalwege des Caspase-unabhängigen Zelltods zu gewinnen. Die Untersuchung dieser Wege erfordert in vielen Zellsystemen eine aktive Inhibition des oftmals parallel ablaufenden Caspase-abhängigen Zelltods. In dem L929 Zellsystem löst hTNF einen über den TNF-R55 vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod aus, ohne dass es nötig wäre, Caspasen zu inhibieren. Dieses Zellsystem eignet sich deshalb im besonderen Maße für Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus des Caspase-unabhängigen Zelltods. Als Mediator dieses Zelltods fungiert Ceramid, das durch die hTNF-vermittelte Aktivierung der A-SMase gebildet wird (Strelow et al., 2000). Dabei wurde beobachtet, dass die aktive Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk oder durch virales CrmA die Zytotoxizität des TNF sogar noch verstärkt (Vercammen et al., 1998; Strelow et al., 2000).

### 1 Ceramid als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods

In dieser Arbeit wurde unter anderem der durch zVAD-fmk verstärkte TNF-induzierte Zelltod (hTNF/zVAD) von L929 Zellen analysiert. Es stellte sich auf molekularer Ebene heraus, dass der hTNF/zVAD- ebenso wie der hTNF-induzierte Zelltod über die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase zu einer Generierung von Ceramid führt (siehe Abb. 47). Das generierte Ceramid ist in beiden Fällen ursächlich an der Vermittlung des Zelltods beteiligt. Erstens werden L929 Zellen durch die Inhibition der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) mittels Desipramin oder D609 vor dem Zelltod geschützt und zweitens sind L929 Zellen, die die saure Ceramidase (AC) überexprimieren, resistenter gegen den beschleunigten Zelltod. Die AC-überexprimierenden L929 Zellen sind aber nicht vollständig geschützt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die in dieser Arbeit gezeigte sehr starke hTNF/zVAD-induzierte Generierung von Ceramid so hoch ist, dass die enzymatische Aktivität der überexprimierten AC nicht ausreicht, um das Ceramid vollständig zu degradieren. Dadurch könnte ein Teil des Ceramids seine Funktion als Mediator des Zelltods wahrnehmen und Caspase-unabhängigen Zelltod auslösen. Eine solche „Überlastung“ der AC konnte auch durch einen starken Influx von exogenem Ceramid verursacht werden (Strelow et al., 2000).

Durch diese Arbeit wird gezeigt, dass Ceramid auch in anderen Zellsystemen als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods fungieren kann. Auch in NIH3T3 und Jurkat T-Zellen wurden Anstiege der intrazellulären Ceramidspiegel im Verlauf des Caspase-unabhängigen Zelltods

nachgewiesen. Durch die Inhibition der A-SMase mit D609 können diese Zelllinien wie die L929 Zellen vor dem Caspase-unabhängigen Zelltod geschützt werden.

Hoffmann et al. (1998) wenden ein, dass die Erhöhung der intrazellulären Ceramidspiegel nur eine Nebenreaktion des ablaufenden Zelltods sein könnte und Ceramid vielleicht kein Signalmolekül ist. Da jedoch die auf verschiedenen Ebenen durchgeführten Versuche zur Inhibition der Ceramid-Freisetzung den Zelltod blockieren, ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Ceramid-Akkumulation in den untersuchten Zelllinien kein Nebeneffekt, sondern zeigt, dass Ceramid ein Mediator des Zelltods ist. Hierfür spricht auch, dass Ceramid in Zellen akkumulieren kann, die nicht dem Zelltod sondern anderen physiologischen Prozessen wie dem Zellzyklusarrest, der Zellseneszenz oder der Differenzierung unterliegen. Das heißt, dass Ceramid als Signalmolekül fungieren kann und nicht nur ein Abbauprodukt ist (Pettus et al., 2002; Kolesnick et al., 1999). Für die Art und Weise wie eine Zelle auf die Generierung von Ceramid reagiert, könnte entscheidend sein, welche der SMasen aktiviert wird und folglich in welchem Kompartiment (Lysosom / Zellmembran, siehe Einleitung Abschnitt 2) das Ceramid entsteht. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wird Zelltod-vermittelndes Ceramid durch die Aktivierung der A-SMase und nicht der N-SMase oder Ceramidsynthese gebildet. In allen untersuchten Zellsystemen schützt nur die Inhibition der A-SMase durch D609 bzw. in L929 Zellen auch die Überexpression der sauren Ceramidase vor dem Tod (siehe Abb. 47).

Es ist noch unklar, warum die Inhibition der A-SMase durch Desipramin die L929 Zellen aber nicht die NIH3T3 und Jurkat T-Zellen vor dem Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod schützen kann. Eventuell ist in den Lysosomen von NIH3T3 und Jurkat T-Zellen soviel A-SMase vorhanden, dass der Desipramin-induzierte Abbau der A-SMase nur unvollständig verläuft. Die verbleibende A-SMase könnte immer noch ausreichend sein, um nach TNF-Stimulation Ceramid zu generieren und somit Zelltod zu induzieren. Die Inhibition der Aktivierung der A-SMase durch D609 wäre aufgrund der anderen Wirkungsweise von einem möglicherweise erhöhten A-SMase-Gehalt nicht beeinträchtigt.

Die N-SMase wurde aufgrund ihrer Membranständigkeit für die Signalweiterleitung als geeigneter angesehen als die lysosomal lokalisierte A-SMase (Hofmann et al., 1998). Studien mit TNF-Rezeptormutanten zeigten aber, dass nach TNF-Bindung der Rezeptorkomplex internalisiert wird und in saure endolysosomale Kompartimente gelangt (Schütze et al., 1999) und somit eine Aktivierung der A-SMase ermöglicht wird.

Durch welche Caspase-unabhängigen Signalwege die A-SMase aktiviert wird, ist noch nicht geklärt. Es konnte aber in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kinase RIP für die

Signalweiterleitung im Caspase-unabhängigen Zelltod essentiell ist, und dass RIP in der Signalkette oberhalb der Generierung von Ceramid steht (siehe dazu Abschnitt 2 unten).

Auch die Effektoren des Caspase-unabhängigen Zelltods und die möglichen Ziele des Mediators Ceramid werden innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei den mitochondrial vermittelten Signalwegen. In eigenen Experimenten wurde beobachtet, dass die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in Jurkat T-Zellen teilweise vor dem Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod schützen kann (nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis, dass die Signalweiterleitung des Caspase-unabhängigen Zelltods zu einem Teil über die Mitochondrien verlaufen könnte. Da für den TNF-induzierten Zelltod eine Beteiligung von mitochondrialen reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) (Goossens et al., 1999) und Ceramid (Corda et al., 2001) diskutiert wird, ist die Untersuchung der funktionalen Rolle der ROI aktuelles Forschungsgebiet innerhalb der Arbeitsgruppe.

Ein weiterer Wirkmechanismus könnte die Ceramid-vermittelte Aktivierung der mitochondrialen Phosphatase PP2A sein. Es konnte gezeigt werden, dass deren Aktivierung zur Dephosphorylierung und Inaktivierung des anti-apoptotischen Bcl-2 führt (Ruvolo et al., 1999) wodurch Zelltod verstärkt werden könnte. Es wird auch von einer direkten Wirkung von Ceramid auf die Mitochondrienmembranen berichtet. So konnte durch Studien an isolierten Mitochondrien gezeigt werden, dass die Behandlung mit kurzkettigem Ceramid die Permeabilität der Mitochondrienmembran für kleine Proteine (<60 kDa) erhöht. Die Autoren vermuten, dass Ceramid aufgrund seiner stark hydrophoben Eigenschaften einen Kanal in der äußeren Membran der Mitochondrien bildet, durch den Proteine des Intermembranraums ein- und austreten könnten (Siskind et al., 2002). Des weiteren wird auch berichtet, dass Ceramid die Erhöhung des Gehaltes an freien Kalziumionen in Mitochondrien erhöht und dadurch die Freisetzung von Zelltod-fördernden Proteinen (Cytochrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA, AIF) aus den Mitochondrien induziert (Darios et al., 2003). Innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche zeigen jedoch, dass die mitochondrialen Faktoren AIF und Cytochrom c nicht ursächlich an dem TNF-induzierten Ceramid-vermittelten Zelltod beteiligt sind (Arne Lange, persönliche Mitteilung).

Des weiteren wird berichtet, dass die Zelltod-induzierende Wirkung von Ceramid durch die Überexpression einer ER-gerichteten Bcl-2-Isoform vermindert werden kann (Annis et al., 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch das endoplasmatische Retikulum (ER) am Ceramid-vermittelten Zelltod beteiligt sein könnte. Auch hierbei könnte die Kalzium-Homöostase eine Rolle spielen. Die Freisetzung von Kalziumionen aus dem ER führt zu ihrer schnellen Aufnahme durch angrenzende Mitochondrien und könnte dadurch die zuvor

beschriebene Zelltod-fördernden Freisetzung von mitochondrialen Proteinen induzieren (Rudner et al., 2002).

Neben der erwähnten Ceramid-bindenden Protease Cathepsin D sind wahrscheinlich noch andere Proteasen als Effektoren des Caspase-unabhängigen Zelltods beteiligt. So konnte für das L929 Zellsystem gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem Serin-Protease-Inhibitor TLCK (N-*p*-tosyl-L-lysine-chloromethylketon) den Caspase-unabhängigen Zelltod blockiert (Fiers et al., 1999). Neuere Studien zeigten in einem anderen Zellsystem, dass dies auch für den Ceramid-vermittelten Zelltod zutrifft (Kimura et al., 2003).

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Effektoren des Ceramid-vermittelten Zelltods genauer zu charakterisieren.

## **2 Bedeutung der Kinase RIP im Caspase-unabhängigen Zelltod**

In Jurkat T-Zellen wird die Kinase RIP zur Weiterleitung des TNF-R55 vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltods benötigt, während apoptotische Signale RIP-unabhängig ablaufen (Holler et al., 2000). Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden, und zusätzlich wurde gezeigt, dass RIP-depletierte L929 Zellen gegenüber dem Caspase-unabhängigen Zelltod resistent sind. Also ist RIP auch in L929 Zellen ein essentieller Faktor der Signaltransduktion des Caspase-unabhängigen Zelltods. Des weiteren wurden Hinweise gefunden, dass die Generierung von Ceramid RIP-abhängig vermittelt wird (siehe Abb. 47).

Da keine RIP-defizienten L929 Zellen zur Verfügung standen, wurde zum einen versucht, das Protein RIP durch die Blockierung der Translation mittels einer Antisense-Strategie und andererseits durch die Induktion von RNAi zu depletieren. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bulfone-Paus konnte gezeigt werden, dass trotz positiver Kontrollen (Depletion von TRAF2) die Induktion von RNAi nicht zu einer Depletion von RIP führt. Auch die Blockierung der Translation durch Antisense-Oligonukleotide bewirkte keine RIP-Depletion. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass RIP ein sehr stabiles Protein mit einer langen Halbwertszeit sein könnte und deshalb nicht durch die Störung seiner Expression zu depletieren ist. Die Befunde von Lewis et al. (2000) unterstützen diese Vermutung. Sie zeigten in HeLa Zellen, dass RIP ein sehr langlebiges Protein ist, denn die Autoren konnten bei Untersuchungen der RIP-Degradation keine echte Halbwertszeit bestimmen.

Durch die pharmakologische Inhibition des Chaperons HSP90 mittels GA oder RC konnte dagegen das Protein RIP in L929 Zellen erfolgreich depletiert werden. Das restliche im Western-Blot noch nachweisbare RIP war nicht mehr in der Lage, nach TNF-Stimulation den NF- $\kappa$ B-

Signalweg zu aktivieren. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass auf funktionaler Ebene eine totale Depletion erreicht wurde, und dass das verbliebene detektierte RIP aufgrund der Inhibition des HSP90 in keiner funktionalen Konformation vorlag.

Die RIP-Depletion induzierte in L929 Zellen eine fast völlige Resistenz gegenüber dem Caspase-unabhängigen Zelltod. Durch die parallele Überprüfung der Expression des Rezeptors TNF-R55, der Adaptorproteine TRADD und FADD und der Caspase-8 konnte eine unspezifische Depletion dieser Proteine als Ursache der Resistenz ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RIP in der Signalkette des Caspase-unabhängigen Zelltods vor der Aktivierung der A-SMase angesiedelt ist, da RIP-defiziente Jurkat T-Zellen kein Ceramid mehr generieren können und auch RIP-depletierte L929 Zellen Beeinträchtigungen bei der Generierung von Ceramid zeigen. Auf welche Weise RIP die A-SMase aktiviert, kann zurzeit nur vermutet werden. Für die Aktivierung scheint aber die Kinase-Funktion von RIP essentiell zu sein. RIP-defiziente Zellen, die mit einem in der Kinase-Domäne mutierten RIP rekonstituiert wurden, waren immer noch resistent gegenüber dem Caspase-unabhängigen Zelltod (Holler et al., 2000). Somit ist es wahrscheinlich, dass RIP ein noch unbekanntes Protein X phosphoryliert, das in der Signalkette zwischen RIP und der A-SMase anzusiedeln ist (siehe Abb. 47). Beschriebene Interaktionspartner von RIP sind neben dem zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung führenden Protein TRAF2 die Faktoren TRAF1 und 3, TRADD, TRAF3 (UBCE7IP1) und die zu RIP ähnlichen Proteine RIP2 (CARDIAK/RICK) und RIP3 (Dixit, 1999). Ob eines dieser Proteine von RIP phosphoryliert wird und vielleicht in Caspase-unabhängigen Signalwegen involviert ist, muss noch untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor GA in L929 Zellen zu einer Veränderung des TNF-induzierten Zelltods führt. So induziert TNF in unbehandelten L929 Zellen einen über RIP verlaufenden Ceramid-vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod. Die Depletion von RIP durch die Behandlung mit GA inhibiert diesen, in L929 Zellen normalerweise dominierenden Signalweg und scheint zu einem „Umschalten“ auf den Caspase-abhängigen Signalweg und so zur Typ I-Apoptose zu führen. Es wird berichtet, dass bei der Entscheidung zwischen TNF-R55 vermittelter Nekrose oder Apoptose die Chaperon-Funktion von HSP90 entscheidend sein soll (Vanden Berghe et al., 2003). Diese Annahme konnte durch eigene Messungen von Caspase-Aktivitäten belegt werden, die zeigten, dass TNF in GA-behandelten Zellen, aber nicht in unbehandelten Zellen die Caspase-Kaskade aktiviert und somit Apoptose induziert. Versuche mit dem HSP90-Inhibitor RC zeigten dagegen, dass die Veränderung in Richtung Apoptose wohl nicht durch eine Inhibition der Chaperon-Funktion von HSP90 verursacht wird. So konnte die hTNF/GA-vermittelte Aktivierung der

Caspase-Kaskade nicht mit RC-Konzentrationen reproduziert werden, die im Western-Blot zu einer vergleichbaren RIP-Depletion führen. Nur durch sehr niedrige Konzentrationen RC, die noch keine RIP-Depletion und somit wohl keine Inhibition der Chaperon-Funktion induzieren, konnte der Apoptose-induzierende zur GA-Behandlung analoge Effekt erreicht werden (nicht gezeigt). Dies spricht gegen die Annahme, dass die Chaperon-Funktion des HSP90 für die Veränderung des Nekrose-artigen Zelltods in Richtung Apoptose verantwortlich ist. Der Apoptose-induzierende Effekt der HSP90-Inhibitoren könnte somit einerseits auf einer Nebenwirkung beruhen oder andererseits auf eine andere in diesem Kontext noch unbekanntes HSP90-vermittelte Funktion hinweisen.

Die Weiterführung dieser Studien könnte vielleicht klären, warum L929 Zellen nach der Stimulation mit TNF keine Caspasen aktivieren, obwohl alle hierfür nötigen Proteine in funktioneller Form in den Zellen vorhanden sind (Dieter Adam, persönliche Mitteilung). Die Anwendung dieser Erkenntnisse könnte einen Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien liefern, z.B. Auslösung von programmiertem Zelltod in Apoptose-resistenten Tumor-Zellen.

### **3 Charakterisierungen des Caspase-abhängigen und- unabhängigen Zelltods**

Während die Apoptose als Caspase-abhängiger programmierter Zelltod gut charakterisiert ist, gibt es immer noch Unklarheiten bei der Beschreibung des Caspase-unabhängigen Zelltods. Dies hat zum einen den Grund, dass in vielen Fällen der Caspase-unabhängige programmierte Zelltod zu Unrecht als Nekrose im Sinne des nicht-programmierten Unfalltods beschrieben wird. Außerdem gibt es diverse Erscheinungsformen des Caspase-unabhängigen Zelltods (Leist et al., 2001), die sich zwar deutlich von der reinen Nekrose abgrenzen, aber untereinander keine typischen und einheitlichen Merkmale wie in der Apoptose (*blebbing* der Zellmembran, markante Veränderungen des Zellkerns und des Chromatins) aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Caspase-unabhängige Zelltod von L929, NIH3T3 Zellen und Jurkat T-Zellen auf Prozessen der Signaltransduktion beruht und durch die Blockierung von intrazellulären Signalen verhindert werden kann und somit keine klassische Nekrose darstellt (Leist et al., 2001).

Da sich die Erscheinungsformen des Caspase-unabhängigen Zelltods untereinander und wie schon oben erwähnt von der Apoptose stark unterscheiden können, wurde der TNF- und TNF/zVAD-induzierte Caspase-unabhängige Zelltod von L929 Zelllinien auf zellulärer Ebene durch Studien von Morphologien der Zelle und des Zellkerns charakterisiert. Es zeigte sich, dass

die Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltods zu einer Ablösung und Abkugelung der Zellen und zur Chromatin-Kondensation aber nicht zu einem nekrotischen Schwellen und Platzen der Zelle führte. Aufgrund des Fehlens von typischen Apoptose-Indikatoren wie Caspase-Aktivität, „blebbing“ und Chromatin-Fragmentation wurde in dieser Arbeit der TNF- und TNF/zVAD-induzierte Zelltod als Nekrose-artiger programmierter Zelltod mit Chromatin-Kondensation (Leist et al., 2001) eingeordnet.

Im Gegensatz zu TNF kann der verwandte Ligand TRAIL in L929 Zellen Apoptose auslösen. Wie der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R55) besitzt der murine TRAIL-Rezeptor eine Todesdomäne (Wu et al., 1999), über welche im Gegensatz zum TNF-R55 ohne die Beteiligung von TRADD direkt das Adaptorprotein FADD und anschließend die Procaspase-8 rekrutiert wird. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade führt dann zur Apoptose. In L929 Zellen wurde in dieser Arbeit nach TRAIL-Stimulation eine deutliche Aktivierung der Caspasen-8 und -3 nachgewiesen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnten typische apoptotische Merkmale wie „blebbing“, Chromatin-Kondensation und -Fragmentation und die spezifische Spaltung des Caspase-Substrates PARP gezeigt werden.

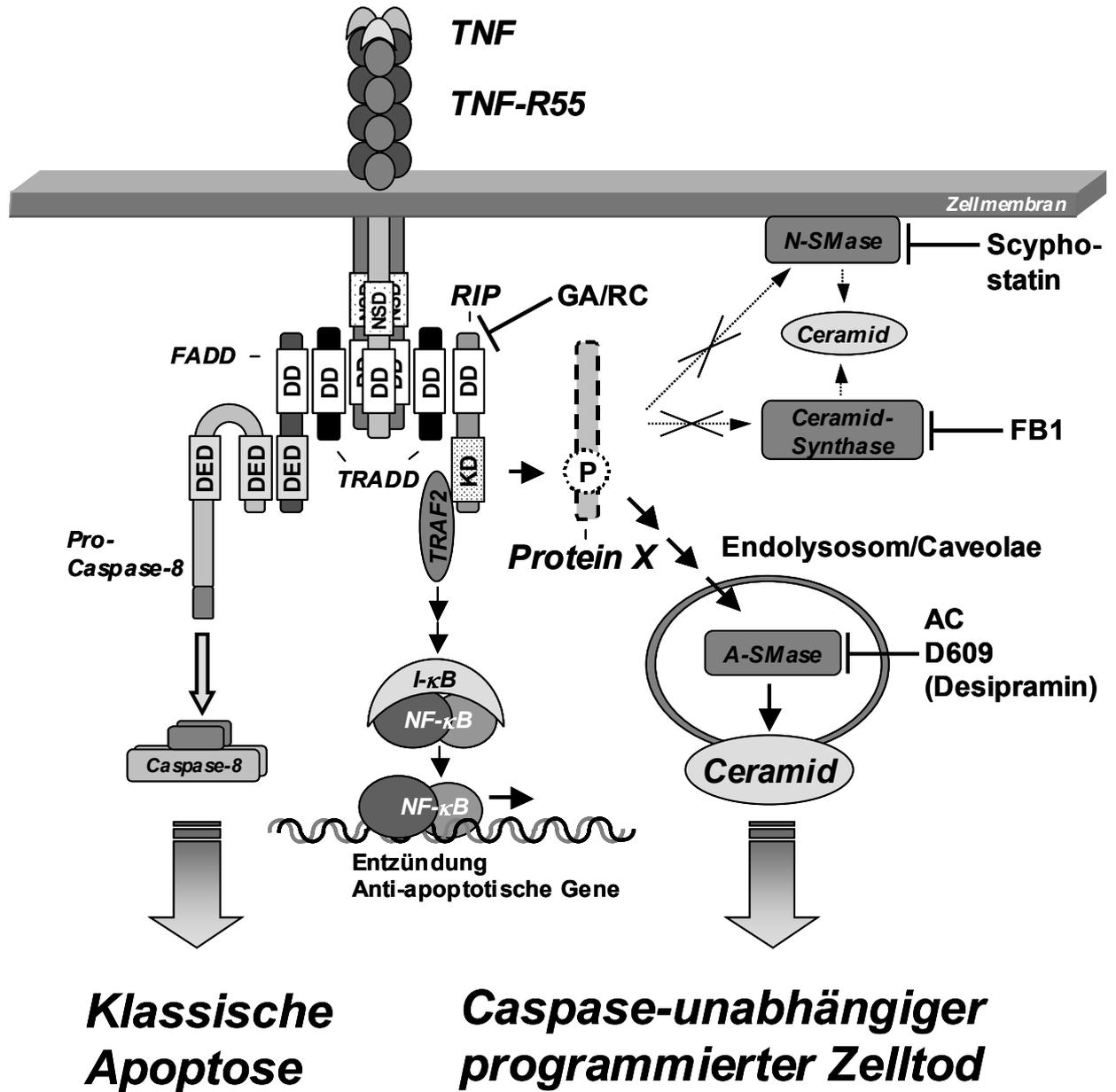
Dies trifft nicht in gleichem Ausmaß auf die drei untersuchten L929 Zelllinien zu. Der Grund ist noch ungeklärt. Es wird aber berichtet, dass nur Krebszellen TRAIL-sensitiv sind (Kim et al., 2003; Almasan et al., 2003). Dies weist auf die Existenz von Regulations-Mechanismen hin und lässt die Vermutung zu, dass erst bestimmte Veränderungen der Zelle zur TRAIL-Sensitivität führen. Eine dieser Veränderungen könnte eine verminderte Expression von anti-apoptotisch wirkenden Decoy-Rezeptoren darstellen, die zwar einen Todesliganden wie TRAIL binden, aber aufgrund einer fehlenden intrazellulären Domäne kein Todessignal weiterleiten. Nachdem für das humane System bereits zwei TRAIL-Decoy-Rezeptoren beschrieben werden konnten (Sheridan et al., 1997) wurden nun auch zwei murine TRAIL-Decoy-Rezeptoren identifiziert (Schneider et al., 2003), deren Expression für die Resistenz von murinen Zellen gegenüber TRAIL verantwortlich sein könnte. Möglicherweise exprimieren die drei L929 Zelllinien diese murinen Decoy-Rezeptoren auf unterschiedlichem Niveau.

Eine weitere noch zu beantwortende Frage ist, warum TRAIL Apoptose und TNF dagegen Nekrose-artigen Zelltod in L929 Zellen induziert, obwohl beide Rezeptoren fast die gleichen Proteine rekrutieren. Da in der Signalkette der TRAIL-induzierten Apoptose das Adaptorprotein TRADD nicht involviert ist, wäre die erste Vermutung, dass TRADD in L929 Zellen in einer veränderten Form vorliegt. Überprüfungen der Gensequenz und der Expression aller bei der Signaltransduktion beteiligten und bekannten, proximal lokalisierten Proteine zeigten aber keine

Veränderungen (z.B. *loss-of-function* Mutation), die dieses Verhalten erklären würden (Dieter Adam, persönliche Mitteilung).

Gegen eine Veränderung in einem in der Signalkette beteiligten Protein spricht auch die Beobachtung, dass durch eine Behandlung mit GA oder RC eine TNF-induzierte Apoptose ausgelöst werden kann. Es erlaubt im Gegenteil eher die Vermutung, dass ein anti-apoptotisches Protein in L929 Zellen vorhanden ist, das selektiv nur die TNF-R55-vermittelte Apoptose verhindert. Durch die Verwendung der Mikro-Array-Technologie soll die Expression von anti-apoptotischen Faktoren und TRAIL-Decoy-Rezeptoren untersucht werden.

Der TRAIL-induzierte Zelltod von Jurkat T-Zellen besitzt neben der apoptotischen auch eine RIP-vermittelte Caspase-unabhängige Komponente (Holler et al., 2000). Dies konnte in dieser Arbeit auch für das L929-Zellsystem gezeigt werden, da die Blockierung der Apoptose durch die Inhibition von Caspasen nicht zu einer TRAIL-Resistenz führt. Die Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk verhindert zwar das Auftreten von apoptotischen Merkmalen wie „blebbing“ und Chromatin-Fragmentation und schützt die L929 Zellen für einige Stunden, führt aber dann zur Initiierung eines Caspase-unabhängigen Zelltods mit Nekrose-artiger Morphologie. Dabei wurde analog zum TNF-induzierten Zelltod beobachtet, dass die Inhibition der Caspasen nicht vor dem Zelltod schützt, sondern im Gegenteil den TRAIL-induzierten Zelltod sogar verstärkt. In weiterer Analogie zum TNF-induzierten Zelltod könnte auch die Caspase-unabhängige Komponente des TRAIL-induzierten Zelltods über Ceramid vermittelt werden, da gezeigt werden konnte, dass L929 Zellen, die die saure Ceramidase überexprimieren, resistenter gegenüber der Behandlung mit TRAIL/zVAD sind. Diese ersten Hinweise bedürfen aber noch der weiteren Untersuchung. Sie sind aber ein weiteres Indiz dafür, dass Ceramid ein genereller Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods sein könnte.



**Abb. 47 Modell der Todesrezeptor-vermittelten Signalwege am Beispiel des TNF-R55.** Neben der Caspase-vermittelten Typ I-Apoptose (Im Falle des TNF-R55 vermittelt über TRADD/FADD/Caspase-8) können über Todesrezeptoren (hier TNF-R55) auch Caspase-unabhängige Todes-Signalwege aktiviert werden. Der Caspase-unabhängige Zelltod wird über die Kinase RIP vermittelt und führt durch die Aktivierung der A-SMase zur Generierung von Ceramid, das als Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods fungiert. Die Kinase RIP kann durch Behandlung mit GA oder RC inhibiert werden. Da gezeigt wurde, dass für die Signaltransduktion des Caspase-unabhängigen Zelltods die Kinase-Funktion von RIP essentiell ist (Holler et al., 2000), scheint ein noch unbekanntes Protein X zu existieren, das von RIP phosphoryliert wird. Das Protein X ist in der Signalkette vor der A-SMase einzuordnen, da RIP-defiziente Zellen nach der Aktivierung des TNF-R55 kein Ceramid mehr generieren können. Das Ceramid wird durch die Aktivierung A-SMase und nicht der N-SMase oder der Ceramidsynthese generiert, da nur die Inhibition der A-SMase (D609/Desipramin) oder der verstärkte lysosomale Abbau von Ceramid (AC-Überexpression) den Caspase-unabhängigen Zelltod blockiert. Nähere Erläuterungen siehe Text.

## 4 Ausblicke

In dieser Arbeit wurde für drei Zellsysteme gezeigt, dass Ceramid ein Mediator des Caspase-unabhängigen Zelltods ist und durch die Aktivität der A-SMase generiert wird.

In der Arbeitsgruppe wurden A-SMase *knock-out* Mäuse gezüchtet, die nun für weitere Studien der Ceramid-vermittelten Signalwege zur Verfügung stehen.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Kinase RIP ein essentieller Faktor des Caspase-unabhängigen Zelltods von L929 Zellen ist und RIP-defiziente Jurkat T-Zellen nach Caspase-unabhängiger Stimulation kein Ceramid mehr generieren können, so dass RIP in der Signalkette vor der Aktivierung der A-SMase zu stehen scheint. In zukünftigen Arbeiten soll geklärt werden, wie über die Kinase RIP die Aktivierung der A-SMase induziert wird. Da für die Vermittlung des Zelltods die Kinase-Funktion von RIP essentiell ist, soll im besonderen untersucht werden welche Substrate RIP phosphoryliert.

Des weiteren soll untersucht werden welche Effektoren durch Ceramid aktiviert oder inhibiert werden und bei der Vermittlung des Caspase-unabhängigen Zelltods involviert sind. Da gezeigt werden konnte, dass Ceramid die Mitochondrien beeinflusst, soll untersucht werden, ob und welche mitochondrialen Proteine bei der Vermittlung des Caspase-unabhängigen Zelltods beteiligt sind und ob auch das ER involviert ist.

Zur weiteren Aufklärung der Signaltransduktion des TNF-induzierten Ceramid-abhängigen Zelltods sollen z.B. L929 Zellen untersucht werden, die das Protein FE65-like oder die Rezeptor-Tyrosine-Kinase AXL überexprimieren. Diese Zellen sind TNF-resistent und können unter anderem auf Beeinträchtigungen bei der Generierung von Ceramid untersucht werden.

Es soll weiter untersucht werden, ob die Caspase-unabhängige Komponente des TRAIL-induzierten Zelltods über Ceramid vermittelt wird.

In Krebszelllinien von Krebspatienten soll untersucht werden, ob Caspase-unabhängiger Zelltod induziert werden kann.

Durch die Verwendung von Mikro-Arrays soll die Expression von anti-apoptischen Proteinen analysiert und dadurch u.a. geklärt werden, warum TNF in L929 Zellen keine Apoptose induziert.

Darüber hinaus soll geklärt werden, ob Caspase-unabhängiger Zelltod in primären und klinisch relevanten Tumorzellsystemen durch Ceramid vermittelt wird und Ceramid-induzierter Caspase-unabhängiger Zelltod gegebenenfalls als Therapieansatz möglich ist.

## Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die Signalwege des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltods zu gewinnen. Um den Mechanismus des Caspase-unabhängigen Zelltods zu untersuchen, eignet sich besonders das murine L929 Zellsystem. In diesem löst TNF einen Caspase-unabhängigen Zelltod aus, ohne dass es nötig wäre, Caspasen zu inhibieren. Als Mediator dieses Zelltods fungiert Ceramid, das aufgrund der TNF-vermittelten Aktivierung der A-SMase gebildet wird (Strelow et al., 2000). Im Gegensatz zu L929 Zellen erfordert die Analyse des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltods in den meisten anderen Zellsystemen die aktive Inhibition der interferierenden Caspase-abhängigen Signalwege. Deshalb wurde zuerst in dem etablierten L929 Zellsystem untersucht, ob Ceramid auch in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk eine entscheidende Rolle im TNF-induzierten Zelltod dieser Zellen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivität der A-SMase gebildetes Ceramid ebenfalls den zVAD-beschleunigten TNF-induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod von L929 Zellen vermittelt. Anschließend wurde in anderen Zellsystemen der Caspase-unabhängige Zelltod untersucht und es konnte in murinen NIH3T3 und humanen Jurkat T-Zellen gezeigt werden, dass auch der Caspase-unabhängige Zelltod dieser Zellen durch Ceramid vermittelt wird. Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen wird das Zelltod-vermittelnde Ceramid nicht durch die Aktivierung der N-SMase oder Ceramidsynthese, sondern durch eine Aktivierung der A-SMase generiert. Diese Untersuchungen zeigen weiterhin, dass Ceramid nicht nur in fibroblastoiden Zellen, sondern auch in Zellen lymphoiden Ursprungs den Caspase-unabhängigen Zelltod vermittelt. Des weiteren wurden erste Hinweise dafür gefunden, dass auch die Caspase-unabhängige Komponente des TRAIL-induzierten Zelltods durch Ceramid vermittelt wird. Diese Ergebnisse lassen gemeinsam den Schluss zu, dass Ceramid ein generellerer Mediator des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltods sein könnte.

Die Aktivierung der A-SMase scheint dabei von der Kinase RIP abhängig zu sein, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass RIP-defiziente Zellen kein Ceramid mehr generieren können und resistent gegenüber dem Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod sind.

Die Charakterisierung des Caspase-unabhängigen Zelltods auf molekularer und zellulärer Ebene zeigt, dass der Caspase-unabhängigen Zelltod keine klassische Nekrose (Unfalltod) darstellt, sondern wie die Apoptose auf Prozessen der Signaltransduktion beruht und somit einen Ansatzpunkt für die Therapie von Erkrankungen mit gestörter Zellproliferation (Autoimmunerkrankungen, Krebs) darstellen könnte.

## Summary

The purpose of this work was to gain further insights into the signaling pathways of caspase-independent programmed cell death. The murine L929 cell system was used in these experiments because in these cells TNF triggers an caspase-independent programmed cell death without active inhibition of caspases. Ceramide acts as mediator of this cell death which is generated by the A-SMase (Strelow et al., 2000). Unlike in L929 cells, the analysis of the caspase-independent programmed cell death in most other cell lines requires the active inhibition of the interfering caspase-dependent responses. Therefore, it was first investigated whether TNF-induced death was still dependent on ceramide under conditions of active inhibition of caspases by zVAD-fmk in the established L929 system. In this work is shown that ceramide is also a mediator of the zVAD-accelerated TNF-induced caspase-independent cell death of L929 cells and is formed likewise by the activity of the A-SMase. Other cell systems were investigated and it was found that ceramide mediates the caspase-independent programmed cell death in the murine fibroblast cell line NIH3T3 and in the human leukemic Jurkat T cell line. In accordance with previous results the cell death mediating ceramide is not formed by the activity of the N-Smase nor the Ceramid-Synthase but by the activation of the A-SMase. These findings further show that ceramid is not only responsible for caspase-independent cell death of murine fibroblast cells but also for cells of T-cell origin.

Preliminary findings show that ceramide also mediates the caspase-independent component of the TRAIL-induced cell death. These results together lead to the conclusion that ceramide could be a more general mediator of caspase-independent programmed cell death.

The activation of the A-SMase seems to be dependent on the kinase RIP, since RIP-deficient cells can no more generate ceramide and are resistant to caspase-independent programmed cell death.

The characterisation of the caspase-independent cell death on a molecular and a cellular level shows that caspase-independent cell death is not classical necrosis (accidental death) but is based like apoptosis on signal transduction processes and therefore could be used as starting point for therapeutic treatments of diseases caused by disordered cell proliferation (autoimmune diseases, cancer).

## Literatur

- Adam D., Heinrich M., Kabelitz D., & Schütze S. (2002) Ceramide: does it matter for T cells? *Trends Immunol.* **23**, 1-4.
- Adam D., Wiegmann K., Adam-Klages S., Ruff A., & Krönke M. (1996) A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J.Biol.Chem.* **271**, 14617-14622.
- Almasan A. & Ashkenazi A. (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 337-348.
- Ameisen J.C. (1996) The origin of programmed cell death. *Science* **272**, 1278-1279.
- Ameisen J.C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death.Differ.* **9**, 367-393.
- Andrieu-Abadie N., Gouaze V., Salvayre R., & Levade T. (2001) Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* **31**, 717-728.
- Annis M.G., Zamzami N., Zhu W., Penn L.Z., Kroemer G., Leber B., & Andrews D.W. (2001) Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. *Oncogene* **20**, 1939-1952.
- Basu S., Bayoumy S., Zhang Y., Lozano J., & Kolesnick R. (1998a) BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J.Biol.Chem.* **273**, 30419-30426.
- Basu S. & Kolesnick R. (1998b) Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* **17**, 3277-3285.
- Black E.J., Street A.J., & Gillespie D.A. (1991) Protein phosphatase 2A reverses phosphorylation of c-Jun specified by the delta domain in vitro: correlation with oncogenic activation and deregulated transactivation activity of v-Jun. *Oncogene* **6**, 1949-1958.
- Cairns J. (2002) A DNA damage checkpoint in Escherichia coli. *DNA Repair (Amst)* **1**, 699-701.

- Cauwels A., Janssen B., Waeytens A., Cuvelier C., & Brouckaert P. (2003) Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat.Immunol.* **4**, 387-393.
- Chalfant C.E., Ogretmen B., Galadari S., Kroesen B.J., Pettus B.J., & Hannun Y.A. (2001) FAS activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1. *J.Biol.Chem.* **276**, 44848-44855.
- Chao R., Khan W., & Hannun Y.A. (1992) Retinoblastoma protein dephosphorylation induced by D-erythro-sphingosine. *J.Biol.Chem.* **267**, 23459-23462.
- Chautan M., Chazal G., Cecconi F., Gruss P., & Golstein P. (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr.Biol.* **9**, 967-970.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., & Dixit V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E., & Dixit V.M. (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **271**, 4961-4965.
- 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.
- Corda S., Laplace C., Vicaut E., & Duranteau J. (2001) Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **24**, 762-768.
- Cregan S.P., Fortin A., MacLaurin J.G., Callaghan S.M., Cecconi F., Yu S.W., Dawson T.M., Dawson V.L., Park D.S., Kroemer G., & Slack R.S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J.Cell Biol.* **158**, 507-517.
- Cremesti A., Paris F., Grassme H., Holler N., Tschopp J., Fuks Z., Gulbins E., & Kolesnick R. (2001) Ceramide enables fas to cap and kill. *J.Biol.Chem.* **276**, 23954-23961.

- Darios F., Lambeng N., Troadec J.D., Michel P.P., & Ruberg M. (2003) Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *J.Neurochem.* **84**, 643-654.
- Dbaibo G.S., Pushkareva M.Y., Jayadev S., Schwarz J.K., Horowitz J.M., Obeid L.M., & Hannun Y.A. (1995) Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 1347-1351.
- Deng X., Ito T., Carr B., Mumby M., & May W.S., Jr. (1998) Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J.Biol.Chem.* **273**, 34157-34163.
- Dixit V.M. (1999) RIPs: an emerging family of kinases involved in pro-inflammatory and apoptotic signaling. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **64**, 359-362.
- Dobrowsky R.T., Kamibayashi C., Mumby M.C., & Hannun Y.A. (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J.Biol.Chem.* **268**, 15523-15530.
- Doerfler P., Forbush K.A., & Perlmutter R.M. (2000) Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. *J.Immunol.* **164**, 4071-4079.
- Dressler K.A. & Kolesnick R.N. (1990) Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. *J.Biol.Chem.* **265**, 14917-14921.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., & Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Ekert P.G., Silke J., & Vaux D.L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death.Differ.* **6**, 1081-1086.
- Faccio L., Fusco C., Chen A., Martinotti S., Bonventre J.V., & Zervos A.S. (2000) Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J.Biol.Chem.* **275**, 2581-2588.

Ferrari D., Stepczynska A., Los M., Wesselborg S., & Schulze-Osthoff K. (1998) Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during. *J.Exp.Med.* **188**, 979-984.

Fiers W., Beyaert R., Boone E., Cornelis S., Declercq W., Decoster E., Denecker G., Depuydt B., De Valck D., De Wilde G., Goossens V., Grooten J., Haegeman G., Heyninck K., Penning L., Plaisance S., Vancompernelle K., van Criekinge W., Vandenabeele P., Vanden Berghe W., van de C.M., Vandevoorde V., & Vercammen D. (1995) TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. *J.Inflamm.* **47**, 67-75.

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.

Fischer U., Jänicke R.U., & Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death.Differ.* **10**, 76-100.

Fröhlich K.U. & Madeo F. (2000) Apoptosis in yeast--a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* **473**, 6-9.

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.

Gray C.W., Ward R.V., Karran E., Turconi S., Rowles A., Viglienghi D., Southan C., Barton A., Fantom K.G., West A., Savopoulos J., Hassan N.J., Clinkenbeard H., Hanning C., Amegadzie B., Davis J.B., Dingwall C., Livi G.P., & Creasy C.L. (2000) Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur.J.Biochem.* **267**, 5699-5710.

Hannun Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859.

Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Wickel M., Schneider-Brachert W., Trauzold A., Hethke A., & Schütze S. (2004) Cathepsin D links TNF-

induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death.Differ.* advance online publication 23 January 2004.

Heinrich M., Wickel M., Schneider-Brachert W., Sandberg C., Gahr J., Schwandner R., Weber T., Saftig P., Peters C., Brunner J., Krönke M., & Schütze S. (1999) Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* **18**, 5252-5263.

Heinrich M., Wickel M., Winoto-Morbach S., Schneider-Brachert W., Weber T., Brunner J., Saftig P., Peters C., Krönke M., & Schütze S. (2000) Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv.Exp.Med.Biol.* **477**, 305-315.

Hofmann K. & Dixit V.M. (1998) Ceramide in apoptosis--does it really matter? *Trends Biochem.Sci.* **23**, 374-377.

Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J.L., Schneider P., Seed B., & Tschopp J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat.Immunol.* **1**, 489-495.

Huwiler A., Brunner J., Hummel R., Vervoordeldonk M., Stabel S., van den B.H., & Pfeilschifter J. (1996) Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 6959-6963.

Jäättelä M. & Tschopp J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat.Immunol.* **4**, 416-423.

Jaffrezou J.P., Laurent G., & Levade T. (2002) Ceramide in regulation of apoptosis. Implication in multitoxicant resistance. *Subcell.Biochem.* **36**, 269-284.

Jin C. & Reed J.C. (2002) Yeast and apoptosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 453-459.

Karasuyama H. & Melchers F. (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur.J.Immunol.* **18**, 97-104.

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

- 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 S.O. & Han J. (2001a) Pan-caspase inhibitor zVAD enhances cell death in RAW246.7 macrophages. *J.Endotoxin.Res.* **7**, 292-296.
- Kim S.O., Ono K., & Han J. (2001b) Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **281**, L1095-L1105.
- Kim Y. & Seol D.W. (2003) TRAIL, a mighty apoptosis inducer. *Mol.Cells* **15**, 283-293.
- Kimura K., Markowski M., Edsall L.C., Spiegel S., & Gelmann E.P. (2003) Role of ceramide in mediating apoptosis of irradiated LNCaP prostate cancer cells. *Cell Death.Differ.* **10**, 240-248.
- Kolesnick R. & Hannun Y.A. (1999) Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 224-225.
- Koonin E.V. & Aravind L. (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death.Differ.* **9**, 394-404.
- Künstle G., Hentze H., Germann P.G., Tiegs G., Meergans T., & Wendel A. (1999) Concanavalin A hepatotoxicity in mice: tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation. *Hepatology* **30**, 1241-1251.
- Kuznetsov S.G., Anton-Erxleben F., & Bosch T.C. (2002) Epithelial interactions in Hydra: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *J.Exp.Biol.* **205**, 3809-3817.
- 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., & Vandenaabeele P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death.Differ.* **9**, 358-361.
- Lang-Rollin I.C., Rideout H.J., Noticewala M., & Stefanis L. (2003) Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *J.Neurosci.* **23**, 11015-11025.

- Leist M. & Jäättelä M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 589-598.
- Levade T. & Jaffrezou J.P. (1999) Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim.Biophys.Acta* **1438**, 1-17.
- Lewis J., Devin A., Miller A., Lin Y., Rodriguez Y., Neckers L., & Liu Z.G. (2000) Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J.Biol.Chem.* **275**, 10519-10526.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., & Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Liu C.Y., Takemasa A., Liles W.C., Goodman R.B., Jonas M., Rosen H., Chi E., Winn R.K., Harlan J.M., & Chuang P.I. (2003) Broad-spectrum caspase inhibition paradoxically augments cell death in TNF-alpha -stimulated neutrophils. *Blood* **101**, 295-304.
- Lozano J., Berra E., Municio M.M., Diaz-Meco M.T., Dominguez I., Sanz L., & Moscat J. (1994) Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **269**, 19200-19202.
- 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.
- Madeo F., Herker E., Maldener C., Wissing S., Lachelt S., Herlan M., Fehr M., Lauber K., Sigrist S.J., Wesselborg S., & Frohlich K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol.Cell* **9**, 911-917.

Martins L.M., Iaccarino I., Tenev T., Gschmeissner S., Totty N.F., Lemoine N.R., Savopoulos J., Gray C.W., Creasy C.L., Dingwall C., & Downward J. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J.Biol.Chem.* **277**, 439-444.

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.

Moyed H.S. & Bertrand K.P. (1983) *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J.Bacteriol.* **155**, 768-775.

Müller G., Storz P., Bourteele S., Döppler H., Pfizenmaier K., Mischak H., Philipp A., Kaiser C., & Kolch W. (1998) Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and cross-talk with mitogenic signalling. *EMBO J.* **17**, 732-742.

Municio M.M., Lozano J., Sanchez P., Moscat J., & Diaz-Meco M.T. (1995) Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J.Biol.Chem.* **270**, 15884-15891.

Nicholson D.W. & Thornberry N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 299-306.

Novak R., Braun J.S., Charpentier E., & Tuomanen E. (1998) Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex *Psa*. *Mol.Microbiol.* **29**, 1285-1296.

Nugroho F.A., Yamamoto H., Kobayashi Y., & Sekiguchi J. (1999) Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. *J.Bacteriol.* **181**, 6230-6237.

Obeid L.M., Linardic C.M., Karolak L.A., & Hannun Y.A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771.

- Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., & Conklin D.S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**, 948-958.
- Pettus B.J., Chalfant C.E., & Hannun Y.A. (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim.Biophys.Acta* **1585**, 114-125.
- Roach H.I. & Clarke N.M. (2000) Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J.Bone Joint Surg.Br.* **82**, 601-613.
- Rudner J., Jendrossek V., & Belka C. (2002) New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. *Apoptosis.* **7**, 441-447.
- Ruvolo P.P., Deng X., Carr B.K., & May W.S. (1998) A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **273**, 25436-25442.
- Ruvolo P.P., Deng X., Ito T., Carr B.K., & May W.S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J.Biol.Chem.* **274**, 20296-20300.
- Sato S., Fujita N., & Tsuruo T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 10832-10837.
- Schneider P., Olson D., Tardivel A., Browning B., Lugovskoy A., Gong D., Dobles M., Hertig S., Hofmann K., Van Vlijmen H., Hsu Y.M., Burkly L.C., Tschopp J., & Zheng T.S. (2003) Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J.Biol.Chem.* **278**, 5444-5454.
- Schulte T.W., Akinaga S., Murakata T., Agatsuma T., Sugimoto S., Nakano H., Lee Y.S., Simen B.B., Argon Y., Felts S., Toft D.O., Neckers L.M., & Sharma S.V. (1999) Interaction of radicicol with members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Mol.Endocrinol.* **13**, 1435-1448.

Schulte T.W., Akinaga S., Soga S., Sullivan W., Stensgard B., Toft D., & Neckers L.M. (1998) Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress.Chaperones*. **3**, 100-108.

Schütze S., Machleidt T., Adam D., Schwandner R., Wiegmann K., Kruse M.L., Heinrich M., Wickel M., & Krönke M. (1999) Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J.Biol.Chem.* **274**, 10203-10212.

Schütze S., Potthoff K., Machleidt T., Berkovic D., Wiegmann K., & Krönke M. (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* **71**, 765-776.

Schwandner R., Wiegmann K., Bernardo K., Kreder D., & Krönke M. (1998) TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **273**, 5916-5922.

Sheridan J.P., Marsters S.A., Pitti R.M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., Ramakrishnan L., Gray C.L., Baker K., Wood W.I., Goddard A.D., Godowski P., & Ashkenazi A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-821.

Siskind L.J., Kolesnick R.N., & Colombini M. (2002) Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J.Biol.Chem.* **277**, 26796-26803.

Smith K.G., Strasser A., & Vaux D.L. (1996) CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J.* **15**, 5167-5176.

Smith T.J. & Foster S.J. (1995) Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *J.Bacteriol.* **177**, 3855-3862.

Stennicke H.R., Jurgensmeier J.M., Shin H., Deveraux Q., Wolf B.B., Yang X., Zhou Q., Ellerby H.M., Ellerby L.M., Bredesen D., Green D.R., Reed J.C., Froelich C.J., & Salvesen G.S. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J.Biol.Chem.* **273**, 27084-27090.

Stennicke H.R., Ryan C.A., & Salvesen G.S. (2002) Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem.Sci.* **27**, 94-101.

Stennicke H.R. & Salvesen G.S. (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J.Biol.Chem.* **272**, 25719-25723.

Strelow A., Bernardo K., Adam-Klages S., Linke T., Sandhoff K., Krönke 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.

van Gurp M., Festjens N., van Loo G., Saelens X., & Vandenabeele P. (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **304**, 487-497.

van Loo G., Saelens X., van Gurp M., MacFarlane M., Martin S.J., & Vandenabeele P. (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death.Differ.* **9**, 1031-1042.

Vanden Berghe T., Kalai M., van Loo G., Declercq W., & Vandenabeele P. (2003) Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J.Biol.Chem.* **278**, 5622-5629.

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.

Vercammen D., Beyaert R., Denecker G., Goossens V., van Loo G., Declercq W., Grooten J., Fiers W., & Vandenabeele P. (1998) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* **187**, 1477-1485.

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

Vogt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkroete (Alytes obstetricans). 130. 1842. Solothurn: Jent und Gassman.

Whitesell L., Mimnaugh E.G., De Costa B., Myers C.E., & Neckers L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8324-8328.

Widlak P., Li L.Y., Wang X., & Garrard W.T. (2001) Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J.Biol.Chem.* **276**, 48404-48409.

Wiegmann K., Schütze S., Machleidt T., Witte D., & Krönke 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.

Wolff R.A., Dobrowsky R.T., Bielawska A., Obeid L.M., & Hannun Y.A. (1994) Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J.Biol.Chem.* **269**, 19605-19609.

Wu G.S., Burns T.F., Zhan Y., Alnemri E.S., & El Deiry W.S. (1999) Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res.* **59**, 2770-2775.

Xing H.R. & Kolesnick R. (2001) Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1. *J.Biol.Chem.* **276**, 9733-9741.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Adam für die Bereitstellung des Themas, des optimalen Arbeitsplatzes und die intensive Betreuung bedanken. Dieter war sehr engagiert und jederzeit ansprechbar. Bei Problemen hatte er immer einen konstruktiven Ratschlag.

Ich danke dem Direktor des Institutes, Herrn Prof. Dietrich Kabelitz, für die Bereitstellung des Arbeitsraumes und die Unterstützung der Arbeitsgruppe.

Vielen Dank den Mitarbeitern dieses Institutes für die tolle fachliche und private Atmosphäre. Dabei geht ein besonderes Dankeschön an Sabine Mathieu als „Mutter“ des Labors, ohne sie ginge nur wenig.

Gar nicht genug kann ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in diesen Lehrjahren in jeder Hinsicht immer unterstützt haben.

Am meisten möchte ich mich bei Silke bedanken. Danke Schatz!

## Lebenslauf

Name: Lutz Thon  
Anschrift: Holtenauer Str. 124  
24105 Kiel  
Geburtsdatum: 30.10.72  
Geburtsort: Kiel  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Ausbildung

Allgemeine Hochschulreife,  
Berufliche Schulen am Königsweg, Fachgymnasium in Kiel 1992

Grundwehrdienst bei der Marine 1992 - 1993

Begonnenes Studium der Chemie an der CAU Kiel 1993 - 1994

Studium der Biologie an der CAU Kiel 1994 - 2000

Beginn des Promotionsstudiums an der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der CAU Kiel 2000

**Erklärung**

Die eingereichte wissenschaftliche Abhandlung mit dem Titel:

„Mechanismen der Regulation  
des Caspase-unabhängigen Zelltods durch Sphingolipidmediatoren“

wurde, abgesehen von der Beratung durch akademische Lehrer, nach Inhalt und Form von mir selbst angefertigt. Diese Arbeit wurde bisher an keiner Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Kiel, den 10.03.2004

---

(Lutz Thon)

