

**Untersuchungen zum molekularen Mechanismus
des Tumor Nekrose Faktor-induzierten
nekrotischen Zelltods in murinen Fibroblasten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Ulf-Eike Werner
aus Hannover

1. Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Silvia Bulfone-Paus

2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Bosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2004

zum Druck genehmigt: Kiel, 13.09.2004

Der Dekan

I Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein aufrichtiger Dank gebührt Frau Dr. Sabine Adam nicht nur für ihre fachliche Unterstützung, sondern auch für ihr Vertrauen, mir die Bearbeitung meiner Doktorarbeit zu ermöglichen. Auch möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus als Gutachterin dieser Arbeit herzlich danken. Daran anschließen möchte ich den Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Bosch für die Übernahme des Korreferates.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz möchte ich meinen herzlichen Dank für ihre mir stets in jeder Weise entgegengebrachte Hilfsbereitschaft sowie für das angenehme Arbeitsklima aussprechen. Hervorheben möchte ich dabei Sandra Ussat, die mir mit ihrer freundlichen und verständnisvollen Art häufig zur Seite stand und immer eine sonnige Atmosphäre in den Laboralltag brachte. Weiterhin danke ich Markus Falk für die in den letzten Jahren entstandene Freundschaft und für die zahllosen persönlichen wie auch fachlichen Gespräche. Auch möchte ich Gudrun Scherer danken für jegliche Unterstützung und hilfreichen Hinweise während der Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzen Herzen bei meiner Mutter und meiner Schwester sowie der gesamten Familie für ihren mir in jeder Hinsicht erwiesenen unschätzbaren Beistand bedanken, durch den sie mir gerade in schwierigen Momenten der Arbeit und des Lebens sehr geholfen haben.

Schließlich danke ich meiner Freundin Ivonne Suckstorff für die Liebe und vonnevolle Zeit.

II Erklärung

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

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

Ulf-Eike Werner

III Inhaltsverzeichnis

I	Danksagung	III
II	Erklärung	IV
III	Inhaltsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Einführung in den Programmierten Zelltod	1
1.2	Geschichte des Programmierten Zelltods	2
1.3	Apoptose	3
1.4	Nekrose	9
1.5	Der programmierte Zelltod und seine unterschiedlichen Formen	9
1.6	Der Tumor Nekrose Faktor und seine biologische Funktion	11
1.7	Der molekulare Mechanismus des TNF-induzierten Zelltods	13
1.8	Die TNF-induzierte Aktivierung von NF- κ B	14
1.9	TNF-vermittelte Nekrose	15
1.10	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte und Materialien	19
2.2	Chemikalien und Reagenzien	20
2.3	Biologische Reagenzien	22
2.4	Vektoren und Plasmide	23
2.5	Zelllinien und Zellkultur	23
2.6	Transfektion von eukaryotischen Zelllinien mit Expressionsvektoren mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation	24
2.7	Stimulation von Zellen	24
2.8	Präparation von zellulären Extrakten	24
2.8.1	Lysate für die Immunoblotanalyse (TNE-Lysate)	25
2.8.2	Lysate zu Isolierung aktiver Kinase	25
2.9	Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotanalyse	26
2.10	Immunpräzipitation aktiver Kinasen und <i>in vitro</i> -Bestimmung der Kinase-Aktivität	26

2.11	<i>In vitro</i> -Translation zur Synthese radioaktiv markierter p21-Konstrukte und <i>in vitro</i> -Verdau der markierten Proteine	27
2.12	Immunofluoreszenzfärbung des p21 ^{WAF1/Cip1} -Proteins und Analyse mittels konfokalen <i>Laser Scanning</i> Mikroskop	28
2.13	Koimmunpräzipitation von p21 ^{WAF1/Cip1} mit cdk2	28
2.14	Antisense-Inhibition durch Morpholino Oligonukleotide	29
2.15	Transkriptionelle Inhibition durch siRNA	29
2.16	Messung der NF-κB-Aktivität nach transienter Transfektion	29
2.17	Toxizitätsanalyse durch Propidiumjodidfärbung und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	30
2.18	Stabile Transfektion mit einem retroviralen Transfektionssystem	30
2.19	Nachweis der Expression des stabil transfizierten FLIP _(s)	31
2.20	Messung der Erk-Aktivität nach stabiler Transfektion	32
2.21	Cathepsin D-Aktivitäts-Assay	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Die Rolle von p21 ^{WAF1/Cip1} während des TNF/zVAD-induzierten NPZs	33
3.1.1	Das Zellzyklusprotein p21 ^{WAF1/Cip1} wird in NIH3T3-Zellen aber nicht in HeLa-Zellen hochreguliert	33
3.1.2	Die Lokalisation von p21 ^{WAF1/Cip1} während des TNF-induzierten NPZs in NIH3T3-Zellen	34
3.1.3	P21 ^{WAF1/Cip1} , das während des TNF-induzierten NPZs hochreguliert wird, koimmunpräzipitiert mit cdk2	36
3.1.4	Antisense Inhibition von p21 ^{WAF1/Cip1} verstärkt den TNF-induzierten NPZ	37
3.1.5	Murines p21 ^{WAF1/Cip1} wird im Gegensatz zu humanem p21 ^{WAF1/Cip1} nicht durch Caspasen gespalten	39
3.1.6	Ein Einfluss von p21 ^{WAF1/Cip1} auf die cdk2-Kinase war nicht zu detektieren	42
3.2	Untersuchung des molekularen Mechanismus des NPZs	44
3.2.1	Die Funktion von Cathepsin D im NPZ	44
3.2.2	Untersuchung des NPZs als eine Form der Autophagie	47
3.2.3	Die Inhibition der pro-apoptotischen Serinprotease Omi/HtrA2	50
3.2.4	PARP als Schalter zwischen Apoptose und Nekrose	51
3.3	cFLIP als mögliches Bindeglied zwischen Proliferation und Zelltod in der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3	53
3.3.1	Messung der NF-κB-Aktivität nach transienter Transfektion von cFLIP	53
3.3.2	Toxizitätsanalyse nach transienter Transfektion von cFLIP	56

3.3.3	Stabile Transfektion von FLIP _(s) mit einem retroviralen Transfektionssystem über GP+E86-Zellen	58
3.3.4	Messung der NF-κB-Aktivität in FLIP _(s) -exprimierenden NIH3T3-Zellen	59
3.3.5	Messung der Erk-Aktivität in FLIP _(s) -exprimierenden NIH3T3-Zellen	61
3.3.6	Toxizitätsanalyse mit FLIP _(s) -exprimierenden NIH3T3-Zellen	62
3.3.7	Stabile Transfektion von FLIP _(s) mit einem retroviralen Transfektionssystem über HEK293T-Zellen	63
3.3.8	Versuch zur siRNA-Inhibition von cFLIP	68
4	Diskussion	70
4.1	Die Hochregulation von p21 ^{WAF1/Cip1} geht dem TNF-induzierten NPZ voraus	71
4.2	Mögliche molekulare Mechanismen für den NPZ	75
4.2.1	Cathepsin D	75
4.2.2	Autophagie	76
4.2.3	Omi/HtrA2	77
4.2.4	PARP	78
4.3	FLIP _(s) verstärkt die Aktivierung von NF-κB und Erk	80
5	Zusammenfassung	86
6	Summary	87
7	Anhang	88
7.1	Literaturverzeichnis	88
7.2	Publikationsverzeichnis der eigenen Veröffentlichungen	101
7.3	Abkürzungsverzeichnis	102
8	Lebenslauf	106

1 Einleitung

1.1 Einführung in den Programmierten Zelltod

Der programmierte Zelltod ist ein genetisch regulierter Selbstmordprozess, der eine zentrale Rolle sowohl in der Entwicklung, Morphogenese als auch in der Homeostase und Integrität von vielzelligen Organismen einnimmt. Er ist dabei in die Balance zwischen der Bildung neuer Zellen und der Eliminierung von überflüssigen, geschädigten und abnormalen Zellen involviert (Übersicht von Vaux and Korsmeyer, 1999; Übersicht von Ameisen, 2002).

Die meisten Zellen, die während der Entwicklung eines Lebewesens entstehen, sterben noch vor Eintreten der Geburt. Danach sterben weiterhin 99,9 % der Zellen, die während der Spanne eines Lebens gebildet werden, ebenfalls durch ein eingebautes Selbstmordprogramm (Übersicht von Jacobson *et al.*, 1997; Übersicht von Denecker *et al.*, 2001). In einem Menschen werden 100000 Zellen pro Sekunde durch Mitose gebildet und eine ähnlich große Zahl stirbt in der gleichen Zeit durch einen physiologischen Zelltod, der im Allgemeinen Apoptose genannt wird. Im Vergleich dazu sterben nur wenige Zellen durch eine Verletzung oder eine andere irreparable Schädigung, wie z. B. Sauerstoffmangel, was meist als pathologischer Zelltod (Nekrose) bezeichnet wird (Übersicht von Vaux and Korsmeyer, 1999). Apoptose und Nekrose sind zwei verschiedene Arten des Zelltods.

Die Evolution der Vielzelligkeit und der damit verbundenen Spezialisierung der Zellen brachte es mit sich, dass der Zelltod durch unterschiedliche Signalwege intrazellulär reguliert wird. Dabei ist zu beachten, dass innerhalb einer Säugerzelle verschiedene, intrazelluläre Signalwege für die Steuerung des programmierten Zelltods nebeneinander existieren können. Der molekulare Signalweg, der zu einer Selbstzerstörung führt, ist sowohl vom Zelltyp und seinem Differenzierungszustand als auch vom Todessignal selbst abhängig. Mögliche Fehlregulationen der Kontrollmechanismen des programmierten Zelltods werden als Ursache für eine Vielzahl von Krankheiten angenommen (Übersicht von Ameisen, 2002). Wahrscheinlich liegt bei so unterschiedlichen Erkrankungen wie Krebs, Autoimmunität und neurodegenerativen Störungen (Alzheimer-Krankheit) eine solche Fehlsteuerung vor, durch die zu viele oder zu wenige Zellen untergehen (Übersicht von Duke *et al.*, 1997).

1.2 Geschichte des Programmierten Zelltods

Das erste Mal wurden sterbende Zellen während der normalen Entwicklung in der Mitte des 19. Jahrhunderts beobachtet. Carl Vogt beschrieb 1842 den physiologischen Zelltod neuronaler Zellen während der Metamorphose von Krötenembryos (Vogt, 1842). Daraufhin erkannte man sehr bald, dass das Absterben von Zellen für den Organismus nicht zwangsläufig von Nachteil, sondern vielfach sogar erforderlich ist für die Entwicklung von Invertebraten sowie von Vertebraten (Glucksmann, 1951; Übersicht von Clarke und Clarke, 1996; Übersicht von Jacobson *et al.*, 1997; Übersicht von Duke *et al.*, 1997). Bis zur ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts erkannte man, dass vielzellige Lebewesen ihre endgültige Gestalt und Organisation gerade dadurch erhalten, dass bestimmte Zellen nach Plan eliminiert werden. Aber erst mit dem Beginn der biochemischen und genetischen Identifizierung des Zelltodprozesses, begann die "moderne Ära" der Zelltodforschung (Übersicht von Vaux, 2002). So konnte durch die Zugabe von Inhibitoren der RNA- und Proteinsynthese der Zelltod während der Metamorphose von Amphibien (Tata, 1966) und Insekten (Lockshin, 1969) blockiert werden. Dies bewies, dass zelleigene Proteine für den Ablauf des Zellselbstmordes rekrutiert und benötigt werden.

Der Begriff "Programmierter Zelltod" wurde zunächst von R.A. Lockshin und C.M. Williams eingeführt, um den Zelltod zu beschreiben, der an vorhersagbaren Orten zu vorhersagbaren Zeitpunkten während der Entwicklung eines Organismus auftritt (Lockshin und Williams, 1964). Die Autoren wollten damit betonen, dass es sich bei dem Zellsterben während der Entwicklung und der Gewebhomeostase um einen gleichartigen Vorgang handelt, der einem festgeschriebenen Programm folgend lebenslang ablaufe. Diese Vorstellung griff die Arbeitsgruppe um John F.R. Kerr auf. Sie hatte entdeckt, dass die Morphologie sowohl von Leberzellen, die Toxinen ausgesetzt wurden, als auch von Lymphozyten, die mit Hormonen behandelt wurden, der Morphologie von sterbenden Zellen glich, die Glucksmann früher schon während der Entwicklung von Organismen beobachtet hatte (Glucksmann, 1951; Kerr *et al.*, 1972; Übersicht von Vaux, 2002). Weil dieser beobachtete Zelltod von Gewebe zu Gewebe und von Lebewesen zu Lebewesen ähnlich erschien, vermuteten Kerr und seine Mitarbeiter darin ein aktives, intrazelluläres Todesprogramm, für den die Zelle selber Energie aufbringen müsse. Um diese Art von Zelltod von dem pathologischen und für sie damals noch eher passiven Zelltod, der Nekrose abzugrenzen, bezeichneten sie diesen als Apoptose (Übersicht von Jacobson *et al.*, 1997; Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984). Dieser Begriff ist aus dem Griechischen entlehnt und setzt sich zusammen aus *apo* (ab, weg, los) und *ptosis* (Senkung), die das Abfallen welcher Blätter bezeichnen. Es sollte dabei den Unterschied

zur Nekrose (abgeleitet von griechisch *nekrosis* für Tod, Tötung, Absterben) verdeutlichen und gleichzeitig die charakteristische Morphologie der Apoptose beschreiben.

Es dauerte allerdings noch eine Weile bis die Idee, dass Zellen ein eingebautes Selbstmordprogramm besitzen und dieses unter bestimmten Umständen abrufen, akzeptiert wurde. Der erste Hinweis, dass ein genetisches Programm den physiologischen Zelltod steuert, erhielt man durch die entwicklungsbiologischen Untersuchungen am Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Übersicht von Denecker *et al.*, 2001; Horvitz *et al.*, 1982; Ellis und Horvitz, 1986). Während der Entwicklung sterben genau 131 der 1090 somatischen Zellen, die den Fadenwurm bilden, durch Apoptose. Dabei handelt es sich immer um Zellen der gleichen Entwicklungslinie die sterben und nicht um verschiedene Zellen. Schon sehr bald konnten in Säugerzellen homologe Gene, wie z. B. das Interleukin-1 β -konvertierende Enzym (ICE, Caspase-1) zu den apoptose-relevanten Nematodengenien identifiziert werden (Yuan *et al.*, 1993; Hengartner und Horvitz, 1994; Zou *et al.*, 1997). Dadurch war auch klar, dass der programmierte Zelltod einen evolutionär hochkonservierten Prozess darstellt. Der Begriff "programmierter Zelltod" verweist inzwischen auf jede Art von Zelltod, der durch ein intrazelluläres Todesprogramm ungeachtet von dem Auslöser vermittelt wird. Die Morphologien können entweder Apoptose, Nekrose oder eine Mischung aus beiden Phänotypen sein (Schweichel und Merker, 1973).

1.3 Apoptose

Obwohl die Apoptose den am häufigsten vorkommenden Phänotyp der Selbstzerstörung darstellt, ist der Begriff "Apoptose" nicht gleichzusetzen mit dem Begriff "Programmierter Zelltod" oder auch "Selbstmord der Zelle" (Übersicht von Ameisen, 2002).

Die Ursprünge der Apoptose werden in den Signalwegen der Einzeller vermutet, weil die an der Apoptose beteiligten Moleküle während der Evolution stark konserviert sind (Übersicht von Ameisen, 1996). Das endogene Selbstmordprogramm sorgt bei den einzelligen Organismen während einer viralen Infektion dafür, dass die infizierte Zelle stirbt, bevor sich das Virus weiter vermehrt und verbreiten kann. Die Zelle schützt so ihre Nachbarzellen vor einer nachfolgenden Infektion (Yarmolinsky, 1995). Bei den vielzelligen Organismen sind dann die weiteren Funktionen der Apoptose hinzugekommen, die sehr vielfältig sein können (Übersicht von Vaux und Korsmeyer, 1999). Die wichtigste Aufgabe übernimmt Apoptose jedoch während der Entwicklung eines Organismus, indem bereits entstandene Strukturen

durch Apoptose später wieder entfernt werden. Dies können Strukturen sein, wie der Schwanz der Kaulquappe, die in der einen Entwicklungsstufe gebraucht werden, in einer späteren aber nicht mehr. Oder es sind Gewebe, die zwar in einem Geschlecht benötigt werden, aber nicht in dem anderen. So bleibt der Müllersche Gang in weiblichen Säugetieren erhalten und die Anlagen für den Wolfschen Gang gehen verloren. In männlichen Säugetieren verhält es sich entgegengesetzt. In einem adulten Organismus übernimmt der physiologische Zelltod hauptsächlich die Funktion der Regulation der Anzahl der Zellen in einem Gewebe oder die Eliminierung gefährlicher und infizierter Zellen (Übersicht von Jacobson *et al.*, 1997).

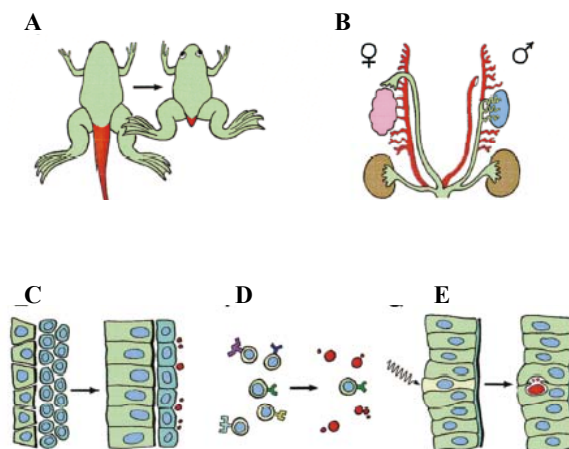


Abb.1 Funktionen der Apoptose. (A) Entfernung von nicht mehr benötigten Strukturen während der Entwicklung eines Lebewesens, z. B. der Schwanz der Kaulquappe. (B) Entfernung von nicht mehr benötigten Geweben während der Entwicklung der Geschlechtsorgane. (C) Regulation der Anzahl der Zellen in Organen oder Geweben. (D,E) Eliminierung gefährlicher und infizierter Zellen. (Übersicht von Jacobson *et al.*, 1997)

Apoptose spielt auch eine zentrale Rolle bei der Entwicklung eines effektiven Immunsystems. Lymphozyten, die fremde Antigene erkennen können, bleiben erhalten (positive Selektion), während solche, die körpereigene Strukturen erkennen, durch Apoptose eliminiert werden (negative Selektion). Desweiteren töten aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten Virus-infizierte Zellen, indem sie in diesen spezifisch Apoptose induzieren. Wenn die Erreger schließlich beseitigt sind, bringen sich die aktivierten T-Lymphozyten entweder selbst oder gegenseitig um, so dass die Immunreaktion dadurch wieder abgeschaltet wird (Übersicht von Hug, 2000). Dabei zeichnet sich die Apoptose in Säugerzellen durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen aus, die sie dadurch von der Nekrose, der pathophysiologischen Form des Zelltods, unterscheiden.

In der ersten Phase der Apoptose verliert die Zelle zunächst den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. Das Chromatin des Zellkerns wird stark verdichtet und zu diesem Zeitpunkt durch aktivierte Endonukleasen zuerst in große Fragmente von etwa 50 bis 300 kbp (Kilobasenpaaren) und anschließend in kleinere Fragmente bestehend aus Multimeren von ungefähr 180 bp internukleosomal gespalten. Die kleine Untereinheit des DNA Fragmentierungsfaktors DFF40 ist eine solche spezifische Nuklease, die nach gängiger Vorstellung inaktiv als Komplex mit ihrem Inhibitor, der anderen Untereinheit des DNA Fragmentierungsfaktors, im Zytosol vorliegt (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999; Sahara *et al.*, 1999; Zamzami und Kroemer, 1999). Die Aktivierung der nukleolytischen Untereinheit erfolgt über die Abspaltung des Inhibitors durch eine Aspartat-spezifische Cystein-Protease, kurz Caspase genannt. Die übrigen Zellorganellen verbleiben zunächst überwiegend intakt.

Die zweite Phase der Apoptose ist gekennzeichnet durch eine Auffaltung der Zellmembran und die Separation zellulärer, insbesondere nukleärer Fragmente. Diese charakteristischen, nun membranassoziierten Fragmente werden als apoptotische Körperchen bezeichnet. Von diesen Körperchen hat die apoptotische Form des Zelltods auch ihren Namen.

Am Schluss werden die verbliebenen Zellreste durch Phagozytose von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen und endgültig abgebaut. Der entscheidende Unterschied zur Nekrose besteht darin, dass die schrumpfende Zelle und die apoptotischen Körperchen von den Phagozyten an den Membranveränderungen, wie z. B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran erkannt und beseitigt werden, bevor die Integrität der Zellmembran endgültig verloren geht. (Savill, 1997 und 1998; Platt *et al.*, 1998; Fadok *et al.*, 1998; Ren und Savill, 1998; Fadok *et al.*, 2000). Dadurch wird eine inflammatorische Reaktion mit einer nachfolgenden Schädigung der Nachbarzellen und eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen vermieden. Die Zellfragmente werden dabei innerhalb von Vesikeln (Phagolysosomen) der phagozytierenden Zelle abgebaut. Um die Phagozytose zu erleichtern, reduzieren apoptotische Zellen ihr Volumen. Sie pumpen Ionen, vor allem K^+ Cl^- und organische Osmolyte, nach außen und kontrahieren ihr Zytoskelett (Hughes *et al.*, 1997; Bortner und Cidlowski, 1999; Übersicht von Hug, 2000).

Lange Zeit wurde das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion als eines der wichtigen Charakteristika des apoptotischen Prozesses angesehen. Einige Faktoren wie die Produktion der immunsuppressiven Zytokine Interleukin (IL)-10 und transformierender Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor-beta*, TGF- β) sprechen auch für diese

Theorie (Fadok *et al.*, 1998; Ronchetti *et al.*, 1999). Peptide von phagozytierten, apoptotischen Körperchen können von dendritischen Zellen präsentiert werden und somit eine Immunantwort auslösen (Bellone *et al.*, 1997; Albert *et al.*, 1998). Zusätzlich kann es vorkommen, dass während massiver Apoptose die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β und IL-18 freigesetzt werden (Hogquist *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1998). Alle aufgezählten Merkmale müssen nicht in jedem Apoptoseprozess festzustellen sein. Verschiedene Faktoren können Apoptose induzieren. Je nach Stimulus lassen sich apoptotische Veränderungen bereits nach einigen Minuten oder erst nach Stunden nachweisen. Ob eine Apoptose eingeleitet wird, hängt nicht nur vom Zelltyp ab, sondern auch vom Differenzierungszustand, der Position im Zellzyklus oder der Genaktivierung. Es können sowohl chemische Substanzen wie Glukocorticoide, freie Radikale, Wasserstoffperoxid und Glutamat, wie auch physikalische Schädigungen, bedingt durch UV-Strahlen, Röntgenstrahlen, Gamma- und Beta-Strahlen sowie Hitzeschock, Apoptose einleiten. Auch ist bekannt, dass Anti-Krebs-Medikamente (Zytostatika) und der Entzug lebensnotwendiger Faktoren Apoptose induzieren können. Dazu kommen noch sogenannte Todesfaktoren, die Apoptose initiieren können, wie z. B. Fas Ligand (FasL), Tumor Nekrose Faktor (TNF) und der TNF-verwandte Apoptose-induzierende Faktor (TRAIL).

Nach der Bindung dieser Todesfaktoren an ihre entsprechenden Rezeptoren wird die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose ausgelöst. Todesrezeptoren weisen eine C-terminale intrazelluläre Todesdomäne (DD) auf, welche als Protein-Protein-Interaktionsmotiv in verschiedenen Rezeptoren, wie z. B. TNF-R1 oder Fas, vorzufinden ist. Mittels der Todesdomäne werden Adapterproteine, die ebenfalls eine Todesdomäne enthalten, an den Rezeptor rekrutiert. Dazu gehören das Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne (FADD), das TNF-R1-assoziierte Protein mit Todesdomäne (TRADD) sowie das Rezeptor-interagierende Protein (RIP). Einige dieser Adapterproteine, wie z. B. FADD, besitzen zusätzlich eine weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die Todeseffektordomäne (DED), über die wiederum die Procaspase-8, die ebenfalls eine Todeseffektordomäne aufweist, rekrutiert und durch Autoprozessierung aktiviert wird. Die aktivierte Caspase-8 initiiert eine proapoptische Signal-Kaskade durch nachfolgende Prozessierung der Effektor-Caspase-3, welche neben der Spaltung von Strukturproteinen auch die ebenfalls ausführenden Caspasen-6 und -7 aktivieren kann. Durch zusätzliche Caspase-6-vermittelte Prozessierung der Caspase-8 wird ein signalverstärkender Rückkopplungskreislauf eingeleitet. Diese Form der durch Caspasen vermittelten Apoptose wird entweder als Typ I-Apoptose oder als extrinsischer Signalweg zur Apoptose bezeichnet (Scaffidi *et al.*, 1998). Im Vergleich dazu wird die Typ-

II-Apoptose oder auch intrinsischer Signalweg zur Apoptose unter mitochondrialer Beteiligung initiiert. Auch hier wird durch die Oligomerisierung des Rezeptors Caspase-8 aktiviert. Im nächsten Schritt fragmentiert diese das zytosolische Protein BID, dessen carboxyterminales Spaltprodukt nach seiner Translokation zu den Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran in das Zytoplasma vermittelt (Luo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Cytochrom C bindet im Komplex mit dATP an Apaf-1 (Apoptotischer Protease-aktivierender faktor-1), wodurch eine Konformationsänderung bewirkt wird, so dass nachfolgend durch homophile Interaktionen der CARD-Domänen von Apaf-1 und Procaspase-9 diese aktiviert wird (Li *et al.*, 1997). Caspase-9 fungiert nun als Initiator-Caspase und prozessiert die Effektor-Caspase-3 und nachfolgend Caspase-6 und -7. Die Signalverstärkung innerhalb der Caspase-Kaskade wird bei diesem Apoptosetyp durch Caspase-7-vermittelte Caspase-9-Prozessierung und durch zusätzliche Aktivierung weiterer Caspase-8-Moleküle erreicht. Dieser Signalweg scheint in Zellen eine Rolle zu spielen, die z. B. durch einen geringen Gehalt an Pro-Caspase-8 die Effektorcaspasen nicht in ausreichendem Umfang direkt aktivieren können. Außerdem beinhaltet er die Grundlage für nicht Rezeptor-vermittelte Apoptoseprozesse, die beispielsweise durch Behandlung mit Chemotherapeutika induziert werden (Übersicht in Los *et al.*, 1999). Auf welche Weise der intrinsische Signalweg zur Apoptose durch derartige Chemotherapeutika ausgelöst wird, ist bisher nicht vollständig verstanden.

Die Hauptbestandteile des Apoptosenetzwerks stellen demnach die Caspasen dar. Diese Enzyme gehören der Familie der Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen an, da sie ihre Substrate nach einem Aspartatrest spalten und sich in dem aktiven Zentrum ein Cystein befindet (Talanian *et al.*, 1997). Die Caspasen sind Komponenten der Signalkaskade und werden als Zymogene synthetisiert. Die Primärstruktur der inaktiven Procaspasen besteht aus einer N-terminalen Prodomäne sowie der großen, das aktive Zentrum enthaltenden (p20) und der kleinen (p10) Untereinheit. Die Procaspasen aktivieren sich gegenseitig in einer intrazellulären Caspase-Kaskade mittels Spaltung. Alternativ werden sie über die Wechselwirkung mit Adapterproteinen durch eine nachbarschafts-induzierte Autoproteolyse aktiviert (Thornberry N.A., 1997; Nicholson D.W. und Thornberry N.A., 1997). Durch proteolytische Spaltung werden die große und die kleine Untereinheit von der N-terminalen Prodomäne freigesetzt und setzen sich daraufhin zu einem aktiven Heterotetramer zusammen. Die so gebildete Caspase ist nun aktiv und kann weitere Procaspasen in der Signalkette aktivieren. Die Erkennungssequenzen für die gegenseitige Prozessierung der Caspasen und der Spaltung von Substratproteinen basiert auf einem Motiv von vier Aminosäuren, das

jeweils spezifisch für die bestimmte Caspase ist und immer einen Aspartatrest an der vierten Position aufweist (Talanian *et al.*, 1997; Thornberry *et al.*, 1997). Carboxyterminal dieses Aspartatrestes werden die Substrate dann fragmentiert. Die Funktionsweise der synthetischen Peptid-Inhibitoren (Ac-DEV-CHO oder zVAD-fmk) und der fluorogenen Substrate für die Aktivitätsmessung der Caspasen basiert ebenfalls auf dem Vorhandensein dieser Erkennungssequenzen. Man teilt die an der Apoptose beteiligten Caspasen in zwei Unterfamilien ein. Caspasen mit langen Pro-Domänen, wie z. B. Caspase-8 und -9, sind meistens in der initialen Aktivierung der apoptotischen Kaskade involviert (Initiatorcaspasen), während Caspasen mit kurzen Prodomänen, wie z. B. Caspase-3, das Apoptoseprogramm zu Ende führen (Effektorcaspasen), indem sie zelluläre Substrate spalten. Die Spaltung dieser zellulären Substrate bestimmt das morphologische und biochemische Bild der Apoptose. Zu diesen Substraten gehören viele Proteine, unter anderem Proteine des Zellgerüsts wie Aktin und Plectin.

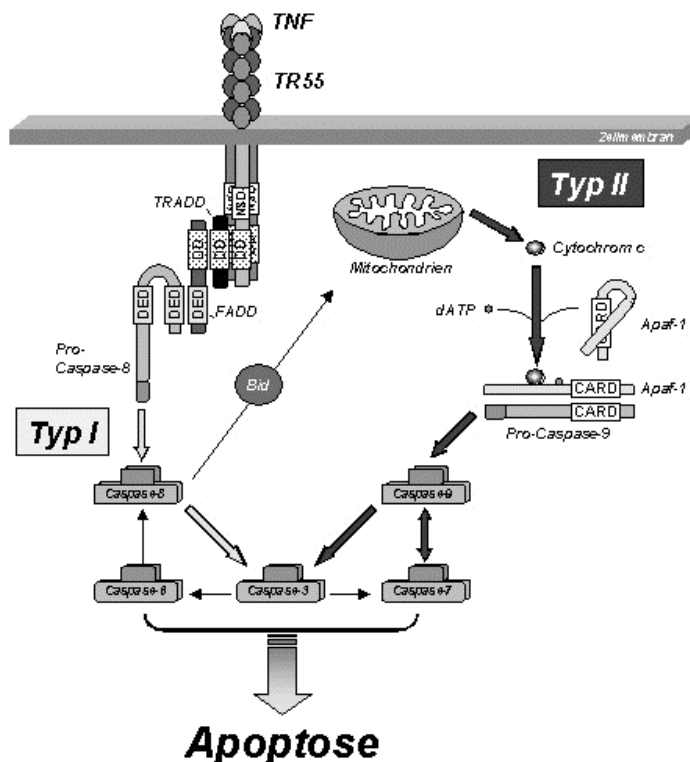


Abb. 2: Caspase-abhängige Apoptose des Typ I und Typ II. Nach der Bindung von TNF an das Trimer aus Rezeptormolekülen des TNF-R1 erfolgt die Rekrutierung von TRADD und FADD und nachfolgend die Aktivierung von Caspase-8. Diese Initiator Caspase aktiviert u. a. die Effektor-Caspase-3 und kann über Caspase-6 in einer positiven Verstärkung vermehrt aktiviert werden. Im Verlauf der Typ II Antwort kann eine Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen wie Cytochrom C über die Wirkung von tBid (aktiviert durch Caspase-8 abhängige Spaltung von Bid) oder über Todesrezeptor unabhängige Stimuli erfolgen. Nach Freisetzung von Cytochrom C kommt es zur Bildung des Apoptosoms und zur Aktivierung von Caspase-9, -7 und -3 (Los *et al.*, 1999).

1.4 Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose ist der Vorgang der Nekrose durch ein Anschwellen der Zelle charakterisiert. Dies führt zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts in den interzellulären Raum. Eine inflammatorische Reaktion mit einhergehenden Gewebeschädigungen ist die Folge. Die Zellorganellen schwellen ebenfalls an und platzen anschließend, während der Zellkern meistens intakt bleibt (Schweichel und Merker, 1973). Hauptsächlich tritt Nekrose in den Geweben entweder in Fällen von akutem Sauerstoff- oder Nährstoffentzug oder in Folge von extremer physiologischer Schädigung durch Hitze, Detergenzien oder Radioaktivität auf. Neueste Studien zeigen dagegen, dass der nekrotische Zelltod ebenfalls sowohl während der normalen Physiologie der Zelle als auch während der Entwicklung eines Organismus erscheint. (Kitanaka und Kuchino, 1999; Chautan *et al.*, 1999). Unter einigen pathologischen Umständen, wie z. B. bei einem Schlaganfall) oder bei durch Zytokine und Toxine induzierter Leberschädigung kann der Zelltod in apoptotischer sowie in nekrotischer Form auftreten (Beilharz *et al.*, 1995; Charriaut-Marlangue *et al.*, 1996; Leist *et al.*, 1996). Demzufolge wurde die Existenz eines nekrose-ähnlichen Zelltodsignalwegs angenommen, der durch ein eingebautes Todesprogramm reguliert wird und von der Apoptosemaschinerie unabhängig ist (Kitanaka und Kuchino, 1999). Obwohl erste *in vitro* Modelle für einen nekrotischen Zelltod ohne Capasenaktivität beschrieben sind, blieb der molekulare Mechanismus der nekrotischen Form des Zelltods in seiner Gesamtheit weitestgehend unverstanden (Daugas *et al.*, 2000; Sarin *et al.*, 1997; Trapani *et al.*, 1998; Heibein *et al.*, 1999; Woodle *et al.*, 1997; Deas *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1998; Vercammen *et al.*, 1998).

1.5 Der programmierte Zelltod und seine unterschiedlichen Formen

Der Begriff "programmierter Zelltod" verweist inzwischen auf jede Art von Zelltod, der durch ein intrazelluläres Todesprogramm ungeachtet von seinem Auslöser vermittelt wird. Die Morphologien können entweder Apoptose, Nekrose oder eine Mischung aus beiden Phänotypen sein (Schweichel und Merker, 1973). Mittlerweile existieren unterschiedliche Bezeichnungen für die verschiedenen Ausprägungen und Morphologien des Zelltods. Es kristallisieren sich jedoch vier Hauptgruppen heraus, in die man die beobachteten Zelltode einordnen kann (Leist und Jäätelä, 2001).

(i) Zunächst die klassische Apoptose mit den schon beschriebenen morphologischen und biochemischen Charakteristika, wie das Schrumpfen des Zytoplasmas, Chromatin-Kondensation, Abschnürung von apoptotischen Körperchen und die Exposition von Phosphatidylserin (Kerr *et al.*, 1972). Wichtig ist zudem die Aktivierung der Caspasen im Rahmen der apoptotischen Zelltodmaschinerie, deren Inhibition zu einer Blockierung des Zelltods führt.

(ii) Daran schließt sich der apoptose-ähnliche programmierte Zelltod (*apoptosis-like programmed cell death*) an. Die Chromatin-Kondensation ist hier weniger dicht als bei der klassischen Apoptose. Ebenfalls werden Phagozytose-erkennende Moleküle auf der Zellmembran gezeigt, bevor sich die apoptotischen Körperchen abschnüren. Andere apoptotische Merkmale unterscheiden sich in ihrer Ausprägung und Kombination von denen der klassischen Apoptose, wobei nicht immer alle Hauptmerkmale zu beobachten sind. Die meisten beschriebenen Modelle der "caspase-unabhängigen Apoptose" gehören in diese Klasse (Borner und Monney, 1999; Kitanaka und Kuchino, 1999; Woodle *et al.*, 1997).

(iii) Der nekrose-ähnliche programmierte Zelltod (*necrosis-like programmed cell death*) wird dagegen definiert über die fehlende Kondensation des Chromatins in der sterbenden Zelle. Verschiedene apoptotische Merkmale können in einem gewissen Grad noch festgestellt werden. Insgesamt unterscheiden sich die auftretenden Morphologien schon beträchtlich von denen der klassischen Apoptose. So laufen die Signalwege des nekrose-ähnlichen Zelltods caspase-unabhängig ab, was diese Form des programmierten Zelltods auch ausmacht. Eine Untergruppe dieser Form des Zelltods wird als abgebrochene Apoptose bezeichnet und meint eine induzierte Apoptose, die in dem Bereich der Caspaseaktivierung inhibiert und über einen alternativen, caspase-unabhängigen Signalweg beendet wird (Nicotera *et al.*, 1999; Mateo *et al.*, 1999; Holler *et al.*, 2000).

(iiii) Im Gegensatz zu den angesprochenen Formen des Zelltods steht die pathologische Form des Zelltods, die reine Nekrose, welche in der Vergangenheit eher als passive Form des Zelltods angesehen wurde, für die jedoch mittlerweile ebenfalls ein eigener Signalweg angenommen wird.

1.6 Der Tumor Nekrose Faktor und seine biologische Funktion

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) gehört zu einer Reihe von Zytokinen, die im Rahmen von Entzündungsantworten freigesetzt werden. Dabei vermittelt TNF die lokalen und systemischen Wirkungen, die für die Induktion der Immunantwort und für die Beseitigung von eingedrungenen Krankheitserregern essentiell sind. TNF wird hauptsächlich von Makrophagen produziert aber auch von Natürlichen Killerzellen, Subpopulationen von T-Zellen (TH1-Zellen), Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und einigen Tumorzelllinien (Wajant *et al.*, 2003). Seinen Namen erhielt TNF aufgrund der Beobachtung, dass Serumfaktoren von Endotoxin-stimulierten und bakteriell infizierten Mäusen bei Sarkomen, die durch Methylcholanthren-Behandlung induziert worden waren, sowie bei anderen transplantierten Tumoren eine hämorrhagische Nekrose und eine damit verbundene Tumorregression einleiten (Carswell *et al.*, 1975). Außerdem induzierte dieser Serumfaktor Zelltod in Kulturen von einigen Tumorzelllinien (Methylcholanthren-induzierte Sarkom-Zellen und L929-Zellen). Schon im 18. Jahrhundert wurde beobachtet, dass Tumore von Krebspatienten schrumpften, die schwere Infektionen abgewehrt hatten. Im Jahre 1985 wurde dieser Serumfaktor schließlich aus dem Kulturüberstand der promyeloischen Leukämie-Zelllinie HL-60 gereinigt, charakterisiert (Aggarwal *et al.*, 1985) und nachfolgend kloniert (Pennica *et al.*, 1984).

Das Zytokin TNF (Übersicht Wallach *et al.*, 1999; Übersicht Locksley *et al.*, 2001) gehört zu einer Familie strukturell verwandter Moleküle, die als TNF-verwandte Ligandenfamilie bezeichnet wird (Ashkenazi und Dixit, 1998). TNF wird zunächst als Typ II-Transmembranprotein exprimiert und ist auch als membranständiges homotrimeres Molekül wirksam (Grell *et al.*, 1995; Kriegler *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1996). Der N-terminale Teil liegt dabei im Zytoplasma vor, während die C-terminale Region in den extrazellulären Raum hinausragt. Von dieser membranintegrierten Form kann ein lösliches homotrimeres Zytokin mittels einer proteolytischen Spaltung durch die auf der Zelloberfläche lokalisierte Metallprotease TACE (*TNF alpha converting enzyme*) freigesetzt werden (Black *et al.*, 1997). Als ein 52 kDa großes Trimer kann es dann in den Zielzellen pleiotrope Effekte hervorrufen (Übersicht in Maskos *et al.*, 1998). Die unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen zellulären Antworten reichen von der Induktion von Genexpression, Differenzierung oder Proliferation bis hin zur Initiation von Entzündung oder Zelltod (Aggarwal und Natarajan, 1996). Neben seiner essentiellen Funktion bei der Vermittlung von Entzündungsantworten und der Koordination der Immunabwehr sind auch viele pathologische Erscheinungsbilder mit der Wirkung von TNF korreliert.

Während hohe Konzentrationen an TNF, dessen Freisetzung durch Lipopolysaccharide und andere bakterielle Produkte induziert wird, durch Infektionen mit Gram-negativen Bakterien zu einem septischen Schock führen kann, resultiert eine anhaltende Exposition von geringen Konzentrationen an TNF in einem starken Auszehrungszustand, der Kachexie. (Männel und Echtenacher, 2000). Dieses Krankheitsbild ist häufig bei Tumorerkrankungen oder chronischen Infektionen zu beobachten. Aus den Patienten mit Kachexie, konnte ein Serumfaktor namens Kachektin isoliert werden, der später als TNF identifiziert wurde (Beutler *et al.*, 1985). TNF ist ebenfalls bei einigen Autoimmunkrankheiten, wie der Rheumatoiden Arthritis, Multipler Sklerose oder Typ I Diabetes mellitus, bei der Gewebeerstörung nach transientscher Ischämie und bei Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion involviert (Übersicht Krönke *et al.*, 1992). In diesem Zusammenhang ist meist ungeklärt, ob TNF eine ursächliche Rolle bei der Ausprägung der Krankheitsbilder spielt oder als modulierender Faktor im Rahmen von Krankheits-begleitenden Entzündungsprozessen auftritt.

Die Mitglieder der TNF Ligandenfamilie üben ihre biologischen Funktionen über die Interaktion mit ihren zugehörigen Membranrezeptoren aus. Diese Membranrezeptoren gehören der TNF/NFG (*nerve growth factor*)-Rezeptorfamilie an und werden über ihre cysteinreiche extrazelluläre Domäne aus ein bis sechs Cystein-Wiederholungen definiert (Locksley *et al.*, 2001; Naismith *et al.*, 1998). Intrazellulär weisen sie mit Ausnahme einer Domäne von ca. 80 Aminosäuren, die außer im TNF-R1 nur in den Rezeptoren CD95/Fas, DR3, DR4, DR5 und DR6 vorkommt, kaum Sequenzhomologien auf. Diese Domäne ist notwendig für die Vermittlung von zytotoxischen Signalen und wurde daher als Todesdomäne (DD) bezeichnet (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993). Aus diesem Grund werden Rezeptoren, die eine solche Todesdomäne aufweisen, als Todesrezeptoren bezeichnet.

Nach der Klonierung von zwei TNF-Rezeptoren mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (TR55, TNF-R1, CD120a) und 75 kDa (TR75, TNF-R2, CD120b) (Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990) hat die Aufklärung der TNF-induzierten Signaltransduktion große Fortschritte gemacht. Die beiden Rezeptoren, TNF-R1 (*tumor necrosis receptor type 1*; CD120a; p55/60) und TNF-R2 (*tumor necrosis receptor type 2*; CD120b; p75/80) können sowohl membrangebundenes TNF (memTNF) als auch lösliches TNF binden. Jeder der beiden Rezeptoren bildet mit seiner cysteinreichen extrazellulären Domäne eine langgestreckte Struktur aus. Damit treten die Rezeptoren mit den lateralen Gruben des Liganden, welche jeweils zwischen zwei der drei Monomere ausgebildet werden, in Wechselwirkung (Banner *et al.*, 1993).

Der TNF-R1 ist ubiquitär auf allen Zellen eines Organismus mit Ausnahme von Erythrozyten und unstimulierten T-Zellen exprimiert, während TNF-R2 vor allem auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs vorkommt und seine Expression auf T-Zellen durch deren Aktivierung stark hochreguliert wird. Die meisten zellulären Antworten auf TNF werden durch den TNF-R1 vermittelt (Wiegmann *et al.*, 1992; Pfeffer *et al.*, 1993; Mackay *et al.*, 1994), wobei allerdings in dem lymphoidem System dem TNF-R2 eine bedeutsamere Rolle zukommt. Im Allgemeinen wird aber die Wichtigkeit des TNF-R2 unterschätzt, weil dieser Rezeptor nur durch membranständiges TNF nicht aber durch lösliches TNF vollständig aktiviert werden kann (Perez *et al.*, 1990; Grell *et al.*, 1995). Die extrazelluläre Domäne von beiden Rezeptoren kann proteolytisch abgespalten werden, was zu löslichen Rezeptorfragmenten mit neutralisierender Wirkung führt (Wallach *et al.*, 1991). Die intrazellulären Domänen von TNF-R1 und TNF-R2 besitzen keine enzymatische Aktivität. Die Mitglieder der TNF/NGF-Rezeptorfamilie werden in zwei wichtige Untergruppen eingeteilt: in die Todesdomänen-besitzenden Rezeptoren und die TRAF (*TNF receptor associated factor*)-interagierenden Rezeptoren. TNF-R1 weist eine Todesdomäne auf, über die andere Todesdomänen-besitzende Proteine rekrutiert werden und so der Rezeptor an die Caspase-Aktivität mit nachfolgender Apoptose gekoppelt wird (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). TNF-R1 kann ebenfalls über die indirekte Wechselwirkung mit Mitgliedern der TRAF Familie Genexpression induzieren. TNF-R2 rekrutiert dagegen das TRAF2-Protein direkt und aktiviert so die Expression verschiedenster Gene.

1.7 Der molekulare Mechanismus des TNF-induzierten Zelltods

Der TNFR-1 vermittelt in kultivierten Zellen meist nur in Gegenwart von Translations- bzw. Transkriptions-Inhibitoren Zelltod, da die gleichzeitige Expression NF- κ B-abhängiger anti-apoptotischer Proteine verhindert werden muss. Ein Trimer aus Rezeptormolekülen des TNF-R1 liegt bereits in der Membran vor, wenn des Zytokin TNF an die extrazelluläre Domäne dieser Rezeptormoleküle bindet (Locksley *et al.*, 2001). Es folgt eine Konformationsänderung in den intrazellulären Bereichen, die eine Interaktion mit unterschiedlichen Adaptermolekülen ermöglicht. Wichtig dabei ist die 80 Aminosäuren lange Todesdomäne, die nicht nur der TNF-R1 sondern auch einige der Adapterproteine, wie FADD, TRADD und RIP aufweisen. Nach der Stimulation des Rezeptors werden die Adapterproteine über eine homophile Interaktion zwischen den beiden Todesdomänen an die Rezeptoren rekrutiert. So bindet das

Adapterprotein FADD, das als Bindeprotein und Zelltodvermittler des CD95/Fas-Rezeptors charakterisiert wurde (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995), über das zwischengeschaltete Protein TRADD (Hsu *et al.*, 1995) indirekt an den TNF-R1. Das Protein FADD trägt zusätzlich eine Todeseffektordomäne, mit der es eine weitere homophile Interaktion mit der inaktiven Pro-Caspase-8 eingehen kann, die ebenfalls ein DED-Motiv aufweist (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Der entstandene Komplex wird Tod-induzierender Signalkomplex (*death inducing signaling complex*, DISC) genannt. Die Pro-Caspase-8 wird infolge der durch die Rekrutierung bewirkten Oligomerisierung durch autokatalytische Prozessierung in ihre aktive Form überführt (Muzio *et al.*, 1998). Nachfolgend initiiert diese eine Protease-Kaskade, was letztlich zur Spaltung zellulärer Substrate und dadurch zu Apoptose führt.

1.8 Die TNF-induzierte Aktivierung von NF- κ B

TRADD ist nicht nur in der Lage das Protein FADD, sondern unabhängig davon noch weitere Proteine an den TNF-R1 zu rekrutieren. So führen die Interaktionen mit TRAF2 (Rothe *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996) und der Todesdomänen-besitzenden Serin-Threonin-Kinase RIP (Hsu *et al.*, 1996; Kelliher *et al.*, 1998) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit zur Induktion von Genexpression, während FADD Apoptose induziert (Chinnaiyan *et al.*, 1996). TRAF2 gehört zu der TRAF Proteinfamilie (Wajant *et al.*, 2001). Deren charakteristisches Merkmal ist die carboxyterminale 180 Aminosäuren große TRAF-Domäne, mittels der TRAF2 an TRADD rekrutiert wird und so in die Nähe des TNF-R1 gebracht wird (Hsu *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu wird RIP mittels seiner carboxyterminalen Todesdomäne an die Todesdomäne des TNF-R1-gebundenen TRADD rekrutiert. Während TRAF2 wichtig für die Rekrutierung des Inhibitors des κ B-Kinasekomplexes (IKK) an den TNF-R1-Signalkomplex ist, aktiviert RIP die Kinasen des IKK-Komplexes (Devin *et al.*, 2000). Der IKK setzt sich aus zwei katalytischen (IKK α und IKK β), einer regulatorischen Untereinheit (IKK γ /NEMO) (Übersicht in Karin und Delhase, 2000) und einem Homodimer des Hitzeschockproteins-90 (Hsp90) sowie zwei oder drei Molekülen des Hsp90-assoziierten cdc37 Proteins (Chen *et al.*, 2002) zusammen. Für IKK γ wurde eine direkte Interaktion mit der Intermediär-Domäne von RIP beschrieben (Zhang *et al.*, 2000), wodurch eine direkte Regulation der I κ B-Degradation ermöglicht wird. Durch die Generation von TRAF-2-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass dieses für die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung

redundant ist (Yeh *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997), wohingegen es für die Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinasen/Jun-N-terminalen Kinasen (SAPK/JNK) jedoch essentiell ist. Die Aktivität des IKK führt letztendlich zur Phosphorylierungs-abhängigen Ubiquitinierung und Degradation des I κ B (Inhibitor- κ B) durch das 26S-Proteasom (Malinin *et al.*, 1997; Regnier *et al.*, 1997; Didonato *et al.*, 1997; Mercurio *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997). Hierdurch wird der im Zytosol zurückgehaltene heterodimere Komplex des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p50/p65) freigesetzt, der nach seiner Kerntranslokation NF- κ B-abhängige Gene induziert. Hierzu zählen neben vielen Genen, die im Rahmen immunologischer Abwehrmechanismen exprimiert werden (hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Chemokine, Leukozyten Adhäsionsmoleküle), auch sogenannte protektive Gene, deren Expression einem induzierten Zelltod entgegenwirken (Baeuerle und Baltimore, 1996; Wallach *et al.*, 1999).

1.9 TNF-vermittelte Nekrose

Obwohl Apoptose und Nekrose völlig verschiedene morphologische und biochemische Merkmale zeigen, können sie doch von denselben Stimuli aktiviert werden. Es existieren eine Vielzahl von Stimuli, die in der Lage sind, sowohl Apoptose als auch Nekrose zu initiieren. Der entscheidende Faktor scheint dabei die Verfügbarkeit von Caspasen zu sein, da Todesrezeptoren in Abwesenheit von Caspasen Nekrose oder nekrose-ähnlichen Zelltod induzieren können. Anti-Fas induziert in L929sAhFas-Zellen Apoptose, die durch eine Vorbehandlung mit dem Breitband-Caspaseinhibitor zVAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone) blockiert werden kann. Die Zellen sterben dennoch nekrotisch. Auf diese Weise kann also nekrotischer Zelltod ebenfalls durch den Fas-Rezeptor ausgelöst werden. Der Tumor Nekrose Faktor initiiert in derselben Zelllinie einen nekrotischen Signalweg, wobei aus unbekanntem Gründen auf die Verfügbarkeit der Apoptosemaschinerie verzichtet wird (Vercammen *et al.*, 1997). Genau wie der Vorgang der Apoptose wird der nekrotische Signalweg durch die Trimerisierung des TNF-R1 eingeleitet. Dagegen verstärkt die Zugabe von zVAD oder eine Überexpression von CrmA, einen viralen Inhibitor von Caspase-1 und -8, die TNF-induzierte Nekrose in L929sAhFas-Zellen (Vercammen *et al.*, 1998). Zudem spielen Sauerstoffradikale, deren Bildung durch TNF induziert wird, eine wichtige Rolle während der TNF-induzierten Nekrose, da durch die Zugabe von butyliertem Hydroxyanisol (BHA), einem Sauerstoffradikalfänger, der

nekrotische Zelltod blockiert werden kann (Goossens *et al.*, 1995; Vercammen *et al.*, 1998). Ebenso sind andere Proteasen als Caspasen in den Todesrezeptor-induzierten Signalweg zur Nekrose involviert. Verschiedene Serinproteaseinhibitoren, wie z. B. N-tosyl-L-phenylalanine-chloromethylketon, sind in der Lage, nekrotischen Zelltod zu blockieren, der sowohl durch TNF als auch in Kombination mit zVAD induziert wurde (Vercammen *et al.*, 1997, 1998). In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass zytosolische Calpaine an der Ausführung des nekrotischen Zelltods beteiligt sein können. Desweiteren spielt die lysosomale Protease Cathepsin D eine entscheidene Rolle in dem anti-Fas- und Interferon- γ -vermittelten Zelltod (Deiss *et al.*, 1996). Andere Studien zeigten, dass in Jurkat-Zellen eine verstärkte Oligomerisierung von FADD zusammen mit zVAD oder einer Defizienz für Caspase-8 zu einem nekrotischen Zelltod führt (Kawahara *et al.*, 1998). Zusätzlich sensibilisiert eine Überexpression einer dominant-negativen Form von FADD, die nur aus der Todesdomäne besteht, TNF-resistente U937- oder NIH3T3-Zellen gegenüber dem TNF-induzierten nekrotischen Zelltod (Khwaja and Tatton, 1999). Ebenso kann eine TNF-Stimulation unter gleichzeitiger Zugabe von zVAD NIH3T3-Zellen sensibilisieren und zu einer nekrotischen Form des Zelltods führen, die im folgenden als nekrotisch-ähnlicher programmierter Zelltod (NPZ) bezeichnet wird (Lüschen *et al.*, 2000).

Durch diese Vorarbeiten (Lüschen *et al.*, 2000) hat sich herausgestellt, dass die Zellzyklus-Progression eine wichtige Rolle bei diesem Sensibilisierungseffekt spielt. So zeigte sich, dass die Zellen gegenüber einer TNF/zVAD-Behandlung resistenter waren, wenn mehr Zellen infolge einer höheren Zelldichte in der G0/G1-Phase vorlagen. Im Gegensatz dazu hatte die Zelldichte und eine damit im Zusammenhang stehende Einschränkung der Zellen auf die G0/G1-Phase keinen Einfluss auf eine TNF/Cycloheximid-vermittelte Apoptose. Weiterhin wurde beschrieben, dass NIH3T3-Zellen, die drei Tage in serumarmen Medium (0,5 % FCS) gehalten wurden, vollständig vor der TNF/zVAD-induzierten Zytotoxizität geschützt werden konnten. Eine TNF/Cycloheximid-initiierte Apoptose konnte jedoch nicht durch einen Serumentzug inhibiert werden. Desweiteren waren NIH3T3-Zellen, die durch Doppel-Thymidinblock in der G1/S-Phase arretiert wurden, weit weniger sensitiv gegenüber einer TNF/zVAD-Behandlung als Kontrollzellen oder Zellen, die mit TNF/Cycloheximid behandelt wurden.

Abschließend konnte in Zeitkinetikexperimenten mit NIH3T3-Zellen, die mit TNF und zVAD kostimuliert wurden, eine Ansammlung von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus beobachtet werden, bevor ein massiver Zelltod der Zellen auftrat. Dieser Effekt konnte wiederum nicht bei Zellen festgestellt werden, die mit dem klassischen Apoptosestimulus

TNF/Cycloheximid behandelt wurden. Diese Ergebnisse zusammengenommen ließen vermuten, dass die Zellen den Zellzyklus durchlaufen müssen bis sie die G2/M-Phase erreichen, in der sie dann arretiert werden. Dies könnte kausal mit der beobachteten Sensibilisierung der Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von TNF in Kombination mit zVAD zusammenhängen. Der Zellzyklus wird gesteuert durch die Aktivität der Cyclin-CDK-Komplexe, die wiederum selbst über eine Vielzahl von Inhibitoren reguliert werden. Die Arbeitsgruppe Sabine Adam hatte begonnen zu untersuchen, welcher molekulare Mechanismus der beobachteten G2/M-Verzögerung zugrunde liegt. Dazu führte sie mehrere Immunoblot-Analysen mit Lysaten von NIH3T3-Zellen durch, die zu unterschiedlichen Zeiten mit TNF/zVAD kostimuliert worden waren. Dabei wurden spezifische Antikörper gegen die verschiedensten Zellzyklus-regulierenden Proteine eingesetzt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in den Expressionsniveaus der Cycline A, B, D1 und G2, der cyclin-abhängigen Kinase cdc2 (cdk1) und cdk2, der Cdk-Inhibitoren GADD45 und p27^{Kip1}, der Cdk-Phosphatase cdc25A, pRB oder phospho-pRB, p53, oder den apoptose-regulierenden Proteinen Bcl-2 und Bax nachgewiesen werden.

1.10 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der molekulare Mechanismen der G2/M-Arretierung und dessen Bedeutung für den nekrotisch-ähnlichen programmierten Zelltod (NPZ) untersucht werden. Desweiteren sollte geklärt werden, über welchen alternativen Signalweg der NPZ ausgelöst wird, und ob dieser Zelltod durch verschiedene pharmakologische Substanzen verstärkt oder inhibiert werden kann.

Schließlich sollte das Protein cFLIP (Casper, I-FLICE, FLAME, CASH, CLARP) in seiner Funktion als mögliches Schaltermolekül zwischen Proliferation und Zelltod charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt	DNA Sequenzer 373
BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	FACSCalibur Analyser, 100 mm-Zellkulturschalen und Zellkulturplatten mit 12 Kavitäten
Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA	Szintillationszähler (LS 6000 LL)
Biometra, Göttingen	Thermocycler Trio Thermoblock, Standard Power Pack P25
Bio Rad, München	Geltrockner Modell 583, Mini Trans-Blot Transfer Cell, Gene Pulser, Photometer Smart Spec 3000, Elektroporationsküvetten, Mini-PROTEAN II, Power Pac 300, Gelelektrophoresekammern, (Mini) Sub Cell Pipetten
Gilson, Middleton, USA	Tischzentrifuge (5417C), Kühlzentrifuge (5417R), Thermomixer 5436, Eppendorf-Reaktionsgefäße, Spannungsgerät Power Pac 300
Eppendorf, Hamburg	Biomax und X-OMAT-AR Röntgenfilme
Eastman Kodak Comp., USA	Zellkulturinkubator
Forma Scientific Inc., Marietta, USA	Zellkulturschalen mit 6 Kavitäten, 50 ml- und 10 ml Röhrchen
Greiner bio-one, Frickenhausen	HORIZON 58, HORIZON 11•14 Agarosegelelektrophoresekammern
Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe	LaminAir HB 2448K, Megafuge 1.0, Minifuge RF
Heraeus, Osterode	Fluoroskan II Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät
Labsystems, Frankfurt	Porablot-NCL (Porenweite 0,45 µM)
Macherey und Nagel, Düren	Objektträger, Deckgläschen
Menzel Gläser	Personal Densitometer
Molecular Dynamics	

Nunc, Nalge Nunc Int., Dänemark	Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten mit sechs, zwölf und sechsundneunzig Kavitäten
Raytest, Straubenhardt, Bremen	Phosphoimager Fujix BAS 1000
Sarstedt, Nümbrecht	15 ml Spitzbodenröhrchen, Serologische Pipetten, Pipettenspitzen, Küvetten, 45-µm Filter
Schleicher & Schüll, Dassel	Gel Blotting Papier GB002
Stratagene, La Jolla, USA	UV Stratalinker 2400
Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Sunrise Mikrotiterplatten-Photometer
Zeiss, Oberkochen	Axioskop Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 135 Lichtmikroskop, Zeiss 510 konfokales Laser Scanning Mikroskop

2.2 Chemikalien und Reagenzien

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

Alexis, Grünberg	Bafilomycin A1
Amersham Life Science, Braunschweig	ECL-Detektions-Kit, Protein-Molekulargewichtsstandard, Big-Dye Terminator Kit, G-Sepharose, ³⁵ [S]-Methionin, [γ - ³³ P]-dATP
Amresco, Ohio, USA	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)
Bachem, Heidelberg	zVAD-fmk
BD Biosciences, USA	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt
Biochrom KG, Berlin	L-Glutamin, Fötale Kälberserum, Trypsin/EDTA, PBS, Penicillin G, Streptomycin
Biomol, Hamburg	Deoxynukleotid Set

Boehringer Mannheim	Restriktionsenzyme, Klenow-Polymerase, Protease-Inhibitor-Mix Complete TM
Bio Rad, München	TEMED, Nitrozellulosemembran 0,45 µM, Molekulargewichtsstandard (prestained low range)
Fluka, Buchs, Schweiz	Nonidet-P40, Natriumvanadat
Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Restriktionsenzyme, Agarose, 100 bp DNA-Längenstandard, Geneticin, Lipofectamin-Reagenz, OptiMEM Medium, DNA-Polymerase, T4 DNA Ligase, Restriktionsenzyme, 100 bp DNA-Längenstandard, Protein-Massenstandard, Lipofectamin TM 2000, Oligofectamin TM , OptiMEM Medium, Agarose, DMEM w/o HEPES Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Zellkulturmedium,
New England Biolabs GmbH, Frankfurt	Restriktionsenzyme
Pierce Biotechnology, München	BCA Proteinbestimmungs-Reagenz und BSA, Coomassie Proteinbestimmungs-Reagenz
Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden	γ-Bind G-Sepharose
Promega GmbH, Mannheim	TNT [®] Coupled Reticulocyte Lysate System, Luciferase Assay System Kit
Qiagen, Hilden	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, DyeEx 2.0 Spin Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN Plasmid Kits, RNaseA
Riedel de Haen, Seelze	Methanol
Roche, Basel, Schweiz	Histon H1, ATP
Roth, Karlsruhe	HEPES
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1 40%), Trypan Blue Staining
TIB MolBiol, Berlin	Sequenzierprimer, Oligonukleotide für PCR

2.3 Biologische Reagenzien

Rekombinantes, humanes TNF (hTNF, spezifische Aktivität 5×10^7 Einheiten/mg) wurde von Dr. G. Adolf (Bender Med Systems, Wien) zur Verfügung gestellt.

Primärantikörper:

Alexis, Grünberg	Anti-FLIP Monoklonaler Antikörper (DAVE 2)
BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg	Maus-anti-p21 Monoklonaler Antikörper, Maus-anti-p27 ^{Kip1} Monoklonaler Antikörper, Cdk2-Antikörper, Anti-PARP Monoklonaler Antikörper
CellSignaling, Beverly, USA	Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Polyklonaler Antikörper
DPC	Antikörper gegen das Parathyroidhormon
Sigma, Deisenhofen	Anti-Flag M5 Monoklonaler Antikörper

Sekundärantikörper:

Jackson ImmunoResearch Lab. USA	Peroxidase-gekoppelter Kaninchen Anti-Maus IgG + IgM Antikörper, Peroxidase-gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper, Peroxidase-gekoppelter Ziege Anti-Ratte IgG Antikörper, fluoreszierender FITC-konjugierter Ziege Anti-Maus IgM Antikörper
Molecular Probes	Alexa Fluor 488 Ziege Anti-Maus IgG Antikörper

2.4 Vektoren und Plasmide

Sämtliche molekularbiologische Arbeiten wurden nach Standardprotokollen (Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1989) durchgeführt.

Die cDNA, die für das murine p21^{WAF/Cip1} (mp21^{WAF/Cip1}) kodiert, wurde mit Hilfe einer RT-PCR amplifiziert (Primer: 5'-GTGTTTCAGCCACAGCGACCATGTC-3' und 5'-AAGACACACAGAGTGAGGGCTAAGG-3') und in den Expressionsvektor pRK5 kloniert.

Die cDNA, die für das humane p21^{WAF/Cip1} (hp21^{WAF/Cip1}) kodiert, wurde von Dr. L Hengst gestellt, mittels PCR amplifiziert, (Primer: 5'-CTCGAATTCATGTCAGAACCGGCT-3' und 5'-CTCTCTAGATTAGGGCTTCCTCTT-3') und in den Expressionsvektor pRK5 kloniert.

Die eukaryotischen Expressionsplasmide für Caspase-3 und Caspase-8 wurden schon vorher beschrieben (Adam-Klages *et al.*, 1998).

Die cDNA, die für die lange Form von cFLIP, FLIP_(L), kodiert, wurde von Dave Goeddel zur Verfügung gestellt (Hong-Bing Shu *et al.*, 1997). Aus diesem wurde durch einen BamH I-Restriktionsverdau und anschließender Religation das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Flip_(s) hergestellt. Dabei wurde die caspase-ähnliche Domäne aus dem FLIP_(L) entfernt. Die DNA des so generierten, artifiziellen FLIP_(s) war ein paar Nukleotide länger als die DNA der natürlichen Form von FLIP_(s).

2.5 Zelllinien und Zellkultur

Alle Zelllinien wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen im Inkubator bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturflaschen oder -schalen gehalten und alle 2-3 Tage subkultiviert. Die Kulturmedien enthielten, wenn nicht anders angegeben, 10 % v/v fötales Kälberserum (FCS), je 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin und 0,5 % v/v einer β-Mercaptoethanol-Lösung (0,07% v/v in 0,9 % PBS w/v) und 10 mM Glutamin. Die verwendeten Zelllinien NIH3T3 (murine Fibroblastenlinie), HeLa (humane Zervixadenokarzinomzelllinie), L929 (murine Fibrosarkomzelllinie) und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK 293 wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, USA) bezogen. Die Zellen für die Durchführung der stabilen Transfektion wurden zum einem von Wulf Schneider (GP+E86) und zum anderen von Hendrik Ungefroren (Hek293T) zur Verfügung gestellt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in FCS mit 10 % v/v DMSO resuspendiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Für die Versuchsansätze wurden die Zellen am Tag vorher in der angegebenen Zelldichte in

Zellkulturschalen ausgesät und mit den Reagenzien (Zytokinen, Agonisten oder Inhibitoren) in den beschriebenen Konzentrationen stimuliert.

2.6 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien mit Expressionsvektoren mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Um Proteine transient zu exprimieren, wurden NIH3T3- oder HEK 293-Zellen in Anlehnung an Protokolle nach Jordan (Jordan *et al.*, 1996) mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen in Primärkulturschalen in DMEM ohne HEPES kultiviert und mit insgesamt 10 µg Plasmid-DNA/100 mm Zellkulturschale transfiziert. Dazu wurden jeweils 1 µg DNA für jedes zu exprimierendes Protein zusammen mit der Leervektor-DNA in einem Volumen von 500 µl 250 mM CaCl₂ angesetzt. Dieser Ansatz wurde unter permanentem Mischen in 500 µl eines zweifach konzentrierten HBS-Puffers (140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7.17) eingetroppt. Die Suspension der dabei entstandenen Calcium-DNA-Komplexe wurde tropfenweise dem Medium in der Zellkulturschale zugefügt. Wie nachfolgend in den einzelnen Versuchen beschrieben, wurden die transfizierten Zellen nach einer gewissen Expressionszeit für weitere Versuche aufgearbeitet oder weiterbehandelt.

2.7 Stimulation von Zellen

Die Zellen wurden am Tag vor der Stimulation ausgesät und direkt in den Zellkulturschalen durch Zugabe von Zytokinen, agonistischen Antikörpern, Inhibitoren oder anderen Agenzien behandelt. Ein Mediumwechsel erfolgte nur bei Versuchen, in denen die Zellen 2-3 Tage lang unter Serumangelbedingungen kultiviert wurden sowie in den jeweiligen Parallelkulturen.

2.8 Präparation von zellulären Extrakten

Für die Extraktion von löslichen Proteinen aus den Zellen wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und mit den durch Trypsin/EDTA-Lösung abgelösten adhären Zellen vereinigt. Nach zweimaligen Waschen mit kaltem PBS wurden die sedimentierten Zellen im jeweiligen

Lysepuffer resuspendiert. Nach Kurzzeitstimulation wurden die adhärenen Zellen auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und durch Abkratzen mit Hilfe eines Zellkulturschabers direkt in einem geringen Volumen des jeweiligen Lysepuffers aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mittels Coomassie-Reagenz oder alternativ durch BCA-Reagenz photometrisch bei einer Wellenlänge von entweder 595 nm oder 570 nm bestimmt und anhand von BSA-Eichgeraden berechnet. Die Lysate wurden bei -80 °C gelagert, sofern diese nicht sofort in einem weiterführenden Versuch eingesetzt wurden.

2.8.1 Lysate für die Immunoblotanalyse (TNE-Lysate)

Die gewaschenen, sedimentierten Zellen wurden in TNE-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % v/v NP-40, 2 mM EDTA) mit frisch zugefügtem Proteaseinhibitor-Mix Complete™ resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Lyse auf Eis wurden durch die Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 10 min die löslichen Proteine von unlöslichen Membranbestandteilen getrennt. Die Überstände wurden überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Immunoblotanalyse enthielt der Lysepuffer zur Inhibition von Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphatasen zusätzlich 1 µM NaVO₄ und 10 mM NaF.

2.8.2 Lysate zu Isolierung aktiver Kinase

Die gewaschenen, sedimentierten Zellen wurden in PufferA (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % v/v NP-40, 20 mM NaF, 1 M Na₃VO₄) mit frisch zugefügtem Proteaseinhibitor-Mix Complete™ resuspendiert und für 15 min zur Lyse auf Eis gestellt. Die unlöslichen Membranbestandteile wurden durch die Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C in 15 min von den löslichen Proteinen abgetrennt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die aktiven Kinasen präzipitiert.

2.9 Denaturierende Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotanalyse

Die Zell-Lysate wurden nach Standardmethode (Lämmli, 1970) im SDS-Polyacrylamidgel bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel (Minigelsystem) separiert. Hierzu wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 µg Protein eingesetzt. Die Volumina der Lysate wurden durch Zugabe des jeweiligen Lysepuffers angeglichen. Die Proteine wurden durch Zugabe von zweifach bzw. vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 62,5 mM Tris, pH 6,8, 2 % w/v SDS, 10 % v/v Glycerin, 3 % v/v β-Mercaptoethanol, 0,1 % w/v Bromphenolblau) und fünfminütigem Kochen vor dem Beladen der Gele denaturiert. Die Auflösung der Elektrophorese wird durch ein diskontinuierliches Puffersystem gesteigert. Es wurden 6 %ige Sammelgele sowie Trenngele einer Konzentration von 10 bis 18 %, je nach Größe des zu analysierenden Proteins, benutzt. Die separierten Proben wurden im Nassblotverfahren (Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol) (Tobwin *et al.*, 1979) unter Kühlung in 1 h durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V auf Nitrozellulosemembran transferiert. Durch reversible Färbung des Nitrozellulosefilters mit Ponceau S-Lösung (0,2 % w/v in 3 % w/v Trichloressigsäure) wurde die Gleichmäßigkeit des Transfers kontrolliert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 30 minütige Inkubation der Membranen in PBS mit 0,1 % v/v Tween-20 (PBST), dem 5 % w/v Trockenmilchpulver oder BSA zugefügt wurden, blockiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Filter für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit in PBST verdünntem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden sie, nachdem der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt worden war, mit den Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:10.000 in PBST) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunkomplexe wurden nach erneutem Waschen mittels ECL-Reagenz nach Angaben des Herstellers detektiert und durch Belichtung von Röntgenfilmen visualisiert.

2.10 Immunpräzipitation aktiver Kinasen und *in vitro*-Bestimmung der Kinase-Aktivität

Die Aktivität der Cdk2-Kinase kann anhand ihrer Fähigkeit, Histon H1 zu phosphorylieren, gemessen werden. Die aktive Kinase wurde, wie unter 2.8.2 beschrieben, aus hergestellten Zell-Lysaten präzipitiert. Dazu wurden 500 µg Gesamtprotein mit 1,5 µg Cdk2-Antikörper

über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit 20 µl Protein-G-Sepharose präzipitiert und danach dreimal mit kaltem Lysepuffer und zweimal mit kaltem Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) gewaschen. Die Phosphorylierungsreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 5 µg Histon H1, 10 µCi ³³[P]-ATP und 30 µl Kinase-Puffer bei 30 °C gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Reaktionsansätze mit 10 µl vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und dadurch abgestoppt. Nach fünfminütigem Kochen wurde die Protein-G-Sepharose durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C in 5 min abgetrennt und die Zentrifugationsüberstände über ein SDS-PA-Gel separiert. Das Gel wurde zur Entfernung von überschüssiger Radioaktivität und Fixierung in 10 % v/v Essigsäure geschwenkt. Anschließend wurde es einige Male in Wasser gewaschen und im Gelrockner getrocknet. Das phosphorylierte, radioaktive Histon H1 wurde daraufhin autoradiographisch mit Hilfe des Phosphoimagers oder alternativ durch Belichtung von Röntgenfilmen detektiert.

2.11 *In vitro*-Translation zur Synthese radioaktiv markierter

p21-Konstrukte und *in vitro*-Verdau der markierten Proteine

Für eine *in vitro*-Expression von humanem und murinem p21^{WAF/Cip1} wurden die cDNAs mittels TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System nach Angaben des Herstellers unter Verwendung einer TNT SP6 Polymerase transkribiert und durch Einbau von ³⁵[S]-Methionin bei der Translation radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierten p21^{WAF/Cip1}-Proteine wurden entweder sofort in einem *in vitro*-Verdau mit rekombinanter aktiver Caspase-3 inkubiert oder vorher unter Verwendung eines p21^{WAF/Cip1}-Antikörpers und Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert. Das Auftreten von Spaltprodukten des p21^{WAF/Cip1}-Proteins wurde durch Separation der Ansätze in einem SDS-PA-Gel und mit einem anschließenden Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF/Cip1} untersucht. Das Gel wurde zur Entfernung von überschüssiger Radioaktivität und Fixierung in 10 % v/v Essigsäure geschwenkt. Anschließend wurde es einige Male in Wasser gewaschen und im Gelrockner getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden daraufhin autoradiographisch mit Hilfe des Phosphoimagers oder alternativ durch Belichtung von Röntgenfilmen detektiert.

2.12 Immunfluoreszenzfärbung des p21^{WAF1/Cip1}-Proteins und Analyse mittels konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop

NIH3T3-Zellen wurden auf Deckgläschen, die vorher für 45 min mit Poly-L-Lysine behandelt worden waren, ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie unter den Versuchen angegeben stimuliert. Danach wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und für 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Nachdem die Deckgläschen dann dreimal mit TBS (10 mM Tris/HCl, pH 7.6, 140 mM NaCl) gewaschen worden waren, wurden die Zellen mit RNaseA (10 ng/ml in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Daran schloss sich wieder dreimaliges Waschen mit TBS an. Die Zellen wurden daraufhin mit dem monoklonalen Antikörper (50 µg/ml), der gegen p21^{WAF1/Cip1} gerichtet ist, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde wiederum dreimal mit TBS gewaschen. Die NIH3T3-Zellen wurden dann mit einer 1:1000 Verdünnung des Alexa Fluor 488-markierten Ziege-anti-Maus Sekundärantikörpers für eine Stunde bei 37 °C sowie mit Propidiumjodid (7,5 µg/ml) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen wiederum dreimal mit TBS und einmal in Wasser gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 10-prozentigem Glycerin benetzt und die Deckgläschen auf Objektträgern befestigt. Die Expression von p21^{WAF1/Cip1} wurde mit Hilfe eines Zeiss 510 konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop analysiert.

2.13 Koimmunpräzipitation von p21^{WAF1/Cip1} mit cdk2

500 µg der aus adhärenenten Zellen gewonnenen Lysate (vgl. 2.8) wurden mit dem spezifischen Antikörper gegen p21^{WAF1/Cip1} über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Volumina der Lysate wurden durch Zugabe des jeweiligen Lysepuffers angeglichen. Am nächsten Tag wurde für eine Stunde Protein-G-Sepharose zu den Reaktionsansätzen gegeben und bei 4 °C unter leichten Bewegungen inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Sepharose abzentrifugiert, dreimal mit TNE-Puffer gewaschen und am Ende mit SDS-Auftragspuffer versetzt. Nach 5-minütigem Kochen der Reaktionsansätze wurden die Überstände mit Hilfe einer denaturierenden Protein-Gelelektrophorese (12 % SDS-PAGE) und einem anschließenden Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen cdk2-Antikörpers analysiert.

2.14 Antisense-Inhibition durch Morpholino Oligonukleotide

Das Antisense Morpholino Oligonukleotid und das Reagenz EPEI (ethoxyliertes Polyethylenimin) wurden von der Firma GeneTools (Corvallis, USA) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenz des Antisense p21^{WAF1/Cip1} Morpholino Oligonukleotids lautete wie folgt: 5`-GTCGGACATCACCAGGATTGGACAT-3`.

2.15 Transkriptionelle Inhibition durch siRNA

Die siRNA-Oligonukleotide sowie das siRNA-Transfektionsreagenz wurden von der Firma Qiagen-Xeragon (Germantown, USA) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Sequenzen der siRNA-Oligonukleotide zur transskriptionellen Inhibition des Proteins FLIP lauteten wie folgt: r(CCCUCACCUUGGUUUCUGAU)D(TT) und r(AUCAGAAACCAGGUGAGGG)d(TT) für FLIP1; r(GGGAUUACACAGGCAGAGG)d(TT) und r(CCUCUGCCUGUGUAAUCCC)d(TT) für FLIP2; r(UACUCUCCAGGCUUCGCUC)d(TT) und r(GAGCGAAGCCUGGAGAGUA)d(TT) für FLIP3. Alternativ wurden die siRNA-Oligonukleotide mittels Oligofectamin von der Firma Gibco Invitrogen GmbH (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

2.16 Messung der NF-κB-Aktivität nach transienter Transfektion

Das Luciferase-Assay System mit den zugehörigen Puffern und Reagenzien wurde von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen. Die Messung der NF-κB-Aktivität mit Hilfe des Luciferase-Assay Systems erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Zellen, die wie unter den entsprechenden Versuchen angegeben transfiziert worden waren, zusätzlich mit dem Expressionsvektor, der für das Luciferase-Gen unter Kontrolle eines NF-κB-abhängigen Promoters kodiert, mittels Lipofectamin2000 nach Angaben des Herstellers kotransfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die so transfizierten Zellen, wie ebenfalls unter den Versuchen angegeben, stimuliert. Im Anschluss daran wurde das Medium verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem Lysepuffer CCLR (Zusammensetzung siehe Hersteller) versetzt und abgeschabt. Die Lysate

wurden bei 14.000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je nach Versuchsansatz wurden entweder 20 µl Lysat oder gleiche Mengen an Protein mit 100 µl Luciferase Assay Reagenz (LAR) versetzt und das emittierte Licht in einem Luminometer der Firma Berthold Detection Systems gemessen. Das emittierte Licht ist abhängig von der Luciferase-Aktivität, über die indirekt auf die NF-κB-Aktivität geschlossen werden kann. Die Reste der Lysate wurden bei - 20 °C eingefroren.

2.17 Toxizitätsanalyse durch Propidiumjodidfärbung und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die am Vortag ausgesäten Zellen wurden mittels Lipofectamin2000 nach Angaben des Herstellers mit den unter den Versuchen angegebenen Expressionsvektoren transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen, wie ebenfalls unter den Versuchen angegeben, stimuliert. Die Zellen des Kulturüberstandes wurden mit den durch Trypsin/EDTA abgelösten adhären Zellen vereinigt und durch Zentrifugation bei 1800 rpm bei 4 °C für 5 min gesammelt. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen in 100 µl PBS/5 mM EDTA (PBS/EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde zur Anfärbung der DNA das gleiche Volumen Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) zugegeben und durch Bestimmung der pro Zelle eingelagerten Menge Propidiumjodids durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass nur tote Zellen Propidiumjodid auf Grund ihrer auseinander gebrochenen Membran aufnehmen können. Die Menge an positiven Zellen wurde als Maß für die Zytotoxizität gemessen.

2.18 Stabile Transfektion mit einem retroviralen Transfektionssystem

Die am Vortag ausgesäten GP+E86-Zellen wurden mittels Lipofectamin2000 nach Angaben des Herstellers mit den unter den Versuchen angegebenen Expressionsvektoren transfiziert und für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurden weitere GP+E86-Zellen ausgesät und für 24 h mit Tunicamycin (100 ng/ml) versetzt. Der Überstand der transfizierten GP+E86-Zellen wurde über einen 45 µm-Filter sterilfiltriert und dann auf Eis mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt. Anschließend erfolgte die Superinfektion, indem die Tunicamycin-versetzten Zellen mit dem Überstand überschichtet und für 90 min bei 37 °C inkubiert

wurden. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und zum Schluss den Zellen frisches Medium zugesetzt. Nach 24-48 h wurde mit der Selektion durch G418 (1mg/ml) begonnen. Die angewachsenen virus-produzierenden Zellen wurden 24 h vor der Abnahme des virushaltigen Überstandes auf eine sehr geringe Menge Medium gesetzt. Der Überstand der virus-produzierenden Zellen wurden über einen 45 µm-Filter sterilfiltriert und dann auf Eis mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt. Daraufhin erfolgte die Infektion der Zielzellen, indem diese mit dem Überstand überschichtet und für 90 min bei 37 °C inkubiert wurden. Dieser Vorgang wurde ebenfalls einmal wiederholt und zum Schluss den Zielzellen frisches Medium zugesetzt. Nach 24-48 h wurde mit der Selektion der Zielzellen durch Zugabe von G418 (500 µg/ml) begonnen. Der nicht verwendete Virusüberstand wurde bei -80 °C eingefroren.

In einem weiteren retroviralen Transfektionssystem wurden HEK293T-Zellen als Ausgangszellen ausgesät. Diese Zellen wurden ebenfalls mittels Lipofectamin2000 nach Angaben des Herstellers mit den unter den Versuchen angegebenen Expressionsvektoren transfiziert und für 48 h wachsen gelassen. Zwischendurch wurden die Zielzellen ausgesät und 48 h nach der Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem Überstand der HEK293T-Zellen infiziert. Der Überstand war vorher über einen 45 µm-Filter sterilfiltriert und dann auf Eis mit Polybrene (8 µg/ml) versetzt worden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde der Überstand abgesaugt und mit der Selektion begonnen. Im Laufe dieses Transfektionssystems wurde auf den Zwischenschritt der Superinfektion tunicamycin-versetzter Ausgangszellen verzichtet.

2.19 Nachweis der Expression des stabil transfizierten FLIP_(s)

500 µg der aus adhärennten Zellen gewonnenen Lysate wurden mit dem Flag-Antikörper M5 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Volumina der Lysate wurden durch Zugabe des jeweiligen Lysepuffers angeglichen. Am nächsten Tag wurde für eine Stunde Protein-G-Sepharose zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben und weiter bei 4 °C leicht bewegt. Im Anschluss wurden die Sepharose-Niederschläge fünfmal mit TNE-Puffer gewaschen und am Ende mit SDS-Auftragspuffer versetzt. Nach 5-minütigem Kochen der Reaktionsansätze wurden diese mit Hilfe einer denaturierenden Protein-Gelelektrophorese (12 % SDS-PAGE) und einem anschließenden Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen cFlip (Dave 2), der auch die kurze Form von cFLIP (FLIP_(s)) erkennt, weiter analysiert.

2.20 Messung der Erk-Aktivität nach stabiler Transfektion

Die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden für 24 h serumfreiem Medium ausgesetzt. Danach wurden die Zellen wie unter den Versuchen angegeben mit TNF stimuliert. Die gewaschenen Zellen wurden auf Eis mittels TNE-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % v/v NP-40, 2 mM EDTA) mit frisch zugefügtem Proteaseinhibitor-Mix Complete™ aus den Zellkulturschalen abgeschabt. Der Lysepuffer enthielt zur Inhibition von Phosphatasen zusätzlich 1 mM NaVO₄ und 10 mM NaF. Durch die Zentrifugation der Lysate bei 14.000 rpm, bei 4 °C für 10 min wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Membranbestandteilen getrennt. Die Überstände wurden überführt und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Durch Separation in einem SDS-PA-Gel und einem anschließenden Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Phospho-Erk (Phospho-p44/42 MAPK) wurden die Ansätze weiter analysiert.

2.21 Cathepsin D-Aktivitäts-Assay

Am Vortag ausgesäte NIH3T3-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder für 1 bis 4 h mit TNF zusammen mit zVAD stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Homogenisierungspuffer (40 mM HEPES 150 mM KCl, 0,05% NP-40, pH 7.4) durch Auf- und Abziehen mittels einer Mikrokanüle lysiert. Für die unter den Versuchen angegebene Zeit wurden 2 µg der zellulären Proteinlysate mit 50 ng Parathyroidhormone (PTH) in einem Volumen von 20 µl Reaktionspuffer (100 mM Na-Acetat, 100 mM KCl, pH 4.2) inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde zum Start der Reaktion in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben. Anschließend wurde die Reaktion beendet, indem das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt und dem Reaktionsgemisch Auftragspuffer zugegeben wurde. Die Ansätze wurden danach über ein SDS-PA-Gel separiert und unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen PTH in einem Immunoblot analysiert. Die Quantifizierung des gespaltenen PTH erfolgte durch eine 2D *laser-scanning* Dichtemesung. Abschließend wurde die Cathepsin D-Aktivität aus der Menge an PTH, die pro Stunde umgesetzt wurde, errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von p21^{WAF1/Cip1} während des TNF/zVAD-induzierten NPZs

3.1.1 Das Zellzyklusprotein p21^{WAF1/Cip1} wird in NIH3T3-Zellen aber nicht in HeLa-Zellen hochreguliert

Ein weiteres Molekül, welches einen G2/M-Block verursachen kann, ist der Cdk-Inhibitor p21^{WAF1/Cip1}, dessen Expression untersucht werden sollte. NIH3T3-Zellen wurden nach einer Stimulation mit TNF und gleichzeitiger Caspaseinhibition durch zVAD geerntet und lysiert. Die Lysate wurden dann unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF1/Cip1} in einem Immunoblot analysiert. Über eine Zeitkinetik von 0 bis 8 h konnte eine Hochregulation des Cdk-Inhibitors p21^{WAF1/Cip1} in den TNF/zVAD-stimulierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet werden. In den Zellen, die für 8 h mit TNF allein stimuliert wurden, war nur eine ganz leichte Steigerung der p21^{WAF1/Cip1}-Expression zu beobachten (Abb. 3). Eine p21^{WAF1/Cip1}-Expression war in den Zellen, die mit dem Apoptosestimulus TNF/Cycloheximid behandelt wurden, nicht zu detektieren, da in diesem Fall die Proteinsynthese durch das Cycloheximid blockiert wurde. Zur Kontrolle wurde mit den Lysaten ein weiterer Immunoblot durchgeführt. Es wurde dazu ein spezifischer Antikörper gegen einen weiteren Cdk-Inhibitor, das p27^{Kip1}-Protein, eingesetzt. Im Gegensatz zu der Hochregulierung von p21^{WAF1/Cip1} konnte keine Veränderung in der Expression von p27^{Kip1} in einem Zeitrahmen von 0 bis 8 h festgestellt werden (Abb. 3). Vielmehr wurde eine ganz leichte Herunterregulation von p27^{Kip1} beobachtet. In den Lysaten, die mit TNF/Cycloheximid behandelt worden waren, war ebenfalls auf Grund der Blockierung der Proteinsynthese eine Abnahme von p27^{Kip1} zu erkennen. Zum Vergleich wurde in HeLa-Zellen ebenfalls die Expression von p21^{WAF1/Cip1} und p27^{Kip1} nach einer TNF/zVAD-Stimulation mittels eines Immunoblots unter Verwendung der spezifischen Antikörper analysiert. HeLa-Zellen werden im Gegensatz zu NIH3T3-Zellen nicht sensibilisiert, sondern können eindeutig gegen eine TNF-initiierte Apoptose durch Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD geschützt werden. Über eine Zeitkinetik von 0 bis 8 h konnte weder eine Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} noch von p27^{Kip1} beobachtet werden (Abb. 3). Eine Behandlung mit dem klassischen Apoptosestimulus TNF/Cycloheximid führte wie auch schon bei den NIH3T3-Zellen zu einer starken Herunterregulation der zu detektierenden Proteine. p21^{WAF1/Cip1} reguliert die Progression des Zellzyklus an den Übergängen sowohl zwischen der G1- und S-Phase als auch zwischen der G2- und M-Phase, indem es die Cyclin-

Cdk-Komplexe inhibiert. Eine Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} könnte demzufolge eine Erklärung für den beschriebenen G2/M-Arrest sein.

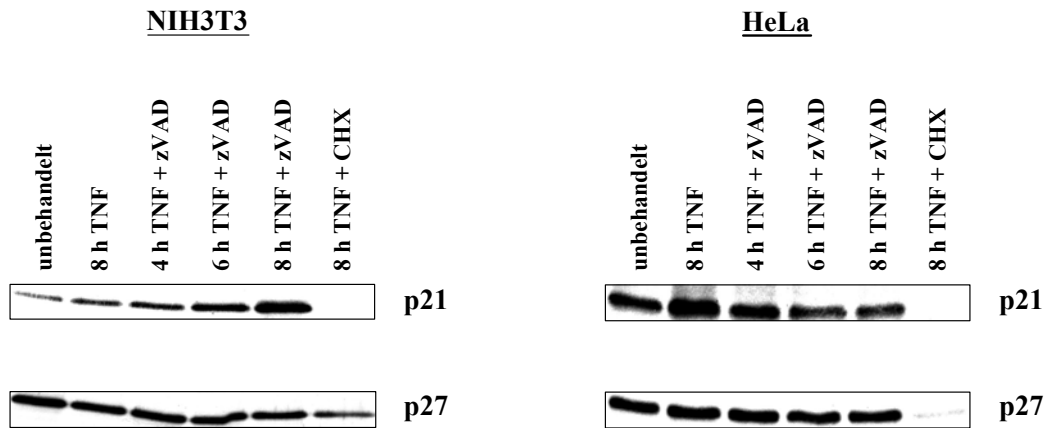


Abb. 3: Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} in NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit TNF (50 ng/ml) allein sowie zusammen entweder mit zVAD-fmk (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert und nach den angegebenen Zeiten geerntet. Die Expressionen von p21^{WAF1/Cip1} und p27^{Kip1} wurden in einem Immunoblot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert.

3.1.2 Die Lokalisation von p21^{WAF1/Cip1} während des TNF-induzierten NPZ in NIH3T3-Zellen

Damit das Protein p21^{WAF1/Cip1} seine Funktion als Cdk-Inhibitor korrekt ausüben kann, muss es im Zellkern vorliegen. Um zu überprüfen, ob p21^{WAF1/Cip1} während einer TNF-Stimulation bei gleichzeitiger Caspaseinhibition durch zVAD im Zellkern lokalisierbar ist und hochreguliert wird, wurde eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. NIH3T3-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) für 4 bis 8 h stimuliert. Die Expression von p21^{WAF1/Cip1} wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF1/Cip1} analysiert. In den unbehandelten Zellen sowie in den Zellen, die nur mit TNF behandelt worden waren, konnte p21^{WAF1/Cip1} in geringen Mengen nur im Zytoplasma nachgewiesen werden. Nur in wenigen Zellen war eine starke Expression von p21^{WAF1/Cip1} im Zellkern zu beobachten (Abb. 4: A und E). Die Zellen, die mit TNF/Cycloheximid stimuliert worden waren, zeigten zwar apoptotische Merkmale, wie z. B. apoptotische Körperchen, aber

keine Expression von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ (Abb. 4: F). Dagegen konnte in den TNF/zVAD-behandelten Zellen ein hoher Gehalt an $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ detektiert werden, wovon die weitaus größte Menge im Zellkern lokalisierbar war. Über den Zeitraum von 4 bis 8 h konnte eine starke Zunahme des Proteins $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ vor allem im Zellkern festgestellt werden (Abb. 4: B,C und D). Schließlich konnte in den toten Zellen, die infolge der TNF/zVAD-Behandlung nekrotisch gestorben sind, $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ nicht mehr nachgewiesen werden. Die Hochregulation von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ erfolgt demnach vor dem NPZ.

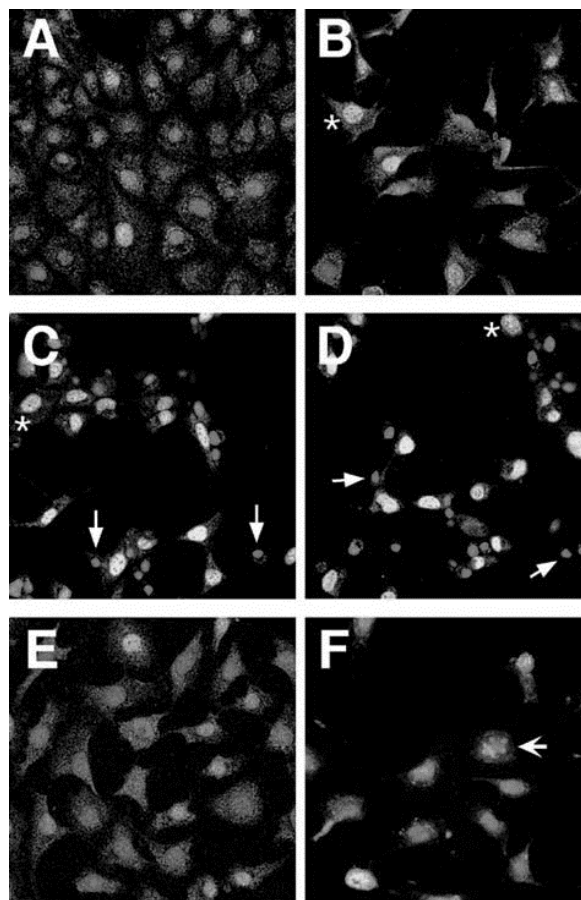


Abb. 4: Kernlokalisierung von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ während des TNF-induzierten NPZs. NIH3T3-Zellen blieben unbehandelt (A), wurden mit TNF/zVAD für 4 h (B), 6 h (C), 8 h (D), oder mit TNF allein (E) sowie mit TNF/Cycloheximid für 8 h (F) behandelt. Die Expression von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ wurde mit Hilfe einer Immunfärbung unter Verwendung eines spezifischen Antiköpers gegen $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ sichtbar gemacht. Der Zellkern wurde mit Propidiumjodid angefärbt. Die Sterne markieren Zellen mit normaler Morphologie. Die vollen Pfeile in den Bildern C und D zeigen Zellen, die den NPZ erleiden, was durch die Chromatin Kondensation zu erkennen ist. Die Pfeilspitze in Bild F zeigt eine apoptotische Zelle, was durch die zu beobachtende Kernfragmentierung belegt wurde.

3.1.3 P21^{WAF1/Cip1}, das während des TNF-induzierten NPZs hochreguliert wird, koimmunpräzipitiert mit cdk2

Während einer Stimulation mit TNF bei gleichzeitiger Inhibition der Caspaseaktivität konnte eine Zunahme der Expression des Cdk-Inhibitors p21^{WAF1/Cip1} in NIH3T3-Zellen beobachtet werden. Diese Hochregulation wurde in der Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des *Laser Scanning* Mikroskops bestätigt. Zudem konnte das Protein p21^{WAF1/Cip1} im Zellkern lokalisiert werden, wo es demzufolge seiner Funktion als Cdk-Inhibitor nachgehen kann.

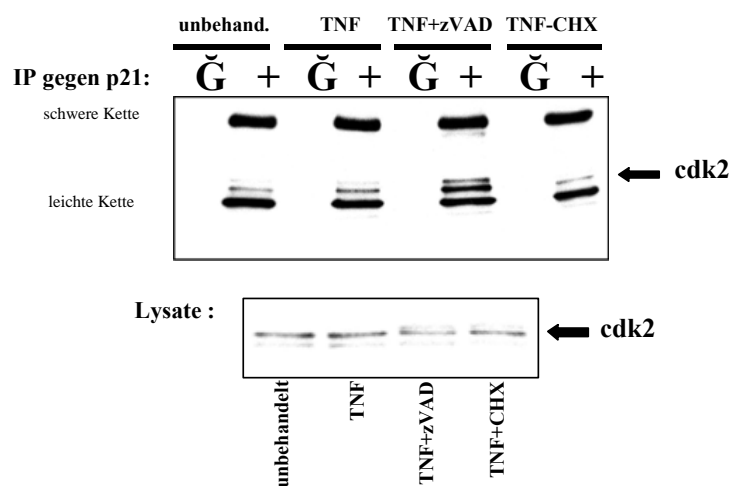


Abb. 5: Koimmunpräzipitation von hochreguliertem p21^{WAF1/Cip1} mit cdk2. NIH3T3-Zellen wurden für 8 h entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert. Die gewonnenen Lysate wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen p21^{WAF1/Cip1} inkubiert oder unbehandelt belassen. Das Koimmunpräzipitierte cdk2 wurde mit Hilfe eines Immunoblots unter Verwendung eines spezifischen Cdk2-Antikörpers nachgewiesen. Die schweren und leichten Ketten der immunpräzipitierenden Antikörper sind in der Abbildung ausgewiesen.

Es sollte nun getestet werden, ob p21^{WAF1/Cip1} mit cdk2 koimmunpräzipitiert. NIH3T3-Zellen wurden für 8 h mit TNF, TNF/zVAD oder TNF/Cycloheximid stimuliert. Die im Anschluss daran gewonnenen Lysate wurden ü. N. bei 4 °C entweder unbehandelt belassen oder mit einem spezifischen Antikörper gegen p21^{WAF1/Cip1} versetzt. Am nächsten Tag wurde den Reaktionsansätzen für eine Stunde Protein-G-Sepharose zugegeben, um so entstandene Antigen-Antikörper-Komplexe zu präzipitieren. In einem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen cdk2 wurde koimmunpräzipitiertes cdk2 detektiert. In den Lysaten, die nicht mit dem spezifischen Antikörper gegen p21^{WAF1/Cip1} inkubiert worden waren, konnte kein immunpräzipitiertes cdk2 festgestellt werden. Dagegen wurde in den

Lysaten, die mit dem p21^{WAF1/Cip1}-Antikörper versetzt worden waren, cdk2 koimmunpräzipitiert (Abb. 5). Den größten Gehalt an koimmunpräzipitierten cdk2 wiesen die Lysate auf, die vorher mit TNF und zVAD stimuliert worden waren, was auf eine erhöhte Expression von p21^{WAF1/Cip1} in diesen Lysaten schließen ließ.

3.1.4 Antisense Inhibition von p21^{WAF1/Cip1} verstärkt den TNF-induzierten NPZ

Um zu untersuchen, ob die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} die Ursache für den NPZ darstellt, sollte die Expression von p21^{WAF1/Cip1} durch die Methode der Antisense-Inhibition blockiert werden. Dazu wurden die NIH3T3-Zellen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Oligonukleotid-Lösungsreagenz (EPEI) inkubiert, welches ein kommerzielles Morpholino Oligonukleotid enthielt. Dessen Nukleotidsequenz war zu der Sequenz des p21^{WAF1/Cip1} komplementär. Zum Vergleich dazu wurden NIH3T3-Zellen nur mit dem Oligonukleotid-Lösungsreagenz (EPEI) ohne das komplementäre Oligonukleotidkonstrukt behandelt. Nachdem die Zellen für 8 und 16 h entweder unbehandelt belassen wurden oder mit TNF/zVAD stimuliert worden waren, wurde mit Hilfe eines Immunoblots unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF1/Cip1} dessen Expression analysiert (Abb. 6 A). Während das Lösungsreagenz keinen Effekt auf die Expression von p21^{WAF1/Cip1} aufwies, konnte eine eindeutige Herunterregulation von p21^{WAF1/Cip1} in den Reaktionsansätzen beobachtet werden, die mit dem Oligonukleotid inkubiert worden waren. Zudem war eine Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} in den Zellen, die mit TNF/zVAD stimuliert worden waren, nicht mehr festzustellen.

Desweiteren wurde untersucht, ob eine Herunterregulation von p21^{WAF1/Cip1} durch das komplementäre Oligonukleotid die TNF/zVAD-vermittelte Nekrose von NIH3T3-Zellen verändert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem Lösungsreagenz allein sowie mit dem Lösungsreagenz, das das Oligonukleotid enthielt, behandelt. Für 16 h wurden die Zellen dann entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. Genauso wie in den unbehandelten Zellen war in den Zellen, die mit TNF allein oder mit TNF/Cycloheximid stimuliert worden waren, nur eine leichte Steigerung des Zelltods in den Ansätzen mit dem komplementären Oligonukleotid zu beobachten. Überraschenderweise wurde der TNF/zVAD-induzierte NPZ nicht durch die

Vorinkubation mit dem komplementären Oligonukleotid blockiert, sondern vielmehr noch verstärkt (Abb. 6 B). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das verwendete Morpholino Oligonukleotid das $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ herunterreguliert. Weiterhin führt jedoch eine Herunterregulation von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ nicht zu einer Inhibition oder Verzögerung des NPZs, der in NIH3T3-Zellen durch TNF und zVAD vermittelt wird. Demzufolge scheinen die Hochregulation von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ und der begleitende G2/M-Arrest nicht die Ursache für den beobachteten Zelltod zu sein.

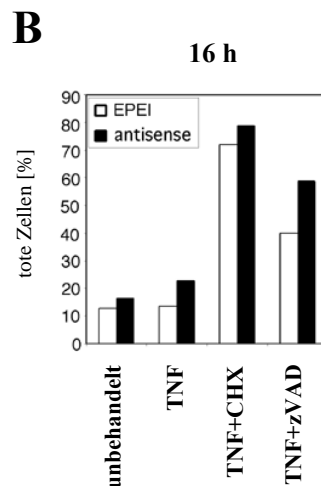
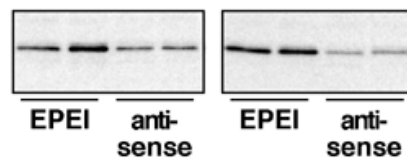


Abb. 6: Die Inhibition von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ durch komplementäres Oligonukleotid verstärkt den TNF-induzierten NPZ. (A) NIH3T3-Zellen wurden zunächst sowohl mit den Antisense- $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ Oligonukleotiden als auch zur Kontrolle mit Lösungsreagenz allein vorinkubiert. Danach wurden die NIH3T3-Zellen für 8 h oder 16 h entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μM) oder Cycloheximid (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und die Expression von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ mit Hilfe eines Immunoblots unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ analysiert. (B) Die NIH3T3-Zellen wurden genauso wie unter (A) beschrieben stimuliert. Danach wurden sie mit Propidiumjodid gefärbt und mittels der Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.5 Murines p21^{WAF1/Cip1} wird im Gegensatz zu humanem p21^{WAF1/Cip1} nicht durch Caspasen gespalten

Verschiedene Veröffentlichungen haben beschrieben, dass eine Spaltung von humanem p21^{WAF1/Cip1} durch Caspasen erfolgt. Als Erkennungssequenz, an der die Caspasen das humane p21^{WAF1/Cip1} spalten, wurde die Sequenz DHVD¹¹²L angegeben. (Levkau *et al.*, 1998; Gervais *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000). Wenn die Caspasen während einer TNF/zVAD-Behandlung jedoch inhibiert werden, würden diese für eine Spaltung von p21^{WAF1/Cip1} nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Folge könnte die beobachtete Ansammlung von p21^{WAF1/Cip1} während des TNF-induzierten NPZs sein. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem p21^{WAF1/Cip1} zeigte sich, dass sich die Sequenzen an der Caspasespaltstelle unterscheiden. Im Gegensatz zu der humanen Sequenz der Spaltstelle DHVD¹¹²L wies das murine p21^{WAF1/Cip1} mit der Abfolge DHVA¹¹⁰L eine andere Sequenz auf. Für Caspasen ist beschrieben, dass sie nach einem Aspartatrest spalten und somit entsprach die Sequenz der Spaltstelle des murinen p21^{WAF1/Cip1} nicht der klassischen Sequenz für Caspaseschnittstellen. Deshalb sollte überprüft werden, ob das murine p21^{WAF1/Cip1} trotzdem als Caspasesubstrat in Frage kam. Humanes p21^{WAF1/Cip1} mit einem HA-tag (hp21^{WAF1/Cip1}) und murines p21^{WAF1/Cip1} (mp21^{WAF1/Cip1}) wurden zusammen mit Caspase-3 oder Caspase-8 in HEK293 Zellen transient transfiziert. Mit Hilfe eines Immunoblots unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF1/Cip1} sollte das Auftreten möglicher Spaltprodukte von p21^{WAF1/Cip1} untersucht werden. Bei der Koexpression von Caspase-3 mit hp21^{WAF1/Cip1} konnte ein 6 kDa-großes Spaltprodukt beobachtet werden. Dagegen war bei der Koexpression von Caspase-8 mit hp21^{WAF1/Cip1} das Spaltsubstrat auf Grund einer beträchtlichen Spaltung nahezu nicht mehr festzustellen. Im Gegensatz dazu konnte weder bei der Koexpression von Caspase-3 noch von Caspase-8 mit mp21^{WAF1/Cip1} irgendein Spaltprodukt von mp21^{WAF1/Cip1} nachgewiesen werden. In einer kürzeren Exposition konnte ein weiteres Spaltprodukt entdeckt werden, das etwas kleiner war als das vollständige, mit dem HA-tag versehene hp21^{WAF1/Cip1} und wahrscheinlich durch eine Spaltung innerhalb des HA-tag zustande kam (Abb. 7.1).

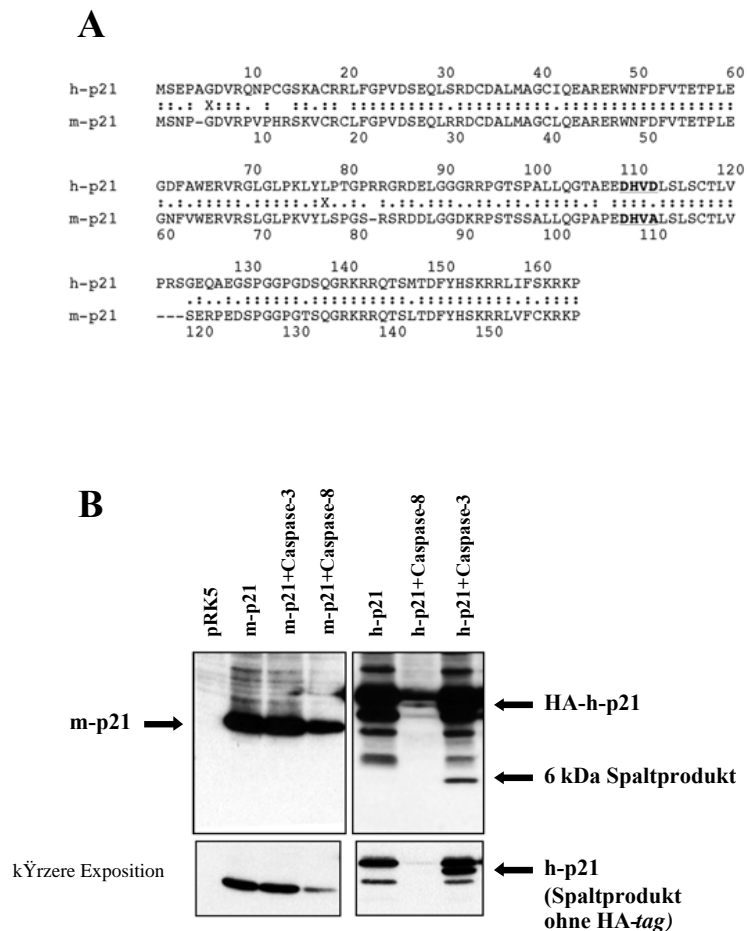


Abb. 7.1: Murines $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ wird im Gegensatz zu humanem $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ nicht durch Caspasen gespalten. (A) Vergleich der Aminosäuresequenzen der Caspasespaltstellen von humanem $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ und murinem $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$. Die Sequenz für die Caspasespaltstelle in dem humanen $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ ist fettgedruckt und unterstrichen. (B) HEK293 Zellen wurden zum einen mit den Expressionsvektoren, die für humanes $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ oder für murines $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ kodieren, allein und zum anderen in Kombination mit Caspase-3 oder Caspase-8 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Gleiche Mengen an Lysaten wurden in einem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ auf Spaltprodukte hin analysiert. Das 6 kDa-große Spaltprodukt von $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$ ist in der Abbildung ausgewiesen.

Um zu untersuchen, ob $hp21^{\text{WAF1/Cip1}}$ ohne einen HA-tag im Gegensatz zu $mp21^{\text{WAF1/Cip1}}$ ebenfalls durch Caspasen gespalten wird, wurde $hp21^{\text{WAF1/Cip1}}$ von vollständiger Länge aber ohne einen HA-tag in den Vektor pRK5 kloniert. Im Anschluss daran wurde ein *in vitro*-Spaltversuch unter Verwendung von rekombinanter Caspase-3 durchgeführt. Spaltversuche *in vitro* unterliegen besseren Versuchsbedingungen als *in vivo*, da störende Faktoren, wie z. B. andere Enzyme, ausgeschlossen werden können. Während wiederum keine Spaltung von $mp21^{\text{WAF1/Cip1}}$ durch Caspase-3 nachgewiesen werden konnte, wurde dagegen $hp21^{\text{WAF1/Cip1}}$

durch Caspase-3 gespalten. Jedoch konnte zunächst nur das 6 kDa-große Spaltfragment nachgewiesen werden. Das 14 kDa-große Spaltprodukt konnte auf Grund der Bestandteile aus dem *in vitro*-Translationsansatzes im Immunoblot nicht detektiert werden. Erst nachdem das *in vitro*-translatierte humane p21^{WAF1/Cip1} mit einem spezifischen Antikörper gegen p21^{WAF1/Cip1} immunpräzipitiert worden war, konnte nach erfolgter Caspase-3-Spaltung das 14 kDa-Spaltprodukt ebenfalls in einem Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 7.2). Es zeigte sich, dass murines p21^{WAF1/Cip1} im Gegensatz zu humanem p21^{WAF1/Cip1} nicht durch Caspasen gespalten wird. Die beobachtete Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} während des NPZs durch TNF/zVAD-Behandlung ist demnach nicht auf eine fehlende Caspaseaktivität zurückzuführen.

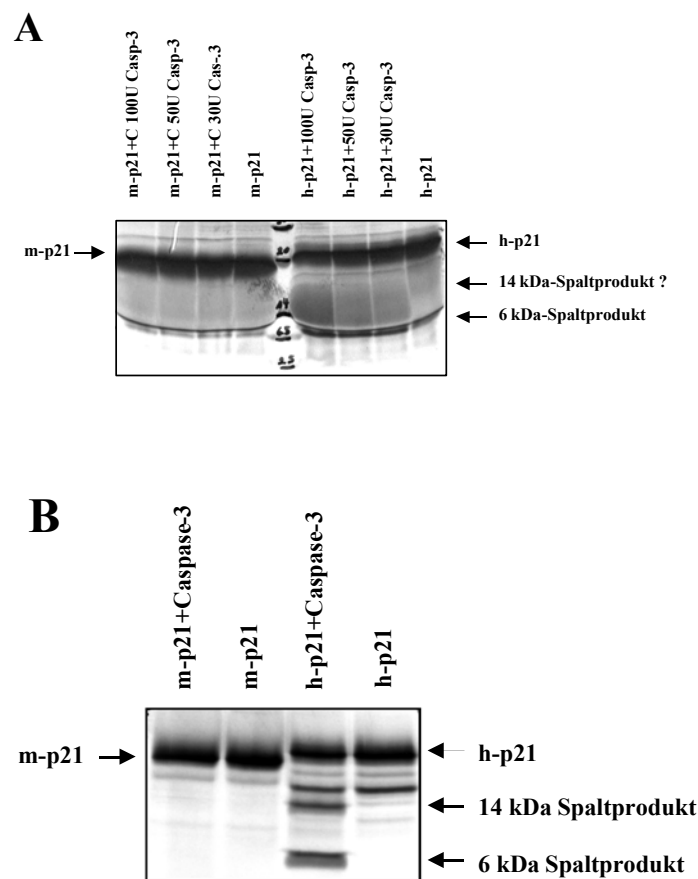


Abb. 7.2: Murines p21^{WAF1/Cip1} wird im Gegensatz zu humanem p21^{WAF1/Cip1} nicht durch Caspasen gespalten. (A) *In vitro* translatiertes humanes sowie murines p21^{WAF1/Cip1} wurden mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinanter Caspase-3 inkubiert und danach in einem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF1/Cip1} auf Spaltprodukte hin analysiert. (B) Bevor *in vitro* translatiertes humanes sowie murines p21^{WAF1/Cip1} mit rekombinanter Caspase-3 inkubiert wurden, wurden diese zunächst mit dem p21^{WAF1/Cip1}-Antikörper aus dem *in vitro*-Translationsansatz heraus immunpräzipitiert. In einem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen p21^{WAF1/Cip1} wurden sie dann wie unter (A) auf Spaltprodukte hin analysiert. Die 6 kDa- und 14 kDa-große Spaltprodukte von p21^{WAF1/Cip1} sowie das vollständige p21^{WAF1/Cip1} sind in der Abbildung ausgewiesen.

3.1.6 Ein Einfluss von p21^{WAF1/Cip1} auf die cdk2-Kinase

war nicht zu detektieren

Während einer Stimulation von NIH3T3-Zellen mit TNF unter gleichzeitiger Inhibition der Caspasen konnte beobachtet werden, dass das Protein p21^{WAF1/Cip1} hochreguliert wird und mit cdk2 interagiert. Um zu untersuchen, ob die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} einen Einfluss auf die Kinaseaktivität von cdk2 hat, wurde eine Kinase-Aktivitätsmessung durchgeführt.

Dazu wurden NIH3T3-Zellen unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert. Daraufhin wurde zunächst cdk2 in den gewonnenen Lysaten immunpräzipitiert und anschließend in eine Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Phosphoryliertes Histon H1 wurde als Maß für die Aktivität der cdk2-Kinase entweder durch einen Phosphoimager radiographisch oder alternativ durch Belichtung von Röntgenfilmen detektiert.

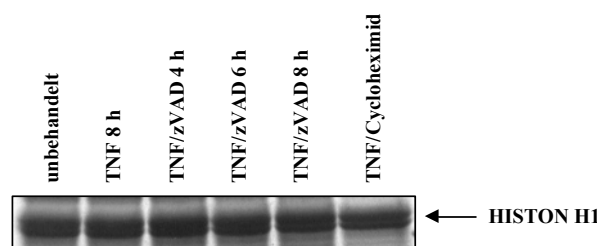


Abb. 8: Ein Einfluss von p21^{WAF1/Cip1} auf die Aktivität der cdk2-Kinase war nicht zu detektieren. NIH3T3-Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) für die angegebene Zeiten stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und lysiert. Gleiche Mengen an Lysaten wurden in die Immunpräzipitation mit einem cdk2-Antikörper und G-Sepharose eingesetzt. Die Präzipitate wurden mit Histon H1 und ³³[P]-ATP versetzt und eine Phosphorylierungsreaktion bei 30 °C gestartet. Abschließend wurden die Ansätze mit Hilfe eines SDS-PA-Gels separiert und durch einen Phosphoimager radiographisch oder alternativ durch Belichtung von Röntgenfilmen analysiert. Phosphoryliertes Histon H1 ist in der Abbildung ausgewiesen.

Weder in den unbehandelten noch in den TNF oder TNF/zVAD-stimulierten Zellen konnten wesentliche Unterschiede in der Menge an phosphoryliertem Histon H1 festgestellt werden. Gerade auch in den Zellen, die mit TNF/zVAD über eine Zeitkinetik von 4 bis 8 h stimuliert worden waren, konnte mit zunehmender Stimulationsdauer keine Abnahme an phosphoryliertem Histon H1 beobachtet werden (Abb. 8). Dies ließ vermuten, dass in diesem Zeitrahmen, in dem der Cdk-Inhibitor p21^{WAF1/Cip1} um ein Vielfaches hochreguliert wird, die Aktivität der cdk2-Kinase dadurch nicht beeinflusst wurde. Auch in den TNF/Cycloheximid-

stimulierten Zellen war kaum ein Unterschied im Gehalt an phosphoryliertem Histon H1 im Vergleich zu den übrigen Zellen zu beobachten. Weil cdk2 ein Zellkernprotein ist, wurde daraufhin angenommen, dass der Einsatz zellulärer Extrakte die Messung der cdk2-Aktivität verfälschte. In Zusammenarbeit mit Sandra Ussat aus der Arbeitsgruppe Sabine Adam wurden in nachfolgenden Experimenten nicht Gesamtzelllysate in die Kinase-Aktivitätsmessung eingesetzt, sondern Zellkernlysate. Zwar wurden bessere und saubere Ergebnisse erzielt, jedoch konnten wieder keine Unterschiede an phosphoryliertem Histon H1 und damit an cdk2-Aktivität in den unterschiedlich behandelten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass durch die Kinase-Aktivitätsmessungen kein Einfluss von p21^{WAF1/Cip1} auf cdk2 gemessen werden konnte. Möglicherweise ist die Sensibilität der Nachweismethode für die cdk-Kinaseaktivität nicht gut genug gewesen. Auszuschließen ist dabei aber auch nicht, dass eine andere Cdk als cdk2 für den beobachteten G2/M-Arrest verantwortlich ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in NIH3T3-Zellen während der Stimulation mit TNF zusammen mit zVAD die Expression von p21^{WAF1/Cip1} hochreguliert wird. Eine Zunahme von p21^{WAF1/Cip1} wurde im Zellkern noch vor Eintreten des NPZs lokalisiert. Somit ist p21^{WAF1/Cip1} in der Lage, dort seiner Funktion als CDK-Inhibitor nachzugehen. Ein Beweis für einen Einfluss auf die Cyclin-CDK-Komplexe konnte trotz nachgewiesener Interaktion mit cdk2 nicht erbracht werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass murines p21^{WAF1/Cip1} im Gegensatz zu humanem p21^{WAF1/Cip1} nicht durch Caspasen gespalten wird. Schließlich führte eine Herunterregulation von p21^{WAF1/Cip1} nicht zu einer Inhibition oder Verzögerung des NPZs. Dies läßt vermuten, dass die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} und der begleitende G2/M-Arrest nicht die Ursache für den NPZ sind (Ussat *et al.*, 2002/a; Ussat *et al.*, 2002/b).

3.2 Untersuchung des molekularen Mechanismus des NPZs

Da in den bisherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} sowie der G2/M-Arrest dem NPZ vorausgehen, aber nicht die Ursache waren, mußte ein anderer Mechanismus für diese Form des Zelltods verantwortlich sein. Um nun zu untersuchen, welcher molekulare Mechanismus der TNF/zVAD-vermittelten Nekrose in NIH3T3-Zellen zu Grunde liegt, sollte unter Verwendung verschiedener pharmakologischer Substanzen dieser Zelltod verstärkt oder inhibiert werden.

3.2.1 Die Funktion von Cathepsin D im NPZ

Während Caspasen die wichtigsten Bestandteile im Apoptosenetzwerk darstellen, werden dagegen andere Proteasen wie z. B. Calpaine, Cathepsine oder Serinproteasen mit den alternativen Formen des programmierten Zelltods in Verbindung gebracht (Leist und Jäätelä, 2001). Insbesondere die lysosomalen Proteasen, die Cathepsine, können maßgeblich an der Ausführung eines caspase-unabhängigen Zelltods, der durch TNF induziert wurde, beteiligt sein (Foghsgaard *et al.*, 2001). Zudem konnte sowohl unter Verwendung von Cathepsin D Antisense-RNA als auch durch Zugabe des Cathepsin D Inhibitors Pepstatin A die Apoptose in IFN- γ - oder Fas-behandelten HeLa-Zellen sowie in TNF- α -stimulierten U937-Zellen blockiert werden (Deiss *et al.*, 1996). Desweiteren verhindert Pepstatin A die Freisetzung von Cytochrom C sowie die Aktivierung von Caspasen (Ollinger, 2000; Roberg *et al.*, 1999). Cathepsine werden als Pre-Proenzyme synthetisiert und in Folge einer proteolytischen Spaltung aktiviert. Im normalen Gewebe weit verteilt, sind diese an einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt.

Um zu überprüfen, ob Cathepsin D an der Sensibilisierung der NIH3T3-Zellen gegenüber der TNF-induzierten Zytotoxizität unter gleichzeitiger Caspaseinhibition beteiligt ist, sollte die Aktivität von Cathepsin D mittels eines PTH-Assay in Zusammenarbeit mit Andrea Hethke aus der Arbeitsgruppe Stefan Schütze (Institut für Immunologie) untersucht werden. Dazu wurden adhärenente NIH3T3-Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 1 bis 4 h mit TNF und zVAD stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem PTH-Assay-spezifischen Lysepuffer (100 mM Na-Acetat, 100 mM KCl, pH 4.2) lysiert. Die Cathepsin D-Aktivität der Lysate wurde indirekt über den Abbau des PTH bestimmt, indem über eine Zeitkinetik von 0 bis 80 min die Lysate mit PTH inkubiert wurden. Die Ansätze wurden danach über ein SDS-PA-Gel separiert und unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen PTH in einem

Immunoblot analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer *2D-Laser-Scanning* Dichtemessung. Über die Zeitkinetik von 0 bis 80 min konnten sowohl in den unbehandelten Ansätzen als auch in den Ansätzen, die mit TNF/zVAD stimuliert worden waren, nur leichte Unterschiede im PTH-Abbau festgestellt werden, die sich in einem engen Schwankungsbereich zueinander befinden. Allein die Ansätze, die für 4 h mit TNF/zVAD behandelt worden waren, zeigten im Gegensatz zu den übrigen Ansätzen einen etwas schnelleren Abbau an PTH (Abb. 9). Dabei liegen jedoch die Werte für 20 min und 40 min Inkubationszeit immer noch in dem Schwankungsbereich der anderen Ansätze und ließen deshalb nicht auf eine höhere Cathepsin-Aktivität schließen. Der Wert für eine Inkubationszeit von 80 min lag bei 0 und war auf die schlechte Exposition des Immunoblots durch den Röntgenfilm zurückzuführen. Zusammenfassend ließ sich keine signifikante Erhöhung der Cathepsin D-Aktivität infolge der TNF/zVAD-Behandlung nachweisen.

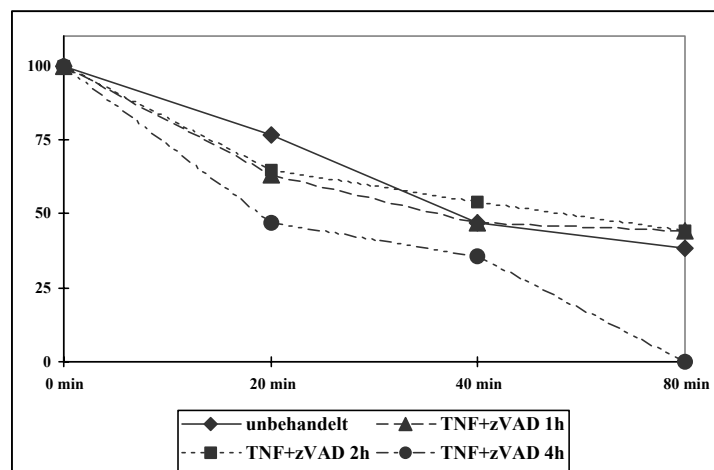


Abb. 9: Cathepsin D-Aktivitäts-Assay. NIH3T3-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder 1, 2 oder 4 h mit TNF/zVAD stimuliert und anschließend mit einem Homogenisierungspuffer lysiert. Die Cathepsin D-Aktivität der Lysate wurde unter Verwendung des PTH als Cathepsin D-Substrat bestimmt, indem die Lysate mit PTH für die angegebene Zeit inkubiert wurden. Die Ansätze wurden danach über ein SDS-PA-Gel separiert und unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen PTH in einem Immunoblot analysiert. Die Quantifizierung des gespaltenen PTH erfolgte durch eine *2D laser-scanning* Dichtemessung. Als Ausgangswert wurde 0 min mit 100 % festgesetzt.

Zusätzlich zu der Messung der Cathepsin D-Aktivität sollte der Effekt von Pepstatin A auf den NPZ, der durch TNF zusammen mit zVAD in NIH3T3-Zellen induziert wird, untersucht werden. Für die Toxizitätsanalyse wurden die NIH3T3-Zellen unter Zugabe von Pepstatin A für 24 h entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder mit Cycloheximid stimuliert. Zum Vergleich wurde eine weitere Versuchsreihe ohne Pepstatin A stimuliert. Abschließend wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Weder in den Ansätzen mit den unbehandelten, noch den TNF-stimulierten Zellen konnte ein Effekt von Pepstatin A festgestellt werden. Ebenso war in den zu unterschiedlichen Zeiten mit TNF/zVAD stimulierten Zellen kein Einfluss von Pepstatin A auf den NPZ zu detektieren. Zudem war in den Zellen, die dem apoptotischen Stimulus TNF/Cycloheximid ausgesetzt waren, ebenfalls kein Effekt von Pepstatin A zu beobachten (Abb. 10). In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen 24 h zunächst mit Pepstatin A vorinkubiert und anschließend stimuliert. Jedoch war hierbei ebenfalls kein Einfluss von Pepstatin A auf den NPZ zu beobachten gewesen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte durch diese Ergebnisse gezeigt werden, dass Cathepsin D während des NPZs, der in NIH3T3-Zellen durch TNF und zVAD induziert wird, keine Rolle spielt.

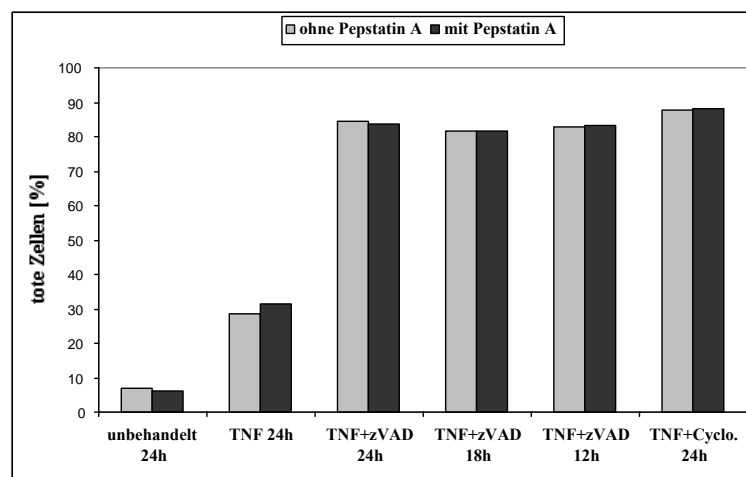


Abb. 10: Toxizitätsanalyse mit Pepstatin A. NIH3T3-Zellen wurden mit oder ohne Pepstatin A (100 μ M) zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert. Die Zellen des Kulturüberstandes wurden mit den abgelösten adhären Zellen vereinigt, zentrifugiert und in PBS/EDTA resuspendiert. Anschließend wurde zur Anfärbung der DNA Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) zugegeben und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.2 Untersuchung des NPZs als eine Form der Autophagie

Autophagie ist eine degradative Form des Zelltods und teilweise wichtig während der Entwicklung. So ist Autophagie hauptsächlich beschrieben während der Metamorphose von *Lepidoptera* sowie während der Involution der Brustdrüsen bei Ratten (Schwartz *et al.*, 1993; Zakeri *et al.*, 1995). Desweiteren wird Autophagie ausgelöst durch stressbedingte Umwelteinflüsse. Demnach degradieren Zellen unter Nährstoffmangel nicht essentielle Proteine und Organellen, um ihre Bestandteile im Zytosol wieder verwenden zu können. Ein ähnlicher Vorgang ist nach der Zelltodinduktion ebenfalls in eukaryotischen Zellen zu beobachten. Während Apoptose mit seinen charakteristischen Merkmalen als programmierter Zelltod Typ I bezeichnet wird, wird eine über das normale Maß hinaus ablaufende Autophagie als programmierter Zelltod Typ II gedeutet. Nach der Induktion der Autophagie werden wiederverwertbare Bestandteile des Cytosols, wie z. B. Mitochondrien, zunächst von einer Doppelmembran umschlossen. Die so entstandenen Autophagosomen fusionieren daraufhin mit einer großen Vakuole oder einem Lysosom, in denen der Prozess der Degradation und Wiederverfügbarmachen der zytoplasmatischen Komponenten mit Hilfe von Hydrolase ablaufen kann (Übersicht von Klionsky und Emr, 2000).

Um zu untersuchen, ob der in NIH3T3-Zellen durch TNF und Caspaseinhibition induzierbare NPZ mit der autophagischen Form des Zelltods gleichzusetzen ist, sollten unter Verwendung verschiedener Autophagie-Inhibitoren Toxizitätsanalysen durchgeführt werden. Zunächst wurde der Effekt von 3-Methyladenin während der Stimulation der NIH3T3-Zellen mit TNF zusammen mit zVAD untersucht. 3-Methyladenin ist ein Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-phosphat Kinase (Kanzawa *et al.*, 2004) und verhindert die Sequestration der zu wiederverwertenden Bestandteile im Zytoplasma (Übersicht von Bursch, 2001). Zu Anfang war das 3-Methyladenin nur schwer in Lösung zu bringen. Es gelang zunächst durch Zugabe von Wasser unter gleichzeitiger Erwärmung auf 55 °C. Die anschließenden Ergebnisse der Toxizitätsanalysen waren jedoch nicht eindeutig (Daten nicht gezeigt). So gab es Versuchsergebnisse, in denen der Sensibilisierungseffekt der NIH3T3-Zellen gegenüber der TNF-Zytotoxizität durch die Zugabe von 3-Methyladenin reduziert werden konnte und Versuchsergebnisse, in denen kein Effekt des Inhibitors nachzuweisen war. Schließlich gelang es, das 3-Methyladenin in 3 % Essigsäure zu lösen und die Toxizitätsanalysen wurden erneut durchgeführt. Dazu wurden die NIH3T3-Zellen zu den angegebenen Zeiten mit oder ohne 3-Methyladenin entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert. In den Ansätzen, in denen die Zellen unbehandelt belassen oder mit TNF allein behandelt wurden, war kein Einfluss des

Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin festzustellen. Ebenfalls waren in den Ansätzen mit oder ohne Inhibitor, die zu unterschiedlichen Zeiten mit TNF/zVAD stimuliert wurden, keine Unterschiede in der Menge an toten Zellen zu beobachten. Zudem waren in TNF/Cycloheximid behandelten Ansätzen keine Unterschiede zu ermitteln gewesen (Abb. 11). Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Essigsäure allein versetzt. Es zeigte sich, dass die Essigsäure keinen Einfluss auf die Zellen ausübte (Daten nicht gezeigt).

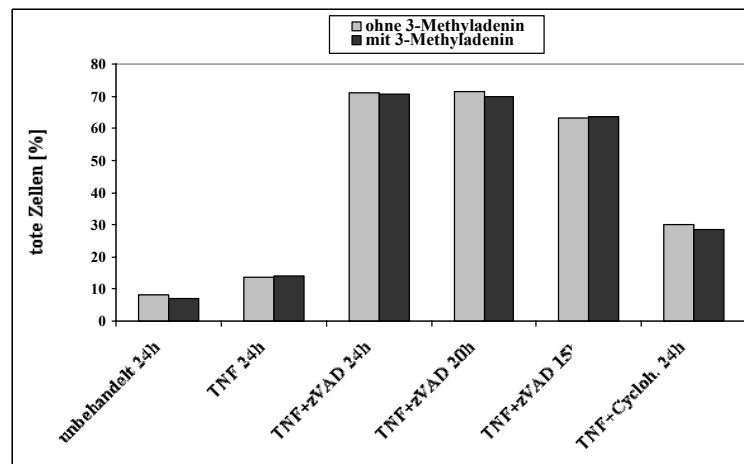


Abb. 11: Toxizitätsanalyse mit 3-Methyladenin. NIH3T3-Zellen wurden mit oder ohne 3-Methyladenin (5 μ M) zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, mit Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Während das 3-Methyladenin den Vorgang der Autophagie in seinen frühen Phasen blockieren kann, inhibiert Bafilomycin A1 die Autophagie in den späten Phasen. Es ist ein Inhibitor der vakuolären H⁺-ATPase und verhindert die Fusion der Autophagosomen und Lysosomen (Kanzawa *et al.*, 2004). Unter Verwendung von Bafilomycin A1 sollte in einer Toxizitätsanalyse analysiert werden, ob der TNF/zVAD-induzierte NPZ in den NIH3T3-Zellen beeinflusst werden und so eine Verbindung zwischen dem beobachteten Zelltod und der autophagischen Form des Zelltods nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die NIH3T3-Zellen zu den angegebenen Zeiten mit oder ohne Bafilomycin A1 entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert. In den Ansätzen, die unbehandelt belassen oder mit TNF stimuliert wurden, war

durch die Zugabe von Bafilomycin A1 eine Zunahme der toten Zellen zu beobachten. Im Vergleich dazu war in den Ansätzen, die zu verschiedenen Zeiten mit TNF und zVAD behandelt wurden, keine Unterschiede in den Mengen der toten Zellen zu beobachten. Ebenso war in den Ansätzen, die dem apoptotischen Stimulus TNF zusammen mit Cycloheximid ausgesetzt waren, kein Effekt durch Bafilomycin A1 zu erkennen (Abb. 12). Demzufolge schützt Bafilomycin A1 die TNF/zVAD-behandelten Zellen nicht vor dem NPZ. Es zeigte sich zudem, dass eine Zugabe von Bafilomycin A1 auf die Zellen, die unbehandelt verblieben sind oder mit TNF allein behandelt wurden, schon zytotoxisch wirkte. Allerdings war auch nicht nachzuweisen, ob auf Grund dieser zytotoxischen Wirkung Bafilomycin A1 den beobachteten Zelltod in den TNF/zVAD-behandelten NIH3T3-Zellen beschleunigt.

Da die verwendeten Inhibitoren den Ablauf der Autophagie in unterschiedlichen Phasen blockieren können, lassen die erzielten Ergebnisse schließlich vermuten, dass eine gesteigerte Autophagie nicht der molekulare Mechanismus für den NPZ ist.

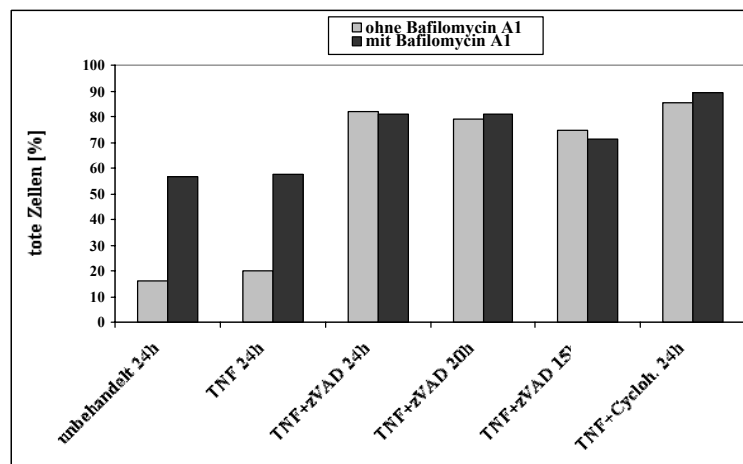


Abb. 12: Toxizitätsanalyse mit Bafilomycin A1. NIH3T3-Zellen wurden mit oder ohne Bafilomycin A1 (10 nM) zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, mit Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.3 Die Inhibition der pro-apoptotischen Serinprotease Omi/HtrA2

Omi/HtrA2 ist eine humane Serinprotease, die stark homolog zu den bakteriellen HtrA Chaperonen ist. Omi/HtrA2 ist in den Mitochondrien lokalisiert und wird in Antwort auf einen apoptotischen Stimulus in das Zytoplasma freigesetzt. Omi/HtrA2 induziert sowohl caspase-abhängigen Zelltod durch inhibitorische Wechselwirkung mit dem Apoptoseinhibitor-Protein (IAP) als auch in caspase-unabhängigen Zelltod auf Grund seiner Proteaseaktivität. Der spezifische Inhibitor gegen Omi/HtrA2, ucf-101, gilt dabei als Mittel, um die caspase-abhängigen und caspase-unabhängigen Wirkungen von Omi/HtrA2 unterscheiden zu können. Für ucf-101 ist beschrieben, dass es einen profunden Effekt gegen die proteolytische Aktivität von Omi/HtrA2 ausüben kann und so den durch Omi/HtrA2-vermittelten caspase-unabhängigen Zelltod in Caspase-9^(-/-)-Mausfibroblasten inhibieren kann (Cilenti *et al.*, 2003). In diesem Versuch sollte unter Verwendung des Inhibitors ucf-101 eine mögliche Rolle von Omi/HtrA2 während des TNF/zVAD-induzierten NPZs nachgewiesen werden. Dazu wurde eine Toxizitätsanalyse durchgeführt, indem die NIH3T3-Zellen mit oder ohne ucf-101 zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert wurden.

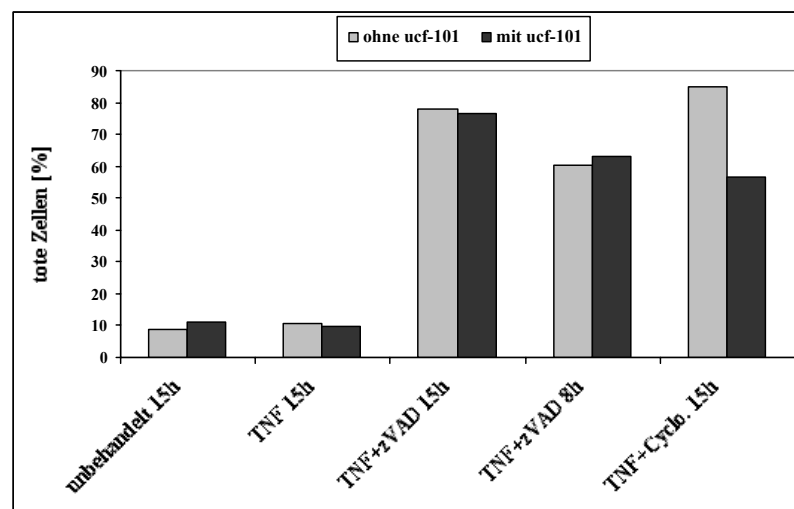


Abb. 13: Toxizitätsanalyse mit ucf-101. NIH3T3-Zellen wurden mit oder ohne ucf-101 (50 μ M) zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, mit Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

In den Ansätzen, in denen die Zellen unbehandelt belassen oder mit TNF allein behandelt wurden, war kein Einfluss des Inhibitors der Serinprotease Omi/HtrA2 festzustellen gewesen. Ebenfalls waren in den Ansätzen mit oder ohne Inhibitor, die zu unterschiedlichen Zeiten mit TNF/zVAD stimuliert wurden, keine Unterschiede in der Menge an toten Zellen zu beobachten. Überraschenderweise war in den mit TNF/Cycloheximid-behandelten Ansätzen eine Reduktion der toten Zellen bei Zugabe des Inhibitors nachzuweisen (Abb. 13). Auf Grund dieser Beobachtungen spielt Omi/HtrA2 keine Rolle während des NPZs. Dagegen scheint diese Serinprotease jedoch wichtig für die TNF/Cycloheximid-vermittelte Apoptose zu sein.

3.2.4 PARP als Schalter zwischen Apoptose und Nekrose

Während der Apoptose wird das Enzym Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) durch Caspasen gespalten (Kaufmann *et al.*, 1993). Dadurch wird verhindert, dass das Enzym die durch den Apoptosevorgang geschädigte DNA wiederherstellt. Im Gegensatz dazu führt eine DNA-Schädigung durch TNF-induzierten oxidativen Stress zu einer Aktivierung von PARP-1. Das chromatin-assoziierte Enzym PARP-1 ADP-ribosyliert verschiedene Proteine der DNA-Reperaturmaschinerie und zusätzlich sich selbst. Dabei verbraucht es eine große Menge an NAD⁺, das unter starkem ATP-Verbrauch wieder resynthetisiert werden muss (Szabo und Dawson, 1998). Der intrazelluläre ATP-Gehalt kann die Form des Zelltods beeinflussen, so dass in Folge der TNF-induzierten PARP-Aktivierung und nachfolgender ATP-Reduktion die Zellen nekrotisch sterben (Eguchi *et al.*, 1997; Los *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob eine mögliche PARP-Aktivierung während des hier untersuchten NPZs von NIH3T3-Zellen vorliegt, sollte eine Toxizitätsanalyse unter Verwendung des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid durchgeführt werden. Daher wurden NIH3T3-Zellen mit oder ohne 3-Aminobenzamid zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert. Die Zellen, die unbehandelt verblieben sind, zeigten unter Zugabe des Inhibitors eine leichte, aber nicht reproduzierbare erhöhte Menge an toten Zellen. In den Ansätzen, die mit TNF allein stimuliert wurden, waren keine Unterschiede festzustellen. Ebenfalls konnten durch die Zugabe des PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid über den Stimulationszeitraum von 12 bis 20 h keine Effekte auf den TNF/zVAD-induzierten NPZ nachgewiesen werden. Der Zelltod war weder verhindert noch verstärkt worden. Wie erwartet war auch kein Einfluss auf die

Ansätze festzustellen gewesen, die mit dem Apoptosestimulus TNF/Cycloheximid behandelt worden waren (Abb. 14). Demnach ist PARP nicht in den NPZ involviert.

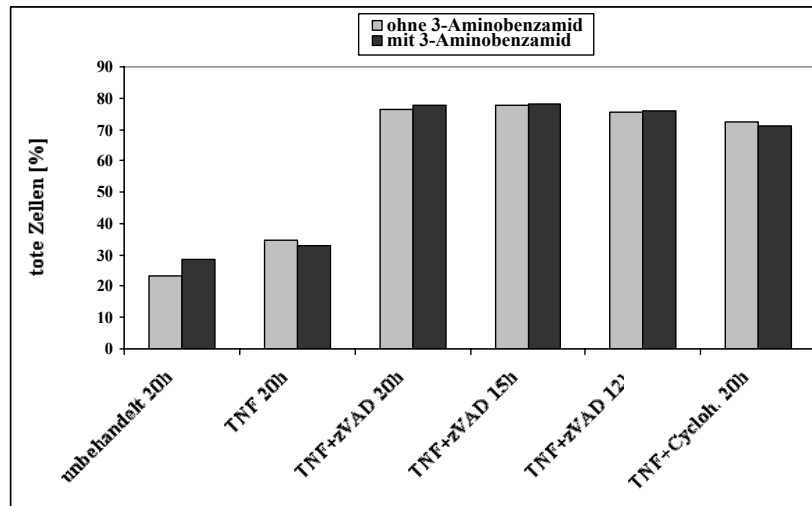


Abb. 14: Toxizitätsanalyse mit 3-Aminobenzamid. NIH3T3-Zellen wurden mit oder ohne 3-Aminobenzamid zu den angegebenen Zeiten entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, mit Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) angefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass der nekrotisch-ähnliche programmierte Zelltod weder auf die Autophagie und noch auf die Aktivität von Cathepsin D oder der Serinprotease Omi/Htr2A sowie des Enzyms PARP zurückzuführen ist.

3.3 cFLIP als mögliches Bindeglied zwischen Proliferation und Zelltod in der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, die TNF-vermittelte Proliferation und Zelltod miteinander verbinden, sollte das Protein cFLIP (Casper, I-FLICE, FLAME, CASH, CLARP) als mögliches Bindeglied näher charakterisiert werden. Die genaue physiologische Rolle von cFLIP ist noch nicht vollständig geklärt. Zwei Formen von cFLIP sind bisher beschrieben, die den beiden *Splice*-Varianten auf der mRNA-Ebene entsprechen. Die lange Form, FLIP_(L), besteht aus zwei Todeseffektordomänen und einer inaktiven caspase-ähnlichen Domäne. Im Vergleich dazu besteht die kurze Form, FLIP_(S), nur aus den beiden Todeseffektordomänen. Versuche mit cFLIP-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass diese sowohl eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose als auch einen Defekt in der Embryonalentwicklung des Herzens aufweisen (Yeh *et al.*, 2000). Eine hohe Konzentration an FLIP verstärkt in T-Zellen die Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Dabei wird Interleukin-2 hochreguliert, was wahrscheinlich auf die Eigenschaft von cFLIP, den NF-kappaB-Signalweg aktivieren zu können, zurückzuführen ist (Kataoka *et al.*, 2000; Lens *et al.*, 2002). Dagegen wurde auch eine proapoptotische Aktivität von FLIP_(L) beschrieben. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Überexpression von cFLIP in HEK293T-Zellen Zelltod verursacht (Shu *et al.*, 1997; Goltsev *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998). Die Gründe für diesen zellzerstörenden Effekt von FLIP_(L) sind unklar. Ebenso ist der Zusammenhang zwischen dem anti-apoptotischen und dem pro-apoptotischen Einfluss noch weitestgehend unverstanden. Dazu sollte in dieser Arbeit die Rolle von cFLIP in NIH3T3-Zellen, die nach einer Behandlung mit TNF bei gleichzeitiger Caspaseinhibition einen nekrose-ähnlichen Zelltod sterben, analysiert werden.

3.3.1 Messung der NF-κB-Aktivität nach transienter Transfektion von cFLIP

Um zu untersuchen, ob cFLIP nicht nur ein Inhibitor des Todesrezeptor-induzierten Zelltods ist, sondern auch die Aktivierung von NF-κB und Erk (extrazelluläre Signalregulierende Kinase) vermitteln kann, wurden HEK293 Zellen zunächst mit dem pRK5-Expressionskonstrukt, das zum einen die lange Form von Flip (Flip_(L)) und zum anderen die kurze Form (Flip_(S)) enthielt, transient transfiziert. Die cDNA von FLIP_(L) wurde von Dave

Goeddel zur Verfügung gestellt (Shu *et al.*, 1997). Aus diesem Konstrukt wurde durch einen BamH 1-Restriktionsverdau und anschließende Religation das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Flip_(s) hergestellt. Dabei wurde die caspase-ähnliche Domäne aus dem FLIP_(L) entfernt. Die DNA des so generierten, artifiziiellen FLIP_(s) war ein paar Nukleotide länger als die DNA der natürlichen Form von FLIP_(s). Als Negativkontrolle wurde der leere pRK5-Vektor sowie als Positivkontrolle ein Expressionsvektor, der für TRAF2 kodiert, transfiziert.

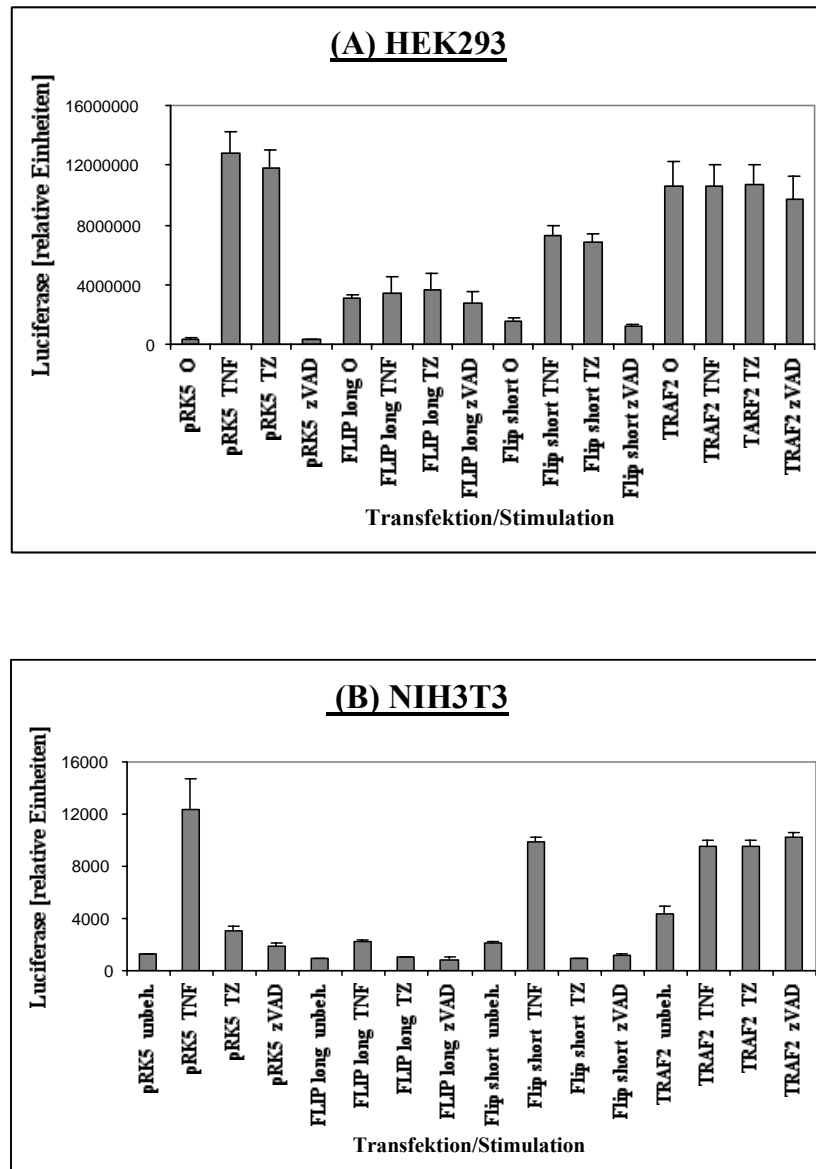


Abb. 15: NF- κ B-Aktivität nach transienter Transfektion von cFLIP in (A) HEK293- und (B) NIH3T3-Zellen. Die Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pRK5, pRK5-Flip_(L), pRK5-Flip_(s) und pRK5-TRAF2 mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transient transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit der DNA, die für NF- κ B-Luciferase kodiert kotransfiziert. Nach einer Expressionsdauer von 24 h wurden die Zellen für 5 h entweder unbehandelt belassen, mit TNF oder zVAD allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD kostimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die gewonnenen Lysate in den Luciferase-Assay eingesetzt

Mit jedem Expressionsvektor wurde zusätzlich die DNA, die für ein NF- κ B-abhängiges Luciferasegen kodiert, kotransfiziert. Nach einer Expressionsdauer von 24 h wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen, mit TNF oder zVAD allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die gewonnenen Lysate in den Luciferase-Assay eingesetzt. In den Zellen, die nur mit dem leeren pRK5-Vektor transfiziert worden sind, zeigten die unbehandelten und die zVAD-behandelten Zellen kaum NF- κ B-Aktivität. Dagegen war eine starke NF- κ B-Aktivität in den Zellen zu beobachten, die mit TNF allein und mit TNF/zVAD stimuliert worden waren. Zum Vergleich dazu war in den Zellen, die mit Flip_(L) transfiziert worden waren, eine höhere NF- κ B-Aktivität in den unstimulierten Zellen nachzuweisen, als in den unbehandelten pRK5-transfizierten Zellen. Jedoch ließ sich die NF- κ B-Aktivität in den FLIP_(L)-transfizierten Zellen nur marginal durch TNF oder TNF/zVAD steigern. Es erreichte zudem auch nicht das Aktivitätsniveau der pRK5-transfizierten Zellen, die mit TNF oder TNF/zVAD stimuliert worden waren. Nur eine leichte NF- κ B-Aktivität zeigten die Zellen, die mit Flip_(S) transfiziert und unbehandelt belassen wurden. Dagegen ließ sich auch bei diesen Zellen durch TNF oder TNF/zVAD-Stimulation die NF- κ B-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um ein Vielfaches steigern. Das Niveau der Aktivität erreichte zwar nicht das Aktivitätsniveau der pRK5-transfizierten Zellen, war aber etwa doppelt so hoch wie das Aktivitätsniveau der Flip_(L)-transfizierten Zellen. Die Zellen, die mit TRAF2 transfiziert worden waren, zeigten in allen vier Behandlungsansätzen eine deutliche NF- κ B-Aktivität (Abb. 15 A)

Anschließend wurden NIH3T3-Zellen ebenfalls in den gleichen Kombinationen mit den Expressionsvektoren für pRK5, Flip_(L), Flip_(S) und TRAF2 transfiziert und mit TNF, zVAD oder mit TNF/zVAD stimuliert sowie unbehandelt belassen. In den NIH3T3-Zellen konnte keine so hohe Transfektionseffizienz erreicht werden, so dass die NF- κ B-Aktivität sehr viel geringer war als in den HEK293-Zellen. Die NF- κ B-Aktivitäten in den unbehandelten Zellen, die mit pRK5, Flip_(L) oder Flip_(S) transfiziert worden waren, unterschieden sich wenig. In den pRK5-transfizierten Zellen ließ sich die NF- κ B-Aktivität durch TNF-Stimulation wieder um ein Vielfaches gegenüber den unbehandelten Zellen steigern. Dagegen wurde die NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen durch TNF/zVAD-Behandlung nur leicht gesteigert. Während die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivität in den Flip_(L)-transfizierten Zellen nur schwach gesteigert wurde, konnte im Gegensatz dazu die NF- κ B-Aktivität in den Zellen, die mit Flip_(S) transfiziert worden waren, um ein Vielfaches hochreguliert werden. Das Aktivitätsniveau war dabei dreimal so hoch wie das der Flip_(L)-transfizierten Zellen. Es erreichte aber nicht ganz das Aktivitätsniveau der pRK5-transfizierten Zellen nach TNF-Stimulation. Im Vergleich zu

den HEK293-Zellen war in den NIH3T3-Zellen die TNF/zVAD-vermittelte NF- κ B-Aktivität stark herabgesetzt. In den TRAF2-überexprimierenden Zellen konnte jeweils durch TNF und zVAD allein ebenso wie in Kombination mit beiden eine doppelt so hohe NF- κ B-Aktivität nachgewiesen werden wie in TRAF2-überexprimierenden Zellen, die unbehandelt verblieben sind (Abb. 15 B).

Zusammenfassend zeigte sich, dass durch eine Überexpression von FLIP_(s) die NF- κ B-Aktivität durch TNF-Stimulation um ein Vielfaches gesteigert wird, während in NIH3T3-Zellen durch Überexpression von FLIP_(L) die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivität nur minimal erhöht ist. Im Vergleich dazu erreichten in beiden Fällen die Aktivitätsniveaus von NF- κ B jedoch nicht das Aktivitätsniveau der Vektorzellen nach TNF-Stimulation. Dies stimmt unter Berücksichtigung der schwächeren Transfektionseffizienz mit den Ergebnissen in den HEK293 Zellen überein. Allerdings wird in den NIH3T3-Zellen im Gegensatz zu den HEK293 Zellen sowohl in den Vektorzellen als auch bei Überexpression von FLIP_(L) sowie von FLIP_(s) die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivität durch zVAD stark reduziert.

3.3.2 Toxizitätsanalyse nach transienter Transfektion von cFLIP

Zur Überprüfung der anti- und proapoptotischen Funktion von cFLIP wurden NIH3T3-Zellen mit den Expressionsvektoren pRK5, pRK5-FLIP_(L) und pRK5-FLIP_(s) transient transfiziert. Desweiteren wurde als Kontrolle pRK5-Vektor mit für dominant-negatives FADD (FADD-DN) kodierender cDNA transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen für weitere 18 h entweder mit TNF allein sowie zusammen mit zVAD oder Cycloheximid stimuliert oder unbehandelt belassen. Danach wurden die Zellen mit Propidiumjodid-Lösung angefärbt und durch Bestimmung der pro Zelle eingelagerten Menge Propidiumjodids durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden drei Populationen festgelegt. Die Zellen, die auf Grund ihrer intakten Zellmembran kein Propidiumjodid aufgenommen haben, wurden als lebende Zellen bezeichnet. Eine Population an kleinen Zellen war schwach Propidiumjodid-positiv und wurde als nekrotisch eingestuft. Als tote Zellen wurde eine große Population bezeichnet, die infolge der zerstörten Zellmembran viel Propidiumjodid-Lösung aufgenommen hatte. In den unbehandelten Versuchsansätzen, die mit dem leeren pRK5-Vektor und FLIP_(s) transfiziert wurden, konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Nur die FLIP_(L)-überexprimierenden Ansätze wiesen eine leicht erhöhte Menge an lebenden Zellen auf. Ebenso verhielt es sich mit den Expressionsansätzen, die mit TNF

stimuliert wurden. Alle Expressionsansätze wiesen eine höhere Anzahl an toten Zellen zuungunsten der lebenden Zellen auf. Dieses Verhältnis verschob sich in den Ansätzen, die mit TNF in Kombination mit zVAD behandelt wurden, noch mehr zugunsten der Population der toten Zellen. Durch TNF/Cycloheximid-Behandlung konnte dies noch weiter gesteigert werden. Zudem unterschied sich bei FLIP_(L)-Überexpression die TNF/zVAD- sowie die TNF/Cycloheximid-stimulierten Ansätze nicht mehr von den übrigen Ansätzen. In allen Expressionsansätzen, die sowohl unbehandelt blieben als auch mit TNF/zVAD sowie TNF/Cycloheximid stimuliert wurden, blieb die Population der nekrotischen Zellen nahezu unverändert. Desweiteren wiesen die Ansätze, die das FADD-DN exprimierten, im Vergleich zu den anderen Expressionsansätzen immer eine leicht geringere Menge an lebenden Zellen sowie eine leicht erhöhte Anzahl an toten Zellen auf. Das Verhältnis der Populationen untereinander blieb aber auch in diesem Fall immer gleich. Nur nach TNF/zVAD-Stimulation war ein leichte Zunahme der nekrotischen Zellen festzustellen gewesen (Abb. 16).

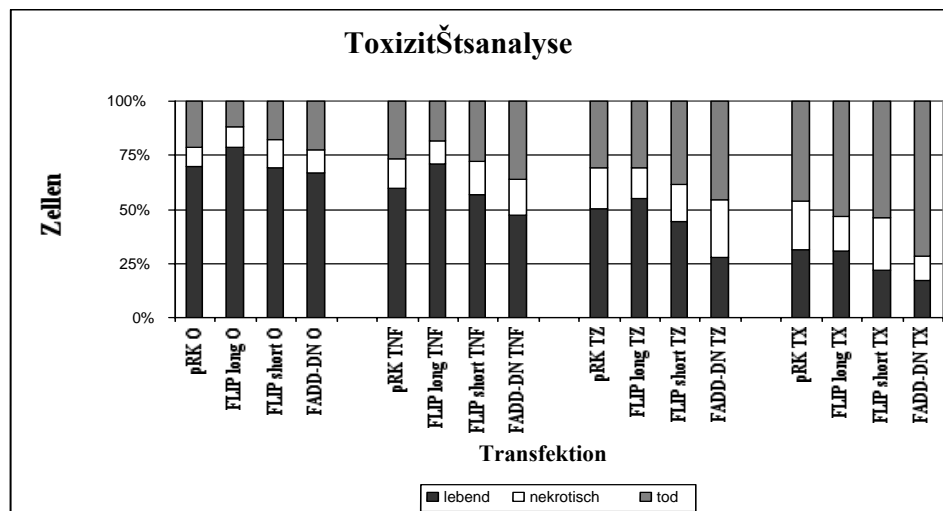


Abb. 16: Toxizitätsanalyse nach transienter Transfektion von cFLIP. NIH3T3-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pRK5, pRK5-FLIP_(L), pRK5-FLIP_(S) und pRK5-FADD-DN transient transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen für weitere 18 h entweder mit TNF (50 ng/ml) allein oder zusammen mit zVAD-fmk (20 μ M) oder Cycloheximid (10 μ g/ml) stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach der Färbung der DNA mit Propidiumjodid-Lösung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Mengen der toten, nekrotischen und lebenden Zellen sind in der Graphik ausgewiesen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Überexpression sowohl von FLIP_(L) als auch von FLIP_(S) die Zellen nicht vor TNF/zVAD-induziertem Zelltod schützt. Umgekehrt verstärken die Überexpressionen dieser beiden Proteine den nekrotischen Zelltod auch nicht. Zudem ist kein TNF-vermittelter Effekt nach Überexpression von FLIP_(L) oder FLIP_(S) zu beobachten. Die starke Zunahme der toten Zellen in allen Ansätzen nach der Behandlung mit TNF und Cycloheximid wurde durch die Inhibition der Proteinsynthese verursacht.

3.3.3 Stabile Transfektion von FLIP_(S) mit einem retroviralen Transfektionssystem über GP+E86-Zellen

Weil die Transfektionseffizienz in NIH3T3-Zellen im Vergleich zu HEK293 Zellen viel schlechter war, wurde dazu übergegangen, FLIP_(S) stabil in NIH3T3-Zellen zu transfizieren. Davon erhoffte man sich zunächst eine bessere Expression von FLIP_(S) und weiterhin eine Bestätigung der bis dahin erzielten Ergebnisse.

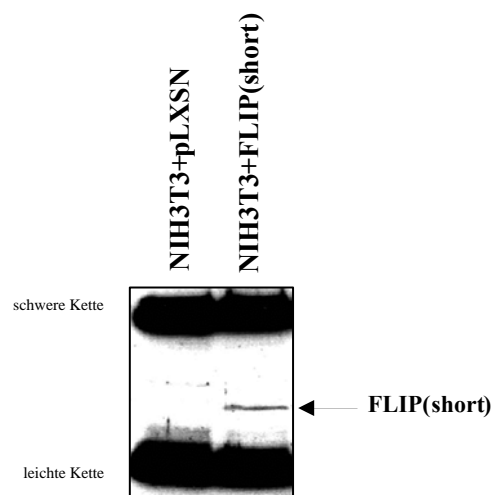


Abb. 17: Nachweis von FLIP_(S) in NIH3T3-Zellen nach Transfektion durch GP+E86-Zellen. Aus adhärennten NIH3T3-Zellen wurden TNE-Lysate gewonnen. 500 µg der Lysate wurden mit dem Flag-Antikörper M5 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das koimmunpräzipitierte FLIP_(S) wurde mit Hilfe eines Immunoblots unter Verwendung eines spezifischen cFLIP-Antikörpers nachgewiesen. Die schweren und leichten Ketten der immunpräzipitierenden Antikörper sind in der Abbildung ausgewiesen.

Um die Rolle der kurzen Form von cFLIP (FLIP_(s)) während anti- und proapoptotischer Vorgänge in der Zelle analysieren zu können, wurde mittels des retroviralen Transfektionssystems pLXSN-FLIP_(s) über die Verpackungszelllinie GP+E86 stabil in NIH3T3-Zellen transfiziert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pLXSN ebenfalls über GP+E86-Zellen retroviral in NIH3T3-Zellen stabil transfiziert. Die Zielzellen, die die Selektion mit G418 überstanden haben, wurden weiter in der Zellkultur gehalten. Der Nachweis der Expression von pLXSN-FLIP_(s) mit einer routinemäßigen Separation der Lysate über ein SDS-PA-Gel und anschließendem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen cFLIP, der auch die kurze Form FLIP_(s) erkennt, gelang zunächst nicht (Daten nicht gezeigt). Erst durch eine vorgeschaltete Immunpräzipitation von FLIP_(s) mit Hilfe des Flag-Antikörpers M5 und Protein-G-Sepharose konnte die Expression in den retroviral transfizierten NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17).

3.3.4 Messung der NF-κB-Aktivität in FLIP_(s)-exprimierenden NIH3T3-Zellen

In NIH3T3-Zellen, die transient mit pRK5-FLIP_(s) transfiziert worden waren, konnte nach TNF-Stimulation eine hohe NF-κB-Aktivität nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob in den mit FLIP_(s) stabil transfizierten Zellen ebenfalls die TNF-vermittelte NF-κB-Aktivität gesteigert werden kann, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Expressionsvektor, der ein NF-κB-abhängiges Luciferasegen enthielt, transfiziert. Das Luciferase-Reportergen steht unter Kontrolle von fünf hintereinandergeschalteten Wiederholungen des NF-κB-Bindeelements. Gleichzeitig wurden sowohl Zellen mit dem leeren Expressionsvektor pRK5 als Negativkontrolle als auch Zellen mit dem Expressionsvektor pGL3, über den Luciferase durch einen SV40-Promotor konstitutiv exprimiert wird, als Positivkontrolle transient transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die transfizierten Zellen entweder mit TNF allein oder zusammen mit zVAD stimuliert sowie unbehandelt belassen. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet und mit dem Lysepuffer versetzt und abgeschabt. Die Lysate wurden zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden anschließend mit Luciferase Assay Reagenz (LAR) versetzt und das emittierte Licht in einem Luminometer der Firma Berthold Detection Systems gemessen. Das Niveau der NF-κB-Aktivität in den unbehandelten NIH3T3-pLXSN-Zellen entsprach dem Aktivitätsniveau der Negativkontrollen. Im Vergleich dazu konnte in den unbehandelten

Zellen mit dem FLIP_(s)-Konstrukt eine minimal erhöhte NF- κ B-Aktivität festgestellt werden. Durch TNF-Behandlung konnte in den FLIP_(s)-überexprimierenden Zellen die NF- κ B-Aktivität nicht nur um ein Vielfaches gesteigert werden, sondern diese war auch doppelt so stark wie die der Zellen mit dem leeren Vektor. Keine Unterschiede waren zwischen den beiden Zelltypen zu beobachten, die sowohl mit TNF/zVAD als auch mit zVAD allein stimuliert worden waren. Während in beiden die NF- κ B-Aktivität durch TNF/zVAD-Stimulation leicht gesteigert wurde, verblieb die zVAD-vermittelte NF- κ B-Aktivität auf dem niedrigen Aktivitätsniveau der Negativkontrolle (Abb. 18). Demzufolge kann die Überexpression von FLIP_(s) die TNF-vermittelte NF- κ B-Aktivität in NIH3T3-Zellen um etwa das Doppelte steigern. Durch TNF in Kombination mit zVAD wird diese Steigerung wieder aufgehoben.

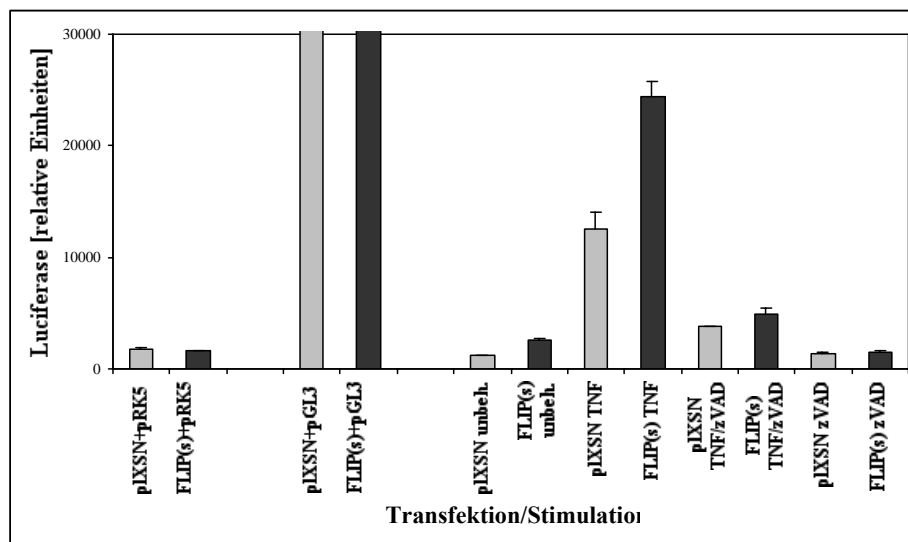


Abb. 18: Messung der NF- κ B-Aktivität nach stabiler Transfektion von FLIP_(s) durch GP+E86-Zellen. Nach der retroviralen Transfektion mit Hilfe von GP+E86-Zellen wurden die NIH3T3-Zellen mit dem Expressionsvektor, der ein NF- κ B-abhängiges Luciferasegen enthielt, mittels Lipofectamin2000 transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem leeren Expressionsvektor pRK5 sowie als Positivkontrolle mit dem Expressionsvektor pGL3 transient transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die transfizierten Zellen entweder für 5 h mit TNF (50 ng/ml) allein oder zusammen mit zVAD-fmk (20 μ M) stimuliert sowie unbehandelt belassen. Die NF- κ B-Aktivität der Zellen wurde mittels eines Luciferase-Assays analysiert. Die erzielten Werte wurden hier graphisch in der Abbildung dargestellt.

3.3.5 Messung der Erk-Aktivität in FLIP_(s)-exprimierenden NIH3T3-Zellen

cFLIP soll an der Induktion der Proliferation nicht nur durch die Aktivierung von NF- κ B, sondern auch durch die Fähigkeit, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Erk zu aktivieren, beteiligt sein. Erk-Aktivierung resultiert meist aus einer Ras-initiierten Rekrutierung der MAP Kinase Kinase Kinase, Raf-1, welche zu einer Aktivierung der MAP Kinase Kinase, Mek, sowie nachfolgend von Erk führt. Es sind zwei unterschiedliche Formen an Erk-Kinasen beschrieben, die auf Grund ihres Molekulargewichts als p42 MAPK (Erk1) und p44 MAPK (Erk2) bezeichnet werden (Übersicht von Johnson und Lapadat, 2002). Um den Einfluss von FLIP_(s) auf die Erk-Aktivität zu analysieren, wurden die stabil transfizierten NIH3T3-Zellen zunächst für 24 h serumfreiem Medium ausgesetzt. Da das Serum von sich aus in der Lage ist, die Erk-Aktivierung zu initiieren, sollte dies durch den vorgeschalteten Serumentzug ausgeschlossen werden. Danach wurden die NIH3T3-Zellen nach einer Stimulation mit TNF geerntet und lysiert. Der Lysepuffer enthielt zur Inhibition von Phosphatasen zusätzlich noch 1 mM NaVO₄ und 10 mM NaF. Die Lysate wurden dann in einem SDS-PA-Gel separiert und unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Phospho-Erk (Phospho-p44/42 MAPK) in einem Immunoblot analysiert.

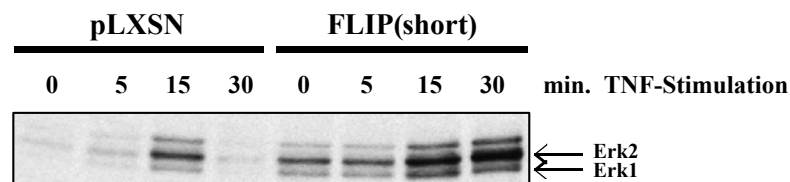


Abb. 19: Messung der Erk-Aktivität nach stabiler Transfektion von FLIP_(s) durch GP+E86-Zellen. Nach der retroviralen Transfektion mit Hilfe von GP+E86-Zellen wurden die NIH3T3-Zellen für 24 h serumfreiem Medium ausgesetzt. Danach wurden die Zellen über eine Zeitkinetik von 0 bis 30 min mit TNF (50 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die TNE-Lysate durch Separation in einem SDS-PA-Gel und einem anschließenden Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Phospho-Erk (Phospho-p44/42 MAPK) weiter analysiert. Phospho-Erk ist in der Abbildung ausgewiesen.

In den NIH3T3-Zellen, die nur den leeren Vektor pLXSN trugen, war kaum Erk-Aktivität innerhalb der ersten fünf Minuten nach TNF-Stimulation festzustellen. Die Erk-Aktivität erreichte 15 min nach TNF-Stimulation ein Maximum und wurde danach wieder stark herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wiesen die NIH3T3-Zellen, die mit dem pLXSN-FLIP_(s) transfiziert worden waren, eine leicht erhöhte Basalaktivität auf. Während bis 5 min nach

TNF-Stimulation keine Veränderung in der Erk-Aktivität festzustellen war, stieg die Aktivität nach 15 min um ein Vielfaches an. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde die Aktivität der Erk-Kinase aber nicht wieder herunterreguliert, sondern blieb nahezu unverändert oder stieg mit zunehmender Stimulationsdauer sogar noch weiter leicht an (Abb. 19). Es zeigte sich also, dass durch Überexpression von FLIP_(s) in NIH3T3-Zellen nach TNF-Stimulation die Erk-Aktivität gesteigert und diese über einen längeren Zeitraum als in den Kontrollzellen aufrecht erhalten werden kann.

3.3.6 Toxizitätsanalyse mit FLIP_(s)-exprimierenden NIH3T3-Zellen

In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass cFLIP eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Um nun den Effekt von stabil transfizierten FLIP_(s) während des TNF/zVAD-induzierten nekrose-ähnlichen Zelltods in NIH3T3 zu untersuchen, wurde eine Toxizitätsanalyse mit retroviral transfizierten NIH3T3-Zellen durchgeführt.

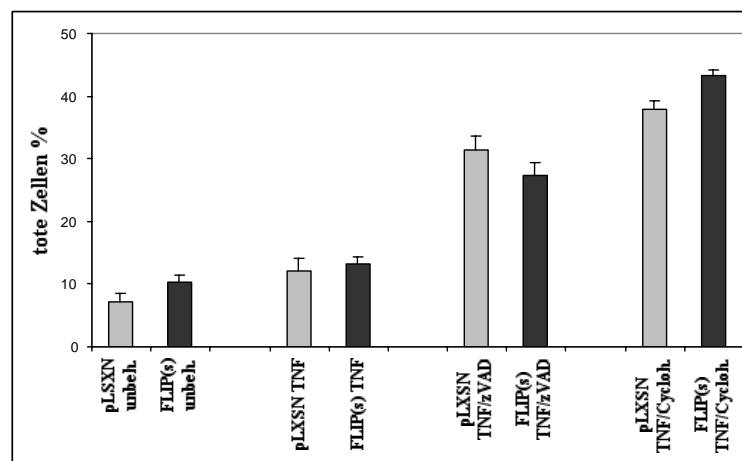


Abb. 20: Toxizitätsanalyse nach stabiler Transfektion von FLIP_(s) durch GP+E86-Zellen. Nach der retroviralen Transfektion mit Hilfe von GP+E86-Zellen wurden die NIH3T3-Zellen für 12 h entweder unbehandelt belassen oder mit TNF (50 ng/ml) allein sowie mit TNF (50 ng/ml) zusammen mit zVAD (20 µM) oder Cycloheximid (10 µg/ml) stimuliert. Die Zellen des Kulturüberstandes wurden mit den abgelösten adherenten Zellen vereinigt, zentrifugiert und in PBS/EDTA resuspendiert. Anschließend wurde zur Anfärbung der DNA das gleiche Volumen Propidiumjodid-Lösung (250 ng Propidiumjodid/ml PBS/EDTA) zugegeben und durch Bestimmung der pro Zelle eingelagerten Menge Propidiumjodids durchflusszytometrisch analysiert. Die Menge der propidiumjodidpositiven Zellen ist in der Abbildung angegeben.

Dazu wurden die Zellen für 12 h entweder unbehandelt belassen oder mit TNF allein sowie mit TNF zusammen mit zVAD oder mit Cycloheximid stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumjodid angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es konnten keine großen Unterschiede zwischen den NIH3T3-Zellen, die das FLIP_(s)-Konstrukt enthielten, und den Kontrollzellen festgestellt werden. Überhaupt keine Unterschiede konnten in den TNF-behandelten Zellen beobachtet werden. In den übrigen Ansätzen waren nur leichte, aber nicht signifikante Unterschiede zu erkennen (Abb. 20). Die Überexpression von FLIP_(s) schützt demzufolge NIH3T3-Zellen weder vor der TNF/zVAD-vermittelten Nekrose noch vor der TNF/Cycloheximid-initiierten Apoptose.

3.3.7 Stabile Transfektion von FLIP_(s) mit einem retroviralen Transfektionssystem über HEK293T-Zellen

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass durch FLIP_(s)-Überexpression in NIH3T3-Zellen, die über die Verpackungszelllinie GP+E86 stabil transfiziert worden sind, die TNF-vermittelte Aktivität sowohl von NF- κ B als auch der Erk-Kinase gesteigert werden kann. Jedoch konnte keine Zelltod-protectierende Wirkung von überexprimiertem FLIP_(s) nachgewiesen werden. Um die erzielten Ergebnisse auf ihre Aussage hin zu überprüfen, wurde FLIP_(s) noch einmal stabil in NIH3T3-Zellen unter Verwendung der Verpackungszelllinie HEK293T transfiziert. Prinzipiell entspricht zwar die Transfektion mit den HEK293T Zellen der Transfektion mit der Verpackungszelllinie GP+E86, jedoch könnte über die HEK293T Zellen durch einen höheren Virustiter ein stärkeres Expressionsniveau in den Zielzellen erreicht werden. Eine größere Menge an exprimiertem FLIP_(s) sollte die beobachteten Unterschiede in den Versuchsergebnissen noch deutlicher machen. Im Anschluss an die retrovirale Transfektion wurden die Versuche zur Bestimmung der Aktivität von NF- κ B und Erk sowie die Toxizitätsanalyse wiederholt. Für den Expressionsnachweis wurde FLIP_(s) wie in dem vorangegangenen Versuch (vgl. 3.3.3) mittels Flag-Antikörpers M5 und Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert und anschließend in einem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen cFLIP analysiert (Abb. 21).

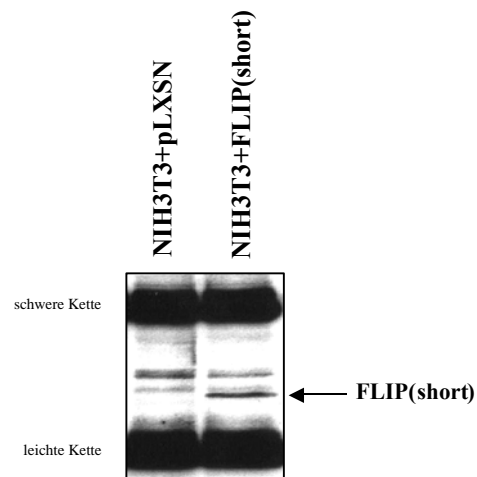


Abb. 21: Nachweis von FLIP_(s) in NIH3T3-Zellen nach Transfektion durch HEK293-Zellen. Die Durchführung des Expressionsnachweises von FLIP_(s) erfolgte entsprechend dem vorausgegangenen Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.3). Die schweren und leichten Ketten der immunpräzipitierenden Antikörper sind in der Abbildung ausgewiesen.

Die neu transfizierten NIH3T3-Zellen wurden ebenfalls auf ihre NF- κ B-Aktivität hin untersucht. Die Messung der NF- κ B-Aktivität erfolgte entsprechend dem Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.4). Es waren keine Unterschiede in der Aktivität von NF- κ B in den unbehandelten Zellen festzustellen. Wie schon in dem vorausgegangenen Versuch war NF- κ B-Aktivität auf einem sehr niedrigen Niveau. Ebenfalls keine Unterschiede in der NF- κ B-Aktivität waren nach der Stimulation mit TNF zu beobachten. Entgegen der zu erwarteten Steigerung der NF- κ B-Aktivität durch überexprimiertes FLIP_(s) nach TNF-Stimulation verblieb diese auf demselben Niveau der Kontrollzellen oder fiel sogar darunter. In diesem Versuch zeigten dagegen die FLIP_(s)-überexprimierenden Zellen nach der TNF/zVAD-Behandlung eine leicht höhere NF- κ B-Aktivität, während in dem vorausgegangenen Versuch noch ähnliche NF- κ B-Aktivitäten in den verschiedenen Zellen festgestellt worden waren. Gegenüber den Ansätzen der unbehandelten Zellen war diese Steigerung nur minimal. Die NF- κ B-Aktivität nach zVAD-Behandlung verblieb in beiden Zelltypen auf dem Niveau der unbehandelten Zellen (Abb. 22). Überraschenderweise konnte in diesem Fall durch eine Überexpression von FLIP_(s) die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivität im Gegensatz zu dem vorausgegangenen Versuch nicht gesteigert werden. Dagegen konnte mittels TNF/zVAD-Stimulation diese Steigerung erneut vermindert werden.

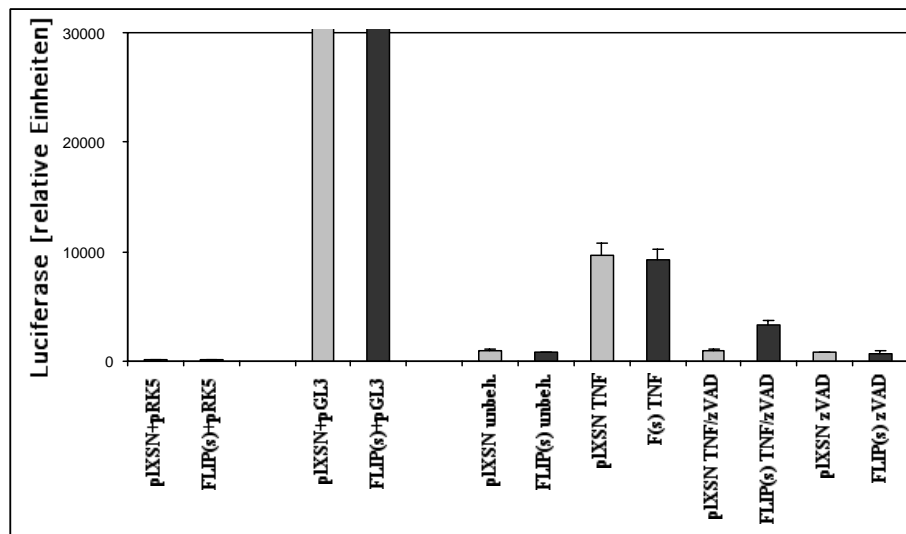


Abb. 22: Messung der NF- κ B-Aktivität nach stabiler Transfektion von FLIP₍₆₎ durch HEK293-Zellen. Die Durchführung zur Messung der NF- κ B-Aktivität erfolgte entsprechend dem vorausgegangenen Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.4). Die erzielten Werte wurden hier graphisch in der Abbildung dargestellt.

Die Messung der Erk-Aktivität erfolgte entsprechend dem vorausgegangenen Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.5). Allerdings wurde hier über eine Zeitkinetik von 0 bis 60 min mit TNF stimuliert. Wie schon in dem vorausgegangenen Versuch erreichte die Erk-Aktivität in den Zellen mit leerem Vektor pLXSN bis 15 min nach der TNF-Stimulation sein Maximum und wurde danach wieder stark herunterreguliert. In den FLIP₍₆₎-überexprimierenden Zellen wurde die Erk-Aktivität ebenfalls bis 15 min nach Zugabe des TNF stärker noch als in den Kontrollzellen gesteigert. Im Gegensatz dazu wurde das Aktivitätsniveau aber nicht gleich wieder herunterreguliert, sondern noch eine zeitlang beibehalten bis es dann nach einer Stunde TNF-Behandlung leicht zurückging (Abb. 23). Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse aus dem vorausgegangenen Versuch. Wie auch dort zu beobachten war, steigert die Überexpression von FLIP₍₆₎ die Kinaseaktivität von Erk und kann diese über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten als die Kontrollzellen.

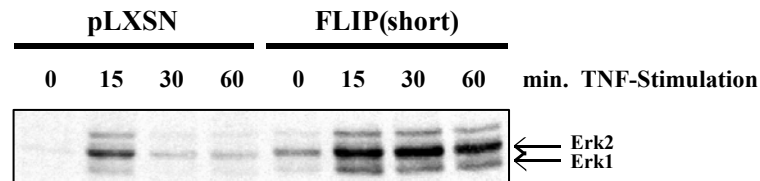


Abb. 23: Messung der Erk-Aktivität nach stabiler Transfektion von FLIP_(s) durch HEK293-Zellen. Die Durchführung zur Messung der Erk-Aktivität erfolgte entsprechend dem vorausgegangenen Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.5). Phospho-Erk wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Phospho-Erk (Phospho-p44/42 MAPK) analysiert und ist in der Abbildung ausgewiesen.

Die Toxizitätsanalyse erfolgte entsprechend dem vorausgegangenen Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.6). Die Zellen wurden in diesem Versuch für 18 h stimuliert. Erstaunlicherweise konnte in den Ansätzen mit den FLIP_(s)-exprimierenden Zellen, die unbehandelt belassen wurden, schon große Mengen an toten Zellen festgestellt werden. Es waren fast zweimal so viele wie in den unbehandelten Kontrollzellen. Während nach TNF-Stimulation keine Unterschiede in der Menge an toten Zellen zu erkennen waren, war die Menge an toten Zellen nach TNF/zVAD-Behandlung in den Ansätzen mit den FLIP_(s)-exprimierenden Zellen gegenüber den Ansätzen der Kontrollzellen minimal erhöht. Allerdings wiesen die Kontrollzellen nach der Stimulation mit TNF und Cycloheximid eine ebenso leicht erhöhte Menge an toten Zellen auf. Diese geringen Unterschiede waren nicht reproduzierbar und wurden nicht weiter berücksichtigt (Abb. 24). Demzufolge schützt eine Überexpression von FLIP_(s) NIH3T3-Zellen weder vor der TNF/zVAD-vermittelten Nekrose noch vor der Apoptose, die durch TNF im Kombination mit Cycloheximid ausgelöst wird. Gleichzeitig hat eine FLIP_(s)-Überexpression auch keinen sensibilisierenden Effekt auf die TNF/zVAD-behandelten NIH3T3-Zellen. Diese Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen aus den parallelen Toxizitätsanalysen, die mit den durch die Verpackungszelllinie GP-E86 transfizierten Zellen durchgeführt wurden. Dort konnte ebenfalls weder ein schützender noch ein sensibilisierender Einfluss von FLIP_(s) festgestellt werden.

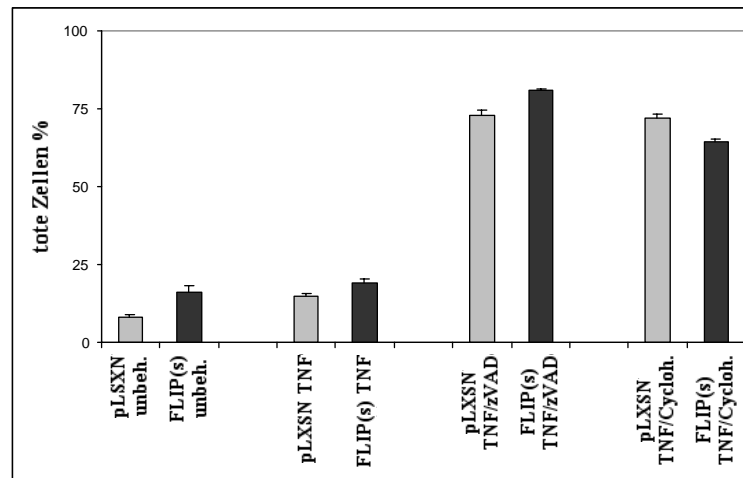


Abb. 24: Toxizitätsanalyse nach stabiler Transfektion von FLIP_(s) durch HEK293T-Zellen. Die Durchführung der Toxizitätsanalyse erfolgte entsprechend dem vorausgegangenen Versuch mit den durch GP+E86-Zellen transfizierten NIH3T3-Zellen (vgl. 3.3.6). Die Menge der propidiumjodidpositiven Zellen ist in der Abbildung angegeben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine FLIP_(s)-Überexpression in NIH3T3-Zellen, die mittels der Verpackungszelllinie GP+E86 transfiziert wurden, die proliferativen Signalwege von NF- κ B und Erk aktivieren kann. Dagegen spielt FLIP_(s) weder während des TNF/zVAD-induzierten NPZs noch während TNF/Cycloheximid-vermittelter Apoptose eine Rolle. Diese Ergebnisse konnten nur zum Teil mit den FLIP_(s)-überexprimierenden NIH3T3-Zellen, die mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T transfiziert wurden, bestätigt werden. In diesen konnte wiederum eine gesteigerte Erk-Aktivierung nachgewiesen werden. Ebenso ließ sich kein zelltodprotektierender oder gar -beschleunigender Einfluss ermitteln. Allerdings war in diesen Zellen im Vergleich zu den vorausgegangenen Versuchen überraschenderweise die Steigerung der TNF-vermittelten NF- κ B-Aktivität nicht zu reproduzieren.

3.3.8 Versuch zur siRNA-Inhibition von cFLIP

Bisher wurden Versuche durchgeführt, in denen die Funktion von FLIP_(s) durch Überexpression analysiert wurde. Im Gegensatz dazu sollte nun die proliferative und antiapoptotische Wirkung von cFLIP durch dessen Herunterregulation untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Methode der siRNA-Inhibition etabliert und nachfolgend überprüft werden, ob sich die bisher erzielten Ergebnissen in umgekehrter Weise bestätigen lassen. Die Transfektion der siRNA-Oligonukleotide erfolgte zunächst strikt nach Protokoll des Herstellers des Transfektionsreagenz Oligofectamin. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die NIH3T3-Zellen mit TNE-Puffer lysiert und im SDS-Polyacrylamidgel separiert. Abschließend wurden die Lysate in einem Immunoblot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen cFLIP auf die Expressionsstärke von cFLIP hin analysiert.

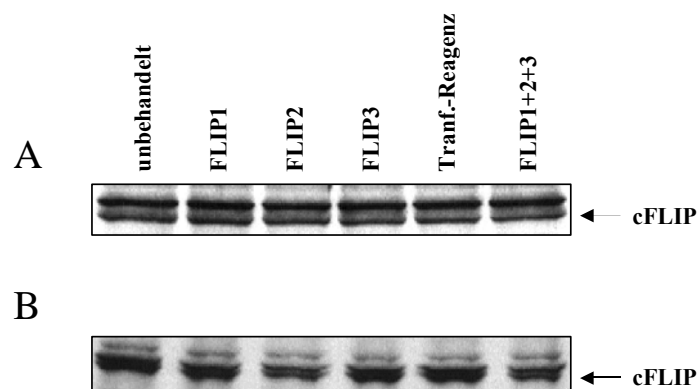


Abb. 25: Antisense Inhibition von cFLIP. NIH3T3-Zellen wurden nach den Protokollen des Hersteller entweder mit Oligofectamin (A) oder Qiagen Transfection Reagenz (B) mit den siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen mit TNE-Puffer lysiert und über ein SDS-PA-Gel separiert. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen cFLIP wurden die Ansätze in einem Immunoblot analysiert.

Es wurden insgesamt drei verschiedene siRNA-Oligonukleotide für die Inhibition der cFLIP-Expression verwendet, aber bei keinem von diesen war anschließend im Immunoblot eine Herunterregulation von cFLIP zu beobachten. Im Vergleich zu den Ansätzen, die unbehandelt belassen wurden oder nur das Transfektionsreagenz erhalten hatten, waren auch bei gleichzeitiger Zugabe aller drei Oligonukleotide keine Unterschiede in der Expressionsstärke von cFLIP nachweisbar (Abb. 25 A). Demzufolge wurden einzelne Schritte des

Transfektionsprotokolls variiert. Es wurde die doppelte Menge an siRNA sowie die doppelte Menge an Transfektionsreagenz eingesetzt. Desweiteren wurde mehrmals transfiziert oder die Inkubationszeit verlängert. Auch wurden Kombinationen dieser unterschiedlichen Behandlungen versucht. Jedoch wurde durch keine einzige Veränderung der Versuchsprotokolls eine deutliche Herunterregulation von cFLIP erzielt (Daten nicht gezeigt). Erst unter Verwendung eines anderen Transfektionsreagenz konnte bei einem der verwendeten Oligonukleotide (FLIP2) sowie bei Zugabe aller drei möglichen Oligonukleotide eine schwache Abnahme des Expressionsniveaus beobachtet werden (vgl. Abb. 25 B). Mittels der verwendeten siRNA-Oligonukleotide konnte nur unter Verwendung eines speziellen Transfektionsreagenz eine ganz leichte Herunterregulation von cFLIP erzielt werden. Allerdings war diese nicht vergleichbar mit Studien, in denen die Expression anderer Proteine mittels siRNA beschrieben wurde. Deshalb hätten nachfolgende Versuche, in denen ein möglicher proliferativer oder antiapoptotischer Effekt von herunterreguliertem cFLIP untersucht worden wäre, keinen Sinn gemacht. Im Rahmen weiterer Studien müßten zusätzliche siRNAs mit anderen Oligonukleotidsequenzen getestet werden.

4 Diskussion

Für jede Art von Zelltod, der durch ein intrazelluläres Todesprogramm unabhängig von der Art des Stimulus vermittelt wird, kann der Begriff "programmierter Zelltod" verwendet werden. Prinzipiell kann Zelltod in zwei verschiedenen Formen auftreten: Apoptose und Nekrose (Schweichel und Merker, 1973). Auf Grund ihrer morphologischen und biochemischen Charakteristika werden die klassischen Ausprägungen dieser beiden Formen meist einander gegenübergestellt. Mit zunehmendem Verständnis der intrazellulären Vorgänge nach induziertem Zelltod werden immer mehr Übergangsformen zwischen Apoptose und Nekrose postuliert und für diese unterschiedliche molekulare Mechanismen beschrieben (Denecker *et al.*, 2001; Leist und Jäätelä, 2001). So haben neben der Verfügbarkeit von aktiven Caspasen, Oxidativer Stress, der zelluläre ATP-Gehalt und die Bcl-2 Konzentration Einfluss auf die Entscheidung zwischen Apoptose und Nekrose (Kerr *et al.*, 1972; Tsujimoto, 1997; Daugas *et al.*, 2000; Nicotera *et al.*, 1998; Borner und Monney, 1999; Benson *et al.*, 1998; Okuno *et al.*, 1998).

Neben der proteolytischen Inaktivierung der Caspasen, können noch andere Mechanismen zur Inhibition der Caspaseaktivität führen. Caspasen sind unter reduzierenden Bedingungen optimal aktiv. Doch in ihrem katalytischem Zentrum besitzen sie ein nukleophil angreifbares Cystein, das oxidiert, S-alkyliert oder S-nitrosyliert werden kann, was zu einer Inaktivierung der Caspasen führen kann. Dies deutet darauf hin, dass in sterbenden Zellen ein Wechsel des Redoxzustandes die Caspasen inaktiviert. Wenn es zu einer hohen Konzentration an Sauerstoffradikalen in der Zelle kommt, führt eine direkte und irreversible Schädigung der zellulären Komponenten zu einer Nekrose. Moderate Konzentrationen an Sauerstoffradikalen begleiten dagegen eine Apoptose (Palomba *et al.*, 1996; Hampton und Orrenius, 1997; Higuchi *et al.*, 1998). Zudem kann eine Virusinfektion zu einer Caspaseinhibition führen. Einige virale Proteine sind in der Lage, die Caspasen der Wirtszelle zu inaktivieren. Dadurch soll verhindert werden, dass sich die Wirtszelle selbst umbringt, bevor sich das Virus replizieren kann (Tewari *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1997).

Andere Veröffentlichungen beschreiben eine ATP-Abhängigkeit in der Entscheidung zwischen Apoptose und Nekrose. Ein wichtiger ATP-abhängiger Prozess während der Apoptose ist die Aktivierung der Procaspase-9 zusammen mit Cytochrom C und Apaf-1. Ohne die Bildung von ATP können demzufolge die nachfolgenden Schritte der Apoptose, wie z. B. DNA Fragmentierung, und auch die Exposition des Phosphatidylserin nicht ablaufen (Leist *et al.*, 1997). Der Vorgang der Apoptose benötigt also viel ATP. Eine Abnahme des

ATP-Gehaltes inhibiert eine anti-Fas-induzierte Apoptose und führt zu einem nekrotischen Zelltod (Leist *et al.*, 1999; Eguchi *et al.*, 1997). Der ATP-Gehalt und die Entscheidung zwischen Apoptose und Nekrose hängt von dem Protein PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) ab. Die Inaktivierung von PARP durch eine Caspasespaltung verhindert die Abnahme von NAD^+ und ATP, welche in den letzten Schritten der Apoptose benötigt werden. Bleibt aber die Spaltung von PARP aus, so führt dies zu einem nekrotischen Zelltod bedingt durch die PARP-vermittelte Abnahme von zellulären NAD^+ und ATP (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998; Boulares *et al.*, 1999; Ha und Snyder, 1999).

Ein weiterer möglicher Kandidat, den die Signalwege von Apoptose und Nekrose gemeinsam haben könnten, ist das Adapterprotein FADD. Durch eine Oligomerisierung von FADD in Jurkat-Zellen, die entweder mit zVAD vorbehandelt wurden oder Caspase-8 defizient waren, sterben die Zellen nekrotisch. Im Gegensatz dazu kann FADD in Wildtyp-Jurkat-Zellen Apoptose induzieren (Kawahara *et al.*, 1998). Weiterhin sensibilisiert die Überexpression von dominant-negativen FADD, das nur aus der Todesdomäne besteht und auf diese Weise die Caspase-8-Bindung blockiert, ebenso wie die Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD, TNF-resistente U937- oder NIH3T3-Zellen gegenüber der TNF-induzierten Nekrose (Khwaja *et al.*, 1999; Lüschen *et al.*, 2000). In Abwesenheit von einer Caspaseaktivierung könnte FADD über seine Todesdomäne den nekrotischen Signalweg einleiten, während es in Anwesenheit von aktiven Caspasen mittels seiner Todeseffektordomäne Apoptose initiiert. Im Gegensatz dazu wurde jedoch beschrieben, dass in Jurkat-Zellen TNF-induzierter nekrotischer Zelltod auch in Abwesenheit von FADD zu beobachten ist (Holler *et al.*, 2000).

Alternativ zu diesen beschriebenen Mechanismen wurde durch Vorarbeiten zu dieser Arbeit für die Progression des Zellzyklus eine wichtige Rolle während des NPZs, der durch TNF in Kombination mit zVAD vermittelt wird, angenommen.

4.1 Die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} geht dem TNF-induzierten NPZ voraus

Durch die Inhibition der Caspasen während der Stimulation mit TNF werden NIH3T3-Zellen gegenüber der Cytotoxizität von TNF nicht geschützt, wie es in der HeLa-Zelllinie zu beobachten ist, sondern vielmehr noch sensibilisiert und dadurch verstärkt in den Zelltod getrieben. Im Vergleich zu der klassischen Apoptose, die durch eine Stimulation mit TNF unter gleichzeitiger Inhibition der Proteinsynthese ausgelöst wird, konnten einige

Unterschiede festgestellt werden. Zum einen unterscheiden sich die Morphologien der sterbenden Zellen und zum anderen geht dem TNF/zVAD-induzierten Zelltod eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus voraus, während die TNF-Cycloheximid-vermittelte Apoptose unabhängig vom Zellzyklus abläuft. Die Progression des Zellzyklus erschien notwendig für den Sensibilisierungseffekt durch TNF-Stimulation bei gleichzeitiger Caspaseinhibition, während ein Arrest des Zellzyklus in der G2/M-Phase die Sensibilisierung noch steigert (Lüschen *et al.*, 2000).

Die Progression durch den Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) reguliert. CDKs sind mit Prozessoren vergleichbar, die extrazelluläre und intrazelluläre Signale koordinieren und auf diese Weise die ungestörte Transition durch verschiedene Phasen des Zellzyklus garantieren. Die katalytische Einheit der CDKs ist nur dann aktiv, wenn sie mit regulatorischen Untereinheiten, den sogenannten Cyclinen, assoziiert ist. Diese treten im Verlauf des Zellzyklus mit CDKs zu definierten Komplexen zusammen. Die Aktivität wird weiterhin durch Phosphorylierung reguliert. Die meisten CDKs müssen an einem konservierten Threoninrest (Position 160 in CDK1) phosphoryliert werden, um ihre volle Aktivität zu erreichen. Durch Phosphorylierung eines Tyrosin- und Threoninrests (T14 in CDK1) wird umgekehrt die Aktivität von CDKs herabreguliert. Die Aktivität von CDK-Cyclin-Komplexen kann schließlich durch Assoziation mit inhibitorischen Proteinen (CDK-Inhibitoren) gehemmt werden. Durch CDK-Inhibitoren kann die Passage des Zellzyklus in gewebsspezifischer Weise als Antwort auf externe und interne Signale blockiert werden. Solch ein CDK-Inhibitor ist das Protein p21^{WAF1/Cip1}, das seine Wirkung unter *in vivo*-Bedingungen hauptsächlich in der G1-Phase des Zellzyklus entfaltet. Normalerweise liegt p21^{WAF1/Cip1} in einem Komplex vor, der neben Cyclin und CDK auch PCNA (Proliferatives Zellkern Antigen), eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ , enthält. p21^{WAF1/Cip1} könnte demnach nicht nur den Zellzyklus durch Interaktion mit CDK-Cyclin-Komplexen, sondern auch die DNA-Replikation in der S-Phase hemmen. (Übersicht in Wagener, 1999). Zudem existieren Beweise, dass p21^{WAF1/Cip1} ebenfalls an einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase beteiligt ist (Taylor und Stark, 2001).

Nach einer Behandlung von NIH3T3-Zellen mit TNF in Kombination mit dem Caspaseinhibitor zVAD konnte in dieser Arbeit die Hochregulation des CDK-Inhibitors p21^{WAF1/Cip1} nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in HeLa-Zellen, die durch die kombinierte Zugabe von TNF und zVAD nicht sensibilisiert werden, keine Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} festgestellt werden. Die Expression von p21^{WAF1/Cip1} wird direkt durch den Tumorsuppressor p53 stimuliert. Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen der

Expression von p53 und der Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Durch Fluoreszenzfärbungen konnte zum einen die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} während der TNF/zVAD-Stimulation bestätigt werden. Zum anderen konnte zusätzlich über die Stimulationszeit hinweg eine Ansammlung von p21^{WAF1/Cip1} im Zellkern noch vor Eintreten des NPZ beobachtet werden. Die gesteigerte Menge an p21^{WAF1/Cip1} koimmunpräzipitierte mit cdk2, was ein Hinweis darauf war, dass p21^{WAF1/Cip1} seiner Funktion als CDK-Inhibitor nachgehen kann. Leider war es nicht möglich mittels Kinase Assay einen Einfluss des hochregulierten p21^{WAF1/Cip1} auf die Aktivität von Cdk2 nachzuweisen.

Eine Herunterregulation von p21^{WAF1/Cip1} durch Antisense Inhibition mittels eines Morpholino Oligonukleotids blockierte den TNF/zVAD-induzierten Zelltod nicht, sondern verstärkte diesen noch zusätzlich. p21^{WAF1/Cip1} ist demnach nicht die Ursache für den NPZ nach TNF/zVAD-Behandlung in NIH3T3-Zellen. Vielmehr führt die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} zu einem transienten G2/M-Arrest, der den Eintritt des Zelltods verzögert. Ein durch p21^{WAF1/Cip1} verursachter Zellzyklusarrest in der G0/G1- oder G2/M-Phase geht häufig der Apoptose voraus (Übersicht in King und Cidlowski, 1998). Obwohl eine Überexpression von p21^{WAF1/Cip1} Apoptose auslösen kann (Goke *et al.*, 2001), ist allgemein akzeptiert, dass p21^{WAF1/Cip1} Zellen vor Apoptose schützen kann, indem es die Zellzyklusprogression für den Einsatz möglicher Reparaturprozesse anhält (Übersicht in Gorospe *et al.*, 1999). So scheint es sich auch mit der beobachteten Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} während des TNF/zVAD-vermittelten NPZs zu verhalten.

Um eine ordnungsgemäße Übertragung der genetischen Information von einer Zelle auf die beiden Tochterzellen zu garantieren, gibt es im Zellzyklus verschiedene Kontrollpunkte. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass die nächste Phase erst dann beginnt, wenn die vorherige Phase vollständig abgeschlossen und fehlerfrei verlaufen ist. Ist dies nicht der Fall, wird der Eintritt in die nächste Phase verzögert. Die Pause wird dazu genutzt, die vorhergehende Phase abzuschließen bzw. Fehler zu reparieren. Gelingt dies nicht, können Zellen unter bestimmten Umständen durch Apoptose eliminiert werden. Ein wichtiger Kontrollpunkt liegt in der späten G1-Phase vor der Verdopplung der DNA in der S-Phase (G1/S-Kontrollpunkt). An diesem Kontrollpunkt wird überprüft, ob die DNA intakt ist und ob Faktoren, die für eine fehlerfreie Verdopplung der DNA in der S-Phase benötigt werden, in ausreichender Konzentration vorhanden sind. Der Eintritt in die S-Phase wird verzögert, um eine Reparatur eventueller DNA-Defekte zu ermöglichen, oder die Zelle wird durch Apoptose eliminiert. An dem zweiten Kontrollpunkt in der späten G2-Phase (G2/M-Kontrollpunkt) wird

verhindert, dass die Mitose vor Beendigung der DNA-Replikation beginnt oder sich eine weitere Verdopplung der DNA anschließt. Am G2/M-Kontrollpunkt wird ferner überprüft, ob Fehler bei der Verdopplung der DNA aufgetreten sind. Ist dies der Fall, werden DNA-Reparatursysteme aktiviert. In diesem Zusammenhang scheint die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} in der G2/M-Phase von der Zelle ein Versuch zu sein, die Progression des Zellzyklus vorübergehend zu unterbrechen, um derartige Überprüfungen vornehmen zu können. Diese Schutzfunktion scheint p21^{WAF1/Cip1} auch während des NPZs auszuüben.

p21^{WAF1/Cip1} ist ein zellzyklusregulierendes Protein und wurde in verschiedenen Arbeiten als Caspasesubstrat beschrieben (Jin *et al.*, 2000; Gervais *et al.*, 1998). Demzufolge war angenommen worden, dass die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} während des TNF/zVAD-vermittelten NPZs durch eine ausbleibende Caspasenspaltung zustande kommt. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass nur humanes p21^{WAF1/Cip1}, aber nicht murines p21^{WAF1/Cip1} durch Caspase-3 gespalten wird. Die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} wird demnach nicht direkt durch zVAD-vermittelte Caspaseinhibition verursacht. Auszuschließen ist dabei aber nicht, dass Caspasen auf andere Enzyme einwirken, welche ihrerseits in der Lage sind, p21^{WAF1/Cip1} zu spalten (Witko-Sarsat *et al.*, 2002). Zumindest ist es wahrscheinlich, dass eine Progression des Zellzyklus ohne eine Abnahme der p21^{WAF1/Cip1}-Konzentration kaum möglich ist. p21^{WAF1/Cip1} reguliert den Übertritt von G2 in die M-Phase, indem es die Aktivität sowohl des CyclinA-Cdk2-Komplexes als auch des CyclinB1-Cdc2-Komplexes steuert. Wenn der inhibitorische Effekt von p21^{WAF1/Cip1} nicht aufgehoben wird, können die CDKs nicht phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Eine Progression des Zellzyklus bliebe damit aus (Dulic *et al.*, 1998).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in NIH3T3-Zellen während der Stimulation mit TNF in Kombination mit dem Caspaseinhibitor zVAD das Protein p21^{WAF1/Cip1} hochreguliert wird. Eine stark zunehmende Konzentration an p21^{WAF1/Cip1} wurde im Zellkern noch vor Eintreten des NPZs lokalisiert. Somit ist p21^{WAF1/Cip1} in der Lage, dort seiner Funktion als CDK-Inhibitor nachzugehen. Ein Beweis für einen Einfluss auf die Cyclin-CDK-Komplexe konnte trotz nachgewiesener Interaktion mit cdk2 nicht erbracht werden. Aufgrund von Antisense-Inhibitions-Versuchen muss davon ausgegangen werden, dass p21^{WAF1/Cip1} nicht die Ursache für den NPZ nach TNF/zVAD-Behandlung ist. Vielmehr führt die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} nur zu einer Verzögerung der Progression des Zellzyklus.

4.2 Mögliche molekulare Mechanismen für den NPZ

4.2.1 Cathepsin D

Da die Ursache für den NPZ, der in NIH3T3-Zellen durch TNF und zVAD initiiert wird, weder der G2/M-Arrest noch das hochregulierte p21 ist, musste ein anderer molekularer Mechanismus für den Zelltod in Frage kommen. Zunächst wurde die Funktion von Cathepsin D während des NPZs untersucht. Eine proapoptotische Wirkung wurde durch Arbeiten mit überexprimierten Cathepsin D und *Knockout*-Mäusen beschrieben. Demzufolge sensibilisiert eine Überexpression von Cathepsin D sowohl HeLa- als auch PC12-Zellen gegenüber Apoptose nach Serumentzug oder oxidativen Stress (Shibata *et al.*, 1998; Kargedal *et al.*, 2001). Im Vergleich dazu sind Fibroblasten von Cathepsin D defizienten Mäusen gegen Adriamycin- oder Etoposid-vermittelte Apoptose resistent (Wu *et al.*, 1998). Weiterhin induziert eine Mikroinjektion von Cathepsin D eine caspase-unabhängige Apoptose in humanen Fibroblasten (Roberg *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit jedoch weder durch Cathepsin D-Aktivitäts-Assays noch durch die Verwendung des Cathepsin D-Inhibitors Pepstatin A eine Rolle von Cathepsin D während des TNF/zVAD-induzierten NPZs von NIH3T3-Zellen durch TNF/zVAD nachgewiesen werden. In einer neueren Arbeit wird Cathepsin D als das verbindende Element zwischen TNF-aktivierter Ceramidproduktion durch die saure Sphingomyelinase und der Bid-vermittelten Caspase-9- und Caspase-3-Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges beschrieben (Heinrich *et al.*, 2004). Dabei generiert die saure Sphingomyelinase in Endosomen Ceramide, die wiederum Cathepsin D aktivieren und dessen Translokation in das Zytoplasma vermitteln. Dort generiert Cathepsin D proteolytisch aus Bid verkürztes Bid (tBid), welches nachfolgend die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien sowie die anschließende Aktivierung der Caspasen-9 und -3 bewirkt (Johansson *et al.*, 2003). Allerdings wird davon ausgegangen, dass die saure Sphingomyelinase via TNF-Stimulation selbst durch Caspase-8 aktiviert wird. Zudem ist die TNF-induzierte Aktivierung der sauren Sphingomyelinase sehr sensitiv gegenüber der Inhibition von Caspase-8 (Heinrich *et al.*, 2004). Demzufolge kommt dieses Modell nicht als Mechanismus für den NPZ, der durch TNF und zVAD in NIH3T3-Zellen induziert wird, in Frage. Durch den Einfluss des Caspaseinhibitors zVAD sollte die Caspase-8 und natürlich nachfolgend die Caspasen-9 und -3 blockiert und somit die Zellen vor dem Zelltod geschützt werden. Auszuschließen ist dabei nicht, dass Cathepsin D in andere Signalwege, die Zelltod vermitteln und zudem caspase-unabhängig sind, involviert ist.

Es ist beschrieben, dass der Cathepsin D-induzierte Zelltod durch den spezifischen Cathepsin D-Inhibitor, Pepstatin A blockiert werden kann (Deiss *et al.*, 1996). Eine Inhibition des TNF/ γ VAD-vermittelten NPZs durch Pepstatin A konnte in dieser Arbeit aber nicht festgestellt werden. Cathepsin D ist demnach für den beobachteten Zelltod nicht wichtig. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen Cathepsin D weder in den durch TNF- oder CD95-induzierten Zelltod noch in durch andere Stimuli, wie z. B. Pharmazeutika oder γ -Strahlung, aktivierter Apoptose in Schafsfibroblasten involviert ist (Tardy *et al.*, 2003).

4.2.2 Autophagie

Als weiterer in Frage kommender Mechanismus für den NPZ wurde daraufhin eine alternative Form des Zellsterbens, die Autophagie, untersucht. Autophagie beschreibt einen Prozess der Wiederverwertung von zellulären Proteinen und Komponenten (Klionsky und Ohsumi, 1999; Kim und Klionsky, 2000). Der Prozess der Autophagie beginnt mit der Sequestration von zytoplasmatischen Organellen, was zu der Bildung eines Vesikels mit doppelter Membran, Autophagosom genannt, führt. Nachfolgend fusionieren die Autophagosomen mit Lysosomen, wo der Inhalt der Autophagosomen degradiert und wiederverwertet wird. Die umgewandelten Moleküle werden anschließend wieder für neue biosynthetische und metabolische Reaktionen genutzt. Eine über das normale Maß hinaus ablaufende Autophagie wird als programmierter Zelltod Typ II bezeichnet und konnte mittlerweile mit der Entwicklung verschiedenster Organismen, inklusive des Menschen in Verbindung gebracht werden (Tanida *et al.*, 2001).

Schon lange ist bekannt, dass 3-Methyladenin Autophagie in den ersten Phasen inhibieren kann (Seglen *et al.*, 1992). Erst kürzlich wurde 3-Methyladenin als ein Inhibitor für Phosphatidylinositol 3-phosphat Kinasen (PI3K) beschrieben (Blommaart *et al.*, 1997). PI3K ist eine stark konservierte Familie von Lipidkinasen, welche die Phosphorylierung an der Position 3 des Inositolringes der Phosphoinositide katalysiert (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Sie bilden dadurch Lipide, die in die Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Autophagie, Selbstorganisation des Zytoskeletts und Membranbewegung involviert sind. Drei Klassen der PI3K sind bisher bekannt. Die Klasse I der PI3K ist in die Inhibition der Autophagie direkt mit einbezogen, während die Klasse III der PI3K wichtig bei der Sequestration des zytoplasmatischen Materials ist (Petiot *et al.*, 2000). Bafilomycin A1 dagegen inhibiert die Autophagie in den späteren Phasen. Es ist ein spezifischer Inhibitor der lysosomalen Proteinpumpe vakuoläre H^+ -ATPase (Yamamoto *et al.*, 1998; Manabe *et al.*,

1993). ATP wird für alle Schritte der Autophagie benötigt. Desweiteren werden die Lysosomen angesäuert, bevor diese mit den Autophagosomen fusionieren (Kim und Klionsky, 2000). Es ist daher anzunehmen, dass Bafilomycin A1 die Autophagie blockiert, indem es die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen supprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder durch 3-Methyladenin noch durch Bafilomycin A1 ein inhibitorischer Effekt auf NPZ nachgewiesen werden. Beide Inhibitoren greifen an sehr wichtigen, aber verschiedenen Stellen im Prozess der Autophagie an. Daher ist anzunehmen, dass Autophagie nicht der verantwortliche Mechanismus für den NPZ ist, der in NIH3T3-Zellen durch die Behandlung mit TNF und zVAD ausgelöst wird.

4.2.3 Omi/HtrA2

Omi/HtrA2 ist eine mitochondriale Serinprotease, die infolge einer Induktion von Apoptose in das Zytoplasma freigesetzt wird (Faccio *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2000). Im Zytoplasma bindet sie an XIAP (X Chromosomen verbundener Inhibitor der Apoptose) und beseitigt so dessen inhibitorischen Effekt auf Caspase-9, was zu einer Aktivierung von Caspase-9 führt (Suzuki *et al.*, 2001). Demnach wirkt es ähnlich wie Smac/DIABLO, ein anderes mitochondriales Protein, das ebenfalls an XIAP bindet (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Omi/HtrA2 wird als Vorläuferprotein in den Mitochondrien synthetisiert und dort zu einem reifen Protein prozessiert. Durch diese Prozessierung wird am Aminoterminus ein internes tetrapeptides Motiv, AVPS, exponiert, das die Interaktion von Omi/HtrA2 mit XIAP vermittelt (Hegde *et al.*, 2002). Ein ähnliches Motiv wurde für alle IAP-bindenden Proteine, wie z. B. *Drosophila* Grim, Reaper, Hid oder Sickie (Chen *et al.*, 1996; Vucic *et al.*, 1997, 1998; Srinivasula *et al.*, 2002) beschrieben. Omi/HtrA2 ist auf Grund seiner Proteasefunktion ebenfalls in der Lage, caspase-unabhängigen Zelltod zu induzieren (Verhagen *et al.*, 2002; van Loo *et al.*, 2002). Dieser caspase-unabhängige Signalweg über Omi/HtrA2 ist bisher noch kaum verstanden. Es liegt jedoch nahe, dass Omi/HtrA2 durch proteolytische Spaltung potentielle Apoptoseinhibitoren inaktiviert und beseitigt oder Vorläuferproteine aktiviert, die für den caspase-unabhängigen Zelltod wichtig sind. Um zu untersuchen, ob der NPZ, der in NIH3T3-Zellen durch TNF in Kombination mit zVAD vermittelt werden kann, möglicherweise durch Omi/HtrA2 initiiert wird, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der spezifische Inhibitor, ucf-101, gegen die proteolytische Aktivität von Omi/HtrA2 verwendet. In einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass ucf-101 in Caspase-9-defizienten embryonalen Mausfibroblasten Omi-induzierte caspase-unabhängige Apoptose blockieren kann (Hakem *et*

al., 1998; Cilenti *et al.*, 2003). Es konnte jedoch kein Effekt von ucf-101 auf die TNF/zVAD-behandelten NIH3T3-Zellen in dieser Arbeit beobachtet werden. Der NPZ wurde durch die Zugabe des Omi/HtrA2-Inhibitors weder verhindert noch verzögert. Demzufolge ist anzunehmen, dass der Mechanismus des TNF/zVAD-induzierten Zelltods in NIH3T3-Zellen nicht auf die Proteaseaktivität von Omi/HtrA2 zurückzuführen ist. Für den Omi/HtrA2-Inhibitor ist zudem beschrieben, dass dieser in hohen Konzentrationen für Säugetierzellen zytotoxisch ist (Cilenti *et al.*, 2003). Während der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte verschiedener Konzentrationen des Inhibitors überprüft (Daten nicht gezeigt). Es wurde allerdings keine zytotoxische Wirkung des Inhibitors auf die Zellen festgestellt. Zudem wurde der NPZ nicht durch die Zugabe des Inhibitors verstärkt, was somit eine Zytotoxizität des Inhibitors auf die NIH3T3-Zellen in der verwendeten Konzentration ausschließt.

Obwohl Cytochrom C, Apoptose-induzierender Faktor und Endonuklease G den Sterbevorgang einer Zelle unterstützen, wenn sie aus den Mitochondrien freigesetzt werden, sind diese in ihrer hauptsächlichen physiologischen Funktion doch wichtig für das Überleben der Zelle sowie für die normale Arbeitsweise der Mitochondrien. Dies könnte genauso für Omi/HtrA2 zutreffen. Omi/HtrA2 ist stark homolog zu den Hitzeschock beantwortenden Serinproteasen (HtrAs), die für Bakterien essentiell für das Überleben bei hohen Temperaturen sind (Spiess *et al.*, 1999). Omi/HtrA2 und seine verwandten Proteine können die Stabilität anderer Proteine unter thermischen, osmotischen oder anderen Stressbedingungen kontrollieren. Natürlich bedeutet eine Behandlung mit TNF und zVAD für die NIH3T3-Zellen Stress, trotzdem könnte Omi/HtrA2 in dieser Zelllinie aber nur in das Überleben unter extremen Bedingungen, aber nicht während des Todesrezeptor-vermittelten Zelltods involviert sein.

4.2.4 PARP

Ein wichtiger Vorgang während der Apoptose ist die Spaltung der Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) durch Caspase-3 (Kaufmann *et al.*, 1993). Nach einer Stimulation von Zellen mit TNF oder anti-Fas Antikörper spaltet Caspase-3 das 113 kDa große Enzym PARP an einer DEVD-Schnittstelle zwischen Asp214 und Gly215. Dabei entstehen zwei Fragmente von 89 kDa und 24 kDa Größe (Nicholson *et al.*, 1995). Die Spaltung von PARP ist während der Apoptose ein sehr wichtiger Prozess, da er die Aktivierung von PARP verhindert. PARP ist ein chromatin-assoziiertes Protein, das infolge von DNA-Schäden an die DNA-Stränge bindet und die DNA-Reparaturmaschinerie der Zelle aktiviert. Dabei poly(ADP-ribosyl)iert es

unter Verwendung von NAD^+ als Substrat sich selbst und andere DNA-Reparaturproteine (Lindahl *et al.*, 1995). Die Neusynthese von NAD^+ wiederum benötigt intrazelluläres ATP. Einige Studien haben gezeigt, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt die Form des Zelltods beeinflusst (Eguchi *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997). Während Apoptose meist durch hohe Konzentrationen an ATP begleitet ist, können geringe ATP-Konzentrationen einen apoptotischen Zelltod in einen nekrotischen verändern. Zudem kann in Mausfibroblasten, die caspase-resistentes PARP exprimieren, durch Stimulation mit TNF Nekrose induziert werden (Herceg und Wang, 1999). In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass eine Behandlung von L929-Zellen mit TNF in Kombination mit zVAD durch eine starke ATP-Abnahme und eine beschleunigte Nekrose charakterisiert war, was mit der Aktivität von PARP in Zusammenhang gebracht wurde (Los *et al.*, 2002). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit NIH3T3-Zellen durch die Zugabe von zVAD ebenfalls gegenüber der TNF-Zytotoxizität sensibilisiert werden konnten, sollte eine mögliche Rolle des Enzyms PARP während des NPZs von NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zelle zusätzlich mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid versetzt. 3-Aminobenzamid wurde als PARP-Inhibitor beschrieben, der gegenüber dem TNF-induzierten Zelltod, aber nicht vor einem anti-Fas-vermittelten Zelltod schützt (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992,1994). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass 3-Aminobenzamid dem sensibilisierenden Effekt der Caspase-Inhibition entgegenwirkt (Los *et al.*, 2002). Leider konnte in dieser Arbeit durch die Toxizitätsanalyse kein Effekt von PARP auf den NPZ nachgewiesen werden. Der beobachtete Zelltod wurde weder verstärkt noch verzögert. Aus diesem Grund wird angenommen, dass das Enzym PARP für diese Form des Zelltods in NIH3T3-Zellen nicht wichtig ist. Der Caspaseinhibitor zVAD kann zwar die NIH3T3-Zellen ebenso wie L929-Zellen gegenüber der Zytotoxizität von TNF sensibilisieren. Im Gegensatz zu L929-Zellen ist PARP jedoch nicht an der Induktion der Nekrose beteiligt. In L929-Zellen schützt zudem der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid eindeutig vor dem nekrotischen Zelltod. Da die ATP-Konzentration in den TNF/zVAD-behandelten NIH3T3-Zellen nicht abnimmt, sondern eher gleich bleibt (Daten nicht gezeigt), kann eine PARP-Aktivität während des NPZs ausgeschlossen werden. Aus diesen Ergebnissen läßt sich auch entnehmen, dass es durch die Behandlung der NIH3T3-Zellen mit TNF in Kombination mit zVAD zu keiner Schädigung der DNA kommt, die das DNA-Reparaturenzym PARP aktiviert, so wie es für TNF-induzierte Schädigungen auf Grund der Produktion von Sauerstoffradikalen zu beobachten ist.

4.3 FLIP_(s) verstärkt die Aktivierung von NF- κ B und Erk

Die untersuchten Mechanismen schienen keine Rolle für den TNF/zVAD-vermittelten NPZ in NIH3T3-Zellen zu spielen. Daraufhin wurde nach molekularen Zusammenhängen zwischen Proliferation und programmiertem Zelltod gesucht. Dazu sollte die Funktion des Proteins cFLIP als mögliches Schaltermolekül charakterisiert werden. Für cFLIP sind nicht nur pro- oder antiapoptotische Effekte, sondern auch ein pro-proliferativer Einfluss beschrieben worden (Goltsev *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997; Irmeler *et al.* 1997). Einige Veröffentlichungen zeigen, dass die Expression von großen Mengen an cFLIP das Tumorstadium verstärkt und so wahrscheinlich den Tumorzellen ermöglicht, der Immunabwehr zu entkommen (Medema *et al.*, 1999; Djerbi *et al.*, 1999). Zudem zeigen embryonale cFLIP-defiziente Mausfibroblasten eine höhere Sensitivität gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose (Yeh *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von FLIP in HEK293T-Zellen zum Zelltod.

Auf dem Niveau der mRNA sind zwar verschiedene *Splice*-Varianten von cFLIP beschrieben worden, aber auf Proteinebene sind bisher nur zwei Formen bekannt, die als FLIP_(L) und FLIP_(s) bezeichnet werden (Scaffidi *et al.*, 1999). Die lange Form von cFLIP enthält zwei DED-Domänen sowie eine caspase-ähnliche Domäne. Auf Grund eines Aminosäureaustausches von Cystein zu Tyrosin im aktiven Zentrum ist die caspase-ähnliche Domäne inaktiv. Die kurze Form von cFLIP besteht nur aus zwei DED-Domänen, an die sich C-terminal nur eine kurze Aminosäurekette anschließt. Die kurze Form von cFLIP ähnelt in seiner Struktur sehr stark dem viralen FLIP (vFLIP). Das sind Proteine, die in verschiedenen Virenstämmen, wie z. B. in Herpesviren nachgewiesen wurden und ebenfalls nur zwei DED-Domänen enthalten (Thome *et al.*, 1997). Für das vFLIP ist eindeutig eine antiapoptotische Wirkung durch Inhibition von Caspase-8 beschrieben worden (Übersicht in Meinel *et al.*, 1998). Eine Überexpression von FLIP_(s) aber nicht von FLIP_(L) bewahrt T-Zellen vor dem Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) (Kirchhoff *et al.*, 2000). In BJAB-Zellen führt eine Überexpression sowohl von FLIP_(L) als auch von FLIP_(s) zu einer Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermitteltem Zelltod. Beide Formen ermöglichen dies auf unterschiedliche Weise (Krueger *et al.*, 2001), aber über welche Mechanismen es erfolgt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Sowohl für FLIP_(L) als auch für FLIP_(s) konnte gezeigt werden, dass diese an den DISC rekrutiert werden können (Scaffidi *et al.*, 1997). Dies führte zu der Annahme, dass das Verhältnis von cFLIP zu Procaspase-8 am DISC entscheidend für die Weiterleitung des Signals nach Rezeptoraktivierung ist. Bei geringen Mengen an cFLIP wird die Procaspase-8 an den DISC rekrutiert und dort vollständig prozessiert. Es wird aktives

Caspase-8-Heterotetramer aus den beiden p18- und p10-Untereinheiten vom DISC freigesetzt, das nachfolgend eine Kaskade an Caspasen aktivieren kann, die dann zum Zelltod führen.

Liegt FLIP_(L) in einer hohen Konzentration vor, wird es zusammen mit der Procaspase-8 an den DISC rekrutiert. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die heterodimere Interaktion zwischen FLIP_(L) und Caspase-8 signifikant stärker ist als die homodimere Interaktion von zwei Procaspasen-8 (Chang *et al.*, 2002). Am DISC erfolgt eine unvollständige Spaltung von FLIP_(L) und der Procaspase-8. Das p43-Spaltprodukt von FLIP_(L) und das p41-Spaltprodukt von Caspase-8 verbleiben am DISC, während die kleineren Untereinheiten, p10-Caspase-8 und p12-FLIP_(L), freigesetzt werden. Der erste Schritt der Caspase-8-Aktivierung erfolgt autokatalytisch. Dabei wird für die Konformationsänderung eine weitere Caspasedomäne benötigt, die durchaus wie im Fall von FLIP_(L) inaktiv sein kann. Im zweiten Schritt wird dann aber für die transkatalytische Prozessierung eine aktive Caspasedomäne benötigt. Ist diese nicht vorhanden, kann demnach die Prozessierung der Caspase-8 nicht vollständig ablaufen. Demzufolge induziert FLIP_(L) in der Procaspase-8 nach der ersten Spaltung eine Konformationsänderung, die eine weitere Prozessierung unmöglich macht (Krueger *et al.*, 2001). Liegen im Vergleich dazu in der Zelle große Mengen an FLIP_(S) vor, wird dieses zusammen mit der Procaspase-8 an den DISC rekrutiert. Jegliche Prozessierung der Procaspase-8 unterbleibt in diesem Fall, was die Zelle resistent gegenüber Todesrezeptor-vermittelte Apoptose macht.

Zusätzlich konnte in weiteren Veröffentlichungen gezeigt werden, dass cFLIP den proliferativen Signalweg nach CD95-Aktivierung verstärken kann, indem es in T-Zellen die Bindung von RIP, TRAF1 und TRAF2 an den DISC ermöglicht. Dies führt nachfolgend zur Aktivierung des NF- κ B und des Erk-Signalweges. Ähnliches wurde für humanes FLIP_(L) in transgenen Mäusen gefunden (Kataoka *et al.*, 2000). Zudem konnte festgestellt werden, dass durch eine Überexpression von vFLIP des humanen Herpesvirus 8 (HHV8) NF- κ B in 293T- und NIH3T3-Zellen aktiviert wird (Liu *et al.*, 2002). Dies wird allein den beiden DED-Domänen zugeordnet, weil eine Caspaseaktivität für die Aktivierung von NF- κ B entbehrlich ist. Im Gegensatz dazu wurde aber auch berichtet, dass eine Überexpression von cFLIP den Signalweg zur NF- κ B-Aktivierung inhibieren kann (Wajant *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach TNF-Stimulation transient transfiziertes FLIP_(S) sowohl in HEK293- als auch in NIH3T3-Zellen die NF- κ B-Aktivität steigert. Überraschenderweise scheint transient transfiziertes FLIP_(L) nach TNF-Stimulation die Steigerung der NF- κ B-Aktivität zu inhibieren. Für den FLIP_(L)-Caspase-8-Heterodimerkomplex, der nach Rezeptorstimulation am DISC verbleibt und aus dem p43-

Spaltprodukt von FLIP_(L) und dem p41-Spaltprodukt von Caspase-8 besteht, wird eine proteolytische Aktivität angenommen. Dieser ist in der Lage, andere Proteine, die ebenfalls am DISC binden wie z. B. RIP, zu spalten (Micheau *et al.*, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass Caspase-8 dabei ähnlich wie Caspase-9 reguliert wird. Die Aktivierung von Caspase-9 erfolgt durch eine Dimerisierung zweier Caspase-9-Monomere. Dabei findet eine Konformationsänderung statt, die dazu führt, dass nur eins der beiden Monomere in dem dimeren Komplex katalytisch aktiv ist, während das andere inaktiv bleibt. Ähnlich könnte es sich mit FLIP_(L) und Caspase-8 verhalten. Dabei übernimmt FLIP_(L) die Rolle des inaktiven Monomers und induziert durch Prozessierung von Caspase-8 eine Konformationsänderung. Der Heterodimerkomplex von FLIP_(L) und Caspase-8 besitzt daraufhin eine Reaktionsfähigkeit, die ohne den zweiten Schritt der transkatalytischen Aktivierung der Caspase-8 auskommt. Es konnte gezeigt werden, dass der FLIP_(L)-Caspase-8-Heterodimerkomplex mit biotinylierten DEVD.aomk-Substraten reagieren kann (Micheau *et al.*, 2002). Ebenso konnte die Spaltung von RIP durch den FLIP_(L)-Caspase-8-Heterodimerkomplex nachgewiesen werden. Die Spaltung erscheint an einer typischen Caspase-8-Schnittstelle und trennt die Kinasedomäne von der Todesdomäne des Proteins. Es entsteht ein Fragment von der Größe, wie es als Inhibitor des NF-κB-Signalwegs beschrieben wurde. RIP ist wichtig für Aktivierung von NF-κB durch TNF, so dass man annehmen kann, dass eine Spaltung von RIP eine Inhibition von NF-κB verursacht. Zu vermuten wäre, dass nach Stimulation der transient transfizierten Zellen mit TNF im Rahmen der vorliegenden Arbeit FLIP_(L) zusammen mit Caspase-8 an den DISC rekrutiert werden würde. Dort würden beide prozessiert und der Komplex aus den beiden am DISC verbleibenden Untereinheiten von FLIP_(L) und Caspase-8 würde eine Konformationsänderung erfahren. Der FLIP_(L)-Caspase-8-Heterodimerkomplex würde proteolytisch aktiv sein und könnte nachfolgend an den DISC rekrutiertes RIP spalten. Dies würde zu einer Herunterregulation der NF-κB-Aktivität in den Zellen führen, die FLIP_(L) überexprimieren. Dies stimmt zum Teil mit Beobachtungen aus anderen Studien überein. Dort konnte ebenfalls eine Inhibition der TNF-induzierten NF-κB-Aktivität durch FLIP_(L)-Überexpression gezeigt werden, die zudem noch konzentrationsabhängig war (Wajant *et al.*, 2000, Hu *et al.*, 2000).

Die Aktivierung der Caspase-8 ist abhängig von der caspase-ähnlichen Domäne von FLIP_(L). FLIP_(S), das nur aus den beiden DED-Domänen besteht, bindet zwar den Caspase-8-Vorläufer, prozessiert diesen aber nicht. An FLIP_(S)-gebundene Caspase-8 bleibt inaktiv und ist demzufolge auch nicht in der Lage, DEVD.aomk-Substraten zu spalten. Es ist beschrieben, dass eine Prozessierung von RIP in FLIP_(S)-überexprimierenden Zellen erheblich reduziert ist

(Micheau *et al.*, 2002). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die caspase-ähnliche Domäne von FLIP_(L) die Spaltung von RIP verstärkt. Zusätzlich konnte eine Spaltung von RIP nur am DISC und nicht durch freigesetzte Caspase-8 im Zytoplasma nachgewiesen werden (Micheau *et al.*, 2002). Im Vergleich zu den FLIP_(L)-überexprimierenden Zellen würde demnach in den FLIP_(S)-überexprimierenden Zellen RIP nicht gespalten werden, was die Weiterleitung des TNF-Signals ermöglichen und somit die NF-κB-Aktivität erlauben könnte. Unterstützt würde dieser Umstand durch die Beobachtung, dass überexprimiertes FLIP_(S) die Spaltung von FLIP_(L) am DISC verhindern kann (Krueger *et al.*, 2001). Dadurch würde zusätzlich endogenes FLIP_(L) inhibiert und eine weitere Steigerung der NF-κB-Aktivität über FLIP_(S) und RIP erreicht werden. Nicht auszuschließen sind weiterhin bisher unbekannte Moleküle, die ebenfalls mit den FLIP_(L)-Caspase-8- oder FLIP_(S)-Caspase-8-Heterodimerkomplexen reagieren und eine Weiterleitung Todesrezeptor-induzierter Signale entweder fördern oder blockieren könnten. Mögliche Funktionen der freigesetzten Untereinheiten des prozessierten FLIP_(L) oder Caspase-8 sind bisher nicht bekannt.

Weil die Transfektionseffizienz in NIH3T3-Zellen so schlecht war, wurde dazu übergegangen, FLIP_(S) stabil in NIH3T3-Zellen zu transfizieren. Davon erhoffte man sich zunächst eine bessere Expression von FLIP_(S) und weiterhin eine Bestätigung der bis dahin erzielten Ergebnisse. FLIP_(S) wurde zunächst mit Hilfe eines retroviralen Vektors stabil in die NIH3T3-Zellen transduziert. Wie schon in den transient transfizierten Zellen konnte nachgewiesen werden, dass das überexprimierte FLIP_(S) die NF-κB-Aktivität steigern kann. Demnach ist anzunehmen, dass FLIP_(S) über die Bindung TRAF1 und TRAF2 das Protein RIP an den DISC rekrutiert und dadurch nachfolgend die NF-κB-Aktivität erhöht. Demzufolge lässt sich spekulieren, ob FLIP_(S) ein vom Todesrezeptor induziertes Signal in die Richtung der Proliferation regulieren könnte. Im Unterschied dazu konnte eine Steigerung der NF-κB-Aktivität in NIH3T3-Zellen, die mit Hilfe der Verpackungszelllinie HEK293T transfiziert wurden, nicht nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden, da die eingesetzten Transfektionsmethoden prinzipiell dieselben sind und sich nur in den verschiedenen Verpackungszelllinien unterscheiden.

Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Überexpression von FLIP_(S) in stabil transfizierten NIH3T3-Zellen zu einer Aktivierung von Erk1/2 führt. Die Aktivierung nach TNF-Stimulation ist nicht, wie in den nicht transfizierten Zellen, transient mit einem Aktivierungsmaximum bei 15 min, sondern sie wird mindestens über einen Zeitrahmen von bis zu 60 min aufrecht erhalten. Hierbei sind keine Unterschiede in der Erk1/2-Aktivierung in den mit den verschiedenen Verpackungszelllinien transfizierten Zellen

festzustellen gewesen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein, in denen eine anhaltende Erk-Aktivierung in Jurkat-Zellen nach anti-CD3-Stimulation beschrieben wurde (Kataoka *et al.*, 2000). Der FLIP_(s)-Caspase-8-Heterodimerkomplex scheint demzufolge nicht nur mit Komponenten des NF-κB-Signalweges, sondern auch mit Elementen des Erk-Signalweges interagieren zu können. Erk-Aktivierung wird meistens durch eine von Ras-initiierte Rekrutierung von Raf-1 erreicht, die zunächst zu einer Aktivierung der MAP Kinase Kinase Mek und nachfolgend von Erk führt (Übersicht in Campbell *et al.*, 1998). Der Beweis für eine Wechselwirkung mit diesen oder auch weiteren Proteinen konnte in dieser Arbeit nicht erbracht werden, würde aber, wie auch eine Vergleichsstudie mit FLIP_(L)-transfizierten Zellen, Bestandteil weiterführender Arbeiten sein. Dazu gehören auch Untersuchungen, in denen FLIP_(s) herunterreguliert wird, wie in dieser Arbeit mit dem Einsatz von siRNAs schon versucht wurde. Wenn infolge einer Herunterregulation von FLIP_(s) die Aktivitäten von NF-κB und Erk reduziert werden könnten, würde dies die beobachteten Effekte von FLIP_(s) auf NF-κB und Erk noch einmal bestätigen.

In verschiedenen Veröffentlichungen wird sowohl FLIP_(L) als auch FLIP_(s) eine antiapoptotische Wirkung und teilweise FLIP_(L) eine proapoptotische Wirkung zugeschrieben (Shu *et al.*, 1997; Goltsev *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte dagegen mit Hilfe von Toxizitätsanalysen nicht nachgewiesen werden, dass überexprimiertes FLIP_(s) einen schützenden oder gar einen sensibilisierenden Effekt auf die stimulierten NIH3T3-Zellen ausübt. Überraschenderweise war FLIP_(s) auch nicht in der Lage NIH3T3-Zellen, die mit dem klassischen Apoptosestimulus TNF/Cycloheximid behandelt worden waren, zu schützen. Für FLIP_(L) ist beschrieben, dass es konzentrationsabhängig wirkt. In HeLa-Zellen kann FLIP_(L), wenn es in physiologisch relevanten Mengen exprimiert wird, durch die Interaktion mit der Procaspase-8 Apoptose unterstützen. In überexprimierten Mengen inhibiert FLIP_(L) den Zelltod in HeLa-Zellen (Chang *et al.*, 2002). Für FLIP_(s) in NIH3T3-Zellen konnte ein solcher Zusammenhang im Rahmen dieser Arbeit nicht gesehen werden. Vielleicht liegt auf Grund des relativ schwachen retroviralen Promotors zu wenig FLIP_(s) in den Zellen vor, so dass ein Schutz vor einem induzierten Zelltod durch FLIP_(s) nicht erreicht wird. Zudem wurde die Wirkung physiologisch relevanter Mengen von FLIP_(s) bisher noch nicht beschrieben. Demzufolge ist eher anzunehmen, dass FLIP_(s) in NIH3T3-Zellen während der Induktion von Zelltod keine Rolle spielt.

Zusammenfassend war zu beobachten, dass eine Überexpression von FLIP_(s) zu einer Aktivierung der Signalwege von NF-κB und Erk führt. Somit konnte eine mögliche proliferative Funktion von FLIP_(s) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erbrachten Toxizitätsanalysen weder mit transient noch mit stabil überexprimierten FLIP_(s) einen Nachweis über einen pro- oder antiapoptotischen Effekt von FLIP_(s). FLIP_(s) ist demnach in NIH3T3-Zellen während des TNF/zVAD-vermittelten nekrose-ähnlichen programmierten Zelltods (NPZ) nicht wichtig.

5 Zusammenfassung

Durch die Stimulation mit TNF bei gleichzeitiger Inhibition der Caspasen mit dem Breitbandcaspaseinhibitor zVAD kann in NIH3T3-Zellen ein nekrotisch-ähnlicher programmierter Zelltod (NPZ) ausgelöst werden. Durch die Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus vor dem Eintritt des Zelltods wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ablauf des Zellzyklus und dem Zelltod angenommen. In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst eine Hochregulation des zellzyklusregulierenden Proteins p21^{WAF1/Cip1} ebenfalls vor Eintritt des Zelltods nachgewiesen werden. Durch die Lokalisation von p21^{WAF1/Cip1} im Zellkern und dessen Koimmunpräzipitation mit cdk2 konnte bewiesen werden, dass p21^{WAF1/Cip1} in der Lage ist, seiner Funktion als CDK-Inhibitor nachzugehen. Allerdings konnte kein Effekt von p21^{WAF1/Cip1} auf die Cyclin-CDK-Komplexe festgestellt werden. Eine Inhibition der Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} blockierte den TNF/zVAD-induzierten Zelltod jedoch nicht, sondern verstärkte diesen noch zusätzlich. p21^{WAF1/Cip1} ist demnach nicht die Ursache für den NPZ nach TNF/zVAD-Behandlung in NIH3T3-Zellen, sondern vielmehr führt die Hochregulation von p21^{WAF1/Cip1} zu einem transienten G2/M-Arrest, der den Eintritt des Zelltods verzögert.

Es wurde weiterhin nach alternativen molekularen Mechanismen gesucht, die dem NPZ möglicherweise zu Grunde liegen. Dazu sollte untersucht werden, ob sich der Zelltod durch verschiedene pharmakologische Substanzen inhibieren läßt. Es zeigte sich, dass weder Autophagie als alternativer Zelltodmechanismus in Frage kommen konnte noch die Aktivität von Cathepsin D, Omi/HtrA2 oder PARP eine Rolle während des NPZs in NIH3T3-Zellen spielen.

Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen Proliferation und Zelltod angenommen. Dabei kam als mögliches Bindeglied das Protein cFLIP in Frage, für das sowohl proliferative als auch pro- sowie antiapoptotische Wirkungen beschrieben sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar nicht ermittelt werden, dass die kurze Form des cFLIP, FLIP_(s), NPZ verzögert oder gar verstärkt. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass FLIP_(s) die Aktivität von NF-κB und Erk steigern kann und somit zwei Signalwege, die wichtig für die Proliferation sind, positiv beeinflussen kann.

6 Summary

TNF-stimulation with simultaneous caspase inhibition by the broadspectrum caspase inhibitor zVAD can induce a necrosis like programmed cell death in NIH3T3 cells. The observation that a cell cycle arrest in the G2/M phase precedes cell death has led to the assumption of a link between cell cycle progression and cell death. First of all, this work demonstrates an upregulation of the cell cycle regulating protein p21^{WAF/cip1} prior to cell death. Detection of p21^{WAF/cip1} in the nucleus, as well as coimmunoprecipitation of p21^{WAF1/Cip1} and cdk2 demonstrated that p21^{WAF/cip1} is able to pursue its function as a cdk inhibitor. However, an effect of p21^{WAF/cip1} on cyclin-cdk-complexes could not be determined. The inhibition of p21^{WAF/cip1} upregulation did not block the TNF/zVAD induced cell death but rather additionally amplified it. Therefore, p21^{WAF/cip1} is not the cause of the necrosis-like programmed cell death after TNF/zVAD treatment in NIH3T3 cells. Actually, the upregulation of p21^{WAF/cip1} leads to a transient G2/M arrest delaying cell death.

Thus, different molecular mechanisms were investigated potentially underlying necrosis like programmed cell death. For that purpose different pharmacological substances were investigated for their potential to inhibit cell death. It was shown that neither autophagy could come into question as an alternative mechanism of cell death, nor could the activity of cathepsin D, Omi/HtrA2 as well as PARP play a role during the observed necrotic cell death in NIH3T3 cells.

Moreover, a connection between proliferation and cell death was assumed. In that context, the protein cFLIP, which is known for its ability to act pro-proliferative as well as pro- and antiapoptotic, was considered as possible connection. In the course of this work, it could not be proven that the short form of cFLIP, FLIP_(s), delays or even amplifies the necrosis like programmed cell death. However, it was shown that FLIP_(s) can increase NFκB- and ERK-activity, thereby positively influencing two signaling pathways known to be critical for proliferation.

7.1 Literaturverzeichnis

- Adam-Klages S., Schwandner R., Luschen S., Ussat S., Kreder D., Kronke M. (1998) Caspase-mediated inhibition of human cytosolic phospholipase A2 during apoptosis. *J.Immunol.* 161:5687-5694.
- Adam-Klages S., Schwandner R., Adam D., Kreder D., Bernardo K., Kronke M. (1998) Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J.Leukoc.Biol.* 63:678-682.
- Aggarwal B.B., Kohr W.J., Hass P.E., Moffat B., Spencer S.A., Hanzel W.J., Bringman T.S. Nedwin G.E., Goeddel D.V. und Harkins R.N. (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260: 2345-2354
- Aggarwal B.B. und Natarajan K. (1996) Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7:93-124
- Albert M.L., Pearce S.F., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L., and Bhardwaj N. (1998) Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and Cross-present Antigens To Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188:1359-1368
- Ameisen J.C (1996) The Origin Of Programmed Cell Death. *Science* 272: 1278-1279
- Ameisen JC (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: A timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation* 9, 367-393
- Ashkenazi A. und Dixit V.M. (1998) Death receptors. signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308
- Ball K.L. (1997) p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. *Prog Cell Cycle Res.* 3:125-134 Übersicht
- Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W. (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-445
- Baeuerle P.A. und Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13-20
- Beilharz E.J., Williams C.E., Dragunow M., Sirimanne E.S., Gluckman P.D. (1995) Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain.Res.Mol.BrainRes.* 29:1-14
- Bellone M., Iezzi G., Rovere P., Galati G., Ronchetti A., Heltai S., Protti M.P., Davoust J., Rugarli C., Manfredi A.A. (1997) Processing OF Engulfed Apoptotic Bodies Yields T cell Epitopes. *J. Immunol.* 159: 5391-5399
- Benson R.S., Dive C., Watson A.J. (1998) Comparative effects of Bcl-2 over-expression and ZVAD.FMK treatment on dexamethasone and VP16-induced apoptosis in CEM cells. *Cell.Death.Differ.* 5:432-439
- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J.D., Chang M., Pan Y.C., Mathison J., Ulevitch R., Cerami A. (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554
- Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J. Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J., Cerretti D.P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis-factor- α from cells. *Nature* 385: 729-733
- Blommaert E.F., Krause U., Schellens J.P., Vreeling-Sindelarova H., Meijer A.J. (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur.J.Biochem.* 243:240-246

- Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., Wallach D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270:7795-7798
- Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815
- Borner C. und Monney L. (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell.Death.Differ.* 6:497-507
- Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1999) Caspase independent/dependent Regulation Of K(+), Cell Shrinkage, And Mitochondrial Membrane Potential During Lymphocyte Apoptosis. *J.Biol.Chem.* 274:21953-21962
- Bursch W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8:569-581. Übersicht
- Boulares A.H., Yakovlev A.G., Ivanova V., Stoica B.A., Wang G., Iyer S., Smulson M. (1999) Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J.Biol.Chem.* 274:22932-22940
- Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L., Clark G.J., Der C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17:1395-413 Übersicht
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., und Williamson B. (1976) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3666-3670
- Chang D.W., Xing Z., Pan Y., Algeciras-Schimmich A., Barnhart B.C., Yaish-Ohad S., Peter M.E., Yang X. (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 21:3704-3714
- Charriaut-Marlangue C., Margail I., Borrega F., Plotkine M., Ben-Ari Y. (1996) NG-nitro-L-arginine methyl ester reduces necrotic but not apoptotic cell death induced by reversible focal ischemia in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 310:137-140
- 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
- Chen G., Cao P., Goeddel D.V. (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol.Cell.* 9:401-410.
- Chen P., Nordstrom W., Gish B., Abrams J.M. (1996) grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10:1773-1782
- 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
- Chou J.J., Matsuo H., Duan H., Wagner G. (1998) Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 94:171-180
- Cilenti L., Lee Y., Hess S., Srinivasula S., Park K.M., Junqueira D., Davis H., Bonventre J.V., Alnemri E.S., Zervos A.S. (2003) Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2. *J.Biol.Chem.* 278:11489-11494
- Clarke P.G.H., and Clarke S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol.*, 193: 81-99

- Daugas E., Susin S.A., Zamzami N., Ferri K.F., Irinopoulou T., Larochette N., Prevost M.C., Leber B., Andrews D., Penninger J., Kroemer G. (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14:729-739
- Deas O., Dumont C., MacFarlane M., Rouleau M., Hebib C., Harper F., Hirsch F., Charpentier B., Cohen G.M., Senik A. (1998) Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J.Immunol.* 161:3375-3383
- Deiss L.P., Galinka H., Berissi H., Cohen O., Kimchi A. (1996) Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* Aug 1;15(15):3861-3870.
- Denecker G., Vercammen D., Declercq W. and Vandenaabeele P. (2001) Apoptotic And Necrotic Cell Death Induced by Death Domain Receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 356-370
- Djerbi M., Screpanti V., Catrina A.I., Bogen B., Biberfeld P., Grandien A. (1999) The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J.Exp.Med.* 190:1025-1032
- Devin A., Cook A., Lin Y., Rodriguez Y., Kelliher M., Liu Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity.* 12:419-429.
- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M. (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-544
- 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
- Duan H., Dixit V.M. (1997) RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385:86-89
- Duke R.C, Ojcius D.M and Ding-E-Young J (1997) *Spektrum der Wissenschaft* 2, 26-35
- Dulic V., Stein G.H., Far D.F., Reed S.I. (1998) Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol.* 18:546-557
- Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 68:383-424
- Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57:1835-1840
- Ellis H.M. and Horvitz H.R. (1986) Genetic Control OF Programmed Cell Death In The Nematode *C.elegans*. *Cell* 44:817-829
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391:43-50. Erratum in: *Nature* 1998 May 28;393(6683):396.
- 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
- Fadok V.A., Bratton D.L, Konowal A., Freed P.W., Westcott JY. and Henson P.M. (1998) Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF-beta, PGE2, And PAF. *J. Clin. Invest.* 101: 890-898
- Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch S.C., Warner M.L., Henson P.M. (1998) The Role Of Phosphatidylserine In Recognition Of Apoptotic Cells By Phagocytes. *Cell.Death.Differ.* 5:551-562
- Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A., Henson P.M. (2000) A Receptor For Phosphatidylserine-specific Clearance Of Apoptotic Cells. *Nature.* 405: 85-90.

- Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D., Lademann U., Bastholm L., Boes M., Elling F., Leist M., Jaattela M. (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J.Cell.Biol.* 153:999-1010
- Fones E., Amigo H., Gallegos K., Guerrero A., Ferreira J. (1989) t-butyl-4-hydroxyanisole as an inhibitor of tumor cell respiration. *Biochem.Pharmacol.* 38:3443-3451
- Gervais J.L., Seth P., Zhang H. (1998) Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* Jul 273: 19207-19212
- Glucksmann A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol.Rev.* 26:5986
- Goke R., Goke A., Goke B., El-Deiry W.S., Chen Y. (2001) Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1. *Digestion.* 64:75-80
- Goltsev Y.V., Kovalenko A.V., Arnold E., Varfolomeev E.E., Brodianskii V.M., Wallach D. (1997) CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J.Biol.Chem.* 272: 19641-19644
- Goossens V., Stange G., Moens K., Pipeleers D., Grooten J. (1999) Regulation of tumor necrosis factor-induced, mitochondria- and reactive oxygen species-dependent cell death by the electron flux through the electron transport chain complex I. *Antioxid.Redox.Signal.* 1:285-295
- Gorospe M., Wang X., Holbrook N.J. (1999) Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expr.* 7:377-385 Übersicht
- 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
- Grell M., Douni E., Wajant H., Löhden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K. und Scheurich P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802
- Gu Y., Kuida K., Tsutsui H., Ku G., Hsiao K., Fleming M.A., Hayashi N., Higashino K., Okamura H., Nakanishi K., Kurimoto M., Tanimoto T., Flavell R.A., Sato V., Harding M.W., Livingston D.J., Su M.S. (1997) Activation Of Interferon-gamma Inducing Factor Mediated By Interleukin-1 β converting enzyme. *Science.* 275: 206-209.
- Ha H.C. und Snyder S.H. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A* 96:13978-13982
- Hakem R., Hakem A., Duncan G.S., Henderson J.T., Woo M., Soengas M.S., Elia A., de la Pompa J.L., Kagi D., Khoo W., Potter J., Yoshida R., Kaufman S.A., Lowe S.W., Penninger J.M., Mak T.W. (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94:339-352
- Hampton M.B. und Orrenius S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 414:552-556
- Heibein J.A., Barry M., Motyka B., Bleackley R.C. (1999) Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and cytochrome c release are caspase independent. *J.Immunol.* 163:4683-4693
- Han D.K., Chaudhary P.M., Wright M.E., Friedman C., Trask B.J., Riedel R.T., Baskin D.G., Schwartz S.M., Hood L. (1997) MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 11333-11338
- Hegde R., Srinivasula S.M., Zhang Z., Wassell R., Mukattash R., Cilenti L., DuBois G., Lazebnik Y., Zervos A.S., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J.Biol.Chem.* 277:432-438

- Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Wickel M., Schneider-Brachert W., Trauzold A., Hethke A., Schutze S. (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death.Differ.* in Druck
- Hengartner M.O. and Horvitz H.R (1994) *C.elegans* Cell Survival Gene CED-9 Encodes A functional Homolog Of The Mammalian Proto-Oncogene bcl-2. *Cell* 76: 665-676
- Herceg Z., Wang Z.Q. (1999) Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol.Cell.Biol.* 19:5124-5133
- Higuchi M., Honda T., Proske R.J., Yeh E.T. (1998) Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene.* 17:2753-2760
- Hogquist K.A., Nett M.A., Unanue E.R., Chaplin D.D. (1991) Interleukin 1 Is Processed And Released During Apoptosis. *Proc .Natl. Acad. Sci. USA* 88:8485-8489
- 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
- Horvitz H.R., Chalfie M., Trent C., Sulston J.E. and Evans P.D. (1982) Serotonin and Octopamine In The Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 216: 1012-1014
- Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504
- Hsu H., Huang J., Shu H.B., Baichwal V., Goeddel D.V. (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4:387-396
- Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308
- Hug H. (2000) Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit* 3: 128-135
- Hughes F.M. Jr, Bortner C.D., Purdy G.D., Cidlowski J.A (1997) Intracellular K⁺ Suppresses The Activation Of Apoptosis In Lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 272:30567-30576
- Inohara N., Koseki T., Hu Y., Chen S., Nunez G. (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 94: 10717-107122
- Irmmler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195
- Isahara K., Ohsawa Y., Kanamori S., Shibata M., Waguri S., Sato N., Gotow T., Watanabe T., Momoi T., Urase K., Kominami E., Uchiyama Y. (1999) Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience.* 91:233-249
- Itoh N. und Nagata S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268:10932-10937
- Jacobson M.D., Weil M. and Raff M.C. (1997) Programmed Cell Death In Animal Development. *Cell* 88: 374-354
- Jin Y.H., Yoo K.J., Lee Y.H., Lee S.K. (2000) Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J.Biol.Chem.* 275: 30256-30263
- Johansson A.C., Steen H., Ollinger K., Roberg K. (2003) Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death.Differ.* 10:1253-1259

- Johnson G.L., Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912 Übersicht
- Johnson M.D., Xiang H., London S., Kinoshita Y., Knudson M., Mayberg M., Korsmeyer S.J., Morrison R.S. (1998) Evidence for involvement of Bax and p53, but not caspases, in radiation-induced cell death of cultured postnatal hippocampal neurons. *J.Neurosci.Res.* 54:721-733
- Kagedal K., Johansson U., Ollinger K. (2001) The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* 15:1592-1594.
- Kanzawa T., Germano I.M., Komata T., Ito H., Kondo Y., Kondo S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* [in Druck]
- Karin M. und Delhase M. (2000) The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* 12:85-98
- Kataoka T., Budd R.C., Holler N., Thome M., Martinon F., Irmeler M., Burns K., Hahne M., Kennedy N., Kovacs M., Tschoop J. (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol.* 10: 640-648
- Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E., Poirier G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53:3976-3985
- Kawahara A., Ohsawa Y., Matsumura H., Uchiyama Y., Nagata S. (1998) Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J. Cell Biol.* 143:1353-1360
- 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. and Currie A.R. (1972) Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications In Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257
- Khwaja A., Tatton L. (1999) Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274:36817-36823
- Kim J., Klionsky D.J. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.* 69:303-342 Übersicht
- King K.L., Cidlowski J.A. (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu.Rev.Physiol.* 60:601-617 Übersicht
- Kirchhoff S., Muller W.W., Li-Weber M., Krammer P.H. (2000) Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur.J.Immunol.* 30:2765-2774
- Kirchhoff S., Muller W.W., Krueger A., Schmitz I., Krammer P.H. (2000) TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J.Immunol.* 165:6293-6300
- Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588
- Kitanaka C und Kuchino Y. (1999) Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell.Death.Differ.* 6:508-515
- Klionsky D.J., Ohsumi Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.* 15:1-32. Übersicht
- Klionsky D.J., Emr S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 290:1717-1721. Übersicht

- Krammer P.H. (2000) Apoptose. Deutsches Ärzteblatt 97, Heft 25, A1752-A1759
- Kriegler M., Perez C., DeFay K., Albert I., Lu S.D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53
- Krönke M., Schütze S., Scheurich P., Pfizenmaier K. (1992) TNF signal transduction and TNF-responsive genes. *Immunol. Ser.* 56:189-216
- Krueger A., Baumann S., Krammer P.H., Kirchhoff S. (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol.Cell.Biol.* 21:8247-8254. Übersicht
- Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P.H., Kirchhoff S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J.Biol.Chem.* 276:20633-20640.
- Lee S.Y., Reichlin A., Santana A., Sokol K.A., Nussenzweig M.C., Choi Y. (1997) TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7:703-713
- Leist M., Gantner F., Kunstle G., Bohlinger I., Tiegs G., Bluethmann H., Wendel A. (1996) The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Mol.Med.* 2:109-124
- Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kuhnle S., Nicotera P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185:1481-1486
- Leist M., Single B., Naumann H., Fava E., Simon B., Kuhnle S., Nicotera P. (1999) Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp. Cell Res.* 249:396-403
- Leist M und Jäättelä M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:589-598
- Leist M., Jaattela M. (2001) Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell.Death.Differ.* 8:324-326
- Lens S.M., Kataoka T., Fortner K.A., Tinel A., Ferrero I., MacDonald R.H., Hahne M., Beermann F., Attinger A., Orbea H.A., Budd R.C., Tschopp J. (2002) The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol.Cell.Biol.* 22: 5419-5433
- Levkau B., Koyama H., Raines E.W., Clurman B.E., Herren B., Orth K., Roberts J.M., Ross R. (1998) Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol.Cell.* 1: 553-563.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501
- 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
- Lindahl T., Satoh M.S., Poirier G.G., Klungland A. (1995) Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci.* 20:405-411 Übersicht
- Liu L., Eby M.T., Rathore N., Sinha S.K., Kumar A., Chaudhary P.M. (2002) The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I kappa B kinase complex. *J.Biol.Chem.* 277:13745-13751
- Liu X., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1997) DFF, A Heterodimeric Protein That Functions Downstream Of Caspase-3 To Trigger DNA Fragmentation During Apoptosis. *Cell.* 89:175-184
- Lockshin R.A. (1969) Programmed Cell Death. Activation of Lysis by a Mechanism involving the Synthesis of Protein. *J. Insect. Physiol.* 15, 1505-1516

- Lockshin R.A. and Williams C.M. (1964) Programmed Cell Death. II. Endocrine Potentiation Of The Breakdown Of The Intersegmental Muscles Of Silkmoths. *J.Insect Physiol.* 10: 643-649
- Locksley R.M., Killeen N. und Lenardo M.J (2001) The TNF and TNF receptor Superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 104. 487-501
- Loetscher H., Pan Y.C., Lahm H.W., Gentz R., Brockhaus M., Tabuchi H. und Lesslauer W. (1990/a) Molecular cloning and expression of the human 55 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61: 351-359
- Loetscher H., Schlaeger E.J., Lahm H.W., Pan Y.C., Lesslauer W. und Brockhaus M. (1990/b) Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 256: 20131-20138
- Loo van G., van Gurp M., Depuydt B., Srinivasula S.M., Rodriguez I., Alnemri E.S., Gevaert K., Vandekerckhove J., Declercq W., Vandenabeele P. (2002) The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 9:20-26
- Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. (1999) The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10:629-639
- Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z.Q., Schulze-Osthoff K. (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol.Biol.Cell.* 13:978-988
- 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
- Mackay F., Rothe J., Bluethmann H., Loetscher H., Lesslauer W. (1994) Differential responses of fibroblasts from wild-type and TNF-R55-deficient mice to mouse and human TNF-alpha activation. *J. Immunol.* 153:5274-5284
- Malinin N.L., Boldin M.P., Kovalenko A.V., Wallach D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385:540-544
- Manabe T., Yoshimori T., Henomatsu N., Tashiro Y. (1993) Inhibitors of vacuolar-type H(+)-ATPase suppresses proliferation of cultured cells. *J.Cell.Physiol.* 157:445-452
- Mannel D.N. und Echtenacher B. (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol.* 74:141-161
- Maskos K., Fernandez-Catalan C., Huber R., Bourenkov G.P., Bartunik H., Ellestad G.A., Reddy P., Wolfson M.F., Rauch C.T., Castner B.J., Davis R., Clarke H.R., Petersen M., Fitzner J.N., Cerretti D.P., March C.J., Paxton R.J., Black R.A., Bode W. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3408-3412.
- Medema J.P., de Jong J., van Hall T., Melief C.J., Offringa R. (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J.Exp.Med.* 190:1033-1038
- Meinl E., Fickenscher H., Thome M., Tschopp J., Fleckenstein B. (1998) Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today.* 19:474-479 Übersicht
- Mercurio F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J., Young D.B., Barbosa M., Mann M., Manning A., Rao A. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278:860-866

- Micheau O., Lens S., Gaide O., Alevizopoulos K., Tschopp J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 21:5299-5305
- Micheau O., Thome M., Schneider P., Holler N., Tschopp J., Nicholson D.W., Briand C., Grutter M.G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J.Biol.Chem.* 277: 45162-45171.
- Miwa K., Asano M., Horai R., Iwakura Y., Nagata S., Suda T. (1998) Caspase 1-independent IL-1 β Release And Inflammation Induced By The Apoptosis Inducer Fas ligand. *Nat Med.* 4:1287-1292
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827
- Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273:2926-2930
- Naismith J.H., Sprang S.R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.* 23:74-79.
- Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43
- Nicholson D.W., Thornberry N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 22:299-306
- Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E. (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol.Lett.* 102-103:139-142
- Okuno S., Shimizu S., Ito T., Nomura M., Hamada E., Tsujimoto Y., Matsuda H. 1998 Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J.Biol.Chem.* 273:34272-34277
- Ollinger K. (2000) Inhibition of cathepsin D prevents free-radical-induced apoptosis in rat cardiomyocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* 373:346-351
- Palomba L., Brambilla L., Brandi G., Sestili P., Cattabeni F., Cantoni O. (1996) Low levels of hydrogen peroxide and L-histidine induce DNA double-strand breakage and apoptosis. *Eur.J.Pharmacol.* 318:167-173
- Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A., Kohr W.J., Aggarwal B.B. und Goeddel D.V. (1984) Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-729
- Petiot A., Ogier-Denis E., Blommaert E.F., Meijer A.J., Codogno P. (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J.Biol.Chem.* 275:992-998. Erratum in: *J Biol Chem* 2000 275:12360
- Perez C., Albert I., DeFay K., Zachariades N., Gooding L., Kriegler M. (1990) A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 6:251-258
- Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Kronke M., Mak T.W. (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73:457-467
- Platt N., da Silva R.P., Gordon S. (1998) Recognizing Death: The Phagocytosis Of Apoptotic Cells. *Trends Cell Biol.* 8:365-372.
- Rasper D.M., Vaillancourt J.P., Hadano S., Houtzager V.M., Seiden I., Keen S.L., Tawa P., Xanthoudakis S., Nasir J., Martindale D., Koop B.F., Peterson E.P., Thornberry N.A., Huang J., MacPherson D.P., Black S.C., Hornung F., Lenardo M.J., Hayden M.R., Roy S., Nicholson D.W. (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a

- mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *CellDeathDiffer* 5: 271-288
- Regnier C.H., Song H.Y., Gao X., Goeddel D.V., Cao Z., Rothe M. (1997) Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90:373-383
- Ren Y., Savill J. (1998) Apoptosis: the importance of being eaten. *Cell.Death.Differ.* 5:563-568
- Roberg K., Johansson U., Ollinger K. (1999) Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free.Radic.Biol.Med.* 27:1228-1237
- Roberg K., Kagedal K., Ollinger K. (2002) Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am.J.Pathol.* 161:89-96
- Ronchetti A., Rovere P., Iezzi G., Galati G., Heltai S., Protti M.P., Garancini M.P., Manfredi A.A., Rugarli C., and Bellone M. (1999) Immunogenicity Of Apoptotic Cells, and Cytokines. *J. Immunol.* 163:130-136
- Rothe M., Sarma V., Dixit V.M., Goeddel D.V. (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269:1424-1427
- Sahara S., Aoto M., Eguchi Y., Imamoto N., Yoneda Y., Tsujimoto Y (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation.. *Nature.* 401:168-73
- Sarin A., Williams M.S., Alexander-Miller M.A., Berzofsky J.A., Zacharchuk C.M., Henkart P.A. (1997) Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6:209-215
- Savill J. (1997) Recognition And Phagocytosis Of Cells Undergoing Apoptosis. *Br. Med. Bull.* 53:491-508
- Savill J. (1998) Apoptosis: Phagocytic Docking Without Shocking. *Nature* 392: 442-443
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687
- Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H., Peter M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 274:1541-1548
- Schall T.J., Lewis M., Koller K.J., Lee A., Rice G.C., Wong G.H.W., Gatanaga T., Granger G.A., Lentz R., Raab H., Kohr W.J. und Goeddel D.V. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361-370
- Schulze-Osthoff K., Bakker A.C., Vanhaesebroeck B., Beyaert R., Jacob W.A., Fiers W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J.Biol.Chem.* 267:5317-5323
- Schulze-Osthoff K., Beyaert R., Vandevoorde V., Haegeman G., Fiers W. (1993) Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J.* 12:3095-3104
- Schulze-Osthoff K., Krammer P.H., Droge W. (1994) Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J.* 13:4587-4598
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254:439-459
- Schwartz L.M., Smith S.W., Jones M.E., Osborne B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 90:980-984.

- Schweichel J.U. and Merker H.J. (1973) The morphology OF Various Types Of Cell Death In Prenatal Tissues. *Teratology* 7:253-266
- Seglen P.O., Bohley P. (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*. 48:158-172. Übersicht
- Shibata M., Kanamori S., Isahara K., Ohsawa Y., Konishi A., Kametaka S., Watanabe T., Ebisu S., Ishido K., Kominami E., Uchiyama Y. (1998) Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 251:199-203
- Shu H.B., Halpin D.R., Goeddel D.V. (1997) Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6: 751-763
- Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Iyer S., Boulares A.H., Smulson M.E. (1998) Transient poly(ADP-ribose)ylation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J.Biol.Chem*. 273:13703-13712
- Spiess C., Beil A., Ehrmann M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97:339-347
- Srinivasula S.M., Datta P., Kobayashi M., Wu J.W., Fujioka M., Hegde R., Zhang Z., Mukattash R., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., Jaynes J.B., Alnemri E.S. (2002) sickle, a novel Drosophila death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein. *Curr.Biol*. 12:125-130
- Stanger B.Z., Leder P., Lee T.H., Kim E., Seed B. (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81:513-523
- Stennicke H.R., Salvesen G.S. (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell.Death.Differ*. 6:1054-9
- 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
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell*. 8:613-621
- Talanian R.V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M.C., Mankovich J.A., Banach D., Ghayur T., Brady K.D., Wong W.W. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J.Biol.Chem*. 272:9677-82.
- Tang P., Hung M.-C. and Klostergaard J. (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35: 8216-8225
- Tanida I., Tanida-Miyake E., Ueno T., Kominami E. (2001) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J.Biol.Chem*. 276:1701-1706
- Tardy C., Tyynela J., Hasilik A., Levade T., Andrieu-Abadie N. (2003) Stress-induced apoptosis is impaired in cells with a lysosomal targeting defect but is not affected in cells synthesizing a catalytically inactive cathepsin D. *Cell Death.Differ*. 10:1090-1100
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., Goeddel D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853
- Tata J.R. (1966) Requirement for RNA and Protein Synthese for Induced Regression of The Tadpole Tail in Organ Culture. *Dev. Biol*. 13, 77-94
- Taylor W.R., Stark G.R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20:1803-1815 Übersicht
- Tewari M., Dixit V.M. (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J.Biol.Chem*. 270:3255-3260

- Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinel E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J.L., Schroter M., Scaffidi C., Krammer P.H., Peter M.E., Tschopp J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-521
- Thome M., Tschopp J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat.Rev.Immunol.* 1: 50-58
- Thornberry N.A. (1997) The caspase family of cysteine proteases. *Br.Med.Bull.* 5:478-90
- Trapani J.A., Jans D.A., Jans P.J., Smyth M.J., Browne K.A., Sutton V.R. (1998) Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J.Biol.Chem.* 273:27934-27938
- Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Panayotou G., Waterfield M.D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 22:267-272 Übersicht
- Vaux D.L. and Korsmeyer S.J. (1999) Cell death in development. *Cell* 96: 245-254
- Vaux DL (2002) Apoptosis Timeline. *Cell Death and Differentiation* 9, 349-354
- Vercammen D., Vandenabeele P., Beyaert R., Declercq W., Fiers W. (1997) Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine.* 9:801-808
- Vercammen D., Brouckaert G., Denecker G., Van de Craen M., Declercq W., Fiers W., Vandenabeele P. (1998) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J.Exp.Med.* 188:919-930
- 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
- Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J.Biol.Chem.* 277:445-454
- Vogt C. (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothum: Jent und Gassmann, pp 130
- Wagener, Christoph (1999) Molekulare Onkologie. Thieme Verlag
- Wajant H., Haas E., Schwenzer R., Muhlenbeck F., Kreuz S., Schubert G., Grell M., Smith C., Scheurich P. (2000) Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J.Biol.Chem.* 275:24357-24366
- Wajant H., Pfizenmaier K. und Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* 10: 45-65
- Wallach D., Varfolomeev E.E. Malinin N.L., Goltsev Y.V., Kovalenko A.V. und Boldin M.P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Ann. Rev. Immunol.* 17: 331-367
- Wallach D., Engelmann H., Nophar Y., Aderka D., Kemper O., Hornik V., Holtmann H., Brakebusch C. (1991) Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl.* 35:51-57
- Wiegmann K., Schutze S., Kampen E., Himmler A., Machleidt T., Kronke M. (1992) Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades. *J. Biol. Chem.* 267:17997-18001
- Woodle E.S., Smith D.M., Bluestone J.A., Kirkman W.M. 3rd, Green D.R., Skowronski E.W. (1997) Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway. *J.Immunol.* 158:2156-2164

- Woronicz J.D., Gao X., Cao Z., Rothe M., Goeddel D.V. (1997) IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278:866-869
- Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid-induced Thymocyte Apoptosis Is Associated With Endogenous Endonuclease Activation. *Nature* 284, 555-556
- Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L. and Dunlop D. (1984) Chromatin Cleavage In Apoptosis: Association With Condensed Chromatin Morphology and Dependence On Macromolecular Synthesis. *J. Pathol.* 142: 67-77
- Yarmolinsky M.B. (1995) Programmed Cell Death In Bacterial Populations. *Science* 267: 836-837
- Yamamoto A., Tagawa Y., Yoshimori T., Moriyama Y., Masaki R., Tashiro Y. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell.Struct.Funct.* 23:33-42
- Yeh W.C., Itie A., Elia A.J., Ng M., Shu H.B., Wakeham A., Mirtsos C., Suzuki N., Bonnard M., Goeddel D.V., Mak T.W. (2000) Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12:633-642
- Yeh W.C., Shahinian A., Speiser D., Kraunus J., Billia F., Wakeham A., de la Pompa J.L., Ferrick D., Hum B., Iscove N., Ohashi P., Rothe M., Goeddel D.V., Mak T.W. (1997) Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 7:715-725
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M. and Horvitz H.R. (1993) The *C.elegans* Cell Death Gene CED-3 Encodes A Protein Similar To Mammalian Interleukin-1 β -converting Enzyme. *Cell* 75: 641-652
- Vucic D., Kaiser W.J., Miller L.K. (1998) Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM. *Mol.Cell.Biol.* 18:3300-3309
- Vucic D., Kaiser W.J., Harvey A.J., Miller L.K. (1997) Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94:10183-10188
- Wu G.S., Saftig P., Peters C., El-Deiry W.S. (1998) Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene* 16:2177-2183
- Zakeri, Z., Bursch, W., Tenniswood, M. and Lockshin R.A. (1995) Cell death: programmed apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ.* 2: 87-96
- Zamzami N., Kroemer G. (1999) Condensed matter in cell death. *Nature.* 401:127-8. No abstract available.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M., Karin M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91:243-252
- Zhang S.Q., Kovalenko A., Cantarella G., Wallach D. (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12:301-311
- Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V.M., Salvesen G.S. (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J.Biol.Chem.* 272:7797-7800
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. and Wang X. (1997) Apaf-1, A Human Protein Homologous to *C.elegans* CED-4, Participates In Cytochrome c-dependent Activation Of Caspase-3. *Cell* 90:405-413
- <http://www.biologie.de/Skripte/referate/html/apoptose.htm>

7.2 Publikationsverzeichnis der eigenen Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ussat S., **Werner U.**, Adam-Klages S. (2002/a) Species-specific differences in the usage of several caspase substrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1186-1190

Ussat S., **Werner U.E.**, Kruse M.L., Luschen S., Scherer G., Kabelitz D., Adam-Klages S. (2002/b) Upregulation of p21(WAF1/Cip1) precedes tumor necrosis factor-induced necrosis-like cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 294:672-679

7.3 Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro- (10^{-6})
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
x g	-faches der Erdbeschleunigung
α	alpha, anti-
β	beta
γ	gamma
κ	kappa
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AIF	Apoptose-inducing-factor
Apaf-1	Apoptotische Protease Aktivierungsfaktor 1
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CaCl_2	Calciumchlorid
CARD	Caspase Rekrutierungs-Domäne
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHX	Cycloheximide
D	Aspartat
d	desoxy-
Da	Dalton

DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>death effector domain</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithioerythrol
ECL	enhanced chemoluminescence light
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-iso-thiozyanat
g	gramm
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethan-Sulfonsäure
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
k	Kilo- (10^3)
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli- (10^{-3})
M	molar
MG	Molekulargewicht
min.	Minute(n)
n	nano- (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid

NAD ⁺	Nicotinadenindinucleotid
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
p	pico- (10 ⁻¹²)
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SMAC/DIABLO	<i>second mitochondrial apoptosis-activating protein/direct IAP-binding protein with low pI</i>
tBid	<i>truncated BH3 interacting domain death agonist</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R1	55 kDa TNF-Rezeptor 1
TNF-R2	75 kDa TNF-Rezeptor 2
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat
ü. N.	über Nacht
V	Volt

v	Volumen
z. B.	zum Beispiel
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon

Amminosäuren werden mit den international üblichen Drei-Buchstaben- bzw. Ein-Buchstaben-Codes abgekürzt.

Weitere Abkürzungen sind an gegebener Stelle im Text erklärt.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ulf-Eike Werner

Anschrift: Preetzer. Str. 255
24147 Kiel

geboren am: 22.09.1974 in Hannover

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulbildung

seit 04 / 2001 Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Rahmen des von der DFG finanzierten Sonderforschungsbereichs 415 "Spezifität und Pathophysiologie von Signaltransduktionswegen"

Thema der Arbeit:
"Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des Tumor Nekrose Faktor-induzierten nekrotischen Zelltods in murinen Fibroblasten"

01 / 2000 – 03 / 2001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Abschluss: Diplom-Biologe
Note: 1,7

Thema der Arbeit:
"Etablierung von Systemen zur Untersuchung der Interaktion zwischen DFF40 und DFF45"

10 / 1995 – 03 / 2001 Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Wehrdienst

10 / 1994 – 09 / 1995 Sanitätssoldat, Standortsanitätszentrum Hannover

Schulbildung

1987 – 1994 Gymnasium Langenhagen, Abschluss: Abitur

1985 – 1987 Orientierungsstufe Hindenburgstraße Langenhagen

1981 – 1985 Friedrich-Ebert-Grundschule Langenhagen