

**Die Signalübertragung durch den TNF-Rezeptor 1
(TNF-R1):
Die Funktion der zytoplasmatischen Rezeptordomänen
in der proapoptotischen Signalgebung**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Jens Neumeyer
aus Wuppertal

Kiel
2005

Referentin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Thomas C.G. Bosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2005

Zum Druck genehmigt: Kiel, 04.05.2005

gez. Prof. Dr. J. Grotemeyer

(Der Dekan)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Der programmierte Zelltod: Apoptose | 1 |
| 1.1.1 | Apoptose versus Nekrose | 1 |
| 1.1.2 | Physiologische Bedeutung der Apoptose | 2 |
| 1.2 | Induktion und Regulation der Apoptose | 3 |
| 1.2.1 | Funktion von Todesrezeptoren in der Apoptose | 3 |
| 1.2.2 | Das Zytokin „Tumor-Nekrose-Faktor- α “ (TNF- α) und seine Rezeptoren..... | 5 |
| 1.2.3 | Weiterleitung proapoptotischer Signale | 6 |
| 1.3 | Die Funktion von Proteasen in der Apoptose..... | 8 |
| 1.3.1 | Die Gruppe der Caspasen | 8 |
| 1.3.1.1 | Initiator-Caspasen..... | 10 |
| 1.3.1.2 | Effektor-Caspasen | 11 |
| 1.3.2 | Die Gruppe der Cathepsine | 12 |
| 1.3.2.1 | Cathepsin D in der Apoptose | 12 |
| 1.4 | Fragestellung der Arbeit..... | 14 |
| | | |
| 2. | Material und Methoden | 15 |
| 2.1 | Material | 15 |
| 2.1.1 | Geräte | 15 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 15 |
| 2.1.3 | Verwendete Enzyme, Kits und Substrate | 16 |
| 2.1.4 | Allgemeine Lösungen | 16 |
| 2.1.5 | Antikörper | 16 |
| 2.1.5.1 | Primäre Antikörper..... | 16 |
| 2.1.5.2 | Sekundäre Antikörper | 17 |
| 2.1.6 | Allgemeine Materialien für die Zellkultur | 17 |
| 2.1.7 | Zelllinien | 17 |
| 2.1.7.1 | TNF-Rezeptor 1/2 defiziente Fibroblasten..... | 17 |
| 2.1.7.1.1 | Klonierung der TNF-R1 Expressionsvektoren und Transfektion | 18 |
| 2.1.7.2 | Cathepsin D defiziente Fibroblasten | 19 |
| 2.1.7.2.1 | Klonierung der Cathepsin D Expressionsvektoren und Transfektion..... | 19 |
| 2.1.7.3 | A-SMase defiziente humane Lymphoblasten (MS 1418)..... | 19 |

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 2.2 | Methoden..... | 19 |
| 2.2.1 | Zellkultur..... | 19 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung der TNF-R1 Fibroblasten und Cathepsin D Fibroblasten..... | 19 |
| 2.2.1.2 | Kultivierung der Lymphoblasten MS 1418..... | 20 |
| 2.2.2 | Behandlung der Zellkulturen..... | 20 |
| 2.2.2.1 | Pharmakologische Behandlung der Zellkulturen..... | 20 |
| 2.2.2.2 | Behandlung der Zellkulturen mit UV-Licht..... | 21 |
| 2.2.3 | Morphologische Darstellung der behandelten Zellkulturen..... | 21 |
| 2.2.4 | Biochemische Methoden..... | 22 |
| 2.2.4.1 | Annexin-V/ Propidium Iodid Färbung und Messung im FACS..... | 22 |
| 2.2.4.2 | Präparation zytosolischer Proteine..... | 22 |
| 2.2.4.3 | Proteinbestimmung..... | 23 |
| 2.2.4.4 | Messung von Caspase-Aktivitäten im Zytosol mittels ELISA..... | 23 |
| 2.2.4.5 | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 24 |
| 2.2.4.6 | Western Blot und Immunodetektion..... | 25 |
| 2.2.5 | Molekularbiologische Methoden..... | 26 |
| 2.2.5.1 | DNA-Laddering..... | 26 |
| 2.2.5.2 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 26 |
| 3. | Ergebnisse..... | 28 |
| 3.1 | Die Funktion der zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 in der Induktion von Apoptose..... | 28 |
| 3.1.1 | Morphologie der Zellen nach Behandlung mit TNF und Actinomycin D..... | 29 |
| 3.1.2 | Untersuchung der Zellkulturen auf Apoptose im FACS..... | 31 |
| 3.1.3 | Aktivierung von Caspasen nach Behandlung mit TNF und Actinomycin D..... | 33 |
| 3.1.3.1 | Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit TNF und Actinomycin D..... | 34 |
| 3.1.3.2 | Caspase 3 und PARP-1 Spaltung im Western Blot..... | 34 |
| 3.1.4 | Morphologie der Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit TNF..... | 36 |
| 3.1.5 | Untersuchung der mit TNF behandelten Zellkulturen auf Apoptose..... | 37 |
| 3.1.6 | Aktivierung der Caspase 3 nach 24 Stunden Behandlung mit TNF..... | 40 |
| 3.1.6.1 | Caspase 3-Aktivität nach 4 bis 24 Stunden Behandlung mit TNF..... | 40 |
| 3.1.6.2 | Caspase 3-Spaltung im Western Blot nach 20 Stunden Behandlung mit TNF..... | 41 |
| 3.1.6.3 | PARP-1-Spaltung im Western Blot nach 20 Stunden Behandlung mit TNF..... | 42 |
| 3.1.7 | DNA-Laddering nach 24 Stunden Behandlung mit TNF..... | 43 |

| | | |
|-----------------|--|-----------|
| 3.1.8 | Mitochondriale Beteiligung durch Aktivierung von Caspase 9 | 44 |
| 3.1.8.1 | Caspase 9-Aktivität nach 24 Stunden Behandlung mit TNF | 45 |
| 3.1.8.2 | Caspase 9-Spaltung im Western Blot nach 24 Stunden Behandlung mit TNF | 46 |
| 3.1.9 | Aktivierung von Caspase 8 in TNF-R1 Wildtyp-Zellen | 46 |
| 3.1.9.1 | Caspase 8-Aktivität nach 2 Stunden Behandlung mit TNF | 47 |
| 3.1.9.2 | Western Blot-Analyse der Caspase 8-Isoformen in Rezeptosomen..... | 47 |
| 3.1.10 | Vermittlung von Caspase 3-Aktivität durch Sphingomyelinasen | 49 |
| 3.1.10.1 | Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit C ₆ -Ceramid | 49 |
| 3.1.10.2 | N-SMase-Aktivität nach Behandlung mit TNF | 50 |
| 3.2 | Die Rolle der Aspartatprotease Cathepsin D im Signalweg des TNF-R1..... | 51 |
| 3.2.1 | Darstellung der Cathepsin D Fibroblasten im Western Blot..... | 52 |
| 3.2.2 | Abhängigkeit des TNF/CHX vermittelten Zelltodes von Cathepsin D Expression | 53 |
| 3.2.3 | Abhängigkeit der Caspase 3- und 9-Aktivierung von Cathepsin D Expression | 55 |
| 3.2.4 | Abhängigkeit der Caspase 3- und 9-Aktivierung von A-SMase Aktivität..... | 56 |
| 3.2.5 | Abhängigkeit des DNA-Laddering nach Behandlung mit TNF von Cathepsin D Expression | 58 |
| 3.2.6 | Caspase 3-Aktivität nach 8 bis 24 Stunden Behandlung mit TNF | 59 |
| 3.2.7 | PARP-1-Spaltung nach 24 Stunden Behandlung mit TNF | 60 |
| 3.2.8 | Abhängigkeit der Bid-Spaltung nach Behandlung mit TNF von Cathepsin D Expression | 61 |
| 4. | Diskussion | 63 |
| 5. | Ausblick | 77 |
| 6. | Zusammenfassung / Summary | 78 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 80 |
| | Publikationen von Teilen der Arbeit | 89 |
| | Vorträge und Poster..... | 89 |
| | Danksagung..... | 90 |
| | Lebenslauf..... | 91 |
| | Erklärung | 92 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ActD | Actinomycin D |
| AIF | Apoptose induzierender Faktor |
| Apaf-1 | „Apoptotic protease activating factor 1“ |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| A-SMase | saure Sphingomyelinase |
| ATP | Adenosin-Tri-Phosphat |
| [aU] | arbitrary Units (relative physiologische Einheit) |
| Bad | „Bcl-associated death promotor“ |
| Bak | „Bcl-2 antagonist/killer 1“ |
| Bax | „Bcl-2 associated X protein“ |
| BCA | Bicinchonin-Säure |
| Bcl-2 | „B-cell lymphoma protein 2“ |
| Bcl-XL | „Bcl-2-like 1“ |
| Bid | „BH3-interacting domain death agonist“ |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CARD | „Caspase recruitment-domain“ |
| Caspase | Cystein-Aspartat spezifische Protease |
| CD95 | Todesrezeptor Fas/Apo-1 |
| CED-3 | „Cell-death protein 3“ |
| cFLIP | „cellular FLICE inhibitor-protein“ |
| CHAPS | 3-[(3-Chlamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat |
| CHX | Cycloheximid |
| DD | „death domain“; Todesdomäne |
| DED | „death-effector domain“ |
| DISC | „death-inducing signalling complex“ |
| DNase | Desoxy-Ribonuklease |
| DMSO | Dimethylsulfonoxid |
| DR-3 | „death-receptor 3“; APO-3 |
| DR-4/5 | „death-receptor 4/5“; TRAIL-R1/TRAIL-R2 |
| DR-6 | „death-receptor 6“ |
| DTT | Dithiothreitol |

| | |
|----------------|---|
| ECL | „enhanced chemoluminescence light“ |
| EDAR | Ektodysplasin A-Rezeptor |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetatsäure |
| ELISA | „enzyme-linked immuno sorbent assay“ |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FACS | „fluorescence-activated cell-sorter“ |
| FADD | „Fas-associated via death domain“ |
| FAN | „factor activating neutral sphingomyelinase“ |
| Fas | Todesrezeptor Apo-1/CD95 |
| FasL | Ligand von Fas-Rezeptor |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FLICE | „FADD-like ICE protease“, Caspase 8 |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N´-(4-Butan-Sulfonsäure) |
| HRP | „horse-reddish peroxidase“ |
| IAP | „inhibitor of apoptosis inducing protein“ |
| ICAD | Inhibitor von Caspase-aktivierbarer DNase |
| ICE | „interleukin-1 β -converting enzyme“ |
| IF- γ | Interferon gamma |
| IL-1/-3 | Interleukin-1/-3 |
| kD | Kilodalton (Molekulare Masse) |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MDC | Monodansylcadaverin |
| NC-Membran | Nitrocellulose-Membran |
| NGFR | „nerve growth-factor-receptor“ |
| NF- κ B | nukleärer Faktor κ B |
| NSD | neutrale Sphingomyelinase Domäne |
| N-SMase | neutrale Sphingomyelinase |
| p53 | Transkriptionsfaktor Protein 53 |
| PARP-1 | Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase Ketten-Reaktion |
| PI | Propidium-Iodid |
| RIP-1 | Rezeptor-interagierende Serin-/Threonin-Kinase 1 |
| RT | Raumtemperatur |

| | |
|--------|--|
| RNase | Ribose-Nuklease |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TACE | „TNF- α converting enzyme“; ADAM17 |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| tBid | 17kD Bid-Isoform, engl. „truncated Bid“ |
| TBST | Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| TNF-R1 | Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 |
| TNF-R2 | Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 2 |
| TRADD | „TNF-receptor associated death domain“ |
| Traf-2 | TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2 |
| TRID | TNF-Rezeptor 1 Internalisierungs-Domäne |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| XIAP | „X-linked inhibitor of apoptosis inducing protein“ |

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde der programmierte Zelltod (Apoptose) nach Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) vermittelter Aktivierung des Todesrezeptors Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNF-R1) untersucht. Diese Studien sollten Aufschluss über die Funktion der einzelnen Rezeptordomänen des TNF-R1 und ihre Auswirkungen auf nachgeschaltete Signalwege geben. Die Untersuchungen befassten sich im Speziellen mit der Aktivierung von proapoptischen Mitgliedern der Caspase-Familie, sowie der Aspartat-Protease Cathepsin D.

1.1 Der programmierte Zelltod: Apoptose

Ursprünglich stammt der Begriff „Apoptose“ aus dem Griechischen (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung) und beschreibt das Ablösen und den Fall der Blätter im Herbst.

In der Zellbiologie beschreibt die Apoptose ein seit Jahrzehnten bekanntes Ereignis, bei dem eine Zelle sich in einem physiologischen Prozess selbst eliminiert. Die Apoptose stellt dabei eine genetisch kontrollierte Form des Zelltodes dar (Kerr et al., 1972), durch den die Anzahl der Zellen eines Organismus reguliert wird. Gewebewachstum und Zellteilung können so in einem Organismus durch Apoptose ständig kontrolliert werden. Im Jahr 1977 wurden im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die ersten Gene entdeckt, die Apoptose kontrollieren (Sulston et al., 1977). Eine Mutation dieser Gene konnte die Regulation des programmierten Zelltodes beeinflussen und so auf die Gewebe- und Organentwicklung wirken. Dreizehn Jahre später konnte durch Überexpression des Gens für das Bcl-2 Protein („B-cell lymphoma protein 2“), dessen Produkt zur Tumorenstehung beiträgt, die Apoptose verhindert werden (McDonnell et al., 1990). Damit stieg das Interesse am Forschungsgebiet der Apoptose drastisch an. Durch die Aufklärung der Signalwege, die diese Prozesse steuern, sollten neue Ansätze entwickelt werden, um unter anderem die Tumorentstehung in einem Organismus kontrollieren zu können.

Neben der genetisch kontrollierten Form des Zelltodes gibt es noch eine weitere Form die einen unkontrollierten Prozess darstellt, den Unfalltod oder „Nekrose“.

1.1.1 Apoptose versus Nekrose

Äußere Einflüsse, die zu einer Nekrose führen können sind Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanische Verletzungen von Zellen oder Geweben. Diese Einflüsse führen zur Lyse des Nukleus, dem Anschwellen von Organellen oder schließlich der ganzen Zelle. Als Folge kommt es zur Degradation der DNA und dem Platzen der Zellen durch Schädigung

der Zellmembran. Dabei werden entzündliche Stoffe des Zytoplasmas entlassen und können Nachbarzellen oder Gewebe weiter schädigen (Perfettini et al., 2003).

Im Gegensatz dazu läuft während der Apoptose ein kontrolliertes genetisches Programm unter einem beträchtlichen Energieaufwand ab. Verschiedenste Signale können bewirken, dass eine Zelle ihren Zellzyklus verlässt und die Apoptose einleitet. Dies kann z.B. passiv durch Entzug von Wachstumshormonen, aktiv durch Rezeptoren auf der Zellmembranoberfläche oder intrazellulär, durch DNA-Schädigung induziert werden. Diese Auslöser führen zum Schrumpfen von Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien. Die Plasmamembran bleibt dabei intakt und entzündliche Faktoren können nicht nach außen gelangen. Durch die Schrumpfung verliert die einzelne Zelle ihren Kontakt zum umliegenden Gewebe und tritt in die Phase der Zeiose ein. Während der Zeiose verdichtet sich das Chromatin und wird zwischen den Nukleosomen in definierter Größe fragmentiert („DNA-Laddering“). Die Zelle rundet sich ab und das Zytoplasma schrumpft weiter. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen („membrane blebbing“). Diese Körperchen können anschließend von Nachbar- oder spezialisierten Fresszellen aufgenommen und dort durch lysosomalen Verdau verwertet werden.

Neben diesen klar definierten Formen des Zelltodes können sterbende Zellen auch Mischformen von Apoptose und Nekrose aufweisen (Jäattela et al., 2002).

1.1.2 Physiologische Bedeutung der Apoptose

Vielfältige Prozesse können in einem Organismus durch den Vorgang der Apoptose gesteuert werden, um die Entwicklung und den Eigenschutz zu regulieren. Unter anderem ist die Embryonalentwicklung eines Organismus der Kontrolle durch Apoptose unterworfen. So wird beim Menschen nicht weiter benötigtes Zellmaterial, wie z.B. die Interdigitalfalten der Hände, noch vor der Geburt eliminiert, oder das wachsende Nervensystem ist in der Lage, durch spezifische Apoptose die Zahl von innervierenden Zellen und Zielzellen im Gleichgewicht zu halten.

Eine weitere Funktion der Apoptose besteht in der Reifung des Immunsystems. Sie hilft unter anderem bei der Selektionierung von T-Lymphozyten im Thymus und B-Lymphozyten im Knochenmark. So werden Lymphozyten mit hoher Affinität für körpereigene Peptide und MHC-Moleküle durch Apoptose eliminiert (sog. „negative Selektion“). Autoreaktive Lymphozyten werden somit, noch bevor sie ausgereift sind und schädigende Autoimmunreaktionen auslösen können, aus dem Repertoire heraus genommen. Auf diese Weise wird die immunologische Toleranz gegen Autoantigene, die im Organismus permanent auftreten, etab-

liert. Auch am Ende einer Infektion können nicht mehr benötigte Immunzellen durch Apoptose aus der Immunüberwachung wieder entfernt werden. Während einer Infektion des Organismus dienen diese Immunzellen selbst als Induktoren von Apoptose. Erkennen sie Zellen, die durch Viren, intrazelluläre Bakterien oder andere Pathogene befallen sind, so wird durch spezifische Mediatoren der Immunzellen die Apoptose in den infizierten Zellen induziert. Apoptose ist somit ein wichtiger Prozess der Gewebe- und Organ-Homöostase, sowie der Immunabwehr im lebenden Organismus.

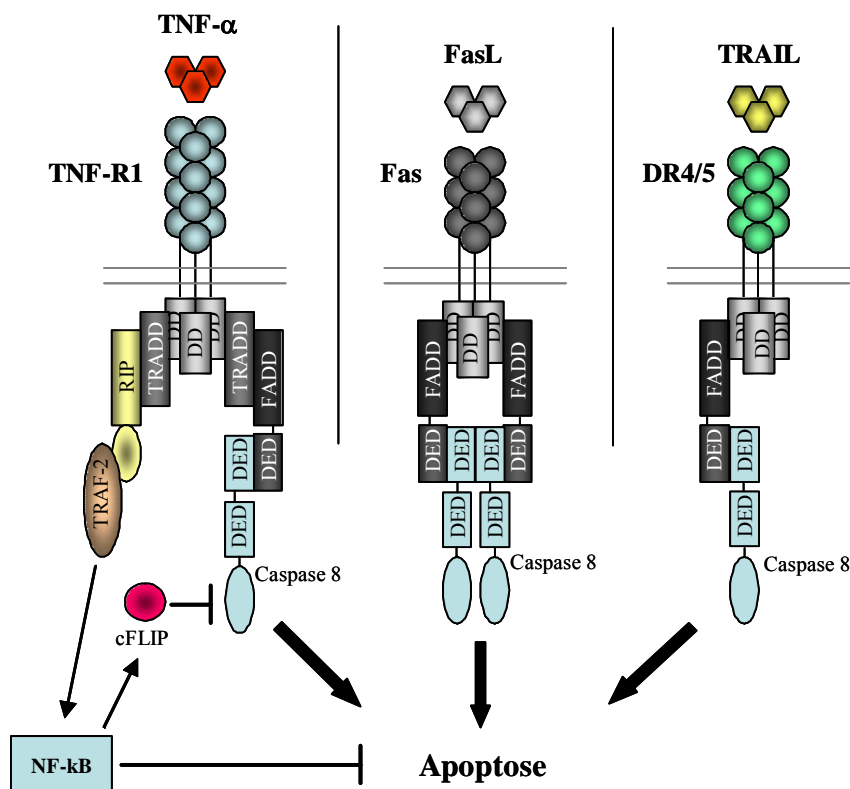
1.2 Induktion und Regulation der Apoptose

In Zellen kann auf unterschiedlichsten Signalwegen Apoptose ausgelöst werden. So kann z.B. nach Schädigung der DNA intrazellulär die Transkription von Genen, deren Produkte eine proapoptotische Wirkung auf die Zelle haben, hoch reguliert werden. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor p53. Nach Schädigung der DNA verhilft dieser Transkriptionsfaktor durch Regulation bestimmter Gene der Zelle zum Zellzyklusarrest, bevor der Zellkern in seine DNA-Synthese-Phase („S-Phase“) eintreten kann. Während dieses Prozesses werden auch Gene der Bcl-2-Proteinfamilie, deren Produkte durch Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien Apoptose induzieren können, durch p53 hoch reguliert (Caspari et al., 2000; Zhou et al., 2000). Ein weiterer Weg zur Induktion von Apoptose besteht darin, dass spezialisierte Zellen (z.B. cytotoxische T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen u.a.) membranständige Liganden exprimieren oder lösliche Zytokine sezernieren, die an Rezeptoren der Zielzelle binden und so durch ein extrazelluläres Signal Apoptose auslösen können. Ziel dieser Signalwege ist immer der unumkehrbare, koordinierte Zelltod durch Aktivierung einer Protease-Kaskade. Diese sogenannten Caspasen („Cystein **A**sparat-spezifische **P**roteasen“) sind an den unterschiedlichsten Schritten in der Apoptose beteiligt. Mittlerweile wurden über 280 Substrate für Caspasen beschrieben (Kidd et al., 2000; Fischer et al., 2003b).

1.2.1 Funktion von Todesrezeptoren in der Apoptose

Apoptose kann in einer Zelle durch membranständige Rezeptoren (sog. Todesrezeptoren) ausgelöst werden. Diese Todesrezeptoren sind Teil der Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Superfamilie, die mittlerweile 29 Mitglieder umfasst. Diese TNF-Rezeptor-Familie ist durch zwei bis fünf extrazelluläre Domänen gekennzeichnet, die reich an Cysteinen sind. Die Todesrezeptoren sind durch den Besitz einer sogenannten Todesdomäne („death domain“ oder „DD“) in ihrem zytoplasmatischen Teil charakterisiert. Eine Homologie dieser Domäne konnte für acht Mitglieder der Todesrezeptoren CD95 (Fas), DR3 (APO-3), DR4 (TRAIL-R1),

DR5 (TRAIL-R2), DR6, EDAR, NGFR und TNF-R1 gezeigt werden (Tartaglia et al., 1993; Schulze-Osthoff et al., 1998; Aggarwal et al., 2003). Die Funktionalität dieser Todesdomäne hängt dabei von ihrer Fähigkeit ab, Adapterproteine die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen zu binden. Diese Adapterproteine sind dann in der Lage intrazelluläre Signalwege zu induzieren. Die am besten charakterisierten Todesrezeptoren Fas, DR4/5 und TNF-R1, so wie deren Liganden sind in *Schema 1* dargestellt (Danial et al., 2004). Durch Bindung ihres entsprechenden Liganden werden diese Rezeptoren in der Plasmamembran trimerisiert, es kommt zu einer Konformationsänderung am zytoplasmatischen Teil und zur Rekrutierung eines Zelltod induzierenden Proteinkomplexes: des DISC („death-inducing signalling complex“) (Muzio et al., 1996). Zur Bildung des DISC bindet das Adapterprotein FADD („Fas-associated via death domain“) über seine DD, die DD des Rezeptors. Weiter rekrutiert FADD über seine DED („death-effector domain“) die Caspase 8 (Kischkel et al., 1995; Barnhart et al., 2005; vgl. *Schema 1*). Im Anschluss kommt es durch autoproteolytische Aktivierung der Caspase 8 zur Induktion nachgeschalteter Signalwege, die eine Apoptose der Zelle zur Folge haben (Scaffidi et al., 1998; Ashkenazi et al., 1998; vgl. *Schema 1*).



Schema 1: Induktion von Apoptose über die Todesrezeptoren TNF-R1, Fas und DR4/5 (TRAIL-R1/R2) durch Rekrutierung des DISC („death inducing signalling complex“) (Danial et al., 2004; verändert)

Über den allgemein beschriebenen Mechanismus zur Aktivierung der Todesrezeptoren hinaus konnte für den TNF-R1 eine komplexe intrazelluläre Signalweiterleitung gezeigt werden.

1.2.2 Das Zytokin „Tumor-Nekrose-Faktor- α “ (TNF- α) und seine Rezeptoren

Zyokine sind hormonähnliche Peptide, die von Zellen des Immunsystems sowie einer Reihe anderer Zelltypen synthetisiert werden. Hauptsächlich Makrophagen, aber auch Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und viele andere Zellen exprimieren TNF als Antwort auf Entzündung, Infektion, Verletzung und Veränderungen des sie umgebenden Milieus (Baud et al., 2001). Dabei wird TNF nicht konstitutiv, sondern nur von aktivierten Zellen durch Stimuli wie Lipopolysaccharid, Interleukin-1, Interleukin-3, Interferon- γ oder TNF selbst gebildet.

Das Zytokin TNF- α wird zunächst als ein 233 Aminosäuren langes membranständiges Protein präsentiert und wurde 1985 erstmals aus lymphoiden Zellen isoliert und charakterisiert (Aggarwal et al., 1985). Nach Spaltung durch die Matrix-Metalloprotease TACE („TNF- α converting enzyme“; „ADAM17“) wird TNF- α als 17 kD Form von der Zelloberfläche abgetrennt und kann seine pleiotrope Wirkung als lösliches Zytokin ausüben (Aggarwal et al., 2003). TNF- α zeigt ein weites Spektrum an Bioaktivität, auf welches die meisten Zellen reagieren.

Die Effekte, die TNF- α in den unterschiedlichen Zielzellen oder Geweben auslösen kann, sind allerdings sehr divers. Einerseits ist TNF- α involviert in die Haematopoiese, die erworbene Immunität, Tumorunterdrückung und Überwachung des Immunsystems. Das Zytokin wirkt sich in einem Organismus dabei positiv auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Induktion von Apoptose in nicht weiter benötigten Zellen oder Geweben, sowie der Eliminierung pathogener Erreger oder entarteter Zellen aus und besitzt somit eine protektive Funktion im Organismus (Aggarwal et al., 2003). Kommt es andererseits zur unkontrollierten Überproduktion des Zytokins, so kann es zu systemischen oder genetisch manifestierten Erkrankungen beitragen. Eine Beteiligung an Erkrankungen wie Alzheimer, Diabetes Typ 2, Multipler Sklerose oder rheumatischer Arthritis, sowie eine induktive Rolle bei allergischem Asthma, septischem Schock oder Organabstoßung nach Transplantation konnte für TNF- α beschrieben werden (Aggarwal et al., 2003; Wajant et al., 2003).

Alle Reaktionen auf TNF- α werden in der Zielzelle durch lediglich zwei Rezeptoren vermittelt. Die beiden Rezeptoren die TNF- α binden können sind der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und der TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2). Aufgrund dessen, dass die Signalübertragung nur über zwei Rezeptoren erfolgt, muss die Pleiotropie der biologischen Funktion von TNF- α auf der

Diversifizierung intrazellulärer Signalwege begründet sein. Da TNF- α eine proapoptotische Wirkung auf Tumorzellen hat, ist der Kenntnisstand über Signalwege, die TNF- α durch den TNF-R1 oder TNF-R2 induzieren kann, wichtig für die Erweiterung von Tumorthérapien.

Unter den beiden TNF-Rezeptoren hat der TNF-R1 eine höhere Affinität zu TNF- α und gehört, aufgrund der Homologie seiner Todesdomäne im zytoplasmatischen Abschnitt, zu den Todesrezeptoren. Er ist in der Lage die proapoptotischen Signalwege durch Bindung von TNF- α in einer Zelle zu induzieren. Der TNF-R1 ist ein ubiquitär vorkommendes 55 kD großes Transmembranprotein. Nach Bindung seines Liganden TNF- α kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors (Wajant et al., 2003) und zur Induktion von intrazellulären Signalen, die u.a. zum Zelltod führen (Leist et al., 1996). Nach Bindung des Liganden am Rezeptor können sich zwei Signalkomplexe formieren. Eine Möglichkeit besteht darin, dass der TNF-R1 über seine Todesdomäne am zytoplasmatischen Teil einen Komplex aus den Proteinen TRADD („TNF-Receptor associated death domain“), dem Adapterprotein TRAF-2 („TNF-Receptor assoziiertes Faktor 2“) und der Kinase RIP-1 („Rezeptor-interagierende Serin-/Threonin-Kinase 1“) rekrutieren kann. TRAF-2 und RIP-1 können dann eine antiapoptotische Signalgebung durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B („nukleärer Faktor κ B“) in der Zelle einleiten. Im Zellkern kommt es so zur Hochregulation von Genen, die ein Überleben der Zelle sichern (Kelliher et al., 1998; vgl. *Schema 1 S.4*).

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass nachdem der TNF-R1 durch Bindung seines Liganden trimerisiert wurde, der Rezeptor internalisiert wird (Schütze et al., 1999). Anschließend wird ein DISC aus den Proteinen TRADD, FADD und Caspase 8 (FLICE) rekrutiert (vgl. *Schema 1*). Durch die Rekrutierung der Pro-Caspase 8 in den DISC kommt es zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase 8, die ihrerseits potentiell nachgeschaltete Caspasen wie Caspase 3 und 7 aktivieren kann. Die freiwerdende Caspase 8 kann so die proapoptotischen Signalwege anschalten (Wajant et al., 2003; Danial et al., 2004).

1.2.3 Weiterleitung proapoptotischer Signale

In der von Caspasen abhängigen Apoptose können prinzipiell zwei Signalwege voneinander unterschieden werden. Einerseits der von außen induzierte (extrinsisch), andererseits der intrazelluläre Signalweg (intrinsisch).

Der extrinsische Signalweg umfasst die Signalweiterleitung apoptotischer Signale durch Bindung eines Liganden, wie z.B. FasLigand oder TNF- α , an seinen membranständigen Rezeptor. Im Anschluss kommt es zur Aktivierung von Caspase 8 oder 10 am Rezeptor durch Rekrutierung eines DISC (Barnhart, 2005; Chosa, 2004; Aggarwal, 2003). Meist wird dieser von

außen induzierte Signalweg zur physiologischen Abtötung von Zellen in der Entwicklung oder in der vom Immunsystem gesteuerten Beseitigung von entarteten, Virus- oder Bakterien befallenen Zellen eingeleitet.

Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg kann, neben rezeptorvermittelter Induktion, auch durch verschiedenste andere apoptotische Stimuli induziert werden. Durch radioaktive Strahlung, Hitzeschock, osmotischen Stress oder Chemotherapeutika können in der Zelle Prozesse in Gang gesetzt werden, die zu einer Schädigung der Kern-DNA führen. Daraus resultierend kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, zur Aktivierung von Caspase 9 und letztendlich zur Apoptose (Scaffidi et al., 1999; Stennicke et al., 2000). Die Schädigung der DNA führt dabei zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, der die Transkription von Genen regelt, deren Produkte die Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien verstärken (Zhou et al., 2000). Diese Proteine gehören der Bcl-2-Familie an. In einer intakten Zelle hemmen antiapoptotische Mitglieder dieser Familie wie Bcl-2 oder Bcl-X_L die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. In geschädigten Zellen kommt es durch p53 zur Produktion des Bcl-2-Proteins Bad, welches antiapoptotische Mitglieder der eigenen Familie binden und so inaktivieren kann. Auf diese Weise binden Bax und Bak (proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie) an der äußeren mitochondrialen Membran. Im Anschluss öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und Cytochrom C wird ins Zytosol entlassen (Hsu et al., 1997; Sharpe et al., 2004). Dort ist Cytochrom C an der Bildung des sogenannten Apoptosom beteiligt. Das Apoptosom ist ein Protein-Heptamer aus Cytochrom C und Apaf-1 („apoptotic protease activating factor-1“), welches unter ATP-Verbrauch die Caspase 9 aktivieren kann (Zou et al., 2003; Stefanis et al., 2005).

Dieser intrinsische Weg der mitochondrialen Caspase 9-Aktivierung kann auch durch Todesrezeptoren induziert werden. Dabei spielt ein weiteres Bcl-2-Protein eine wichtige Rolle. In einer Todesrezeptor vermittelten Apoptose spaltet aktivierte Caspase 8 das Bcl-2-Protein Bid in die kleinere tBid-Isoform. tBid kann mit dem in der mitochondrialen Membran lokalisierten proapoptotischen Bcl-2-Protein Bax einen Komplex eingehen (Sharpe et al., 2004). Dieser Komplex ist dann in der Lage, eine größere Membranpore zu öffnen, so dass Cytochrom C das Mitochondrium verlassen kann. Neben Cytochrom C können auch weitere proapoptotische Proteine durch diesen Porenkomplex das Mitochondrium verlassen. Endonuklease G, AIF („Apoptose induzierender Faktor“) Smac/DIABLO und die Serin-Protease HtrA2/OMI gehören dazu (Wang et al., 2001). Smac/DIABLO kann dann XIAP binden („X-linked inhibitor of apoptosis inducing protein“) und verhindert so eine Bindung und Inhibition der Caspasen 3, 7 und 9 kompetitiv. HtrA2/OMI nutzt das gleiche Bindungsmotiv wie Smac/DIABLO,

um weitere IAP-Proteine kompetitiv zu binden. AIF und Endonuklease G werden in den Zellkern verlagert, wobei eine mögliche Funktion in der Beteiligung an DNA-Degradationsprozessen besteht. Eine genauere Funktion wird aber noch diskutiert. (Ravagnan et al., 2002).

Neben den oben dargestellten Signalwegen wurde noch ein dritter Weg zur Induktion von Apoptose beschrieben. Dabei wird nach Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum die Aktivierung von Caspase 12 eingeleitet (Sergeev, 2004; Lin, 2003; Diaz-Horta, 2003). Diese Kalziumfreisetzung kann durch oxidativen Stress in der Zelle ausgelöst werden.

1.3 Die Funktion von Proteasen in der Apoptose

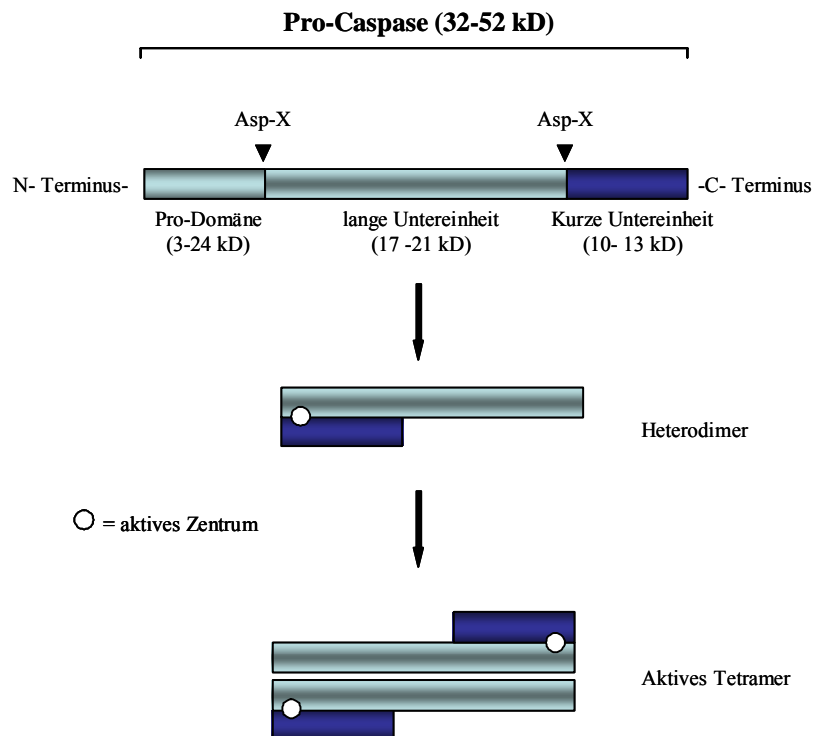
Proteasen spielen während der Apoptose eine zentrale Rolle. Diese Proteasen haben zu ihren pH- und Temperaturmaxima eine hohe Spezifität zu ihren Substraten. Sie sind in der Apoptose die Induktoren und Effektoren der intrazellulären Degradationsprozesse und helfen so, eine Zelle in geordneter Weise zu entsorgen.

1.3.1 Die Gruppe der Caspasen

Durch Studien am Modellorganismus der Entwicklungsbiologie, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, konnte gezeigt werden, dass das Produkt des Gens CED-3 („cell-death protein 3“) für alle Zelltodereignisse in der Entwicklung des Nematoden verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen ergaben, dass CED-3 eng mit der Protease ICE („interleukin-1 β converting enzyme“) der Säugetiere verwandt ist (Yuan et al., 1993; Thornberry et al., 1992). Diese Ergebnisse führten in den folgenden Jahren zur Entdeckung einer großen Anzahl weiterer ICE-ähnlicher Proteasen, die letztendlich in der Familie der Caspasen zusammengefasst wurden (Wolf et al., 1999; Stennicke et al., 1997). Caspasen sind durch ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum charakterisiert. Ihre Spezifität auf entsprechende Substrate beruht darin, diese an Aspartat-Säure Resten zu spalten. Der Begriff Caspase leitet sich daher aus einer Abkürzung der „Cystein **A**spartat-spezifischen **P**rotease“ ab (Thornberry et al., 1997).

Mittlerweile sind 14 Mitglieder der Caspase-Familie bekannt (Earnshaw et al., 1999; Rathmell et al., 1999). Caspasen werden intrazellulär als Pro-Enzyme, sogenannte Zymogene gebildet. Diese unreifen Pro-Enzyme werden durch interagierende Proteasen von zwei Seiten an ihren Aspartat-Säure Resten proteolytisch gespalten und damit aktiviert (Stennicke et al., 1999). Während dieses Vorgangs werden die lange und kurze Untereinheit getrennt und die Pro-Domäne des Enzyms abgespalten. Die lange und kurze Untereinheit bilden darauf ein Heterodimer mit einer aktiven Bindungsstelle. Zwei Heterodimere bilden dann ein aktives

tetrameres Enzym, das zwei katalytisch aktive Zentren besitzt (Bleackley et al., 2001; vgl. Schema 2).

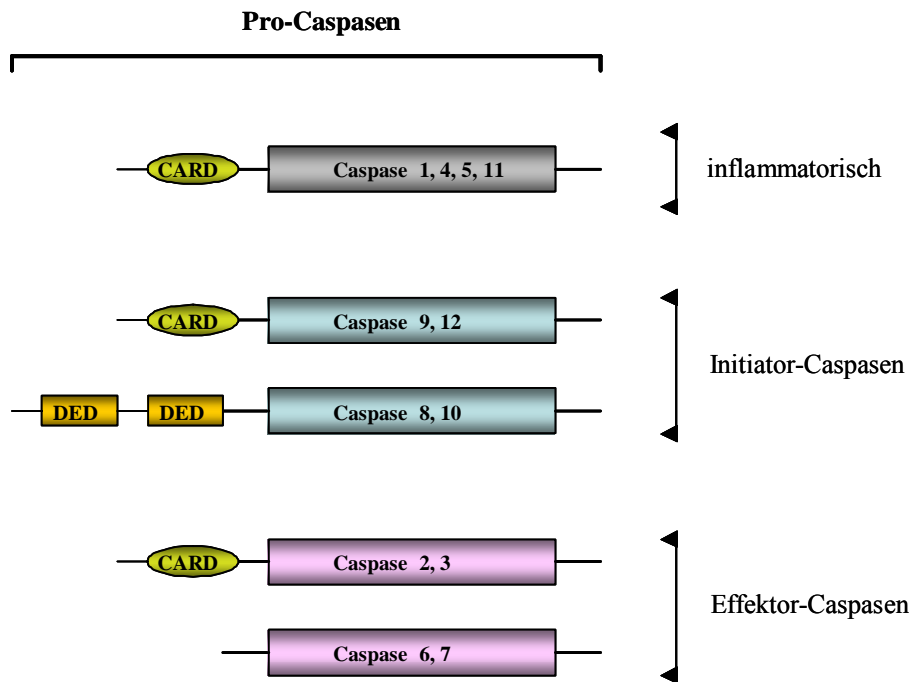


Schema 2: Proteolytische Aktivierung von Caspasen
(Nach Bleackley et al., 2001; verändert)

Die Familie der Caspasen kann in zwei große Gruppen aufgeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst Caspasen, die pro-inflammatorische Zytokine während einer Immunantwort prozessieren (Caspasen 1, 4, 5, 11). Die zweite Gruppe von Caspasen ist für Prozesse in der Apoptose verantwortlich (Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12) und kann in zwei weitere Untergruppen unterteilt werden (Creagh et al., 2001). Für die Caspasen 13 und 14 gibt es noch keine genaue Funktionsbeschreibung. Sie zeigen aber mehr Ähnlichkeit zu Caspase 1 und haben damit möglicherweise keine für die Apoptose relevante Funktion (Wolf et al., 1999).

Unter den proapoptotischen Caspasen gelten Caspasen mit langen Pro-Domänen als Initiator-Caspasen, da sie N-terminale Domänen beinhalten, die für die Bindung an Adapterproteine der initialen Signalgänge verantwortlich sind. Zwei Proteinadapterbereiche sind in den Pro-Domänen identifiziert worden: Die DED („death-effector domain“) und die CARD („caspase recruitment domain“). Beide Domänen kommen unter anderem auch in den Adapterproteinen des DISC von Todesrezeptoren vor. Da diese Domänen spezifisch mit gleichen

Domänen interagieren können, sind die rezeptorgebundenen Adapterproteine in der Lage Caspasen zu binden. Die zweite Untergruppe umfasst Effektor-Caspasen, die nachgeschaltete Signalwege innerhalb der Apoptose induzieren und für den letztendlichen Tod und Abbau der Zelle verantwortlich sind (Kidd et al., 2000; vgl. *Schema 3*). Diese Effektor-Caspasen besitzen eine eher kurze Pro-Domäne.



Schema 3: Die verschiedenen Mitglieder der Caspase-Familie (Kidd et al., 2000; verändert)

DED = „death-effector domain“; **CARD** = „caspase recruitment domain“

1.3.1.1 Initiator-Caspasen

Die Initiator-Caspasen 8 und Caspase 10 sind nach dem heutigen Wissensstand für eine durch Todesrezeptoren vermittelte Apoptose verantwortlich (Sprick et al., 2002). Caspase 8 leitet auf der einen Seite die extrinsische Apoptose über direkte Spaltung von Caspase 3 ein. Auf der anderen Seite ist Caspase 8 auch an der mitochondrialen Apoptose beteiligt. Caspase 8 ist dort in der Lage, das Bcl-2 Protein Bid in tBid zu spalten. tBid bindet dann im weiteren Verlauf an die mitochondriale Membran und kann dort Cytochrom C Freisetzung und daraus resultierend die Aktivierung von Caspase 9 vermitteln (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Caspase 9 ist dann wiederum in der Lage Caspase 3 zu aktivieren. Somit vermittelt Caspase 8 nicht nur direkt, sondern auch indirekt die Aktivierung von Caspase 3. Für Caspase 8 und 9 sind endogene Inhibitoren beschrieben, die eine mögliche Fehlaktivierung im Ruhezustand der

Zelle verhindern sollen. So ist für Caspase 8 das zelluläre FLICE-Inhibitor Protein („cellular FLICE inhibitory protein“ oder „cFLIP“) beschrieben (Kreuz et al., 2001; Ganten et al., 2004). cFLIP bindet kompetitiv an Caspase 8 und hält diese inaktiv. Ein weiterer endogener Inhibitor ist XIAP. Durch Bindung seiner Bir-3-Domäne an das enzymatische Zentrum von Caspasen kann XIAP unter anderem die Aktivierung von Caspase 9 inhibieren (Devereux et al., 1999).

Eine weitere Initiator-Caspase ist Caspase 12. Sie wurde als Initiator der Stress induzierten Apoptose durch Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) beschrieben. Caspase 12 vermittelt dabei nach Freisetzung von Kalzium die Aktivierung der Protease Calpain und kann so möglicherweise für die Apoptose relevante Signalwege einleiten (Nakagawa et al., 2000; Nakagawa et al., 2000).

1.3.1.2 Effektor-Caspasen

Im Gegensatz zu Initiator-Caspasen liegen Effektor-Caspasen meist zytosolisch in inaktiven Homodimeren vor. Sie können durch Initiator-Caspasen oder andere Proteasen, wie Granzym B durch Proteolyse an ihren Aspartat-Säure-Resten gespalten und aktiviert werden. Dabei lagern sich die lange und die kurze Untereinheit der gespaltenen Caspasen aneinander und bilden so zwei Heterodimere mit je einem aktiven Zentrum (*vgl. Schema 2*). Für Caspase 3, 6 und 7 ist eine solche Aktivierung durch Initiator-Caspasen beschrieben (Boatright et al., 2003). Einmal aktiviert haben diese Caspasen zahlreiche Substrate die während der Apoptose zur Degradation der Zelle geschnitten werden können. Caspase 3 spielt dabei eine zentrale Rolle mit einer hohen Spezifität zu einer Vielzahl von Substraten. Zu ihren Substraten gehören unter anderem Proteine wie Lamin A, ICAD („Inhibitor von Caspase-aktivierbarer DNase“), RIP-1, PARP-1 („Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1“) oder XIAP (Wolf et al., 1999; Fischer et al., 2003b).

In zahlreichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass trotz des Einsatzes von Breitband-Inhibitoren für Caspasen, wie z.B. zVAD-FMK, eine Apoptose nicht verhindert werden kann. Trotz der Inhibition von Caspasen können Zellen phagozytiert oder getötet werden (Egger et al., 2003; Jäättelä et al., 2002). Dies führte in den letzten Jahren zur Forschung an Caspase-unabhängigen Signalwegen im apoptotischen Zelltod.

1.3.2 Die Gruppe der Cathepsine

Die Gruppe der Cathepsine umfasst endo- und lysosomale Cystein-Proteasen (Cathepsin B, H, L, S, C, K, O, F, V, X und W), Aspartat-Proteasen (Cathepsin D und E) und Serin-Proteasen (Cathepsin A und G) (Turk et al., 1997; McGrath et al., 1999). Allgemein wurden Cathepsine bis vor kurzem als Enzyme des intrazellulären Proteinabbaus und Recyclings angesehen (Turk et al., 2000). Mittlerweile ist aber bekannt, dass sie eine Funktion in der zellulären Immunabwehr haben (Zhang et al., 2001; Maekawa et al., 1998). Eine weitere Funktion besteht darin, dass Cathepsine im Verlauf der Apoptose aus den Lysosomen entlassen werden und dann die Aktivierung von Caspasen und anderen Proteinen vermitteln können (Monney et al., 1998; Kitano et al., 2001; Ishisaka et al., 2001). Hinweise auf eine Interaktion von Cathepsinen und Caspasen in der Apoptose ergeben sich durch Befunde aus Inhibitionsversuchen, in denen für Caspasen spezifische Inhibitoren (zVAD-FMK, zDEVD-FMK) Signalwege blockieren können, die durch Cathepsine vermittelt werden (Lougie et al., 1999; Gray et al., 2001).

1.3.2.1 Cathepsin D in der Apoptose

Cathepsin D ist eine Endopeptidase die zu ungefähr 60 % in Lysosomen und zu einem kleineren Teil in Endosomen lokalisiert ist (Rodman et al., 1990). Es werden vier Isoformen von Cathepsin D unterschieden. Am rauhen endoplasmatischen Retikulum wird die enzymatisch inaktive 52 kD Prä-Proform synthetisiert. Die weitere Prozessierung findet in prä-lysosomalen Organellen statt. Hier kann aus der 52kD Isoform eine schwach enzymatisch aktive 48kD Isoform gespalten werden. Die eigentliche Aktivierung von Cathepsin D findet bei der Prozessierung von der 48kD zur 32kD Isoform statt. Der Ablauf dieser Reifung erfolgt autoproteolytisch. Wird die enzymatisch aktive 32kD Isoform abgebaut, entsteht eine 14kD Isoform (Diment et al., 1987).

Eine prinzipielle Bedeutung von Cathepsin D in der Apoptose konnte durch Mikroinjektion dieses Proteins gezeigt werden, indem dadurch in humanen Fibroblasten Caspase-abhängige Apoptose ausgelöst werden konnte (Roberg et al., 2002). In weiteren Arbeiten konnte die Translokation von Cathepsin D aus dem Kompartiment der Lysosomen ins Zytosol, durch Induktion von oxidativem Stress mittels Naphtharazin, ausgelöst werden. Eine anschließende Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien und daraus resultierende Apoptose war die Folge (Roberg et al., 1998; Roberg et al., 2001). In verschiedenen Zelltypen konnte weiterhin durch Stimulation von Todesrezeptoren (TNF-R1, Fas) eine proapoptotische Wirkung von Cathepsin D nachgewiesen werden (Roberts et al., 1999; Deiss et al., 1996; Demoz et al., 2002).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Todesrezeptoren, sowie UV-Licht oder pathogene Bakterien und Viren, eine Aktivität der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) induzieren können (Gulbins et al., 2002; Pettus et al., 2002; De Stefanis et al., 2002). Eine mögliche Aktivierung von Cathepsin D durch Autoproteolyse könnte dabei durch Ceramidfreisetzung über die lysosomale A-SMase vermittelt werden. Cathepsin D ist in der Lage Ceramid zu binden (Heinrich et al., 1999). Neben den beschriebenen Ergebnissen gibt es noch eine Reihe weiterer physiologischer Befunde, die eine Relevanz von Cathepsin D beschreiben. Unter anderem sterben Cathepsin D defiziente Mäuse 25 Tage nach ihrer Geburt an einer Zerstörung des Darmepithels durch Nekrose der intestinalen Zellen (Saftig et al., 1995).

1.4 Fragestellung der Arbeit

TNF- α kann die Aktivität von Proteasen der Caspase-Familie induzieren. Diese Caspasen spielen eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung während der Apoptose (Thornberry et al., 1998). TNF- α induziert dabei durch den TNF-R1 und dessen an seine Todesdomäne rekrutierbaren Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase 8 Apoptose (Micheau et al., 2003; Aggarwal et al., 2003). Es ist weiter bekannt, dass nach Behandlung mit TNF- α eine Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) stattfindet, die Ceramid aus Sphingomyelin hydrolysieren kann (Schütze et al., 1992; Wiegmann et al., 1994; Gulbins et al., 2002). Die A-SMase wird ebenfalls über die Todesdomäne und die Adapterproteine TRADD und FADD aktiviert (Schwandner et al., 1998; Wiegmann et al., 1999). Neben seiner Todesdomäne („DD“) besitzt der Rezeptor noch eine weitere zytoplasmatische Domäne, die sogenannte neutrale Sphingomyelinase Domäne („NSD“). Durch sie kann der TNF-R1 über das Protein FAN („factor activating neutral sphingomyelinase“) die Plasmamembranständige neutrale Sphingomyelinase (N-SMase) aktivieren (Adam-Klages et al., 1996). Ob durch diesen Signalweg pro- oder antiapoptotische Prozesse in der Zelle reguliert werden ist noch strittig (Adam-Klages et al., 1996; Malagarie-Cazenave et al., 2002). Eine genauere Charakterisierung der Funktion der einzelnen zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 in der Aktivierung Zelltod vermittelnder Signalwege, sowie die funktionelle Bedeutung der Internalisierung des TNF-R1 für die Weiterleitung intrazellulärer Signale steht in diesem Zusammenhang noch aus und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Eine durch TNF- α induzierte A-SMase-Aktivität und daraus resultierende Apoptose konnte durch Blockade der Internalisierung des TNF-R1 nach Zugabe von Monodansylcadaverin (MDC) unterbunden werden (Schütze et al., 1999). Wie oben beschrieben kann über die Todesdomäne des TNF-R1 die A-SMase aktiviert werden. Das durch die endo-lysosomale A-SMase produzierte Ceramid bindet und aktiviert die im gleichen subzellulären Kompartiment befindliche Aspartat-Protease Cathepsin D (Heinrich et al., 1999). Durch Mikroinjektion von Cathepsin D in humane Fibroblasten, konnte eine proapoptotische Wirkung von Cathepsin D durch Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden (Roberg et al., 2002). Welche Bedeutung Cathepsin D an der TNF-R1 vermittelten Apoptose hat ist bis jetzt unklar und sollte deshalb ebenfalls in dieser Arbeit untersucht werden, wobei insbesondere die Rolle von Cathepsin D in der Aktivierung der Caspase-Kaskade von Interesse war.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| Produkt | Hersteller |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1D-Elektrophorese (Mini-Gel Twin) | Biometra |
| Agfa Curix 60 | Agfa Photo GmbH |
| Eppendorf Zentrifuge 5417R | Eppendorf AG |
| FACS-Calibur | BectonDickinson |
| Fluoroskan II ELISA-Reader | Labsystems |
| Forma Scientific Cell Incubator | Forma Scientific |
| GS-800 Calibrated Densitometer | Bio-Rad Laboratories |
| INTAS- Geldokumentation CCD UV | INTAS Science Imaging GmbH |
| Invers-Mikroskop | Olympus |
| LaminAir HB 2472 K | Hereaus |
| Mini Sub Cell GT | Bio-Rad Laboratories |
| pH-Meter KNICK | KNICK GmbH |
| PowerPac 200 | Bio-Rad Laboratories |
| Sepatech Minifuge RF | Hereaus |
| Stratalinker 1800 UV | Stratagene |
| Tecan Reader (Modell: Sunrise) | Tecan Austria Gesellschaft |
| Transfer Cell Transblot SD | Bio-Rad Laboratories |
| Vortexer | Heidolph |

2.1.2 Chemikalien

Die allgemein verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biochrom KG, Biomol, Boehringer/Roche, Calbiochem, Fluka, Gibco Life Technologies/Invitrogen, Serva, Sigma-Aldrich und VWR bezogen und in der Qualität pro analysis (p.a.) eingesetzt. Methodenspezifisch verwendete Lösungen und speziell verwendete Chemikalien werden zu Beginn der jeweiligen Methodendarstellung aufgeführt. Die eingesetzten Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser nach Milliporestandard hergestellt.

2.1.3 Verwendete Enzyme, Kits und Substrate

| Produkt | Hersteller |
|----------------------------------|--------------------|
| BCA Proteinbestimmungskit | Pierce |
| Caspase 3 Substrat (Ac-DEVD-AMC) | Biomol |
| Caspase 8 Substrat (Ac-IETD-AMC) | Biomol |
| Caspase 9 Substrat (Ac-LEHD-AMC) | Biomol |
| DNA-Ladder 100bp | NewEnglandBiolabs |
| ECL Westernblot Detektionskit | Amersham Pharmacia |
| Trypsin/EDTA (10x) | Gibco/Invitrogen |

2.1.4 Allgemeine Lösungen

| | |
|------|---|
| PBS | 150mM NaCl, 8,3mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, pH 7,4 |
| TAE | 24,2g Tris-Base, 5,71ml Essigsäure, 10ml 0,5 M EDTA, pH 8,5 |
| TBST | 150mM NaCl, 50mM Tris/HCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5 |

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

| <u>Antikörper</u> | <u>Spezies</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| anti-β-Aktin (C-11) | Ziege, polyclonal | 1:2000 | Santa Cruz |
| anti-Bid (C-20) | Kaninchen, polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz |
| anti-Caspase-3 (#9662) | Kaninchen, polyclonal | 1:1000 | NewEnglandBiolabs |
| anti-Cleaved-Caspase-3 (#9661) | Kaninchen, polyclonal | 1:1000 | NewEnglandBiolabs |
| anti-Caspase-8 (H134) | Maus, monoclonal | 1:500 | Santa Cruz |
| anti-Caspase-9 (#9504) | Kaninchen, polyclonal | 1:1000 | NewEnglandBiolabs |
| anti-Cathepsin D (C-20) | Kaninchen, polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz |
| anti-PARP-1 (#9542) | Kaninchen, polyclonal | 1:1000 | NewEnglandBiolabs |

Alle Verdünnungen der Antikörper zur Proteindarstellung im Westernblot

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

| <u>Antikörper</u> | <u>Spezies</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Anti-Kaninchen IgG, HRP | Ziege, polyclonal | 1:10000 | Dianova |
| Anti-Maus IgG, HRP | Ziege, polyclonal | 1:10000 | Dianova |
| Anti-Ziege IgG, HRP | Esel, polyclonal | 1:10000 | Santa Cruz |
| Anti-Ziege IgG, HRP | Kaninchen, polyclonal | 1:10000 | Calbiochem |

2.1.6 Allgemeine Materialien für die Zellkultur

| Produkt | Hersteller |
|---|-------------------|
| RMPI 1640 Medium | PAA |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM+HEPES) | Gibco/Invitrogen |
| Fötales Kälberserum | Biochrom KG |
| L-Glutamin | Gibco/Invitrogen |
| Penicilin/Streptomycin | Gibco/Invitrogen |
| Trypsin/EDTA | Gibco/Invitrogen |
| Gewebekulturplatten | Sarstedt |

2.1.7 Zelllinien

2.1.7.1 TNF-Rezeptor 1/2 defiziente Fibroblasten

Die murinen TNF-Rezeptor 1/2 defizienten Fibroblasten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Daniela Männel (Regensburg) generiert. Aus Hautgewebe einer TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) doppeldefizienten Maus (Alexopoulou et al., 1997) wurden primäre Zellen isoliert und immortalisiert. Die so generierten Parentalzellen wurden in einer Kooperation mit Dr. Wulf Schneider-Brachert (Regensburg) retroviral stabil mit dem humanen TNF-R1 retransfiziert (TNF-R1 Wildtyp). Weiterhin wurden Deletionsmutanten des TNF-R1 Konstruktes kloniert und ebenfalls in die Parentalzellen retroviral stabil transfiziert. Die Aminosäuresequenz des TNF-R1 Wildtyp sowie der verschiedenen Mutanten, ist in 2.2.1.1 Tabelle1 dargestellt. Für das vorliegende Projekt wurden folgende retransfizierte Fibroblasten verwendet: TNF-R1 Wildtyp, Δ TRID (Deletion der „TNF-Rezeptor 1 Internalisierungs-Domäne“), Δ NSD (Deletion der „Neutrale Sphingomyelinase-Domäne“), Δ DD (De-

letion der „death-domain“), sowie die Doppelmutanten Δ TRID Δ ADD und Δ TRID Δ NSD (siehe 2.1.7.1.1 Tabelle1).

2.1.7.1.1 Klonierung der TNF-R1 Expressionsvektoren und Transfektion

Die folgenden unter 2.1.7.1.1 und 2.1.7.2.1 beschriebenen Arbeiten wurden von der Arbeitsgruppe Schneider-Brachert (Regensburg) durchgeführt.

Der humane TNF-R1 wurde durch PCR aus dem Plasmid pEF-Bos TNF-R1 in seiner vollen Länge generiert und in die BamHI und XhoI Schnittstelle des retroviralen Vektors pQCXIP (BD Clontech) kloniert. Ebenso wurde mit den Deletionsmutanten TNF-R1 Δ TRID (Δ AS 213-222), Δ ADD (Δ ab AS 346) und Δ NSD (Δ AS 309-321) verfahren. Alle Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

Die fertigen pQCXIP Konstrukte wurden mit Hilfe des viralen Plasmides pCL-10A1 (Imgenex, RetroMax System) in 293 T Zellen durch Calcium Phosphat Transfektion eingebracht. Nach 24 bis 48 Stunden Virusproduktion wurde das Medium von den 293 T Zellen getrennt und mit dem viralen Überstand die parentalen Fibroblasten der TNF-R1/-R2 defizienten Maus infiziert. Die infizierten Zellen wurden mit Puromycin (Sigma) selektioniert.

Während der Zellkultur wurden die stabil transfizierten Fibroblasten im Rhythmus von 15-18 Passagen unter Puromycin gesetzt, um eine Reinheit der Zelllinien zu gewährleisten.

Tabelle1: Aminosäuresequenz der Deletionsmutanten des humanen TNF-R1

| TNF-R1 | | | | | | |
|--------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 1 | mglstvpdll | lplvllellv | giypsgvigl | vphlgdrekr | dsvcpqgkyi | hpqnnsicct |
| 61 | kchkgtlyln | dcpvggqtdt | crecesgsft | asenhrlhcl | scskcrkemg | qveissctvd |
| 121 | rdtvegrkn | qyrhywsenl | fqcfnslcl | ngtvhlscqe | kqntvctcha | gfflre necv |
| 181 | scsnckksle | ctklclpqie | nvkgtedsgt | tvlpiveff | glclslsllfi | glmyryqrwk |
| 241 | sklysvcgk | stpekegele | gtttkplapn | psfsptpgft | ptlgfspvps | stfssstyt |
| 301 | pgdcpnfaap | rrevappyqg | adpilatala | sdpipnplqk | wedsahkpqs | ldtddpatly |
| 361 | avvenvpplr | wkefvrrgl | sdheidrlel | qngrcleaq | ysmlatwrrr | tpreatlel |
| 421 | lgrvlrdmdl | lgcledieea | lcpaalppa | psllr | | |

Signalsequenz (SS) von Aminosäure 1-21 Transmembrandomäne (TM) von Aminosäure 191-212

TNF-Rezeptor-Internalisierungsdomäne (TRID) Aminosäuresequenz 213-222 deletiert

Todesdomäne (DD) ab Aminosäure 346 deletiert

neutrale Sphingomyelinasedomäne (NSD) Aminosäuresequenz 309-321 deletiert

2.1.7.2 Cathepsin D defiziente Fibroblasten

Die Cathepsin D defizienten murinen Fibroblasten (CD^{-/-} bezeichnet) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Paul Saftig (Kiel) aus einem Cathepsin D knock out C57BL/6 Mausembryo generiert und zur Verfügung gestellt. Die Arbeitsgruppe Dr. Wulf Schneider-Brachert (Regensburg) hat diese Cathepsin D defiziente Zelllinie mit humanen Cathepsin D retroviral stabil retransfiziert (CD^{-/-} CatD bezeichnet) und zur Verfügung gestellt. Die CD^{-/-} Fibroblasten wurden, zur Kontrolle unspezifischer Effekte nur mit dem leeren retroviralen Vektor transfiziert. Murine Wildtyp C57BL/6 Fibroblasten (CD^{+/+} bezeichnet) wurden als Kontrolle der endogenen Cathepsin D-Expression eingesetzt und ebenfalls aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Paul Saftig (CAU zu Kiel) bezogen.

2.1.7.2.1 Klonierung des Cathepsin D Expressionsvektors und Transfektion

Das Prinzip wurde bereits unter 2.2.1.1 beschrieben, jedoch wurde Cathepsin D in den retroviralen Vektor pBabe-Puro (BD Clontech) kloniert.

2.1.7.3 A-SMase defiziente humane Lymphoblasten (MS 1418)

Der humane Lymphoblasten Klon MS 1418 ist eine saure Sphingomyelinase (A-SMase) defiziente Zelllinie. Die Zellen wurden aus Patienten mit der Niemann-Pick Krankheit isoliert und transformiert. Die Arbeitsgruppe von Dr. Douglas Green (La Jolla, USA) hat diese Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Als Vergleichskontrolle wurde diese A-SMase defiziente Zelllinie von Dr. Wulf Schneider-Brachert mit humaner A-SMase retroviral stabil retransfiziert (MS 1418 ASM) und ebenfalls zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der TNF-R1 Fibroblasten und Cathepsin D Fibroblasten

| | |
|--------------|--|
| Kulturmedium | DMEM+HEPES, 10% FCS, 100U/ml Penicilin, 100µg/ml Streptomycin |
| Trypsin/EDTA | Stammlösung (Invitrogen) 1:10 in sterilem H ₂ O |

Die Fibroblasten-Zelllinien wurden in Kulturmedium in einem Zellkultur-Inkubator (Forma-Scientific) bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte dreimal pro Woche. Die adhärennten Fibroblasten wurden dabei mit 10ml PBS gewaschen und mit 5ml Trypsin/EDTA aus der Zellkulturflasche gelöst. Ein Zehntel der Zellmenge wurde dann erneut in 40ml Kulturmedium kultiviert. Aliquots der Kulturzellen wurden in regelmäßigen Abständen eingefroren. Dabei wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend in Einfriermedium (10% DMSO, 30% FCS, 60% Kulturmedium) aufgenommen. Nach dem Herunterkühlen auf –80°C in einem mit Isopropanol gefüllten Kryogefäß wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Die Zellkultur wurde alle vier Wochen durch neue Aliquots, die in flüssigem Stickstoff bei –156 °C gelagert waren, ersetzt.

2.2.1.2 Kultivierung der Lymphoblasten MS 1418

| | |
|--------------|---|
| Kulturmedium | RMPI 1640, 10% FCS, 100U/ml Penicilin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin |
| Trypsin/EDTA | Stammlösung (Invitrogen) 1:10 in sterilem H ₂ O |

Die Suspensions-Zelllinien wurden in Kulturmedium in einem Zellkultur-Inkubator (Forma-Scientific) kultiviert (siehe oben). Die Passage der Zellen erfolgte dreimal pro Woche. Die Lymphoblasten wurden dabei mit 10ml PBS gewaschen und 5 Min bei 700 x g zentrifugiert. Ein Zehntel der Zellmenge wurde dann erneut in 70ml Kulturmedium kultiviert. Die Zellkultur wurde ebenfalls alle vier Wochen durch eingefrorene Zellen ersetzt.

2.2.2 Behandlung der Zellkulturen

2.2.2.1 Pharmakologische Behandlung der Zellkulturen

| | |
|------------------------------|--|
| 6-Well-Plates | Greiner |
| 10cm Gewebekulturschalen | Sarstedt |
| 60µM C ₆ -Ceramid | 30mM C ₆ -Ceramid (Sigma-Aldrich) in DMSO |
| 1µg/ml Actinomycin D (ActD) | 1mg/ml ActD (Sigma-Aldrich) in sterilem H ₂ O; 1:1000 eingesetzt |

| | |
|-----------------------------|---|
| 3,6µM Cycloheximid (CHX) | 10mg/ml CHX (Sigma-Aldrich) in sterilem H ₂ O; 1:1000 eingesetzt |
| 100ng/ml humanes TNF (hTNF) | 100ng/ml hTNF (Knoll AG) in FCS freiem Medium; 1:1000 eingesetzt |

Die Zelllinien wurden in 6-well-Plates mit 3ml Kulturmedium oder 10cm Gewebekulturschalen mit 10ml Kulturmedium kultiviert. Je nach Länge der Behandlung wurden in 6-Well-Plates $1-5 \times 10^5$ Zellen oder $0,5-1,5 \times 10^6$ Zellen in Gewebekulturschalen am Vortag der Behandlung ausplattiert, um zur Ernte ungefähr 1×10^6 Zellen in 6-well-Plates oder 3×10^6 Zellen je 10cm Gewebekulturschale zur Verfügung zu haben. Der wasserlösliche Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid wurde zu 3,6µM und Actinomycin D zu 1µg/ml eingesetzt. Die Inhibitoren wurden eine Stunde vor der eigentlichen Behandlung im Medium gelöst. Das Zytokin hTNF (humanes TNF- α) wurde in einer Konzentration von 100ng/ml und das Lipid C₆-Ceramid 60µM im entsprechenden Volumen Kulturmedium gelöst und der Zellkultur zugegeben. Parallel zu den behandelten Proben wurde in Kontrollzellkulturen nur das Medium ausgetauscht oder DMSO in Kulturmedium gelöst.

2.2.2.2 Behandlung der Zellkulturen mit UV-Licht

10cm Gewebekulturschalen Sarstedt

Die Zellkulturen wurden in 10cm Gewebekulturschalen in 10ml Kulturmedium kultiviert. Die Behandlung mit UV-Licht wurde im Stratalinker 1800 (Firma Stratagene) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden dabei für 5-10 Sekunden $500 \times 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ UV-Licht ausgesetzt. Nach 1 bzw. 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und auf DNA-Laddering untersucht.

2.2.3 Morphologische Darstellung der behandelten Zellkulturen

Über einen am Lichtmikroskop angebrachten Fototubus wurden Dias in wechselnden Belichtungsintensitäten von den Zellkulturen gemacht. Die entwickelten Dias wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Calibrated Densitometer GS-800, Bio-Rad) digitalisiert.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Annexin-V/ Propidium Iodid Färbung und Messung im FACS

| | |
|-----------------------------|--|
| Inkubationspuffer | 10mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl und 5mM CaCl ₂ |
| Propidium-Iodid (PI) Lösung | 100ng/ml PI (Sigma-Aldrich) Stammlösung in PBS/EDTA (5mM) |
| Annexin-V-Fluos-Lösung | Boehringer/Roche 20µl in 1000µl Inkubationspuffer + 10µl PI-Lösung |
| 1x Trypsin/EDTA | Stammlösung (Invitrogen) 1:10 in sterilem H ₂ O |

Der Zellkulturüberstand der adhärennten Zellen wurde in 15ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gesammelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung aus den Kulturschalen gelöst. In dem entsprechenden Medienüberstand wurden die Zellen bei 200 x g für 5 Min (4°C) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS (4°C) vorsichtig resuspendiert und in ein 5ml FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden wiederum bei 4°C für 5 Min bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig mit 100µl Annexin-V-Fluos-Lösung resuspendiert und dunkel bei RT für 20 Min inkubiert. Anschließend wurde den Proben 400µl PBS zugegeben und die mit Annexin-V und Propidium-Iodid gefärbten Zellen im FACS-Calibur („fluorescence-activated cell-sorter“; Beckton-Dickinson) mittels DOT-PLOT Darstellung ausgewertet. Einstellungen des Durchflusszytometers FSC Lin; SSC Lin; Fluoreszenz FL1 Log; Fluoreszenz FL3 Log wurden spezifisch für jede Zelllinie vorgenommen und die zu analysierenden Zellen gegatet.

2.2.4.2 Präparation zytosolischer Proteine

| | |
|-----------------------|---|
| Homogenisationspuffer | 10mM HEPES, pH 7,4, 142mM KCl 5mM MgCl ₂ , 1mM EDTA, 0,2% NP-40 |
| 1x Trypsin/EDTA | Stammlösung (Invitrogen) 1:10 in sterilem H ₂ O |

Sämtliche Schritte zur Präparation der Proteine wurden bei 4°C durchgeführt. Zuerst wurde das Medium der Zellkultur in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen mit 1ml

kaltem PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung aus den Gewebekulturschalen gelöst. Alle Zellsuspensionen wurden im entsprechenden Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen bei 800 x g für 5 Min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500µl PBS gewaschen und bei 800 x g für 5 Min zentrifugiert. Darauf wurde das Pellet in 50 – 100µl Homogenisationspuffer resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und auf Eis für 15 Min stehen gelassen. Anschließend wurde die Probe für 10 Sekunden gevortext. Dann wurde die Probe für 5 Min bei 10000 x g abzentrifugiert und der gewonnene zytosolische Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und bei –20°C gelagert.

2.2.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte colorimetrisch mit einem BCA-Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce). Hierbei wird durch Zugabe von Bicinchonin-Säure innerhalb einer Inkubationszeit von 30 Min bei 37 °C eine Farbreaktion ausgelöst. Die Farbreaktion resultiert aus der Reduktion von Kupferionen, die einen Komplex mit den Peptidbindungen der Proteine bilden. Die reduzierten Kupferionen reagieren ihrerseits mit der Bicinchonin-Säure. Es kommt zu einer violetten Färbung der Lösung. In einem ELISA-Reader (Tecan Reader Modell: Sunrise, Tecan Austria) wurde bei 570nm die Extinktion gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte in einer 1:10 Verdünnung der Proben. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe einer Eichreihe aus Bovinem Serum Albumin mit Proteinkonzentrationen von 0-10µg/µl, deren Extinktion parallel bestimmt wurde.

2.2.4.4 Messung von Caspase-Aktivitäten im Zytosol mittels ELISA

| | |
|-----------------------|--|
| Caspase-Assaypuffer | 50mM HEPES pH 7,2, 100mM NaCl, 10mM DTT, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 0,1% CHAPS |
| Homogenisationspuffer | 10mM HEPES, pH 7,4, 142mM KCl 5mM MgCl ₂ , 1mM EDTA, 0,2% NP-40 |
| Caspase 3 Substrat | 15mM Ac-DEVD-AMC in DMSO gelöst |
| Caspase 8 Substrat | 15mM Ac-IETD-AMC in DMSO gelöst |
| Caspase 9 Substrat | 15mM Ac-LEHD-AMC in DMSO gelöst |

Die auf Caspase 3, 8 und 9 Aktivität zu untersuchenden Lysate, dafür verwendete Puffer und Substrate wurden bis zum Start der Enzym-Aktivitätsmessung auf Eis gelagert. Pro Probe

wurden 50µg zytosolisches Protein eingesetzt. Alle Proben wurden mit Homogenisationspuffer auf ein gleiches Probenvolumen gebracht, wobei das Volumenverhältnis von Homogenisations- zu Assaypuffer 1:4 nicht überschreiten durfte. Insgesamt wurden 100µl Gesamtvolumen (Probe + Assaypuffer) mit 1µl Substratlösung, entsprechend der zu messenden Caspase, in eine 96-Well-Platte (Fluoronunc (weiß), NUNC) bei 4°C pipettiert. Als Kontrolle wurde Substrat ohne Probe in Assaypuffer, oder Probe ohne Substrat im Assaypuffer eingesetzt. Da es sich bei den verwendeten Substraten um fluorogene Farbstoffe handelt, wurde die 96-Well-Platte in einem ELISA-Reader (Fluoroscan II, Labsystems and Life Science Int. LTD, UK) analysiert. Der ELISA-Reader wurde auf 37°C erwärmt, um die in den Proben enthaltene enzymatische Aktivität zu aktivieren. Durch die Spaltung des Substrates wird dabei der Farbstoff Amino-Methyl-Coumarin (AMC) freigesetzt, der durch spezifische Anregung bei 380nm ein Emissionslicht bei 460nm zeigt. Diese Fluoreszenz wurde in Meßintervallen von 0,1 Sek alle 2 Min für 3 Std aufgezeichnet. Somit konnte die enzymatische Aktivität der Caspasen durch Anstieg der gemessenen Fluoreszenzwerte ermittelt werden.

Die Meßwerte wurden parallel mit Genesis II (Labsystems an Life Science Int. LTD, UK), einem PC basierten Steuerprogramm des ELISA-Readers, gespeichert. Anschließend wurden die Meßwerte jeder Probe mit Hilfe von MS Excel in ein Diagramm mit Einzelmeßpunktdarstellung überführt.

2.2.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

| | |
|-------------------------|--|
| 3x Protein-Probenpuffer | 50mM Tris pH 6,8, 4M Harnstoff, 1% SDS 15% Glycerol, 0,01% Bromphenolblau 2% β-Mercaptoethanol |
| Elektrophoresepuffer | 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS |

Die Auftrennung von zytosolischen Proteinen erfolgte nach der Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen. Hierbei werden durch Hitze und Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) die Proteine denaturiert und ihre Rückfaltung verhindert. In einer Sammelgelschicht werden die denaturierten Proteine konzentriert und anschließend nach ihrem spezifischen Molekulargewicht in einem Trenngel aufgetrennt (Laemmli et al, 1970). Es wurden je nach gesuchtem Protein 7,5 – 15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele gegossen. Die Elektrophorese fand in MiniGel-Kammern (BIOMETRA) statt. Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit 3fach konzentriertem Protein-Probenpuffer versetzt, 3-4

Min gekocht und mit Hilfe von Gel Saver Tips (Kisker AG) auf des Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Grösse der aufgetrennten Proteine wurden Molekulargewichtsstandards (Proteinstandard, MBI Fermentas) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25mA (PowerPac 200, BioRad) pro Gel für 1,5-2 Std in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

2.2.4.6 Western Blot und Immunodetektion

Blotpuffer 25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol

Blockpuffer 1x TBST, 5% Milchpulver, 1% BSA

Die Proteine wurden aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran, Amersham-Biosciences) geblottet. Der Protein-Transfer aus 1mm dicken Gelen wurde in einer Semi-Dry Blotkammer (Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) in Blotpuffer für 1 Std bei 30mA/cm (PowerPac 200, BioRad) durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 25ml Blockpuffer für 45 Min bei RT abgesättigt.

Nach dem Blockvorgang wurde die NC-Membran 3x 10 Min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die NC-Membran in entsprechend verdünnter Antikörperlösung (Antikörper in TBST + 5% Milchpulver) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die NC-Membran wurde 3x 10 Min mit TBST gewaschen, bevor sie mit Zweitantikörperlösung (TBST + Peroxidasegekoppelter Sekundär-Antikörper) für 1 Std bei RT inkubiert wurde.

Die Detektion von Antigenen erfolgte indirekt über die Reaktion der an den Sekundär-Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (Umsetzung von Substraten und Emission von Chemoluminiszenz, ECL-Detektions-Kit, Amersham-Biosciences). Hierzu wurde nach 3x 10 Min Waschen mit TBST die Chemilumineszenz auf der NC-Membran durch ECL-Behandlung für eine Minute angeregt. Durch Exposition der NC-Membran auf sensitivem Film (HyperFilm, Amersham Life Science) wurde die Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 DNA-Laddering

| | |
|----------------|---|
| Lysispuffer | 10mM Tris/HCL pH 7,4, 10mM EDTA pH 8,0, 0,5% TRITON-X100 |
| DNA-Puffer | 10mM Tris pH 8,5 |
| Proteinase K | 0,5mg/ml in sterilem H ₂ O |
| RNase A | 0,5mg/ml in sterilem H ₂ O |
| Natrium-Acetat | 3M |

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT) geerntet. Das Kulturmedium mit eventuell bereits toten Zellen wurde in 15ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Mit 1ml PBS wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin/EDTA aus den Kulturschalen gelöst. Zusammen mit dem Kulturmedium wurden die Zellen 5 Min bei 800 x g abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100µl Lysispuffer aufgenommen, kurz gevortext und 20 Min bei RT stehen gelassen. Das Lysat wurde dann bei 1000 x g für 5 Min zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet.

Der Überstand wurde nun mit 20µl 10% SDS und 20µl Proteinase K versetzt und für 1 Std bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde bei 37°C 1µl RNase A für eine Stunde zugegeben. Nun wurde bei RT 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat hinzupipettiert und im Anschluss das doppelte Volumen 100%iges Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde bei RT für 15 Min bei 12000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Lösung wurde dann bei 4°C für 15 Min bei 12000 x g zentrifugiert und das Pellet bei RT 5-10 Min getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50µl DNA-Puffer, der auf 70°C erwärmt wurde, resuspendiert. Die DNA wurde bei 4°C gelagert und 1-2µg DNA in einem 2%igen Agarose-Gel (siehe 2.2.5.4) analysiert.

2.2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der spezifischen DNA-Fragmente (siehe 2.2.5.1) wurden 2%ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Laufpuffer hergestellt. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wurde das Gel mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt. In den Geltaschen wurden 1-2µg/10µl DNA eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der aufgetragenen

Proben erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Mini Sub Cell GT, BioRad) bei einer Stromstärke von 80V (PowerPac 200, BioRad). Den Proben wurde Bromphenolblau zugesetzt, um die Laufstrecke abschätzen zu können. Zum Ablesen der DNA-Fragmentgrößen wurden verschiedene Fragmentlängenstandards (DNA-Ladder, NewEnglandBiolabs) eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Funktion der zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 in der Induktion von Apoptose

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollen Aufschluss über die Rolle der einzelnen zytoplasmatischen Domänen des Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNF-R1) in seiner Apoptose induzierenden Signalgebung geben. Nach Bindung seines Liganden Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF) sollte geprüft werden ob eine Deletion der Internalisierungsdomäne (Δ TRID), der neutralen Sphingomyelinasedomäne (Δ NSD) oder der Todesdomäne (Δ DD) des TNF-R1 Auswirkungen auf diverse Vorgänge des programmierten Zelltodes haben. Zu diesem Zweck wurden murine Fibroblasten, welche defizient für beide TNF-Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2) sind, mit humanem TNF-R1 (Wildtyp) und Deletionsmutanten des TNF-R1 (Δ TRID, Δ NSD, Δ DD, Δ TRID Δ NSD und Δ TRID Δ DD) stabil retransfiziert und untersucht (siehe Abb.1).

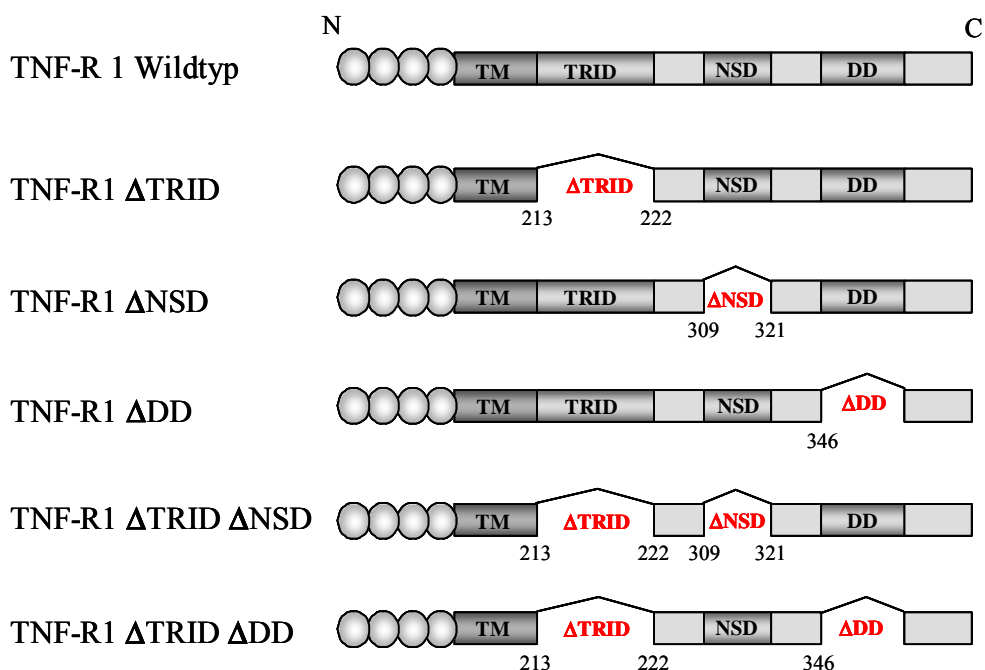


Abb.1: Schematische Darstellung des TNF-R1 (Wildtyp) und der generierten Deletionsmutanten. Bedeutung der verwendeten Abkürzungen: TM = Transmembrandomäne, TRID = TNF-R1 Internalisierungsdomäne (AS 213-222), NSD = neutrale Sphingomyelinase-Domäne (AS 309-321), DD = Death Domain (Todesdomäne; ab AS 346) und Δ = Deletion der entsprechenden Domäne. N steht für N-Terminus, C für C-Terminus, AS für Aminosäure.

3.1.1 Morphologie der Zellen nach Behandlung mit TNF und Actinomycin D

Die stabil transfizierten Zelllinien wurden mit 100ng/ml TNF behandelt. Eine Stunde vor dieser Behandlung wurde den Zellkulturen mit 1µg/ml Actinomycin D (ActD) ein Proteinbiosynthese-Inhibitor zugegeben. Dieser Inhibitor bewirkt eine Unterbrechung des Proteinnachschubs auf transkriptioneller Ebene, indem die Nukleinsäuren Cytosin und Guanin koagulierte werden und so eine Transkription unmöglich wird. Auf diese Weise sollte den Zellen die Möglichkeit genommen werden, verbrauchte Proteine neu zu synthetisieren, die dem zytotoxischen TNF-Effekt entgegenwirken könnten.

Die so behandelten Zellkulturen wurden im Lichtmikroskop beobachtet. Nach 4 Stunden Behandlung wurde der Versuch gestoppt und die Zellkulturen fotografiert (*Abb.2a und 2b*).

Die mit TNF behandelten Zellkulturen von TNF-R1Wildtyp-, TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1ΔNSD-Zellen zeigten morphologische Veränderungen im Vergleich zum jeweiligen Kontrollansatz mit Actinomycin D (ActD) allein. Nach Behandlung mit TNF rundete sich eine größere Anzahl von Zellen ab und kompartimentierte sich. Im entsprechenden Kontrollansatz kam es zu keinen Veränderungen (*Abb.2a*). Dieser Effekt ist in Ausschnittsvergrößerungen deutlicher dargestellt. TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1ΔNSD-Zellkulturen zeigten dabei eine signifikant höhere Anzahl versterbender oder toter Zellen, als der TNF-R1Wildtyp.

Im Gegensatz zu TNF-R1Wildtyp-, TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1ΔNSD-Zellen zeigten die Zellkulturen von TNF-R1ΔDD-, sowie der Doppelmutanten TNF-R1ΔTRIDΔDD- und TNF-R1ΔTRIDΔNSD-Zellen (*Abb.2b*) keine morphologischen Veränderungen nach TNF-Behandlung über den entsprechenden Versuchszeitraum. Nur die Zellkultur von TNF-R1ΔTRIDΔNSD-Zellen zeigte schwache morphologische Veränderungen (*Abb.2b*), die sich aber in ähnlicher Form auch im Kontrollansatz mit Actinomycin D beobachten ließen.

Eine Deletion der Todesdomäne (DD) oder Doppeldeletion der Internalisierungsdomäne und der Todesdomäne (TRID/DD), sowie der Internalisierungsdomäne und der neutralen Sphingomyelinasedomäne (TRID/NSD) führte somit morphologisch zu einer Resistenz gegen den durch TNF/ActD induzierbaren Zelltod.

Die nachfolgenden Experimente sollten klären, über welche Signalwege der programmierte Zelltod in den einzelnen Deletionsmutanten eingeleitet wird.

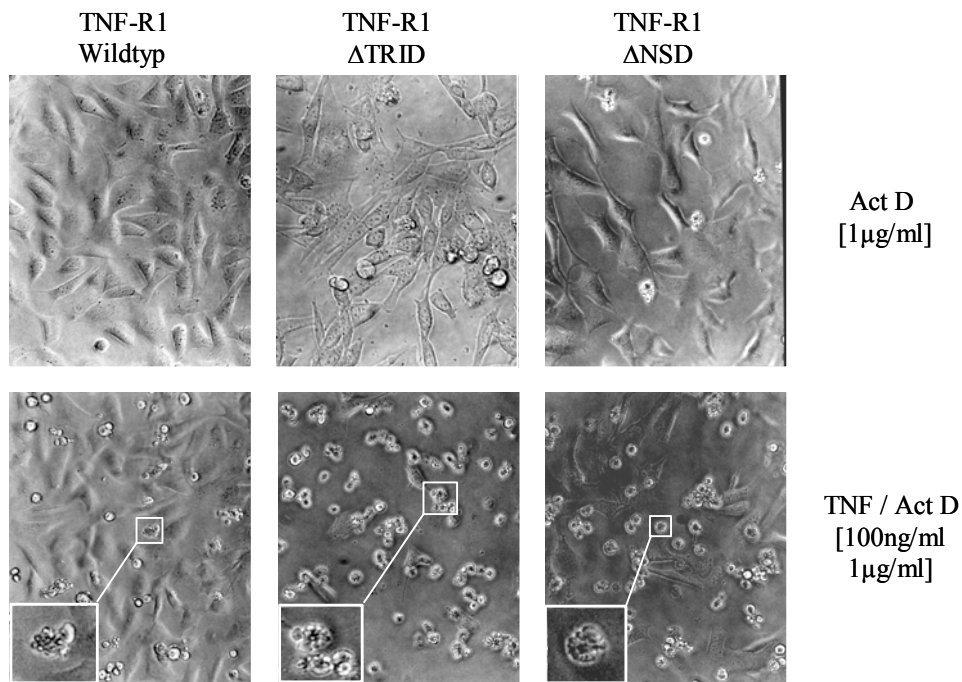


Abb.2a: Morphologische Darstellung der mit TNF- α behandelten Zellkulturen

TNF-R1 Wildtyp-, TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen wurden mit 1 µg/ml ActD für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 100ng/ml TNF behandelt. Nach 4 Stunden wurden die Zellkulturen fotografiert. In Kontrollansätzen wurden die Zellkulturen mit 1 µg/ml ActD allein behandelt. Ausschnittsvergrößerungen der jeweiligen Zellkultur unter TNF wurden dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

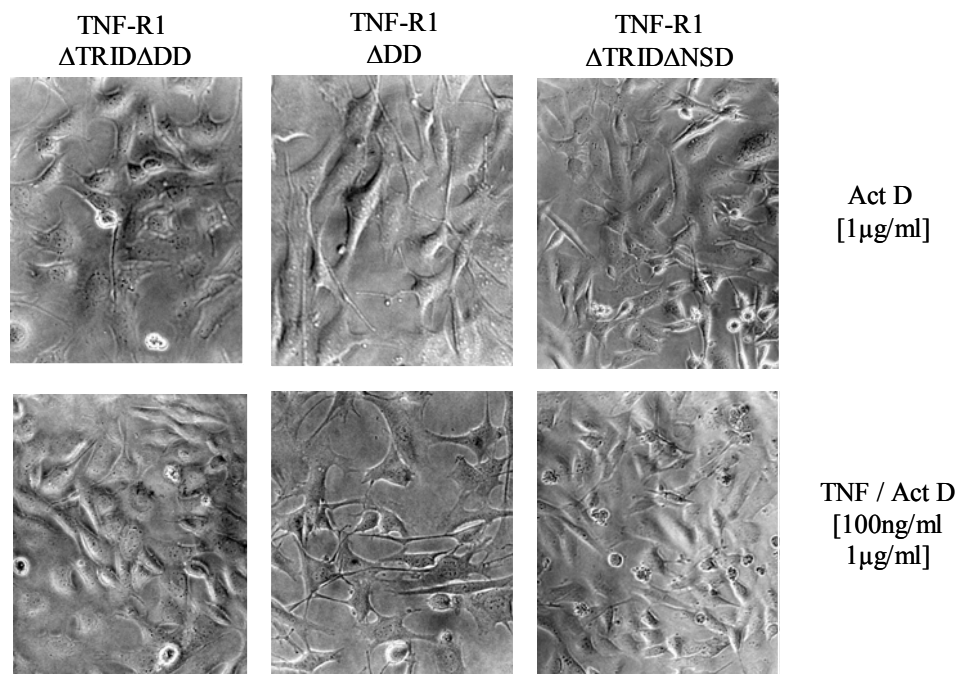


Abb.2b: Morphologische Darstellung der mit TNF- α behandelten Zellkulturen

TNF-R1 Δ TRID Δ DD-, TNF-R1 Δ DD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen wurden mit 1 µg/ml ActD für eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit 100ng/ml TNF behandelt. Nach 4 Stunden Versuchsdauer wurden die Zellkulturen fotografiert. In Kontrollansätzen wurden die Zellkulturen für die Versuchsdauer mit 1 µg/ml ActD allein behandelt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Untersuchung der Zellkulturen auf Apoptose im FACS

Nachdem in den mit 100ng/ml TNF und 1µg/ml Actinomycin D behandelten Zellkulturen von TNF-R1 Wildtyp-, TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1ΔNSD-Zellen augenscheinlich Zelltod ausgelöst wurde, sollte nun geklärt werden, ob es sich im vorliegenden Fall um klassische Apoptose handelte. Hierfür wurden die Zellkulturen wiederum 4 Stunden mit 100ng/ml TNF und 1µg/ml Actinomycin D behandelt und im FACS („fluorescence-activated cell-sorter“) untersucht. Die Zellen wurden nach der Ernte durch eine Doppelfärbung mit Annexin-V und Propidium-Iodid (PI) für die Messung vorbereitet. Annexin-V färbt dabei die während der Apoptose nach außen gekehrten Phosphatidylserinreste der Zellmembran an. Propidium-Iodid hingegen interkaliert mit der Kern-DNA von toten bzw. nekrotischen Zellen. Man kombiniert Annexin-V und Propidium-Iodid um lebende Zellen (Annexin-V und PI negativ) von apoptotischen (Annexin-V positiv und PI negativ) und toten Zellen (Annexin-V und PI positiv) zu unterscheiden. In einem Dot-Plot Diagramm wurden grüne Fluoreszenz (FL1-H) für Annexin-V und rote Fluoreszenz (FL3-H) für PI gegeneinander dargestellt.

Zur Kontrolle wurde im FACS auch die nicht transfizierte Parentalzelllinie (Parental) der TNFR-1/2 doppeldefizienten Fibroblasten untersucht.

Wie in *Abb.3a und 3b* zu sehen ist ließen sich die verschiedenen Zellkulturen sowohl nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/ActD, als auch nach Behandlung mit Actinomycin D alleine durch Annexin-V und PI anfärben. Im Dot-Plot sind dabei die lebenden Zellen im unteren linken Quadranten, die apoptotischen Zellen im unteren rechten Quadranten und tote Zellen im oberen rechten Quadranten dargestellt. Freie Kerne und Zellfragmente von bereits desintegrierten Zellen befinden sich im oberen linken Quadranten.

Abb.3a zeigt die Parentalzelllinie mit und ohne TNF. Es wurden keine eindeutig apoptotischen, sondern nur eine geringe Anzahl toter Zellen schwach über PI angefärbt. Da diese Zelllinie nicht über den TNF-R1 oder TNF-R2 verfügt, konnte nur ein eventueller Effekt von Actinomycin D zum Tragen kommen.

Verglichen mit der Parentalzelllinie zeigten TNF-R1 Wildtyp- und TNF-R1ΔTRID-Zellen eine Anfärbung durch Annexin-V und PI, wobei sich die mit TNF behandelten Proben deutlich von den mit Actinomycin D behandelten Kontrollzellen unterschieden. Die TNF-R1 Wildtyp-Zellen zeigten einen Anstieg von 17% auf 32 % apoptotische Zellen, während die TNF-R1ΔTRID-Zellen keine Zunahme an eindeutig apoptotischer Zellen (31% zu 32%) zu verzeichnen hatten. Bei den TNF-R1ΔTRID-Zellen kam es zu einem Anstieg von 18% auf 46% PI-Annexin-V doppelt positiver Zellen. Dabei blieb die Anzahl Annexin-V gefärbter

Zellen konstant. Im Vergleich zu den Zellkulturen von TNF-R1 Wildtyp- und TNF-R1 Δ TRID-Zellen (Abb.3a) gab es in TNF-R1 Δ DD-, TNF-R1 Δ TRID Δ NSD- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen (Abb.3b) zwischen TNF behandelten und mit Actinomycin D allein behandelten Kontrollzellen keinen deutlichen Unterschied in der Menge toter bzw. apoptotischer Zellen. Der in lichtmikroskopischen Bildern gezeigte morphologische Zelltod von TNF-R1 Δ NSD-Zellen nach TNF-Behandlung konnte im FACS nicht dargestellt werden.

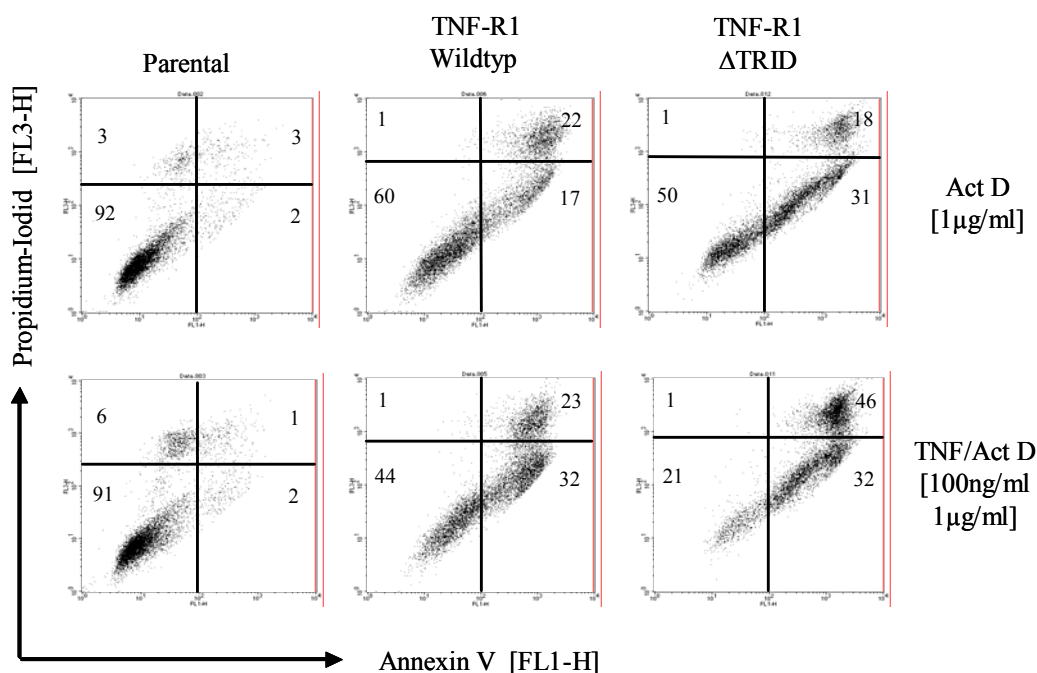


Abb.3a: FACS-Analyse der mit TNF/ActD behandelten Zellkulturen

Parental-, TNF-R1 Wildtyp- und TNF-R1 Δ TRID-Zellkulturen wurden eine Stunde mit 1 μg/ml ActD vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden mit 100 ng/ml TNF behandelt. Die Zellen wurden mit Annexin-V-Fluos (Roche) und 1 ng/ml PI angefärbt und im FACS dargestellt. Annexin-V (FL1-H) und PI (FL3-H) wurden im Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Die Verteilung der gefärbten Zellen wurde in Prozent in den entsprechenden Quadranten angegeben. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

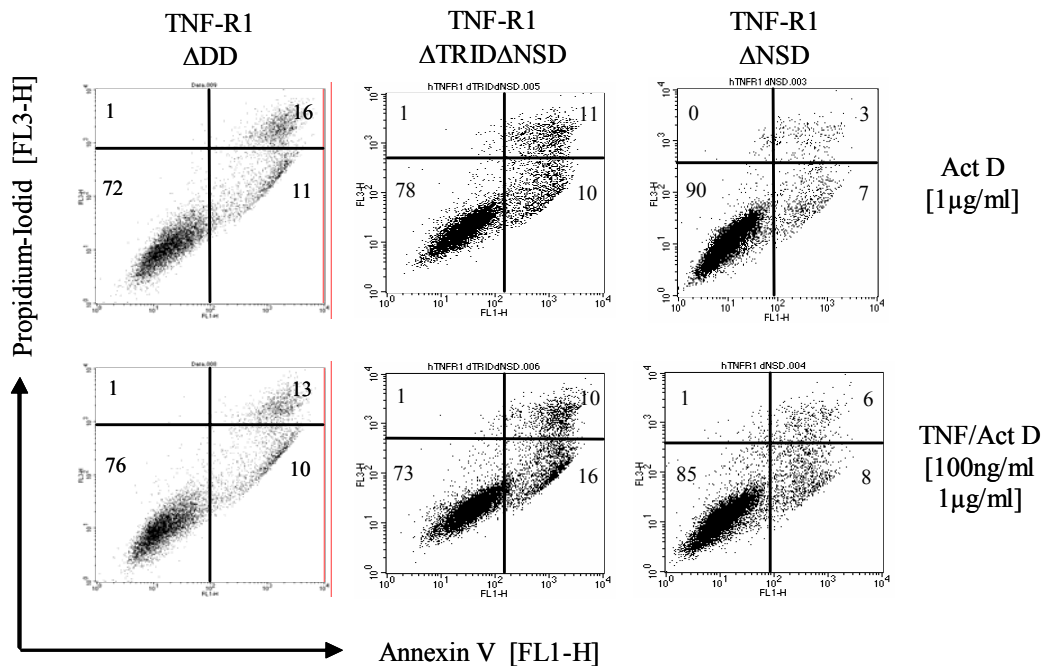


Abb.3b: FACS-Analyse der mit TNF/ActD behandelten Zellkulturen

TNF-R1ΔDD-, TNF-R1ΔTRIDΔNSD- und TNF-R1ΔNSD-Zellkulturen wurden eine Stunde mit 1 µg/ml ActD vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. Die Zellen wurden mit Annexin-V-Fluos (Roche) und 1ng/ml PI angefärbt und im FACS dargestellt. Annexin-V (FL1-H) und PI (FL3-H) wurden im Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Die Verteilung der gefärbten Zellen wurde in Prozent in den entsprechenden Quadranten angegeben. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Ursache für die Unterschiede der Rezeptordomänen-abhängigen Sensitivität der verschiedenen Zellkulturen auf TNF, sollte in Folgeexperimenten geklärt werden. Insbesondere sollte dabei die durch den TNF-R1 vermittelte Aktivierung der Caspase-Familie und nachgeschalteter Signalwege untersucht werden, um Aufschluss über die Unterschiede im Verlauf des Zelltodes zwischen den einzelnen Zelllinien zu geben.

3.1.3 Aktivierung von Caspasen nach Behandlung mit TNF und Actinomycin D

Um zu untersuchen ob es in den verschiedenen Zellkulturen während der 4 Stunden Behandlung mit 100ng/ml TNF und 1 µg/ml Actinomycin D (ActD) zur Aktivierung von Proteasen der Caspase-Familie kommt, wurde in kernfreien Lysaten von TNF-R1 Wildtyp-, TNF-R1ΔTRID-, TNF-R1ΔNSD-, TNF-R1ΔDD-, TNF-R1ΔTRIDΔDD- und TNF-R1ΔTRIDΔNSD-Zellen die Caspase 3-Aktivität bestimmt. Parallel dazu wurden entsprechende Lysate im Western Blot auf die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 („Poly-(ADP-Ribose) Polymerase 1“) untersucht. Caspase 3 ist eine zentrale Effektorprotease im Verlauf der Apoptose. PARP-1

stellt dabei ein Substrat für Caspase 3 dar. In der Frühphase der Apoptose wird PARP-1 zur DNA Reparatur in den Kern transportiert, in späteren Stadien jedoch durch Caspase 3 geschnitten und deaktiviert.

3.1.3.1 Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit TNF und Actinomycin D

Die Deletion der TRID- sowie der NSD-Domäne des TNF-R1 führte zu einer deutlichen Erhöhung der Caspase 3-Aktivität nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/ActD (*Abb.4*). Die TNF-R1 Wildtyp-Zellen zeigten zwar eine signifikante Erhöhung der Caspase 3-Aktivität, diese reichte jedoch nicht an die Aktivität der Caspase 3 in TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen (*Abb.4*) heran. Die TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen zeigten nur schwache Caspase 3-Aktivität, während in den Lysaten von TNF-R1 Δ DD- und TNF-R1 Δ TRID Δ DD-Zellen keine Aktivität (*Abb.4*) gemessen werden konnte.

Die Aktivierung der Caspase 3 war somit von den verschiedenen Domänen des TNF-Rezeptors abhängig. Erstaunlicherweise lag die Aktivität in den NSD und den TRID deletierten Zellen weitaus höher, als in TNF-R1 Wildtyp-Zellen.

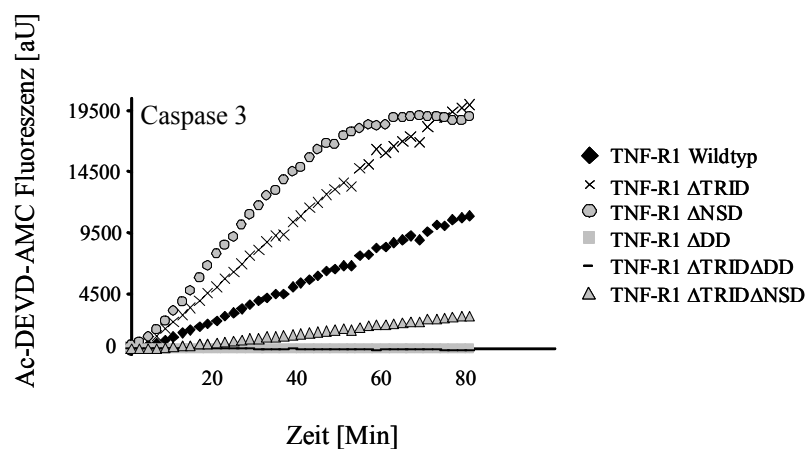


Abb.4: Caspase 3-Aktivität nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/ActD

Die Zellkulturen wurden 1 Stunde mit 1 μ g/ml ActD vorinkubiert und anschließend 4 Stunden mit 100 ng/ml TNF behandelt. 50 μ g Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Für 80 Minuten wurde alle 2 Minuten der Substratumsatz durch Caspase 3 im ELISA-Reader gemessen. Die relative Fluoreszenz [aU] des gespaltenen Substrates (Ac-DEVD-AMC) wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten.

3.1.3.2 Caspase 3 und PARP-1 Spaltung im Western Blot

Die über 4 Stunden mit TNF/ActD behandelten Zellkulturen wurden als kernfreie Lysate im Western Blot auf Caspase 3 und PARP-1 Spaltung untersucht (*Abb.5 und 6*). Außer bei der

Deletion von TRID- und NSD-Domäne im TNF-R1 zeigten alle Zelllinien schon bei Behandlung mit Actinomycin D allein eine konstitutive Spaltung der Caspase 3 32kD Isoform in das aktive 17kD Fragment (Abb.5). Nur TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen zeigten darüber hinaus bei TNF-Behandlung eine sichtbar erhöhte Spaltung bzw. ein Erscheinen der 17kD Isoform.

Entsprechend verhielt es sich für die PARP-1 116kD Isoform, die zu der inaktiven 89kD Isoform gespalten wurde. Nur TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen zeigten einen TNF abhängige Prozessierung (Abb.6).

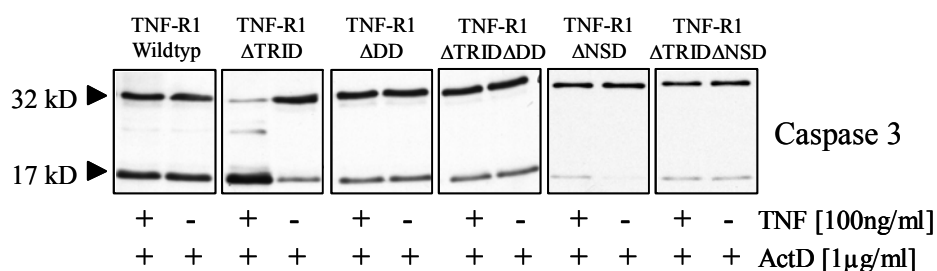


Abb.5: Immunoblot-Auswertung von Caspase 3 nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/ActD.

Western Blot der Caspase 3-Isoformen (32kD und 17kD) von kernfreien Proteinlysaten nach Vorinkubation der Zellkulturen mit 1 μ g/ml ActD und anschließender Behandlung mit 100ng/ml TNF über 4 Stunden. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

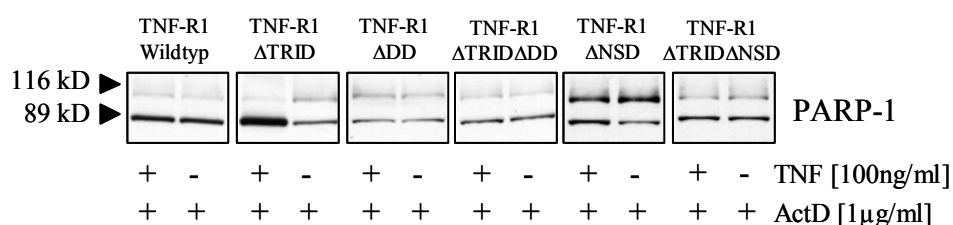


Abb.6: Immunoblot-Auswertung von PARP-1 nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/ActD.

Western Blot der PARP-1-Isoformen (116kD und 89kD) von kernfreien Proteinlysaten nach Vorinkubation der Zellkulturen mit 1 μ g/ml ActD und anschließender Behandlung mit 100ng/ml TNF über 4 Stunden. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Actinomycin D zeigte in den vorangegangenen Experimenten überaus starke Effekte, die die Auswirkungen von TNF zumindest teilweise zu überlagern schienen. Durch diesen starken Effekt konnte auch keine eindeutige Aussage über den durch TNF induzierten Zelltod in TNF-R1 Δ NSD- und TNF-R1 Δ TRID-Zellen gemacht werden. Daher wurde in den folgenden Experimenten auf den Zusatz von Actinomycin D verzichtet und die Zelllinien mit TNF alleine behandelt.

3.1.4 Morphologie der Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkulturen der stabil transfizierten Zelllinien wurden für 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt oder in Medium allein kultiviert. Die so behandelten Zellkulturen wurden im Lichtmikroskop auf morphologische Veränderungen untersucht. Nach 24 Stunden wurde der Versuch gestoppt und die Zellkulturen fotografiert (*Abb.7a und 7b*).

Die für 24 Stunden mit TNF behandelten TNF-R1Wildtyp-, TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen (*Abb.7a*) rundeten sich ab und kompartmentierten sich. In Ausschnittsvergrößerungen (*Abb.7a*) ist dies deutlicher dargestellt. Die Kontrollansätze der entsprechenden Zelllinien zeigten innerhalb der Versuchsdauer keine morphologischen Veränderungen. Die Anzahl versterbender oder toter Zellen nach Behandlung mit TNF stellte sich in den Zelllinien von TNF-R1Wildtyp, TNF-R1 Δ TRID und TNF-R1 Δ NSD mit ungefähr 50% gleichwertig dar. Im Vergleich mit den TNF-R1Wildtyp-Zellen führte die Deletion von TRID- und NSD-Domäne nicht zu einem verzögerten oder blockierten Zelltod durch TNF.

Die Versuchsansätze der TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRIDADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen sind in *Abb.7b* dargestellt. Diese Zelllinien zeigten keine morphologischen Veränderungen nach 24-stündiger TNF-Behandlung. Im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien zeigten die Kulturen der TNF-R1 Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRIDADD-Zellen allerdings ein verstärktes Zellwachstum. Dies war sowohl in den TNF behandelten als auch in den unbehandelten Ansätzen erkennbar (*Abb.7b*).

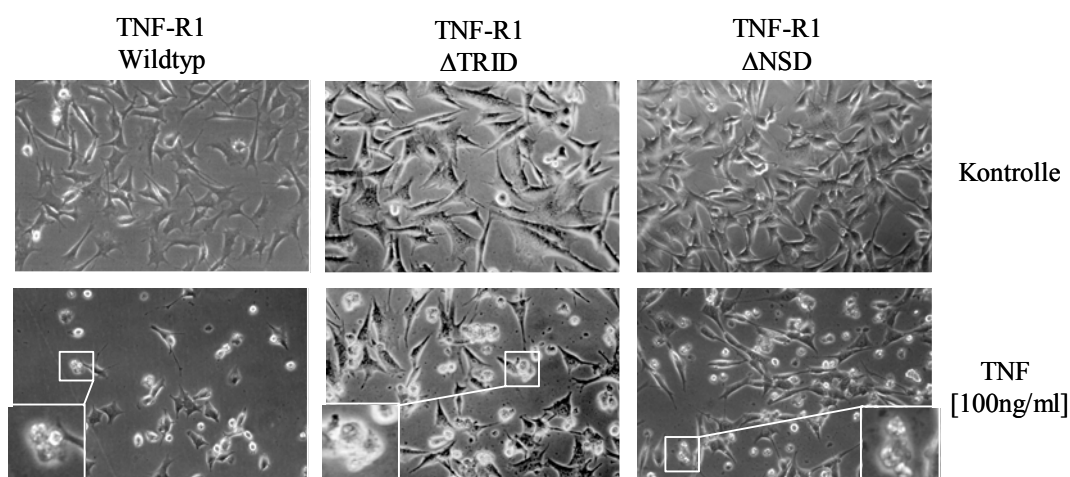


Abb.7a: Zellkulturen von TNF-R1Wildtyp, TNF-R1 Δ TRID und TNF-R1 Δ NSD nach 24 std. TNF

Die Zellkulturen wurden mit 100ng/ml TNF für 24 Stunden behandelt. Ausschnittsvergrößerungen von Einzelzellen der mit TNF behandelten Kulturen sind dargestellt. Die Kontrollen wurden in Kulturmedium allein inkubiert. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

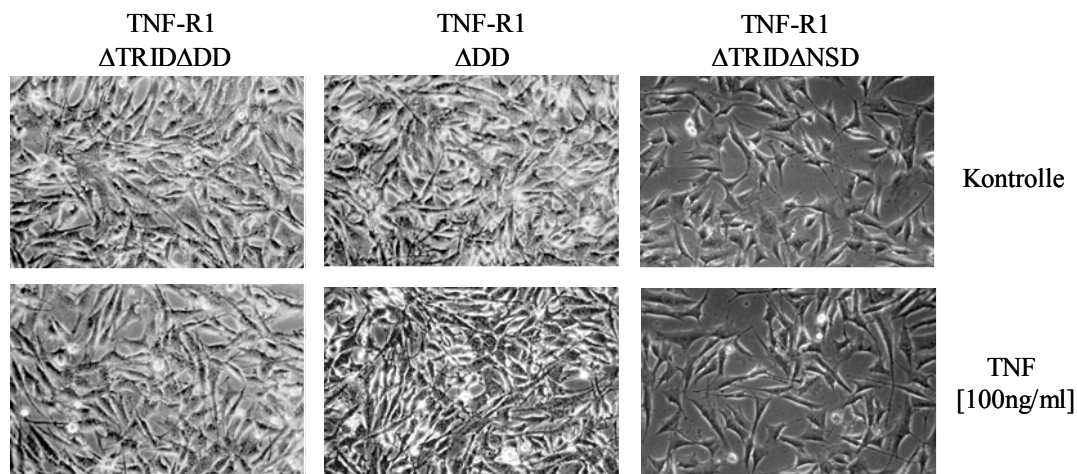


Abb.7b: Zellkulturen von TNF-R1 Δ DD, TNF-R1 Δ TRID Δ DD und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD nach 24 std. TNF
Die Zellkulturen wurden mit 100ng/ml TNF für 24 Stunden behandelt. Die Kontrollen wurden in Kulturmedium allein inkubiert. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Deletion der Todesdomäne (Δ DD), Internalisierungsdomäne und Todesdomäne (Δ TRID Δ DD), sowie Internalisierungsdomäne und neutralen Sphingomyelinasedomäne (Δ TRID Δ NSD) kam es zu einer Resistenz gegen induzierbaren Zelltod durch TNF. Diese ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus mit TNF/ActD behandelten Zellkulturen. Auf welche Art und Weise der Zelltod in den verschiedenen Zelllinien im Einzelnen abläuft, sollte in Folgeexperimenten geklärt werden.

3.1.5 Untersuchung der mit TNF behandelten Zellkulturen auf Apoptose

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 dargestellt, färbt Annexin-V die während der Apoptose nach außen gekehrten Phosphatidylserinreste der Zellmembran an. Propidium-Iodid hingegen interkaliert mit der Kern-DNA von toten bzw. nekrotischen Zellen. Man kombiniert Annexin-V und Propidium-Iodid um lebende Zellen (Annexin-V und PI negativ) von apoptotischen (Annexin-V positiv und PI negativ) und toten Zellen (Annexin-V und PI positiv) zu unterscheiden. In einem Dot-Plot Diagramm wurden die mit 100ng/ml TNF für 20 bis 48 Stunden behandelten und anschließend gefärbten Zellen dargestellt, um den durch TNF induzierbaren Zelltod der einzelnen Zelllinien näher zu charakterisieren.

In *Abb.8a* wurden TNF-R1Wildtyp-, TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die TNF-R1Wildtyp-Zellen verstarben im Verlauf von 48 Stunden zu über 90%. Im Vergleich zu TNF-R1Wildtyp-Zellen zeigten die TNF-R1 Δ TRID-Zellen zwar durch TNF induzierten Zelltod, jedoch verstarben nur gut 50%

der Zellen innerhalb von 48 Stunden. Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass bei den TNF-R1 Δ TRID-Zellen keine klare apoptotische Population auftrat.

Die Zelllinie der TNF-R1 Δ NSD-Zellen zeigte entgegen der morphologischen Darstellung (S.36 Abb.7a) in der FACS-Analyse keinen TNF-abhängigen Zelltod. Die Zellen blieben über den gesamten Versuchsverlauf zu über 97% vital.

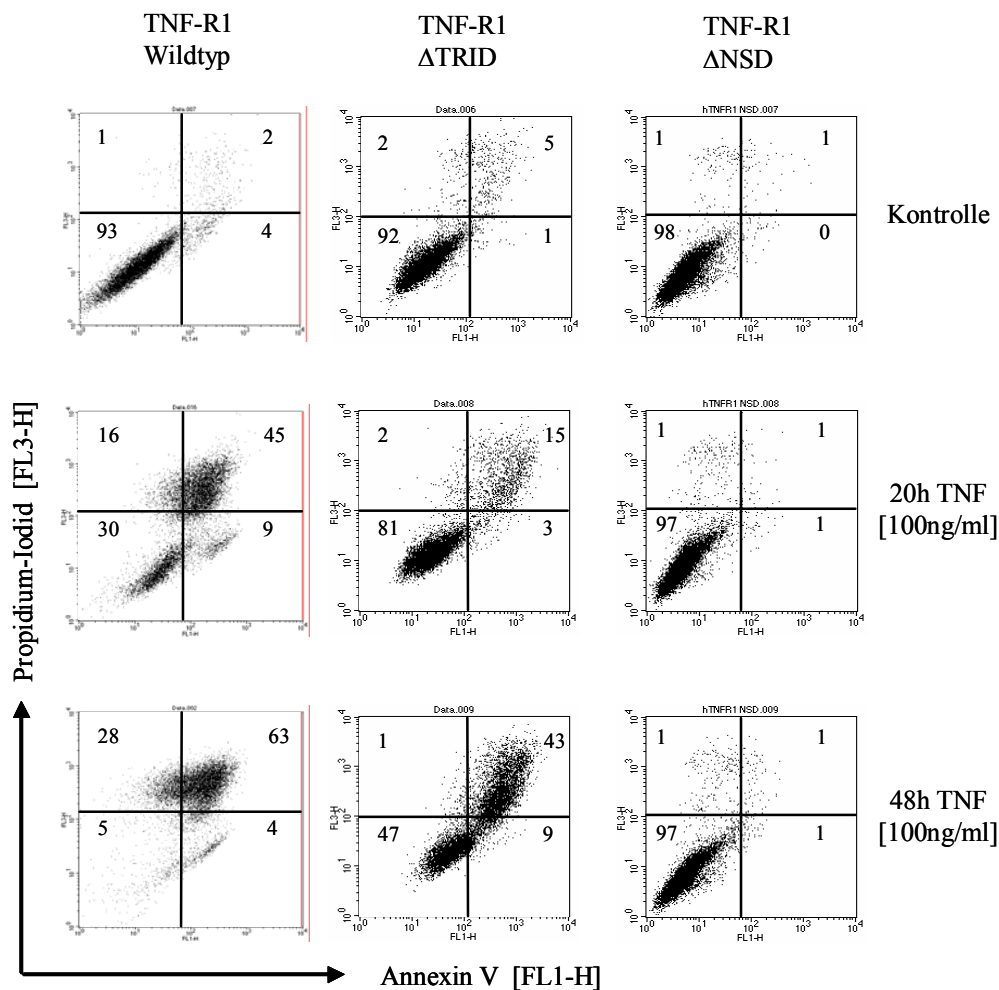


Abb.8a: FACS-Analyse von TNF-R1 Wildtyp, TNF-R1 Δ TRID und TNF-R1 Δ NSD nach 20 bzw. 48 Stunden Behandlung mit TNF

TNF-R1 Wildtyp-, TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen wurden für 20 bzw. 48 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellkulturen für 48 Stunden im Medium weiterkultiviert. Im FACS wurden die mit Annexin-V-Fluos (Roche) und 1ng/ml PI angefärbten Zellen dargestellt. Annexin-V (FL1-H) und PI (FL3-H) wurden im Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Die Verteilung der gefärbten Zellen wurde in Prozent in den entsprechenden Quadranten angegeben. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die in *Abb.8b* dargestellten FACS-Analysen von TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen demonstrierten die TNF-Resistenz dieser Zellen. Es kam zu keiner Anfärbung durch Annexin-V oder PI über den gesamten Behandlungszeitraum mit TNF.

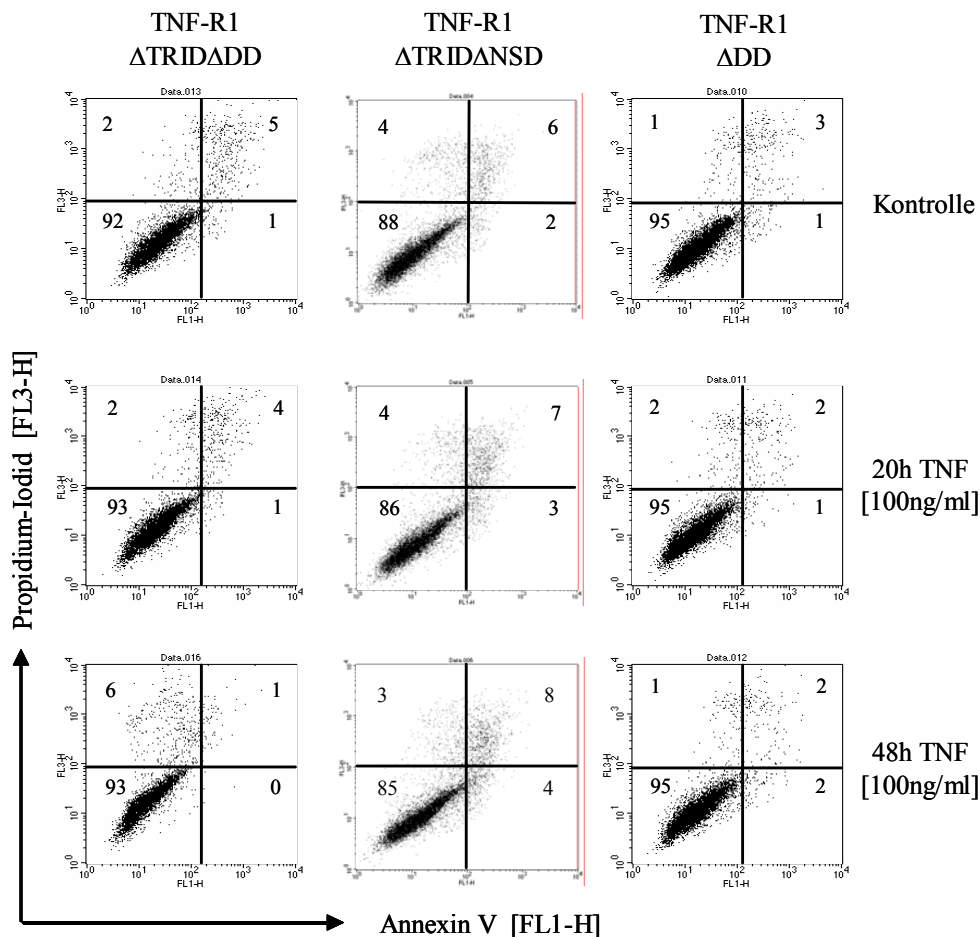


Abb.8b: FACS-Analyse von TNF-R1 Δ ADD, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD nach 20 bzw. 48 Stunden Behandlung mit TNF

TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen wurden für 20 bzw. 48 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellkulturen für 48 Stunden im Medium weiterkultiviert. Im FACS wurden die mit Annexin-V-Fluos (Roche) und 1ng/ml PI angefärbten Zellen dargestellt. Annexin-V (FL1-H) und PI (FL3-H) wurden im Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Die Verteilung der gefärbten Zellen wurde in Prozent in den entsprechenden Quadranten angegeben. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Unterschiede im TNF-induzierbaren Zelltod und der TNF-R1 vermittelten Signalweiterleitung zwischen den einzelnen Zelllinien sollte in Folgeexperimenten näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Zelllinien auf die Aktivierung von Mitgliedern der Caspasefamilie nach Behandlung mit TNF untersucht.

3.1.6 Aktivierung der Caspase 3 nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Um zu untersuchen, ob innerhalb von 24 Stunden nach Zugabe von TNF Caspasen im Zytosol der Zelllinien aktiviert sind, wurde die Caspase 3-Aktivität im Enzymaktivitätsassay bestimmt. Parallel dazu wurden entsprechende Lysate der Zelllinien im Western Blot auf Caspase 3 und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) Spaltung untersucht. PARP-1 ist, wie unter 3.1.3 beschrieben, ein Substrat für Caspase 3 im Verlauf des programmierten Zelltodes.

3.1.6.1 Caspase 3-Aktivität nach 4 bis 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zelllinien wurden für 4, 16 und 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt und anschließend die Caspase 3-Aktivität in kernfreien Lysaten bestimmt. In keiner der beschriebenen Zellkulturen kam es bereits nach 4 Stunden TNF Behandlung zu einer eindeutig messbaren Caspase 3-Aktivität (*Abb.9*). Nach einer längeren Behandlungszeit von 16 Stunden erhöhte sich dann die Caspase 3-Aktivität in den TNF-R1 Wildtyp-Zellen deutlich und konnte nach 24 Stunden nicht mehr gesteigert werden (*Abb.9*). Die TNF-R1 Δ TRID-Zellen zeigten nach 16 Stunden und 24 Stunden nur eine mäßige Aktivierung der Caspase 3 im Vergleich zu TNF-R1 Wildtyp-Zellen. Die Deletion der NSD führte zu einer verzögerten Caspase 3-Aktivierung, denn erst nach 24 Stunden erreichten die TNF-R1 Δ NSD-Zellen das Niveau der TNF-R1 Δ TRID-Zellen (*Abb.9*).

Die Lysate von TNF-R1 Δ DD-, TNF-R1 Δ TRID Δ DD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen zeigten keine Aktivität der Caspase 3 innerhalb der 24 Stunden Behandlung mit TNF (*Abb.9*).

Die Aktivität der Caspase 3 war somit von den verschiedenen Domänen des TNF-R1 abhängig.

Im Folgenden sollten mit TNF behandelte Zellen im Western Blot auf Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 untersucht werden.

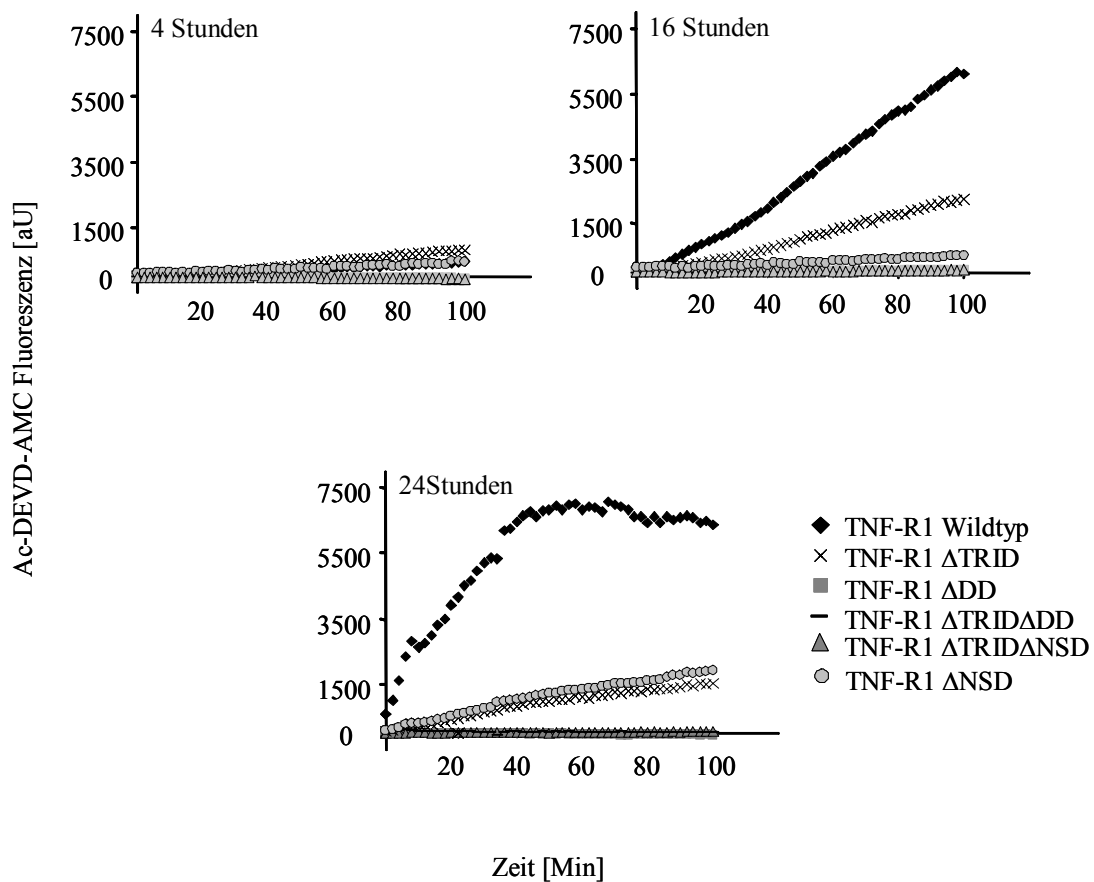


Abb.9: Caspase 3-Aktivität nach 4 bis 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkulturen wurden 4 bis 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurde im Enzymassay eingesetzt. Für 100 Minuten wurde alle 2 Minuten der Substratumsatz durch Caspase 3 im ELISA-Reader gemessen. Die relative Fluoreszenz [aU] des gespaltenen Substrates (Ac-DEVD-AMC) wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.6.2 Caspase 3-Spaltung im Western Blot nach 20 Stunden Behandlung mit TNF

Es wurden kernfreie Lysate der für 20 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelten Zelllinien auf Caspase 3-Spaltung untersucht. Im Wildtyp wurde nach 20 Stunden Behandlung mit TNF die Caspase 3 von der inaktiven 32kD Isoform in das aktive 17kD Fragment gespalten (*Abb.10*). Verglichen mit den TNF-R1 Wildtyp-Zellen war diese Spaltung in TNF-R1 Δ TRID- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen geringer. Neben der TNF-abhängigen kam es in TNF-R1 Δ TRID-Zellen auch zu einer konstitutiven Caspase 3-Spaltung. Dieser Effekt könnte mit der sensiblen Zellkultur der TNF-R1 Δ TRID-Zellen zusammenhängen, da bei jedem Kultivierungsschritt oder Kultur-

medienwechsel eine gewisse Anzahl der Zellen verstarb und somit potentiell Caspase 3 aktiviert haben könnte.

Die Zellkulturen von TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen zeigten keine aktivierende Spaltung der Caspase 3 innerhalb der 20 Stunden Behandlung mit TNF (*Abb.10*). Dies entsprach dem Bild, welches sich bereits in der Aktivität der Caspase 3 im Enzymassay zeigte.

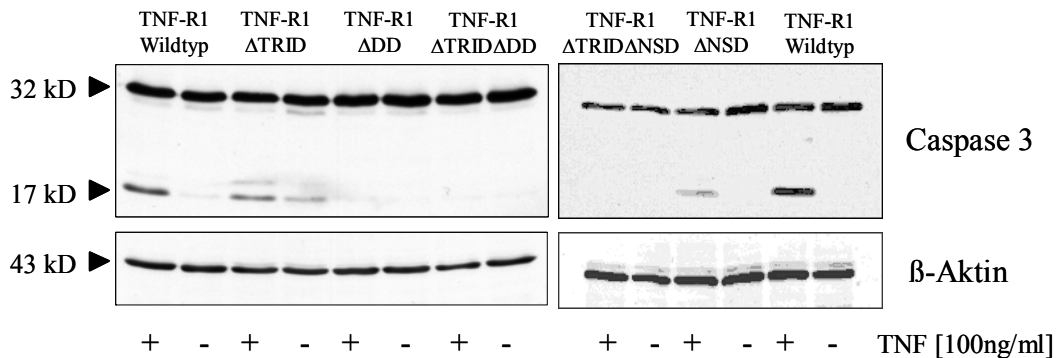


Abb.10: Immunoblot-Auswertung von Caspase 3 nach 20 Stunden Behandlung mit TNF

Western Blot der Caspase 3-Isoformen (32kD und 17kD) aus kernfreien Proteinlysaten nach Behandlung der Zellkulturen mit 100ng/ml TNF über 20 Stunden. Eine Normalisierung der Proben fand über β -Aktin (43kD) statt. Repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten.

3.1.6.3 PARP-1 Spaltung im Western Blot nach 20 Stunden Behandlung mit TNF

Nach 20 Stunden Behandlung mit 100ng/ml TNF wurden kernfreie Lysate der Zelllinien auf Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) untersucht. PARP-1 wurde in TNF-R1 Wildtyp von der 116kD (aktiv) Isoform, in die 89kD (inaktiv) Form gespalten (*Abb.11*). Eine geringere Spaltung stellte sich bei TNF-R1 Δ TRID und TNF-R1 Δ NSD-Zellen durch eine schwächere Bande der 89kD Isoform dar (*Abb.11*). Die TNF-R1 Δ TRID-Zellen zeigten wie unter 3.1.6.2 (*Abb.10*) eine schwache konstitutive Spaltung.

Die Zellkulturen von TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen zeigten keine erkennbare Spaltung von PARP-1 (*Abb.11*), was den Caspase 3 Befunden aus *Abb.10* entsprach.

Die Aktivierung von Caspase 3 (*Abb.10*) und die resultierende Inaktivierung von PARP-1 während des programmierten Zelltodes ist somit von den verschiedenen Domänen des TNF-R-1 abhängig.

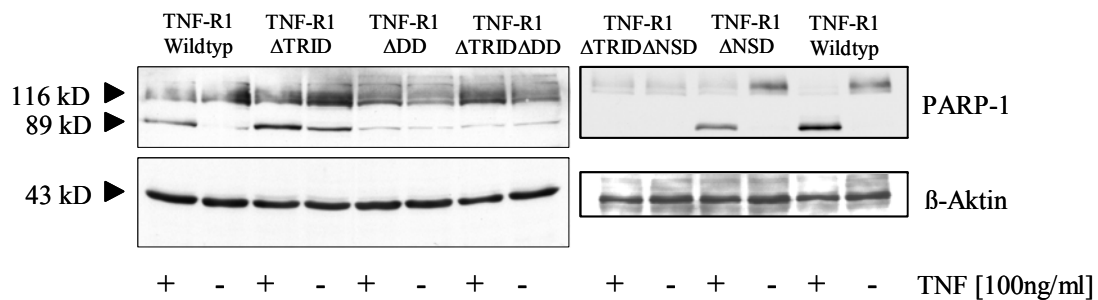


Abb.11: Immunoblot-Auswertung von PARP-1 nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Western Blot der PARP-1-Isoformen (116kD und 89kD) aus kernfreien Proteinlysaten nach Behandlung der Zellkulturen mit 100ng/ml TNF über 20 Stunden. Eine Normalisierung der Proben fand über β -Aktin (43kD) statt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Nachdem die Aktivierung proapoptischer, zytosolischer Signalwege in Abhängigkeit der Domänen des TNF-R1 gezeigt wurde, sollte im Folgenden die Veränderung der DNA-Struktur im Verlauf des programmierten Zelltodes untersucht werden.

3.1.7 DNA-Laddering nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

In späten Stadien der Apoptose kommt es zur Degradierung der DNA durch Endonukleasen, die kondensierte DNA im Bereich zwischen den Histon-DNA Komplexen schneiden. Dadurch entstehen 180 bis 200 Basenpaare große DNA-Fragment-Ketten. Im Agarose-Gel kann diese Form der DNA-Degradierung („DNA-Laddering“) durch ein charakteristisches Bandenmuster nachgewiesen werden.

Die Zellkulturen wurden nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden mit 100ng/ml TNF auf DNA-Laddering untersucht. Die TNF-R1 Wildtyp-Zellen zeigten die charakteristische Bandenstruktur für apoptotische DNA-Degradierung (Abb. 12). Die TNF-R1 Δ NSD-Zellen zeigten DNA-Degradierung, jedoch kein definitives Bandenmuster. Auch über den Zeitraum von 48 Stunden (nicht dargestellt) zeigte die DNA-Degradierung in TNF-R1 Δ NSD-Zellen keine Steigerung. Die Zellkultur von TNF-R1 Δ TRID-Zellen zeigte zu keiner Zeit DNA-Laddering, obwohl die Aktivierung von Caspase 3 im Enzymassay und die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 im Western Blot TNF-abhängig nachgewiesen worden war. Der Ablauf des programmierten Zelltodes scheint sich von TNF-R1 Wildtyp- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen zu unterscheiden. Die TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen zeigten keine DNA-Degradierung nach einer TNF-Behandlung für 24 Stunden (Abb. 12).

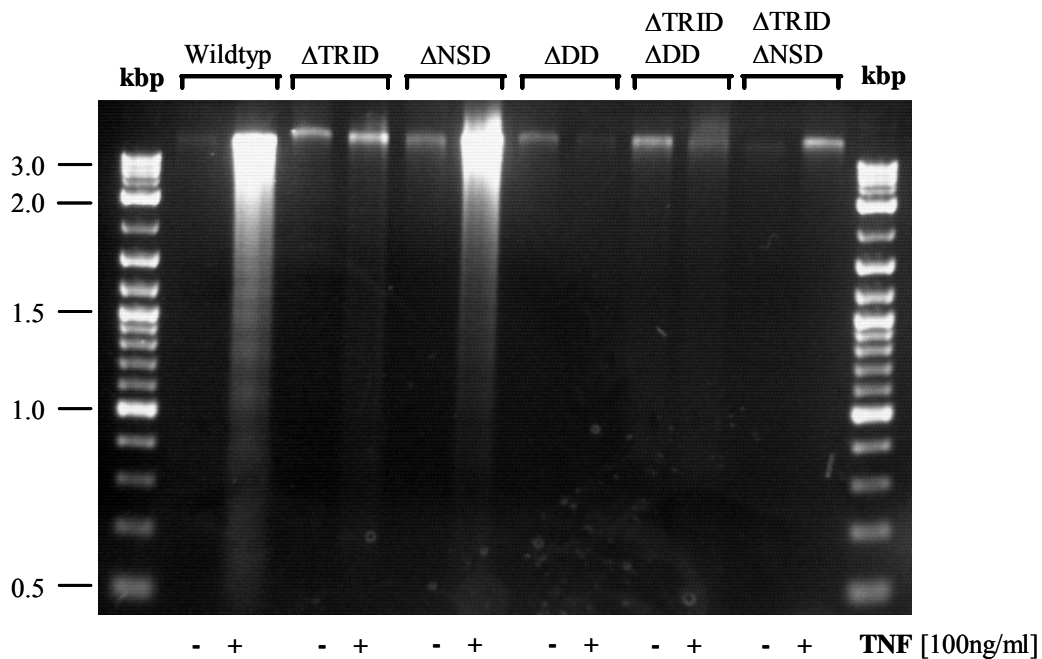


Abb.12: DNA-Laddering Analyse nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkulturen wurden 24 Stunden mit 100ng/ml TNF oder unbehandelt kultiviert. 1µg DNA der Zellkulturen wurde in 2%igem Agarosegel analysiert. Als Standard wurde eine 100 bp DNA-Ladder (NewEnglandBiol.) eingesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

In den vorangegangenen Versuchen konnte eine inaktivierende Spaltung von PARP-1 durch aktivierte Caspase 3 nach TNF in TNF-R1Wildtyp-, TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1ΔNSD-Zellen dargestellt werden. Diese Aktivitäten waren in TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1ΔNSD-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen reduziert. Weiterhin wurde in TNF-R1Wildtyp die für apoptotische Zellen typische Form des DNA-Laddering gezeigt. Es scheint Unterschiede zwischen der Signalweiterleitung in TNF-R1ΔTRID- und TNF-R1Wildtyp-Zellen zu geben, da TNF-R1ΔTRID-Zellen nach TNF-Behandlung kein DNA-Laddering zeigten. Aus diesen Gründen sollte in Folgeexperimenten geklärt werden, ob im TNFR-1 vermittelten Signalweg der verschiedenen Deletionsmutanten noch weitere Unterschiede bestehen. Dazu wurden als nächstes der Caspase 3 vorgeschaltete Signalwege näher untersucht.

3.1.8 Mitochondriale Beteiligung durch Aktivierung der Caspase 9

Die Zelllinien wurden über 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt und auf Caspase 9-Aktivität untersucht. Caspase 9 wird innerhalb des programmierten Zelltodes nach Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien durch das Apoptosom, einem Multimer aus Apaf-1 („apoptotic protease activating factor 1“), Cytochrom C und ATP („Adenosin-Tri-

Phosphat⁴), aktivierend gespalten. Im Apoptosom wird zuerst die 49kD inaktive Form der Caspase 9 in eine schwach aktive 39kD Isoform überführt, bevor diese im Zytosol aus der 49kD Caspase 9 eine aktive 37kD Isoform spalten kann. Die aktive Caspase 9 kann dann ihrerseits Caspase 3 durch Spaltung aktivieren.

3.1.8.1 Caspase 9-Aktivität nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Behandlung mit 100ng/ml TNF für 24 Stunden führte bei TNF-R1 Wildtyp-Zellen zu einer starken Aktivierung der Caspase 9 (Abb.13). Im Vergleich dazu fällt die Aktivität bei TNF-R1 Δ NSD-Zellen nur schwach aus. In kernfreien Lysate der TNF-R1 Δ TRID-, TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRID Δ ADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen konnte keine Aktivität der Caspase 9 gemessen werden (Abb.13).

Um diese Daten weiter zu kontrollieren, wurden kernfreie Lysate der mit TNF behandelten Zelllinien auch im Western Blot auf Caspase 9 Spaltung als Zeichen einer Aktivierung untersucht.

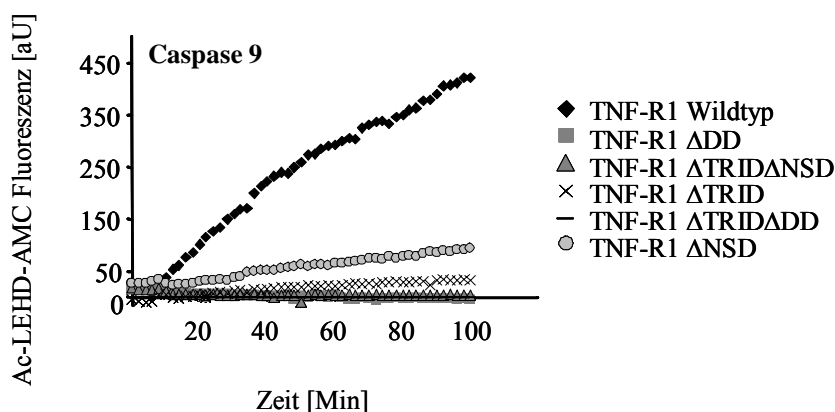


Abb. 13: Caspase 9-Aktivität nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkulturen wurden 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Für 100 Minuten wurde alle 2 Minuten der Substratumsatz durch Caspase 9 im ELISA-Reader gemessen. Die relative Fluoreszenz [aU] des gespaltenen Substrates (Ac-LEHD-AMC) wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten.

3.1.8.2 Caspase 9-Spaltung im Western Blot nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zelllinien wurden 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. Bei TNF-R1 Wildtyp-Zellen kam es, wie im Enzymassay (Abb.13), zu einer Aktivierung der Caspase 9. Durch Spaltung der 49kD Isoform in die schwach aktive 39kD und aktive 37kD Isoform ist dies im Western Blot dargestellt (Abb.14). TNF-R1 Δ NSD-Zellen zeigten nur eine geringe Spaltung der 49kD Isoform in die 39kD Isoform.

Bei allen anderen Zelllinien kam es zu keiner Spaltung und Aktivierung der Caspase 9 innerhalb der 24-stündigen TNF-Behandlung (Abb.14). Die Deletion der Rezeptordomänen in TNF-R1 Δ TRID-, TNF-R1 Δ ADD-, TNF-R1 Δ TRIDADD- und TNF-R1 Δ TRID Δ NSD-Zellen führte, im Vergleich zu den Zelllinien von TNF-R1 Wildtyp- und TNF-R1 Δ NSD-Zellen, zu einer vollständigen Blockade des mitochondrialen Signalweges.

Da die Deletion der TRID-Domäne die Internalisierung des TNF-R1 verhindert, deuten diese Ergebnisse auf eine essentielle Rolle der TNF-R1 Endozytose für die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs hin.

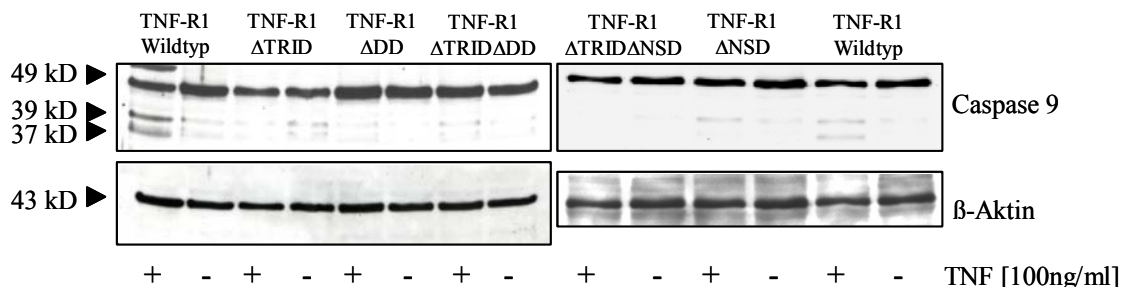


Abb. 14: Immunoblot-Auswertung von Caspase 9 nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Western Blot der Caspase 9-Isoformen (49kD, 39kD und 37kD) aus kernfreien Proteinlysaten nach Behandlung der Zellkulturen mit 100ng/ml TNF über 24 Stunden. Eine Normalisierung der Proben fand über β -Aktin (43kD) statt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.9 Aktivierung von Caspase 8 in TNF-R1 Wildtyp-Zellen

Caspase 8 spielt im Signalweg der TNFR-1 vermittelten Apoptose eine initiale Rolle. Nach Bindung des Liganden TNF- α am TNFR-1 wird der DISC („death-inducing signalling-complex“) durch Rekrutierung der Proteine TRADD, FADD und Caspase 8 gebildet. Caspase 8 wird dann autokalalytisch in eine aktive Form überführt und kann weitere Caspasen aktivie-

ren, oder über nachgeschaltete Faktoren Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien vermitteln und auf diese Weise Caspasen aktivieren.

Aus diesem Grund sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden, ob in TNF-R1 Wildtyp-Zellen nach TNF-Behandlung Caspase 8 aktiviert wird.

3.1.9.1 Caspase 8-Aktivität nach 2 Stunden Behandlung mit TNF

Die TNF-R1 Wildtyp-Zellen wurden für 2 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. Anschließend wurden kernfreie Lysate der Zellen im Enzymassay untersucht. Durch Umsetzung des spezifischen Caspase 8-Substrates Ac-IETD-AMC konnte somit eine frühe Aktivierung der Caspase 8 dargestellt werden (Abb.15).

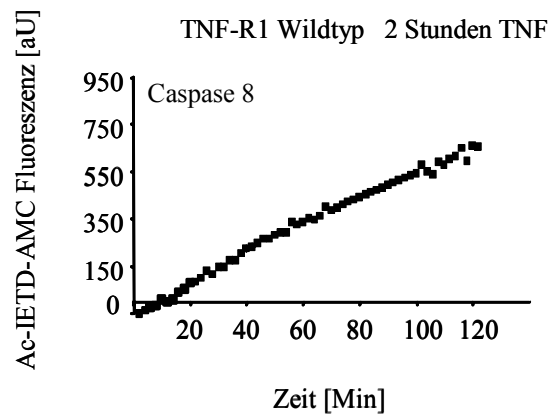


Abb.15: Caspase 8-Aktivität im TNF-R1 Wildtyp nach 2 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkultur wurde 2 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. 50µg kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Für 120 Minuten wurde alle 2 Minuten der Substratumsatz durch Caspase 8 im ELISA-Reader gemessen. Die relative Fluoreszenz [aU] des gespaltenen Substrates (Ac-IETD-AMC) wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.9.2 Western Blot-Analyse der Caspase 8-Isoformen in Rezeptosomen

Zur näheren Charakterisierung der nach 2 Stunden messbaren Caspase 8-Aktivität in TNF-R1 Wildtyp-Zellen, wurden TNF-Rezeptorkomplexe über eine magnetische Separation, nach einer Inkubationszeit von 10 Min mit biotinyliertem TNF, aus den Zellen isoliert. Auf diese Weise sollte an den TNF-R1 gebundene Caspase 8 und folglich die Rekrutierung des DISC dargestellt werden. Die im Western Blot zu analysierenden Rezeptorkomplexe wurden von Dr. Vladimirt Tchikov, einem Mitarbeiter der AG Schütze durch eine patentierte Separationsmethode gewonnen (Tchikov et al., 2001; Schütze et al., 2003; Schneider-Brachert et al., 2004). Dabei werden Zellen bei 4°C mit biotinyliertem TNF inkubiert, anschließend werden an Streptavidin gebundene magnetische Microbeads hinzugegeben. Die Zellkultur wird auf

37°C erwärmt, sodass der magnetisch markierte TNF-R1 internalisieren kann. Die Zellen werden im Anschluss homogenisiert und die internalisierten Membranvesikel mittels einer Free-Flow-Magnetkammer aus dem Homogenat isoliert.

Die so gewonnenen Rezeptorkomplexe wurden in der vorliegenden Arbeit im Western Blot zusammen mit dem entsprechenden Totallysat der TNF-R1 Wildtyp-Zellen aufgetragen (*Abb.16*).

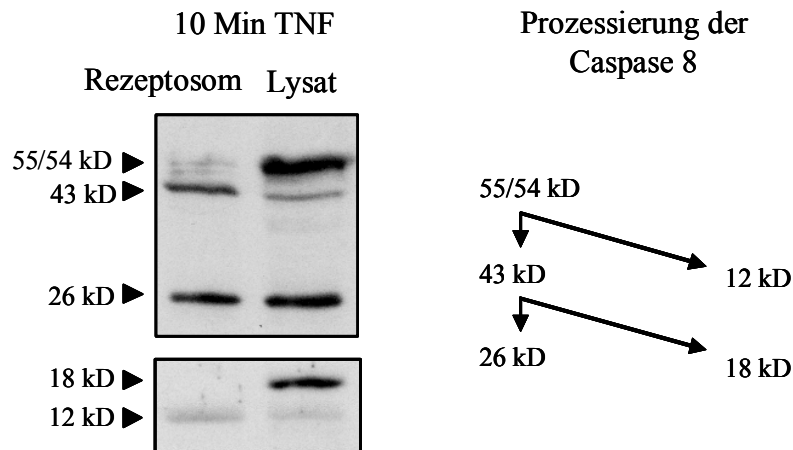


Abb.16: Immunoblot Analyse der Caspase 8-Isoformen nach 10 Min TNF

Western Blot der Caspase 8-Isoformen (55/54kD, 43kD, 26kD, 18kD und 12kD) aus magnetisch isolierten TNF-Rezeptorkomplexen (Rezeptosomen) im Vergleich zu kernfreiem Volllysat nach Behandlung der Zellkultur mit 100ng/ml TNF für 10 Minuten. Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

In *Abb.16* ist neben der Analyse des Western Blot auch schematisch die Aktivierung der Caspase 8 dargestellt. Die zytosolisch vorkommende 55kD Isoform wird nach Trimerisierung des TNF-Rezeptorkomplexes rekrutiert und an die Adapterproteine des Rezeptors gebunden. Dabei wird eine 12kD Isoform abgespalten. Am Rezeptorkomplex lagern sich dann zwei 43kD lange Untereinheiten der Caspase 8 unter Abspaltung einer 18kD Isoform aneinander und bilden somit eine rezeptorgebundene 26kD Isoform. Die enzymatisch aktive 18kD Isoform und die schwach aktive 12kD Isoform bilden im Zytosol aktive Caspase 8 Heterodimere, die Caspase 3 aktivierend spalten oder mitochondriale Cytochrom C Freisetzung über die Spaltung des proapoptotischen Bcl-2 Proteins Bid induzieren können.

In magnetisch isolierten Rezeptorkomplexen kam es demnach zur Rekrutierung der 55/54kD Pro-Caspase 8 über die rezeptorgebundene 43kD Isoform unter Abspaltung der 12kD Isoform. Im Volllysat erscheinen dann die 18kD und 12kD Isoform, welche im Zytosol aktive Heterodimere bilden können (*Abb.16*).

3.1.10 Vermittlung der Caspase 3-Aktivität durch Sphingomyelinasen

Während des programmierten Zelltodes können Todesrezeptoren, wie z.B. TNF-R1, Interleukin-1-Rezeptor oder Fas-Rezeptor, nach Bindung ihres entsprechenden Liganden pH abhängige Sphingomyelinasen aktivieren. Die endolysosomal vorkommende saure Sphingomyelinase (A-SMase) und die an die Plasmamembran gebundene neutrale Sphingomyelinase (N-SMase) setzen dann durch Hydrolyse von Sphingomyelin Ceramid frei. Ceramid ist ein „Lipid-second Messenger“ und in der Lage Apoptose zu induzieren (Hannun et al., 1995).

In den folgenden Experimenten sollte durch Zugabe von exogenem C₆-Ceramid geprüft werden, ob Caspase 3-Aktivität durch Ceramid induzierbar ist.

3.1.10.1 Caspase 3-Aktivität nach 8 Stunden Behandlung mit C₆-Ceramid

Die Induktion von Caspase 3 durch Ceramid ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Monney et al., 1998). Ob dies auch für die vorliegenden Zelllinien zutrifft, wurde nachfolgend untersucht. Die Zelllinien von TNF-R1 Wildtyp und TNF-R1 Δ TRID-Zellen wurden für 8 Stunden mit in DMSO gelöstem C₆-Ceramid (60 μ M) behandelt. In beiden Zelllinien konnte Caspase 3 aktiviert werden. Durch eine Behandlung mit DMSO als Kontrolle konnte in den Zelllinien keine Caspase 3-Aktivität induziert werden.

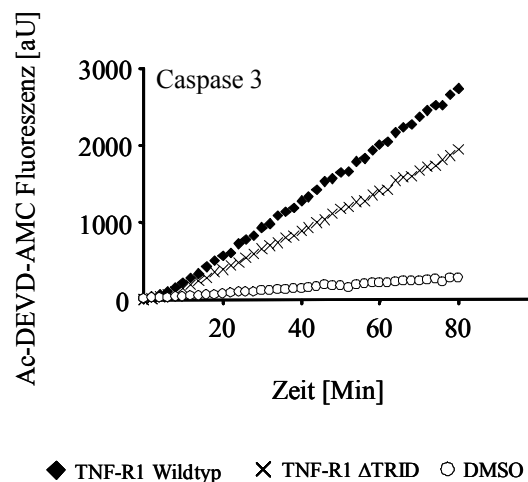


Abb.17: Caspase 3-Aktivität nach 8 Stunden Behandlung mit C₆-Ceramid

Die Zellkulturen wurden 8 Stunden mit 60 μ M C₆-Ceramid oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Für 80 Minuten wurde alle 2 Minuten der Substratumsatz durch Caspase 3 im ELISA-Reader gemessen. Die relative Fluoreszenz [aU] des gespaltenen Substrates (Ac-DEVD-AMC) wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

Nachdem durch exogenes C₆-Ceramid in TNF-R1 Wildtyp- und TNF-R1ΔTRID-Zellen Caspase 3-Aktivität induziert werden konnte, sollte in Folgeexperimenten die N-SMase Aktivität der Zelllinien nach TNF Behandlung untersucht werden. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob durch die Aktivierung der N-SMase über die NSD des TNF-R1 endogenes Ceramid gebildet wird, welches Caspase 3 aktivieren kann.

3.1.10.2 N-SMase Aktivität nach Behandlung mit TNF

Um Aufschluss über eine Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase) nach TNF Behandlung zu bekommen, wurden Sphingomyelinase Aktivitätsassays von Supandi Winotomorbach einem Mitglied der AG Schütze durchgeführt. Die Zellen wurden dabei nach einer entsprechenden Behandlungszeit mit TNF für 1 bis 5 Minuten durch Ultraschall homogenisiert. Der postnukleäre Überstand wurde mit N-methyl-[C¹⁴] Sphingomyelin bei pH 7.4 und 37°C inkubiert. Die N-SMase spaltet durch Hydrolyse das Sphingomyelin in Ceramid und radioaktives Phosphorylcholin im gleichen stöchiometrischen Verhältnis. Die freiwerdende radioaktive Strahlung gibt dann die Stärke der N-SMase Aktivität an (Abb.17).

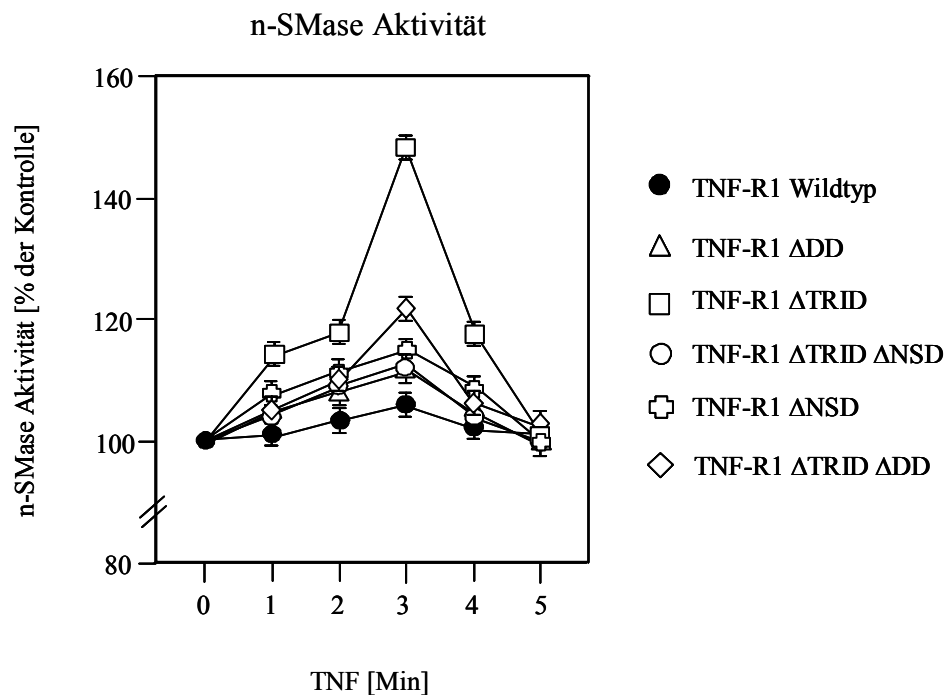


Abb.17: neutrale Sphingomyelinase (N-SMase)-Aktivität nach TNF Behandlung

Die Zellkulturen wurden für 1 bis 5 Minuten mit 100ng/ml TNF inkubiert. 20µg kernfreies Proteinlysate dieser Zellkulturen wurden 2 Stunden mit N-methyl-[C¹⁴] Sphingomyelin in Assaypuffer [20mM HEPES, 10mM MgCl₂, pH 7,4] bei 37°C inkubiert. Die Substratumsetzung durch N-SMase wurde im β-Counter gemessen und als % der Kontrolle dargestellt. Median aus fünf unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zelllinien kam es nur in TNF-R1 Δ TRID-Zellen nach 3 Minuten Inkubation mit TNF zu einer Steigerung der N-SMase Aktivität auf ungefähr 150%. Die übrigen Zelllinien zeigten keine signifikante Erhöhung der N-SMase Aktivität.

Die gesteigerte N-SMase Aktivität der TNF-R1 Δ TRID-Zellen könnte über die Freisetzung von Ceramid und unabhängig von Caspase 8 und 9, die Aktivierung von Caspase 3 induzieren. Dieser Effekt konnte durch Doppeldeletion der Δ TRID- und Δ NSD-Domäne des TNF-R1 unterbunden werden, wodurch es zu einer kompletten Apoptose-Resistenz kommt (vgl. S.38 Abb.8b).

3.2 Die Rolle der Aspartatprotease Cathepsin D im Signalweg des TNFR-1

Aus Ergebnissen der Arbeitsgruppe Schütze ist bekannt, dass die Blockade der Internalisierung des TNF-R1 durch Monodansylcadaverin (MDC) eine Apoptose verhindern kann (Schütze et al., 1999). Durch eine Vorinkubation mit MDC konnte dabei ebenfalls eine Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) nach Zugabe von TNF- α verhindert werden. Aktivierte A-SMase ist in der Lage, aus Sphingomyelin das Lipid „Ceramid“ durch Hydrolyse freizusetzen. In weiteren Arbeiten wurde dargestellt, dass die proapoptotische Aspartatprotease Cathepsin D von Ceramid gebunden und dadurch aktiviert werden kann (Heinrich et al, 1999). Weiter konnte gezeigt werden, dass in TNF behandelten humanen HeLa-Zellen der spezifische Cathepsin D Inhibitor Pepstatin A partiell die Aktivierung von Caspasen hemmt (Heinrich et al., 2004). Aufgrund dieser Befunde sollte in weiteren Experimenten der genauere Einfluss von Cathepsin D auf den TNFR-1 vermittelten Signalweg untersucht werden.

Die 52kD Präpro-Isoform von Cathepsin D befindet sich in einer intakten Zelle in primären Lysosomen. Nach einem Apoptose-induzierenden Stimulus kommt es zur Prozessierung der 52kD Isoform zur wenig aktiven 48kD Isoform im endolysosomalen Kompartiment. Die 48kD Isoform kann durch Spaltung in die aktive 32kD Isoform überführt werden, die dann ins Zytosol der Zelle entlassen werden kann. Ein genauer Mechanismus für die Translokation und Aktivierung von Cathepsin D ist noch weitgehend unbekannt. Ceramid scheint aber eine wichtige Rolle dabei zu spielen (Heinrich et al., 1999). Auch die weitere Aktivierung von Caspasen durch Cathepsin D wird kontrovers diskutiert. In vivo Experimente durch Mikroinjektion von Cathepsin D in Fibroblasten konnten eine Caspase-Aktivierung und daraus resultierende Apoptose darstellen (Roberg et al., 2001).

Um sich ein Bild von der Rolle des Cathepsin D im TNF vermittelten Zelltod machen zu können, wurden murine Cathepsin D knockout Fibroblasten ($CD^{-/-}$) mit Cathepsin D stabil retransfiziert ($CD^{-/-}$ CatD) und mit den entsprechenden knockout Zellen verglichen. Als weitere Kontrolle wurden auch Wildtyp-Fibroblasten ($CD^{+/+}$) untersucht.

3.2.1 Darstellung der Cathepsin D-Isoformen im Western Blot

Aus den Zellkulturen von murinen Fibroblasten ($CD^{+/+}$), Cathepsin D knockout Fibroblasten ($CD^{-/-}$) und mit Cathepsin D stabil retransfizierten knockout Fibroblasten ($CD^{-/-}$ CatD) wurden kernfreie Lysate erstellt. Die konstitutive Verteilung der unterschiedlichen Cathepsin D-Isoformen wurde in *Abb.18* dargestellt.

In Wildtyp-Zellen ($CD^{+/+}$) liegt konstitutiv überwiegend die 52kD Isoform von Cathepsin D vor, während die 48kD und 32kD Isoformen kaum nachweisbar waren.

Die in $CD^{+/+}$ -Zellen dargestellten Isoformen von Cathepsin D fanden sich nicht in $CD^{-/-}$ -Zellen wieder. Nach einer Behandlung mit TNF kann Cathepsin D somit in diesen Zellen keine Funktion übernehmen.

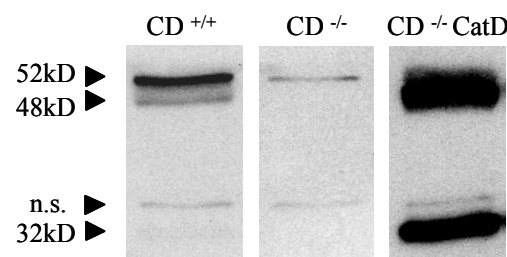


Abb.18: Immunoblot Analyse konstitutiver Cathepsin D Isoformen

Western Blot der Cathepsin D Isoformen (52kD, 48kD und 32kD) aus kernfreien Proteinlysaten unbehandelter Zellkulturen von $CD^{+/+}$, $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}$ CatD Fibroblasten. n.s. steht für nicht signifikante Bande.

In $CD^{-/-}$ CatD-Zellen waren alle Isoformen des Cathepsin D im Western Blot sichtbar. Die Retransfektion mit Cathepsin D cDNA führte somit in $CD^{-/-}$ Zellen zur Rekonstituierung der Protease. Die 52kD Präpro-Isoform, die 48kD Pro-Form und die 32kD aktive Isoform sind im Western Blot konstitutiv exprimiert (*Abb.18*).

In den folgenden Experimenten wurden die Zellen mit 100ng/ml TNF behandelt. Da die hier untersuchten $CD^{+/+}$ -Fibroblasten auf TNF alleine nicht reagierten, wurde eine Stunde zuvor den Zellen mit Cycloheximid (CHX) ein Proteinbiosynthese Inhibitor zugegeben. CHX wird eingesetzt, um den Proteinnachschub der Zelle zu unterbinden. Somit können pro- und antia-

apoptotische Proteine nicht nachgeliefert werden und die Zelle kann auf einen Rezeptorstimulus nur mit dem schon konstitutiv vorliegenden Proteinbesatz reagieren. Da CHX alleine in zu hoher Konzentration toxisch auf Zellen wirkt, wurde CHX in einer subletalen Konzentration (3,6 μ M) eingesetzt, so dass in den Zellkulturen innerhalb von 36 Stunden durch Blockade der Proteinbiosynthese kein Zelltod auftrat.

3.2.2 Abhängigkeit des TNF/CHX vermittelten Zelltodes von Cathepsin D Expression

Die Kulturen von CD^{-/-} und CD^{-/-}CatD-Zellen wurden mit 100ng/ml TNF und 3,6 μ M Cycloheximid (CHX) behandelt. Nach 4 Stunden (*Abb.19a*) Behandlungszeit wurden die Zellkulturen im FACS auf Zelltod untersucht. Wie unter 3.1.2 beschrieben, wurden im Dot-Plot die mit Annexin-V und PI gefärbten Zellen dargestellt. Eine Behandlung der CD^{-/-}-Fibroblasten mit TNF/CHX für 4 Stunden führte, verglichen mit CD^{-/-}CatD-Fibroblasten, zu keinem vermehrten Zelltod (*Abb.19a*). In *Abb.19b* sind CD^{-/-} und CD^{-/-}CatD-Fibroblasten nach 12 Stunden Behandlung mit TNF im Vergleich mit der CHX behandelten Kontrolle dargestellt. Die CD^{-/-}CatD-Zellen verstarben im Verlauf von 12 Stunden zu 45%. Die knockout Zelllinie zeigte dagegen zwar durch TNF induzierbaren Zelltod, jedoch verstarben nur 13% der Zellen. Die apoptotische Population war in beiden Zelllinien mit 18 bis 21% vergleichbar. Die Kontrollzellen blieben über den gesamten Versuchsverlauf zu über 95% vital.

Eine Retransfektion mit Cathepsin D sensibilisierte die knockout Zelllinie folglich für durch TNF induzierbaren Zelltod.

Um zu untersuchen, ob Cathepsin D eine funktionelle Bedeutung für der Aktivierung von Caspasen im TNF vermittelten Signalweg hat, wurden die Zellen in Folgeexperimenten stimulationsabhängig auf Caspase 3- und 9-Aktivität untersucht.

Abb. 19a 4 Stunden TNF/CHX

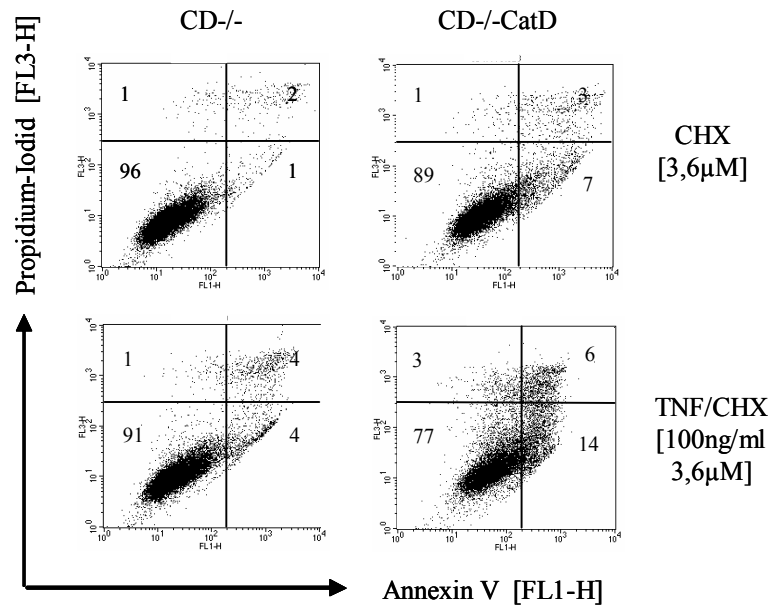


Abb. 19b 12 Stunden TNF/CHX

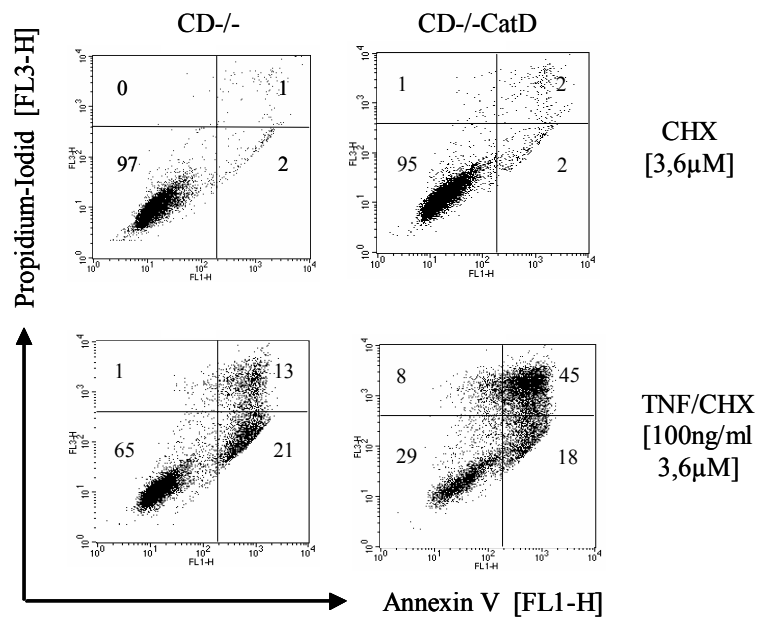


Abb.19a und 19b: FACS-Analyse von $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}CatD$ Zellen nach 4 und 12 Stunden TNF/CHX
 Die Zellkulturen wurden für 4 Stunden mit 100ng/ml TNF und 3,6µM CHX behandelt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Zellkulturen für 4 bzw. 12 Stunden in Medium mit 3,6µM CHX kultiviert. Im FACS wurden die Annexin-V-Fluos (Roche) und mit 1ng/ml PI angefärbten Zellen analysiert. Annexin-V (FL1-H) und PI (FL3-H) wurden im Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Die Verteilung der gefärbten Zellen wurde prozentual in den entsprechenden Quadranten dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.3 Abhängigkeit der Caspase 3- und 9-Aktivierung von Cathepsin D Expression

Es wurde untersucht, ob die Aktivität von Caspase 3 und 9 nach Behandlung mit TNF/CHX von einer Expression von Cathepsin D abhängig sind. Hierzu wurden die oben beschriebenen Wildtyp ($CD^{+/+}$), Cathepsin D defizienten ($CD^{-/-}$) und stabil mit Cathepsin D transfizierten ($CD^{-/-}$ CatD) Fibroblasten eingesetzt.

Die $CD^{-/-}$ Fibroblasten wiesen eine verringerte Caspase 3-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp Zellen nach 4 Stunden TNF/CHX Behandlung auf (*Abb.20*). Nach Retransfektion mit Cathepsin D in $CD^{-/-}$ CatD erreichte die Caspase 3-Aktivität wieder das Niveau der $CD^{+/+}$ -Zellen.

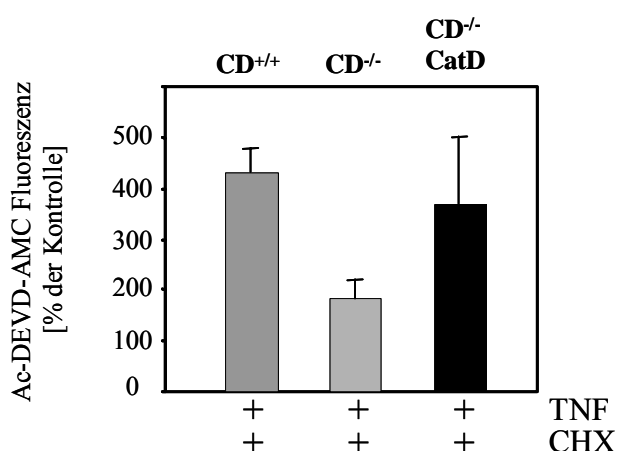


Abb.20: Caspase 3-Aktivität nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/CHX

Die Zellkulturen wurden 4 Stunden mit 100ng/ml TNF und 3,6 μ M CHX behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellkulturen mit 3,6 μ M CHX in Medium kultiviert. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Nach 100 Minuten wurde der Substratumsatz durch Caspase 3 im ELISA-Reader gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Behandlung mit TNF wurde prozentual auf den jeweiligen Kontrollansatz bezogen. Mittelwert (+/- Stabw.) aus vier unabhängigen Experimenten.

Da Caspase 3 als klassische Effektor-Caspase innerhalb des TNF-vermittelten Zelltodes durch Caspase 9 aktiviert werden kann, wurde daraufhin die Caspase 9-Aktivität untersucht.

Nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/CHX zeigten die $CD^{-/-}$ -Fibroblasten eine verringerte Caspase 9-Aktivität (*Abb.21*) im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Dieser Effekt konnte durch die Retransfektion mit Cathepsin D ($CD^{-/-}$ CatD) wieder auf das Wildtyp-Niveau gesteigert werden (*Abb.21*).

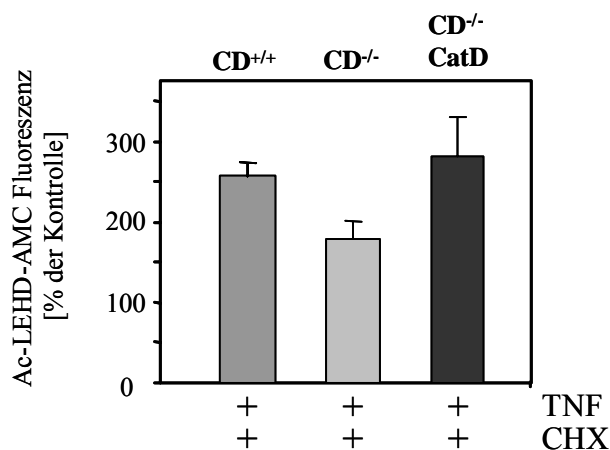


Abb.21: Caspase 9-Aktivität nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/CHX

Die Zellkulturen wurden 4 Stunden mit 100ng/ml TNF und 3,6 μ M CHX behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellkulturen mit 3,6 μ M CHX in Medium kultiviert. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Nach 100 Minuten wurde der Substratumsatz durch Caspase 9 im ELISA-Reader gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Behandlung mit TNF wurde prozentual auf den jeweiligen Kontrollansatz bezogen. Mittelwert (+/- Stabw.) aus vier unabhängigen Experimenten.

Zusammengefasst weisen die Versuche auf eine Beteiligung von Cathepsin D in der Aktivierung von Caspase 3 und 9 im TNF/CHX vermittelten Zelltod hin.

Während des programmierten Zelltodes können Todesrezeptoren, wie z.B. TNF-R1, Interleukin-1-Rezeptor oder Fas-Rezeptor, nach Bindung ihres entsprechenden Liganden pH abhängige Sphingomyelinasen aktivieren. Die Protease Cathepsin D und die saure Sphingomyelinase (A-SMase) kommen zusammen im gleichen intrazellulären Kompartiment der Lysosomen vor. Aktive A-SMase kann Ceramid durch Hydrolyse von Sphingomyelin in Phosphorylcholin und Ceramid produzieren. Dieses Ceramid wäre dann für Cathepsin D zugänglich. Wie oben beschrieben kann Ceramid an Cathepsin D binden und zur Aktivierung der Protease führen (Heinrich et al., 1999). Deshalb wurde im Folgenden die Abhängigkeit der Cathepsin D vermittelten Caspase 3- und 9-Aktivierung von der A-SMase nach Behandlung mit TNF/CHX untersucht.

3.2.4 Abhängigkeit der Caspase 3- und 9-Aktivierung von A-SMase Aktivität

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung der A-SMase eine Funktion in der Aktivierung von Caspase 3 und 9 auch nach einer Behandlung mit TNF hat, wurden A-SMase defiziente MS1418 und mit A-SMase stabil retransfizierte MS1418/ASM Lymphoblasten eingesetzt. Wie in *Abb.22* zu sehen ist, zeigten A-SMase defiziente MS1418 Zellen eine verringerte Aktivierung der Caspase 3 nach 4 Stunden TNF/CHX, im Vergleich zu rekonstituierten MS1418/ASM Zellen. Ebenso verhält es sich für die Caspase 9-Aktivität: In *Abb.23* zeigte die

defiziente MS1418 Zelllinie eine verringerte Aktivität der Caspase 9, im Vergleich zur re-konstituierten MS1418/ASM Zelllinie.

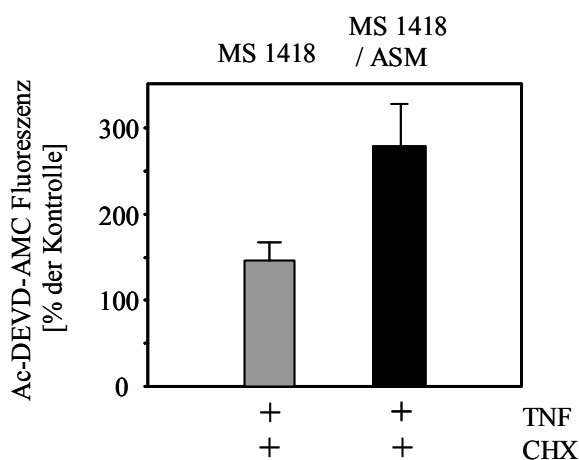


Abb.22: Caspase 3-Aktivität nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/CHX

Die Zellkulturen wurden 4 Stunden mit 100ng/ml TNF und 3,6 μ M CHX behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellkulturen mit 3,6 μ M CHX in Medium kultiviert. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Nach 100 Minuten wurde der Substratumsatz durch Caspase 3 im ELISA-Reader gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Behandlung mit TNF wurde prozentual auf den jeweiligen Kontrollansatz bezogen. Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier unabhängigen Experimenten.

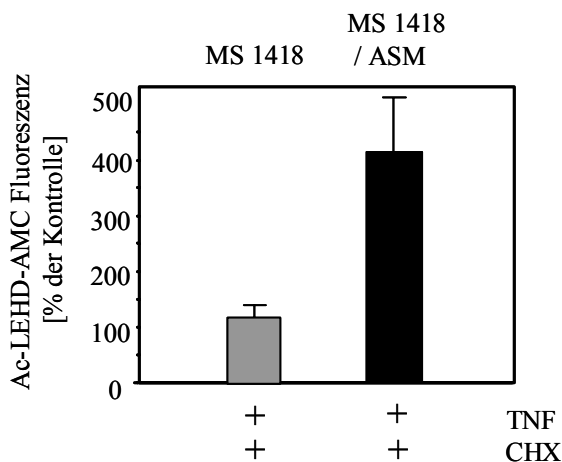


Abb.23: Caspase 9-Aktivität nach 4 Stunden Behandlung mit TNF/CHX

Die Zellkulturen wurden 4 Stunden mit 100ng/ml TNF und 3,6 μ M CHX behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellkulturen mit 3,6 μ M CHX in Medium kultiviert. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Nach 100 Minuten wurde der Substratumsatz durch Caspase 9 im ELISA-Reader gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Behandlung mit TNF wurde prozentual auf den jeweiligen Kontrollansatz bezogen. Mittelwert (+/- Standardabweichung) aus vier unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das von der A-SMase produzierte Ceramid zumindest partiell eine Rolle bei der Aktivierung von Caspase 3 und 9 spielt. Zusammen mit den Beobachtungen

in $CD^{-/-}$ -Zellen (*Abb.20 und 21*) kann geschlossen werden, dass die A-SMase über die Produktion von Ceramid eine Aktivierung von Cathepsin D nach Zugabe von TNF/CHX vermitteln kann. Cathepsin D ist dann wiederum an der Aktivierung von Caspase 3 und 9 beteiligt. Es sollte weiter untersucht werden, ob der von Cathepsin D abhängige Zelltod, wie nach Behandlung mit TNF/CHX gezeigt, auch unter alleiniger TNF-Behandlung zum apoptotischen Zelltod der Zelllinien führt. Dies sollte eventuelle Effekte, die durch den Proteinbiosynthese Inhibitor CHX ausgelöst werden können, ausschließen.

3.2.5 Abhängigkeit des DNA-Laddering nach Behandlung mit TNF von Cathepsin D Expression

Die Zelllinien von $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}CatD$ wurden auf DNA-Laddering nach TNF-Behandlung untersucht. Als Positivkontrolle wurde in den Zelllinien durch UV-Bestrahlung Apoptose ausgelöst. Nach Bestrahlung mit UV wurden die Zelllinien nach 1 und 16 Stunden auf DNA-Laddering untersucht (*Abb.24*). Innerhalb von 16 Stunden konnte in den Zelllinien von $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}CatD$ ein vergleichbares DNA-Laddering ausgelöst werden.

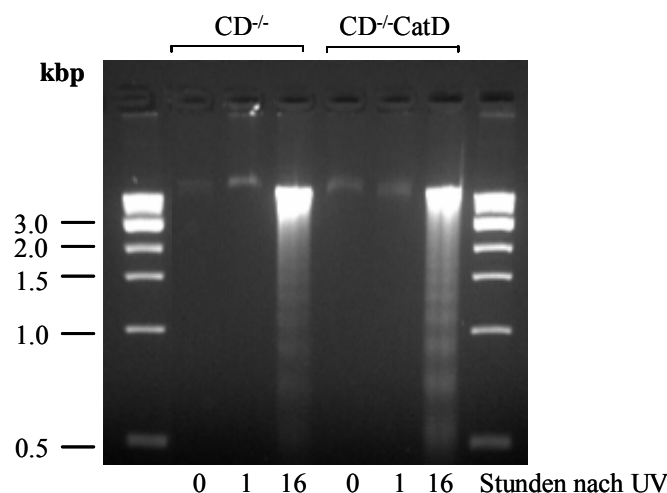


Abb.24: DNA-Laddering Analyse 1 und 16 Stunden nach UV-Behandlung

Die Zellkulturen wurden 1 und 16 Stunden kultiviert, nachdem sie mit $500 \times 100 \mu W/cm^3$ UV bestrahlt wurden. $1 \mu g$ DNA der Zellkulturen wurde in 2%igem Agarosegel analysiert. Als Standard wurde eine 500 bp DNA-Ladder (NewEnglandBiolabs) eingesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die für 24 und 48 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelten Zelllinien von $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}$ CatD zeigten einen deutlichen Unterschied im DNA-Laddering (Abb.25). Während sich bei den $CD^{-/-}$ -Fibroblasten keine DNA-Ladder ausbildete, konnte bei den mit Cathepsin D retransfizierten $CD^{-/-}$ CatD-Fibroblasten nach 24 und 48 Stunden TNF-Behandlung ein DNA-Laddering dargestellt werden (Abb.25).

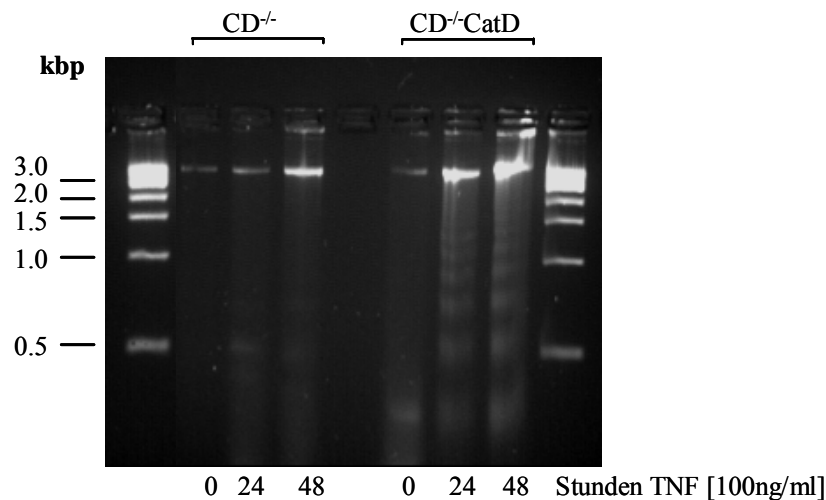


Abb.25: DNA-Laddering Analyse nach 24 und 48 Stunden TNF

Die Zellkulturen wurden 24 und 48 Stunden mit 100ng/ml TNF oder unbehandelt kultiviert. 1 μ g DNA der Zellkulturen wurde in 2%igem Agarosegel analysiert. Als Standard wurde eine 500 bp DNA-Ladder (NewEnglandBiolabs) eingesetzt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammen mit den vorangegangenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass in $CD^{-/-}$ CatD-Fibroblasten sowohl nach 4 Stunden TNF/CHX, als auch nach 24 Stunden alleiniger TNF-Behandlung ein gesteigerter Zelltod im Gegensatz zu $CD^{-/-}$ -Fibroblasten ausgelöst werden konnte.

In Folgeexperimenten sollte anhand von Caspase 3-Aktivität im Enzymassay und PARP-1 Spaltung im Western Blot geklärt werden, ob in nur mit TNF behandelten Zellen vergleichbare Ergebnisse zu den vorliegenden TNF/CHX-Befunden darstellbar sind.

3.2.6 Caspase 3-Aktivität nach 8 bis 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkulturen von $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}$ CatD Fibroblasten wurden für 8 bis 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt (Abb.26). Schon nach 8 Stunden Behandlung mit TNF zeigten die mit Cathepsin D retransfizierten Fibroblasten ($CD^{-/-}$ CatD) eine höhere Caspase 3-Aktivität als die knockout Zelllinie ($CD^{-/-}$). Dieser Effekt verstärkte sich innerhalb von 24 Stunden.

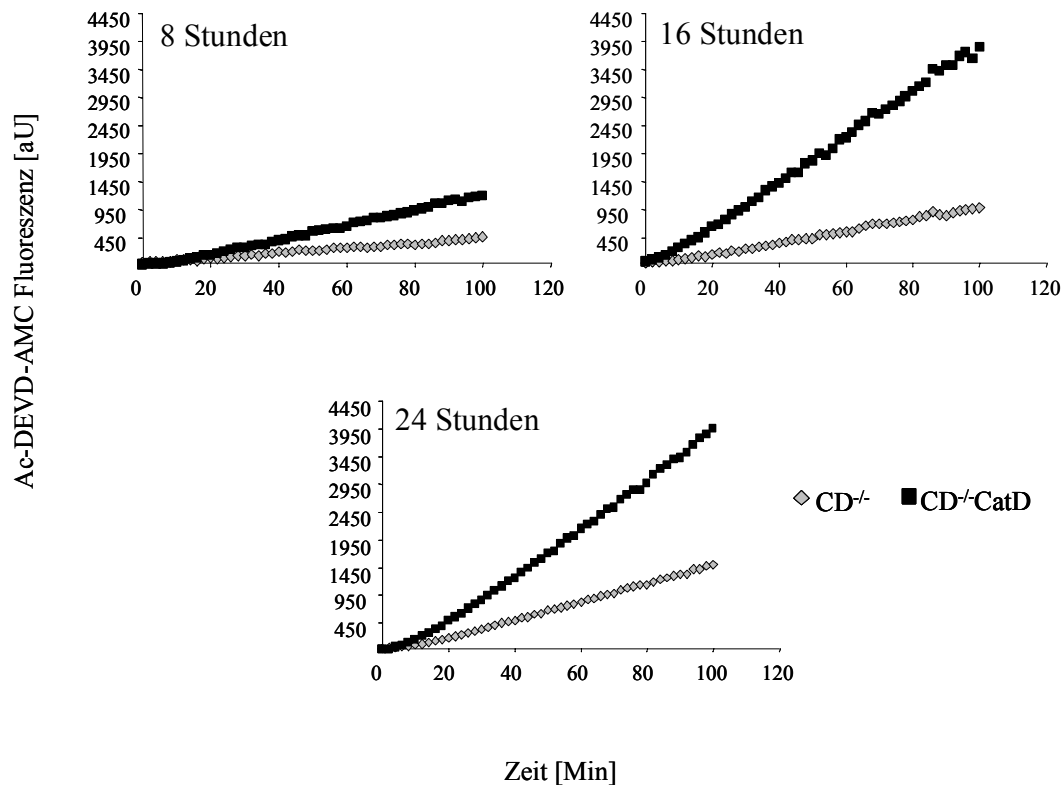


Abb.26: Caspase 3-Aktivität nach 8 bis 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die Zellkulturen wurden 8, 16 und 24 Stunden mit 100ng/ml TNF behandelt. 50µg kernfreies Proteinlysate wurden im Enzymassay eingesetzt. Für 100 Minuten wurde alle 2 Minuten der Substratumsatz durch Caspase 3 im ELISA-Reader gemessen. Die relative Fluoreszenz [aU] des gespaltenen Substrates (Ac-DEVD-AMC) wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz dargestellt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression von Cathepsin D hatte somit einen verstärkenden Effekt auf die Caspase 3-Aktivierung, sowohl nach 4 Stunden TNF/CHX (vgl. Abb.20), als auch nach 24 Stunden alleiniger TNF-Behandlung (Abb.26).

3.2.7 PARP-1 Spaltung nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Die verminderte Caspase 3-Aktivität in CD^{-/-} Fibroblasten zeigte sich auch im Western Blot durch eine verminderte inaktivierende Spaltung der 116kD PARP-1-Isoform in die 89kD Isoform. Die CD^{-/-}CatD Fibroblasten hingegen zeigten eine stärkere inaktivierende Spaltung von PARP-1 (Abb.27).

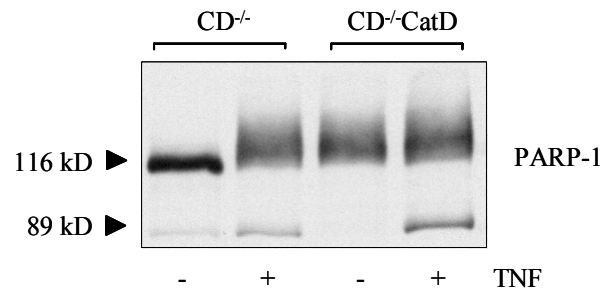


Abb.27: Immunoblot-Darstellung von PARP-1 nach 24 Stunden Behandlung mit TNF

Western Blot der PARP-1-Isoformen (116kD und 89kD) aus kernfreien Proteinlysaten nach Behandlung der Zellkulturen mit 100ng/ml TNF über 20 Stunden. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Cathepsin D nach einer Behandlung der Zellen mit TNF durchaus einen proapoptischen Einfluss auf nachgeschaltete Signalwege hat. In Gegenwart von Cathepsin D kam es zum verstärkten DNA-Laddering, einer erhöhten Caspase 3-Aktivität und einer vermehrten Spaltung von PARP-1 in TNF-behandelten Kulturen.

3.2.8 Abhängigkeit der Bid-Spaltung nach Behandlung mit TNF von Cathepsin D

Expression

Es ist bekannt, dass es nach Stimulation des Fas-Rezeptors durch Aktivierung der Caspase 8 zur Spaltung des proapoptischen Bcl-2 Proteins Bid kommen kann (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Durch Bid-Spaltung entsteht eine 17kD Isoform von Bid, auch tBid oder „truncated Bid“ genannt. Dieses tBid vermittelt dann die Freisetzung von Cytochrom C aus der mitochondrialen Membran, was in der Bildung des Apoptosoms und gesteigerter Caspase 9-Aktivität resultiert (Zou et al., 2003). In Folgeexperimenten sollte deshalb geklärt werden, ob Bid-Spaltung auch in den TNF-R1 vermittelten, Caspase 8 abhängigen Signalweg über A-SMase- und Cathepsin D-Aktivierung involviert ist.

Nach 2 Stunden Behandlung mit 100ng/ml TNF wurden $CD^{+/+}$, $CD^{-/-}$ und $CD^{-/-}CatD$ Fibroblasten auf die Spaltung von Bid im Western Blot untersucht. Die mit TNF behandelten Wildtyp $CD^{+/+}$ Fibroblasten zeigten eine Abnahme der 23kD Isoform von Bid, resultierend in einer Zunahme der gespaltenen 17kD tBid Isoform (Abb.28). Die dargestellten Isoformen im Western Blot wurden in Abb.30 gegen β -Aktin normalisiert und quantifiziert. Eine durch TNF induzierbare Bid-Spaltung konnte in den $CD^{-/-}$ -Fibroblasten nicht nachgewiesen werden (Abb.28). Die $CD^{-/-}$ -Fibroblasten zeigten eine von TNF unabhängige konstitutive Spaltung. Eine Retransfektion der knockout Zellen mit Cathepsin D cDNA führte zur Wiederherstellung

der TNF vermittelten Bid-Spaltung (Abb.28). In Abb.29 ist die quantitative Auswertung der Western Blot Analyse dargestellt.

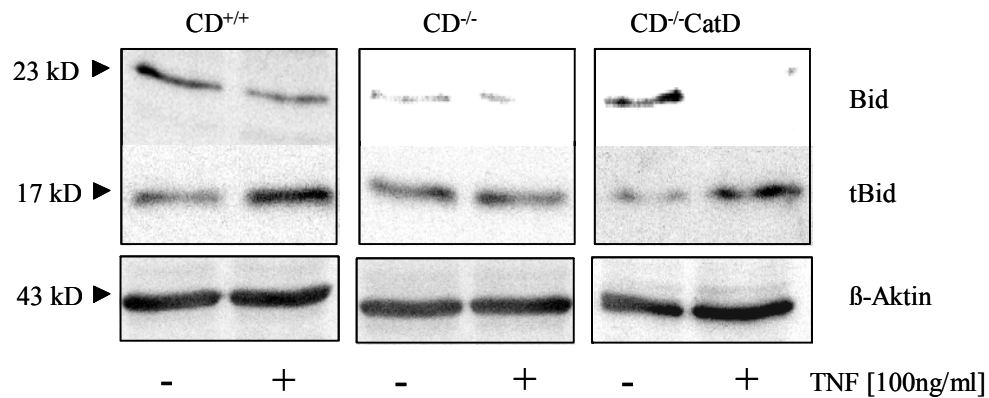


Abb.28: Immunoblot-Darstellung von Bid und tBid nach 2 Stunden Behandlung mit TNF

Western Blot der 23kD Bid und 17kD tBid Isoformen aus kernfreien Proteinlysaten nach Behandlung der Zellkulturen mit 100ng/ml TNF über 2 Stunden. Eine Normalisierung der Proben fand über β-Aktin (43kD) statt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

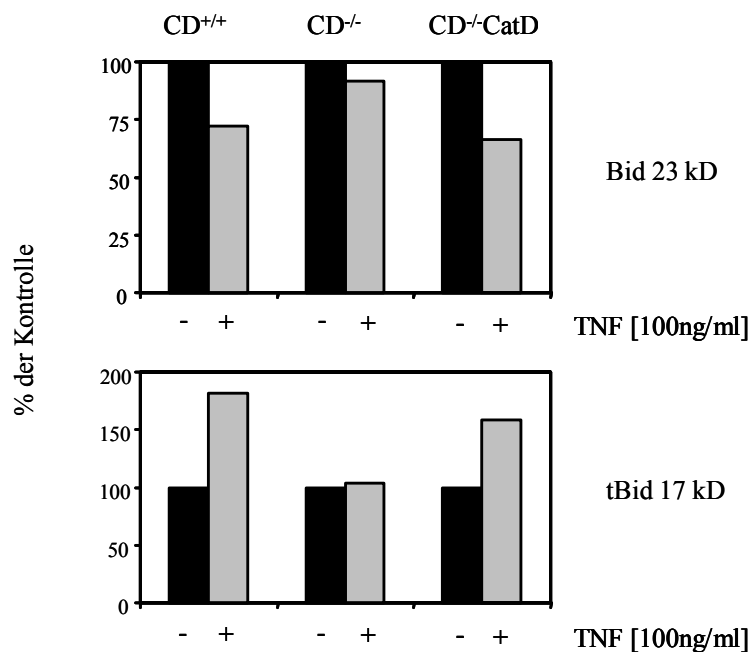


Abb.29: Quantitative Auswertung der Bid- und tBid-Isoform nach 2 Stunden TNF Behandlung

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der beiden Isoformen von Bid. Die Intensität der Banden wurde über das Programm Image-Quant (Molecular Dynamics) errechnet und mit Hilfe der β-Aktin Kontrolle normalisiert. Die Menge der Bid-Isoformen nach Behandlung mit TNF wurde als Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere von den unterschiedlichen zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 abhängige Wege zur Induktion der Apoptose nach Zugabe des Zytokins TNF- α charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen und gut charakterisierten Todesrezeptoren Fas (Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997) und TRAIL-R1/R2 (Sprick et al., 2000), verbleibt der TNF-R1 nach Bindung seines Liganden nicht an der Zelloberfläche, sondern wird internalisiert (Schütze et al., 1999; Schneider-Brachert et al., 2004). Nach den hier vorliegenden Ergebnissen ist dieser Schritt der Internalisierung essentiell für die Etablierung intrinsischer Signalwege, die die Apoptose einleiten. Eine Blockade der Internalisierung durch Deletion des TNF-R1 Internalisierungsmotivs (TRID) konnte eine Aktivierung der intrinsischen, mitochondrialen Mechanismen partiell verhindern, und so den Zelltod verzögern. Neben den bekannten Mechanismen zur Induktion von Apoptose durch Todesrezeptoren, wie die Caspase 8-Aktivierung über die Todesdomäne (DD) des TNF-R1, konnte in der vorliegenden Arbeit ein TNF-R1 vermittelter Apoptoseweg über das saure Kompartiment der Lysosomen näher beschrieben werden. Die Aktivierung apoptotischer Proteasen und mitochondrialer Faktoren wird dort über das Ceramid der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) und die Aspartat-Protease Cathepsin D vermittelt. Darüber hinaus konnte auch eine Rolle für die neutrale Sphingomyelinase-Domäne (NSD) des TNF-R1 und das Ceramid der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase) bei der Aktivierung von Todessignalen nach TNF-Behandlung dargestellt werden.

Für den TNF-R1 konnten in dieser Arbeit somit mehrere Signalwege die zur Induktion der Apoptose führen, aufgezeigt werden.

Abhängigkeit des Zelltodes von den zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1

Die Rekrutierung eines DISC aus den Adapterproteinen TRADD, FADD und Caspase 8 ist der erste Schritt für eine durch Todesrezeptoren vermittelte Apoptose. Bis vor kurzem konnte die direkte Rekrutierung des DISC nur für die Todesrezeptoren Fas (Kischkel et al., 1995) und DR4/5 (Sprick et al., 2000) dargestellt werden. Für den TNF-R1 wurde dies aufgrund der Homologie seiner Todesdomäne (DD) nur vermutet (Wajant et al., 2003). Micheau und Tschopp konnten 2003 erstmals die Formierung eines DISC im Zytosol, jedoch ohne Assoziation an den TNF-R1, durch Immunpräzipitation darstellen (Micheau et al., 2003). Aufgrund ihrer Untersuchungen postulierte die Arbeitsgruppe eine Trennung in der Signalgebung des TNF-R1 in einen membranständigen Komplex aus den Adapterproteinen TRADD, RIP-1 und Traf-2 zur NF- κ B-Aktivierung und einen zytosolischen proapoptotischen DISC aus den A-

adapterproteinen TRADD, FADD und Caspase 8. Nachgeschaltete Signalwege zur Induktion von Apoptose wurden bei diesen Analysen nicht untersucht. Ein vollständiger an die DD des TNF-R1 gebundener DISC, konnte erstmals an den hier untersuchten Wildtyp-TNF-R1 tragenden Fibroblasten nachgewiesen werden (Schneider-Brachert et al., 2004). Die funktionelle Bedeutung dieser DISC-Rekrutierung in der Apoptose konnte in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Untersucht man TNF-R1-Wildtyp-Zellen in Bezug auf ihre morphologischen Veränderungen nach Zugabe von TNF/ActD (*Abb.2a*), so sieht man in der Zellkultur bereits nach 4 Stunden sich abrundende und versterbende Zellen. Unter alleiniger TNF-Behandlung für 24 Stunden wird dieser Effekt noch deutlicher (*Abb.7a*). Eine Deletion der Todesdomäne (Δ DD) im TNF-R1 führt hingegen zur völligen Blockade des Zelltodes (*Abb.2b; Abb.7b*). Untersucht man die Zusammensetzung des DISC an isolierten TNF-R1-Präparationen aus diesen Zellen, so stellt man fest, dass die benötigten Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase 8 nicht rekrutiert werden (Schneider-Brachert et al., 2004).

Die DD ist folglich essentiell für die Weiterleitung eines proapoptotischen Signals durch den TNF-R1.

Im Vergleich zu anderen Todesrezeptoren verbleibt der TNF-R1 nach Bindung seines Liganden nicht an der Zelloberfläche, sondern wird internalisiert (Schütze et al., 1999). Verhindert man die Internalisierung des TNF-R1 durch die Deletion seines Internalisierungsmotivs (Δ TRID), so kommt es auch hier zum Verlust der Fähigkeit einen DISC zu rekrutieren und der Rezeptor bleibt an der Zelloberfläche (Schneider-Brachert et al., 2004). Betrachtet man für 4 Stunden mit TNF/ActD und für 24 Stunden mit TNF behandelte Zellkulturen der TNF-R1- Δ TRID-Zellen, so findet man dennoch versterbende Zellen (*Abb.2a; Abb.7a*).

Es muss in diesen Zellen folglich ein DISC-unabhängiger Zelltod ausgelöst worden sein. In entsprechenden FACS-Analysen konnten TNF-R1- Δ TRID-Zellen zwar Annexin-V/PI angefärbt werden, zeigten aber im Gegensatz zu TNF-R1-Wildtyp-Zellen keine klare apoptotische Population nach einer Behandlung mit TNF (*Abb.8a*). Da durch die Deletion der TRID-Domäne eine Internalisierung verhindert wird (Schneider-Brachert et al., 2004), muss es ein membrangebundenes Signal geben, welches durch den TNF-R1 vermittelt Zelltod induzieren kann. Es ist bekannt, dass die neutrale Sphingomyelinase-Domäne (NSD) des TNF-R1 über das Adapterprotein FAN („factor activating neutral sphingomyelinase“) die neutrale Sphingomyelinase (N-SMase) aktivieren kann (Wiegmann et al., 1994b; Adam et al., 1996; Adam-Klages et al., 1996). Diese Aktivierung der N-SMase führt zur Produktion von Ceramid, einem bekannten proapoptotischen Lipid-Mediator, welcher eine nachfolgende Caspase 3-Aktivierung vermittelt. Eine TNF-abhängige Aktivierung von Caspasen in Abhängigkeit einer

N-SMase-Aktivität konnte in Inhibitionsversuchen an MCF-7-Zellen bereits dargestellt werden (Luberto et al., 2002). Dies wäre eine mögliche Erklärung für den induzierbaren Zelltod der TNF-R1- Δ TRID-Zellen, da nach Behandlung mit TNF- α eine erhöhte Caspase 3-Aktivität messbar ist (*Abb.9*). Blockiert man nun die N-SMase, indem man sowohl die TRID, als auch die NSD-Domäne im TNF-R1 deletiert, so kann in den Zellkulturen durch eine Behandlung mit TNF kein Zelltod mehr ausgelöst werden (*Abb.2b; Abb. 7b*). Obwohl der Rezeptor an der Zelloberfläche gehalten wird, kann er in diesem Fall durch die Deletion seiner NSD keine N-SMase-Aktivität induzieren (*Abb.17*). Da eine alleinige Deletion der NSD eine DISC-Rekrutierung nicht verhindern sollte, ist es nicht überraschend, dass auch in TNF-R1- Δ NSD-Zellkulturen Zelltod durch TNF-Behandlung ausgelöst werden kann (*Abb. 2a; Abb.7a*).

Es ergibt sich somit eine distinkte Funktion der einzelnen Rezeptor-Domänen in der Einleitung von Zelltod nach TNF. Die Rekrutierung eines DISC spielt dabei wie in der Induktion von Zelltod über FasLigand und TRAIL (Danial et al., 2004) eine essentielle Rolle. Jedoch kann im Signalweg des TNF-R1 sowohl durch Internalisierung (Wildtyp- und Δ NSD-Zellen), als auch durch ein Verbleiben an der Zelloberfläche (Δ TRID-Zellen) Zelltod induziert werden.

Folglich können durch den TNF-R1 zwei getrennte Signalwege zur Induktion von Zelltod genutzt werden: Einerseits die Rekrutierung des DISC (TNF-R1 Wildtyp-Zellen) und andererseits die Aktivierung der N-SMase mit resultierender Caspase 3-Aktivität (*vgl. Schema 4*).

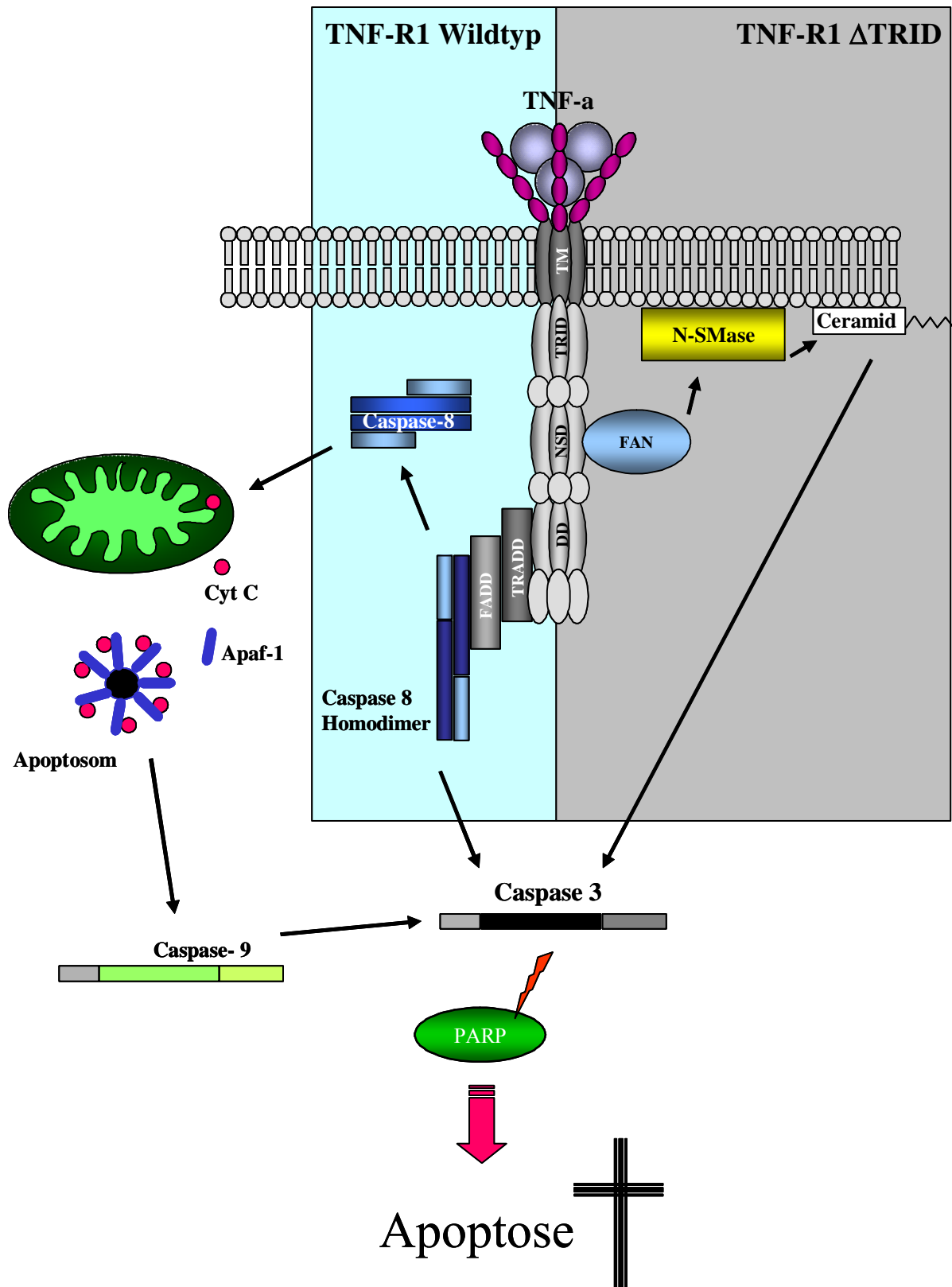
Rezeptor-Domänen abhängige Aktivierung der Caspase-Kaskade

Untersucht man die Zelllinien auf die Aktivierung zytosolischer Caspasen so stellt man fest, dass nach TNF-Behandlung Caspase 3 (*Abb.4; Abb.9*) und Caspase 9 (*Abb.13*) in den Wildtyp- und TNF-R1- Δ NSD-Fibroblasten aktiviert werden. Die Rekrutierung des DISC am TNF-R1 ist die Voraussetzung für die in der Literatur auch für FasL und TRAIL (Aggarwal et al., 2003; Danial et al., 2004) beschriebene zytosolische Aktivierung der Caspasen. Der TNF-R1 ist somit in der Lage über die Formierung seines DISC und die Rekrutierung der Caspase 8, eine Caspase 9 und 3 Aktivität zu induzieren. In TNF-R1-Wildtyp-Zellen kann diese Caspase 8-Rekrutierung durch Western Blot Analysen an immuno-magnetisch isolierten Rezeptosomen dargestellt werden (*Abb.16*). Im Gegensatz zum von Micheau und Tschopp (2003) postulierten Modell, indem der TNF-R1 nicht mit Caspase 8 kolokalisiert werden konnte, tauchen in den vorliegenden Versuchen innerhalb von 10 Minuten nach TNF-Behandlung am TNF-R1 gebundene Isoformen der Caspase 8 auf. Die autokatalytische Prozessierung und Aktivierung zeigt sich dabei im Auftauchen der enzymatisch aktiven 12 und 18 kD-Isoformen (*Abb.16*).

Diese können daraufhin ein zytosolisches aktives Heterodimer bilden (Chang et al., 2003). Eine Aktivierung der Caspase 8 tritt in den vorliegenden Befunden innerhalb von 2 Stunden TNF-Behandlung auf (*Abb.15*). Caspase 8 ist dann in der Lage, über den intrinsischen mitochondrialen Weg durch Aktivierung von Caspase 9 (*Abb.13*), oder durch direkte Aktivierung der Caspase 3 (*Abb.9*) unumkehrbar Apoptose zu induzieren. Dieses Aktivierungsschema ist für FasL und TRAIL und deren Rezeptoren in der Literatur vergleichbar beschrieben (Aggarwal et al., 2003; Danial et al., 2004). Neben Caspase 8 konnten auch die Adapterproteine TRADD und FADD an internalisierten TNF-R1 Rezeptosomen nachgewiesen werden (Schneider-Brachert et al., 2004). Micheau und Tschopp (2003) konnten diesen Aktivierungsmechanismus in Abhängigkeit eines TNF-R1-gebundenen DISC nicht darstellen. Der Grund dafür könnte in unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren liegen (Immunpräzipitation vs. Rezeptosomen-Isolierung). Die Rezeptosomen werden durch eine Detergenz freie Homogenisation isoliert.

Wie oben beschrieben ist die Rekrutierung des DISC nicht die einzige Möglichkeit über den TNF-R1 eine Aktivierung von Caspasen zu erreichen. Untersucht man TNF-R1- Δ TRID-Zellen so zeigt sich, dass es stimulationsabhängig zu einer Aktivierung der Caspase 3 (*Abb.9*), aber nicht der Caspase 9 (*Abb.13*) kommt. Da es auch keine DISC-Formierung in diesen Zellen gibt (Schneider-Brachert et al., 2004), fällt die TNF-R1 vermittelte Aktivierung der Caspase 8 aus. Folglich kann auch nicht der mitochondriale Weg zur Aktivierung der Caspase 9 eingeleitet werden. Untersucht man diese Zellen auf N-SMase Aktivität (*Abb.18*) so stellt man fest, dass diese in TNF-R1- Δ TRID-Zellen im Vergleich zu den übrigen Zelllinien deutlich erhöht ist. Wie schon zuvor diskutiert könnte das von der aktiven N-SMase produzierte Ceramid eine Aktivierung der Caspase 3 induzieren. Versuche an TNF-R1-Wildtyp- und Δ TRID-Zellen mit Zugabe von exogenem C₆-Ceramid unterstützen dies (*Abb.17*). Ein Modell der beschriebenen Aktivierungsmechanismen ist in *Schema 4* dargestellt.

Caspase 3 Aktivierung kann somit einerseits nach Rekrutierung des DISC und Internalisierung des Rezeptor-Komplexes oder andererseits durch Aktivierung membranständiger N-SMase durch den TNF-R1 vermittelt werden.



Schema 4: Aktivierungsmechanismen des TNF-R1 in Abhängigkeit seiner zytoplasmatischen Domänen DD und NSD: Der TNF-R1 kann durch seine im DISC assoziierte Caspase 8 (Wildtyp) oder über membranständige N-SMase (Δ TRID) Apoptose induzieren. Diese unterschiedlichen Wege konvergieren in der Aktivierung von Caspase 3.

Relevanz der PARP-1 Spaltung durch Caspase 3

In zahlreichen Arbeiten konnte PARP-1 (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1) als Substrat der Caspase 3 identifiziert werden (Tewari et al., 1995; Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994). Die Funktion dieser Spaltung ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass die Spaltung von PARP-1 in der Apoptose zur Aufrechterhaltung der ATP-Level benötigt wird (Los et al., 2002; Danial et al., 2004). Da Apoptose ein energieaufwändiger Prozess unter hohem ATP-Verbrauch ist, könnte die Spaltung von PARP-1 durch Caspase 3 eine Art Schalter in der Apoptose darstellen. In der Regel kommt es durch einen DNA-Schaden zur Bindung von PARP-1 an die geschädigte Stelle. Nachdem die DNA so markiert wurde wird PARP-1 durch Poly-ADP-Ribosylierung inaktiviert und von der DNA gelöst. Dieser Schritt verbraucht eine große Menge an NAD^+ . Da die Zelle zur Gewinnung von NAD^+ ATP verbraucht, kann es bei größeren DNA-Schäden zu einer ATP-Depletion und nachfolgenden Nekrose der Zelle kommen. Dies konnte für den Fas-Rezeptor (CD95) gezeigt werden (Los et al., 2002). Da während der Apoptose die Kern-DNA fragmentiert und PARP-1 somit aktiviert wird, ist der Mechanismus der PARP-1 Spaltung durch Caspase 3 essentiell, um den ATP-Level für apoptotische Prozesse aufrecht zu erhalten. Die Zelle braucht unter anderem ATP zur Aktivierung der Caspase 9 im Apoptosom. In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die PARP-1-Spaltung ebenfalls in Abhängigkeit von den Domänen des TNF-R1 über die Aktivierung der Caspase 3 vermittelt wird. In den Zelllinien von TNF-R1-Wildtyp, $-\Delta\text{NSD}$ und $-\Delta\text{TRID}$ kommt es nach Behandlung mit TNF zu einer Aktivierung der Caspase 3 (*Abb.10*), die ihrerseits in der Lage ist PARP-1 von der 116kD in die 89kD Isoform zu spalten und somit zu inaktivieren (*Abb. 11*). TNF-R1-Wildtyp- und $-\Delta\text{NSD}$ -Zellen induzieren diesen Schritt durch die Rekrutierung eines DISC. Die Zelle ist so in der Lage einen für die Apoptose wichtigen ATP-Level aufrecht zu erhalten, nachdem durch TNF-Behandlung über den TNF-R1 Apoptose ausgelöst wurde (*vgl. Schema 4*). Die Inaktivierung von PARP-1 ist für die Zelle so wichtig, dass auch bei Fehlen eines DISC und damit unterbundener Caspase 8-Aktivität in TNF-R1- ΔTRID -Zellen (Schneider-Brachert et al., 2004) eine Caspase 3-Aktivität (*Abb.9*) durch Aktivierung der membranständigen N-SMase (*Abb.18*) induziert werden kann. Eine Deletion der DD im Rezeptor und eine Doppeldeletion von TRID- und NSD-Domäne sowie TRID- und DD-Domäne können dies verhindern (*Abb.11*).

Blockade der Caspase 8- und 9-Aktivierung durch Deletion des Internalisierungsmotivs am TNF-R1

Die Deletion der TRID-Domäne führt im Vergleich mit TNF-R1-Wildtyp- und Δ NSD-Zellen zu einem veränderten, aber der Apoptose ähnlichen Zelltod. Der Unterschied im Zelltod von TNF-R1- Δ TRID- zu Wildtyp-Zellen stellt sich im FACS dar. Es kommt zu keiner klaren apoptotischen Population der Δ TRID-Zellen nach Behandlung mit TNF (*Abb.8a*). Es scheinen durch die fehlende Formierung des DISC Mechanismen auszufallen, die zur Umstülpung und Präsentation von Phosphatidyl-Serinen auf der Zellmembran führen. Der Verlust des DISC verhindert in Δ TRID-Zellen weiterhin eine Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Weges. Es kommt zu keiner Aktivierung der Caspase 9 (*Abb.13*).

In der Literatur ist Caspase 9 als eine wichtige Caspase für die anfängliche Degradation des Zellkernes beschrieben. Caspase 9 ist in der Lage die Kernporen-Komplexe durch inaktivierende Spaltung der Importine zu zerstören (Buendia et al., 1999), um somit größeren Proteasen bis 50kD, wie z.B. Caspase 3, den Zugang zum Zellkern zu erleichtern. Die DNasen (Deoxy-Ribonukleasen) können dann nach Inaktivierung von ICAD („Inhibitor von Caspase-aktivierbarer DNase“) und verschiedener DNA-PK's (DNA-Phospho-Kinasen) durch Caspase 3 und 6 (Fischer et al., 2003) anfangen die DNA zu fragmentieren (Kawahara et al., 1998). Eine Fragmentierung der Kern-DNA findet in Δ TRID-Zellen im Vergleich zu Wildtyp und Δ NSD-Zellen ebenfalls nicht statt (*Abb12*). Dies kann durch die fehlende Caspase 9-Aktivität (*Abb.13*) erklärt werden. Die Aktivierung der Caspase 3 scheint im Zelltod der TNF-R1- Δ TRID-Zellen die hauptsächliche Rolle zu spielen. Sie verhilft durch ihre hohe Affinität zu vielen Substraten (Fischer et al., 2003) in der Zelle, einen vom DISC unabhängigen Zelltod in apoptose-ähnlicher Form durchzusetzen (*vgl. Schema 4*).

Der TNF-R1 muss folglich nach Bindung seines Liganden internalisiert werden, um alle für die Apoptose relevanten Signalwege einleiten zu können.

Actinomycin D als proapoptischer Faktor

Actinomycin D (ActD) wird allgemein als Proteinbiosynthese-Inhibitor in Versuchen zur Aktivierung von Todesrezeptoren zugegeben (Kim et al., 2002; Utaisincharoen et al., 2000; Kleef et al., 2000). Es wird dadurch die Balance von Rezeptorsignalen, die einerseits proliferative und andererseits apoptotische Signalwege in einer Zelle steuern können, aus dem Gleichgewicht gebracht. Indem man schon durch Inhibition auf transkriptioneller Ebene die Neusynthese antiapoptotischer Proteine wie NF- κ B, XIAP, Traf usw. verhindert, reicht der zytosolische Vorrat an proapoptotischen Proteinen aus, um ein Zelltod vermittelndes Signal in der Zelle zu etablieren. Diese Vorgehensweise ist aber nicht unproblematisch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

Durch eine Behandlung mit TNF/ActD wird Caspase 3-Aktivität in TNF-R1-Wildtyp-, Δ TRID-, und Δ NSD-Zellen im Vergleich zum jeweiligen Kontrollansatz unter ActD induziert (*Abb.4*). Jedoch zeigt sich im Western Blot, dass Caspase 3 konstitutiv prozessiert wird (*Abb.5*), unabhängig von einer Aktivierung durch den Rezeptor und dessen Domänen. Das Caspase 3-Substrat PARP-1 zeigt ein ähnliches Bild im Western Blot (*Abb.6*), so dass von einer konstitutiv durch ActD induzierten Caspase 3-Aktivität auszugehen ist. In den morphologischen Darstellungen der jeweiligen Zellkulturen konnten hingegen keine von ActD abhängigen Effekte beobachtet werden (*Abb. 2a; Abb.2b*). In der FACS-Analyse zeigen jedoch sowohl mit ActD behandelte Kontrollansätze, als auch die mit TNF/ActD behandelten Zellkulturen eine Färbung mit Annexin-V/PI, so dass der eigentliche TNF-Effekt oft nicht erkennbar ist (*Abb.3a; Abb.3b*). Aufgrund dieser Tatsache wurden die nach TNF/ActD-Behandlung erhobenen Daten durch eine entsprechende TNF-Behandlung ohne Zugabe von ActD verifiziert.

Die Zugabe von ActD ist ein kritischer Faktor, sie verzerrt in beträchtlicher Weise den eigentlichen Effekt der Signalgebung, der durch Stimulation der Todesrezeptoren erreicht werden kann, vor allem dann, wenn nicht entsprechende Kontrollen mit in die Untersuchung einbezogen werden.

Aktivierung von Caspasen durch Fusion des TNF-R1-Komplexes mit Lysosomen

Für den TNF-R1 ist, wie oben beschrieben, die Internalisierung zur Etablierung einer geregelten Apoptose notwendig. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Schütze konnte gezeigt werden, dass der internalisierte TNF-R1 nach Formierung des DISC mit dem endolysosomalen Kompartiment der Zelle innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach Stimulation fusioniert (Schneider-Brachert et al., 2004). Innerhalb von 30 Minuten ist eine deutliche Steigerung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase (A-SMase), die in Lysosomen lokalisiert ist, messbar. Durch A-SMase Aktivität kann Ceramid aus Sphingomyelin hydrolysiert werden (Wiegmann et al., 1994). Ceramid ist dann in der Lage die Aspartat-Protease Cathepsin D zu binden (Heinrich et al., 1999). In Western Blot Analysen kann eine Kolo-kalisation der Aspartat-Protease Cathepsin D mit dem TNF-R1-Komplex nach 30 Minuten Internalisierung dargestellt werden. Cathepsin D liegt dort in der aktiven 32kD-Isoform vor (Schneider-Brachert et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cathepsin D eine wichtige Rolle in der TNF-R1 vermittelten Apoptose nach Internalisierung des Rezeptors spielt. FACS-Analysen von Cathepsin D knockout Fibroblasten ($CD^{-/-}$) und mit Cathepsin D rekonstituierten Fibroblasten ($CD^{-/-}CatD$) zeigen eine deutliche Abhängigkeit des durch TNF induzierten Zelltodes von Cathepsin D. Innerhalb von 12 Stunden Behandlung mit TNF/CHX versterben dabei deutlich mehr Cathepsin D exprimierende Zellen (*Abb.19a und b*). Dieser verstärkte Zelltod im Vergleich zu Cathepsin D knockout Fibroblasten resultiert aus einer Cathepsin D abhängigen Aktivierung der Caspasen 3 und 9 (*Abb.20 und 21*). Eine Retransfektion mit Cathepsin D in $CD^{-/-}$ -Zellen führt nach Behandlung mit TNF/CHX zu einer gleichstarken Caspase 3 und 9-Aktivierung wie in $CD^{+/+}$ Wildtyp-Fibroblasten (*Abb.20 und 21*). Der Verlust der Cathepsin D-Expression in $CD^{-/-}$ -Fibroblasten verhindert diese Aktivierung weitgehend. Auch ohne Zugabe von CHX ist dieser von Cathepsin D abhängige Effekt nach einer TNF-Behandlung darstellbar (*Abb.26*). Cathepsin D ist somit zumindest partiell an der Aktivierung von Caspase 3 und 9 beteiligt. Eine von Cathepsin D abhängige Aktivierung von Caspasen wurde bereits von Roberg et al. (2002) beschrieben. Durch Mikroinjektion von Cathepsin D in murine Fibroblasten konnte eine Caspase-abhängige Apoptose induziert werden. Weiterhin konnte in humanen HeLa-Fibroblasten durch Zugabe des Cathepsin D-Inhibitor Pepstatin A die TNF-induzierte Caspase 3 und 9-Aktivität reduziert werden (Heinrich et al., 2004).

Neben Cathepsin D ist unter anderem auch Cathepsin B in den Lysosomen lokalisiert und konnte nach TNF-Behandlung mit apoptotischen Ereignissen in Verbindung gebracht werden (Werneburg et al., 2002). Sowohl Cathepsin B, als auch Cathepsin D werden während der Apoptose ins Zytoplasma der Zelle entlassen (Johnson et al., 2000; Heinrich et al., 2004).

Durch entsprechende Inhibitionsversuche konnte für beide Proteasen eine proapoptotische Wirkung beschrieben werden (Roberts et al., 1997; Foghsgaard et al., 2001). Es scheint auch eine Interaktion zwischen den beiden Proteasen zu existieren, da eine Aktivierung von Cathepsin B durch Cathepsin D gezeigt werden konnte (Roberts et al., 1999). In Lysosomen sind noch weitere Cathepsine zu finden (McGrath et al., 1999), so dass sich die Frage stellt, ob es eine ähnliche Aktivierungs-Kaskade vergleichbar zu zytosolischen Caspasen im endolysosomalen Kompartiment der Zelle geben könnte. Aufgrund dessen, dass Lysosomen neben ihrer Funktion in der Apoptose im Allgemeinen als Ort des Proteinabbaus und Recyclings beschrieben werden (Turk et al., 2000), wäre eine solche kompartimentierte Protease-Kaskade nützlich und in einer intakten Zelle unschädlich.

Aktivierung von Cathepsin D in Abhängigkeit von A-SMase-Aktivität

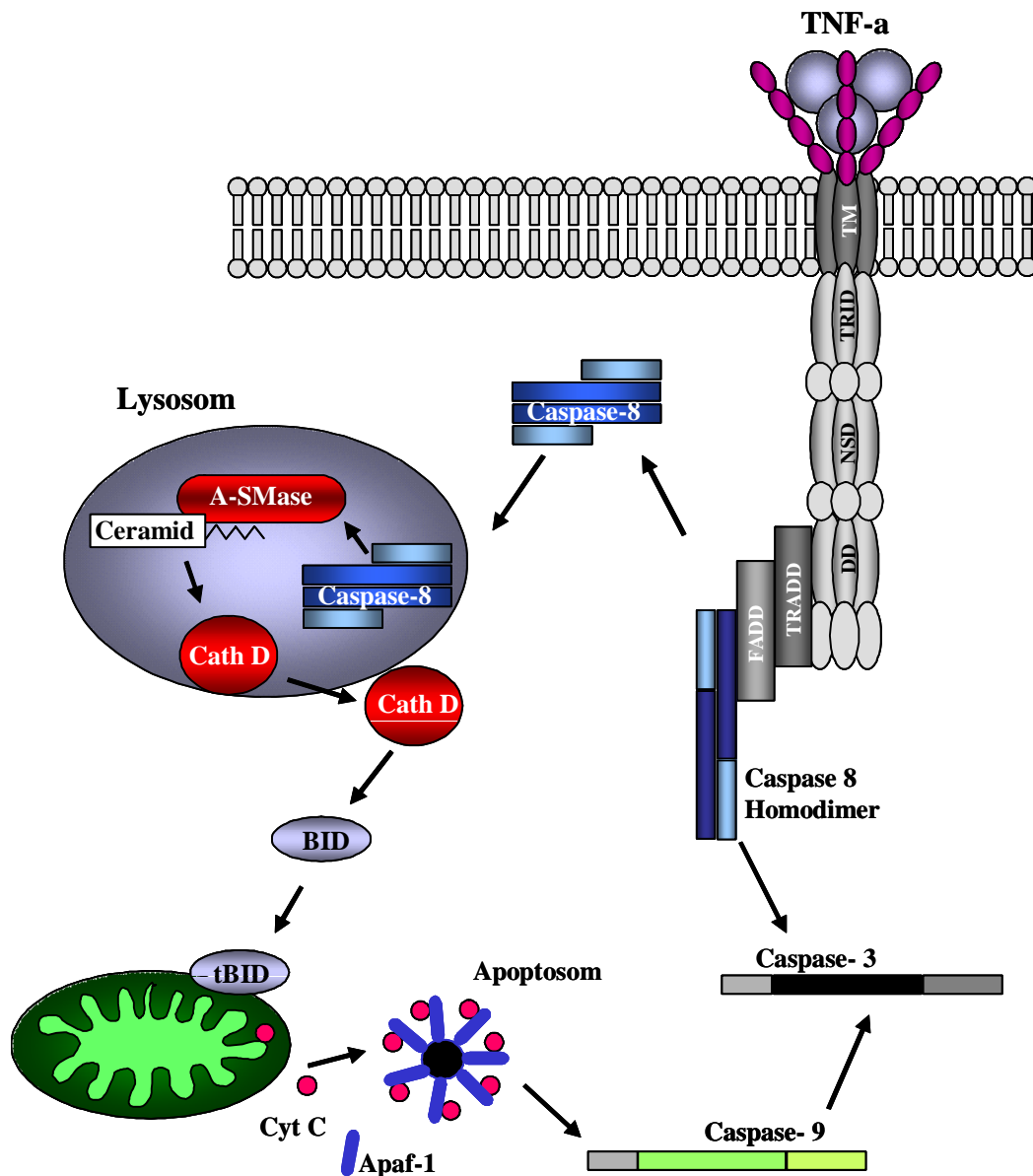
In Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass die Aktivierung von Caspase 3 und 9 durch Zugabe von TNF nicht nur von einer funktionalen Expression von Cathepsin D, sondern auch von einer Aktivierung der A-SMase abhängt. Die Wirkung der A-SMase auf die Aktivierung von Cathepsin D wurde oben diskutiert. Sowohl eine Defizienz von Cathepsin D (*Abb.20 und 21*), als auch der A-SMase (*Abb.22 und 23*) führt zu einer Reduktion der Caspase 3 und 9-Aktivität nach TNF-Behandlung. Die Caspase 3 und 9-Aktivität ist zumindest partiell von lysosomalen Proteinen abhängig. Eine Blockade der A-SMase Aktivität durch Zugabe des Caspase 8 Inhibitors Ac-IETD-Fmk in TNF-behandelten Zellen, sowie in Caspase-8 defizienten Jurkat-Zellen (Ergebnis der Arbeitsgruppe, nicht dargestellt) zeigt die Abhängigkeit des Cathepsin D von Caspase 8 am DISC des TNF-R1. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Inhibitionsversuche in humanen Gliomzellen erlangt werden (Sawada et al., 2004).

Caspase 8 besitzt somit eine initiale Funktion bei der Aktivierung der lysosomalen A-SMase, die ihrerseits die Aktivität von Cathepsin D vermitteln kann. Alle drei Enzymsysteme sind von der Internalisierung des TNF-R1 abhängig (Schneider-Brachert et al., 2004). In *Schema 5* ist eine Vorstellung zu diesem Aktivierungsschritt zusammengefasst. Eine proapoptotische Wirkung von A-SMase wurde auch unabhängig von TNF in Makrophagen gezeigt (Gomez-Munoz et al., 2004). Durch Entzug von M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“) konnte in Makrophagen eine A-SMase abhängige Apoptose induziert werden. Durch Zugabe des Mitogens Ceramid-1-Phosphat konnte eine diese induzierbare Apoptose durch Blockade der A-SMase-Aktivität verhindert werden. Desweiteren wurden dadurch auch Caspase 3 und 9-Aktivität, sowie Fragmentierung der Kern-DNA unterdrückt. Das lysosomale Komparti-

ment scheint nach den vorliegenden Ergebnissen eine bedeutendere Rolle innerhalb apoptotischer Prozesse zu spielen als bisher vermutet.

Mitochondriale Apoptose in Cathepsin D exprimierenden Zellen

Durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Cathepsin D, nach Induktion des TNF-R1 Signalweges, mit dem proapoptotischen Bcl-2-Protein Bid kolokalisieren kann (Heinrich et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte im Western Blot erstmals eine Cathepsin D abhängige Spaltung von Bid dargestellt werden (*Abb.28*). Innerhalb von 2 Stunden Behandlung mit TNF kommt es in Abhängigkeit von einer Expression von Cathepsin D zur Prozessierung von Bid in seine aktive tBid-Isoform. tBid ist in der Lage, durch Bindung am mitochondrialen Bax eine Cytochrom C Freisetzung und nachfolgende Caspase 9-Aktivierung durch Bildung des Apoptosom zu induzieren (Sharpe et al., 2004; Zou et al., 2003). Caspase 9 kann dann die Fragmentierung der Kern-DNA durch weitere Proteasen einleiten (Buendia et al., 1999). Die Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung nach Induktion des TNF-R1 Signalweges von der Expression von Cathepsin D ist in *Abb.26* dargestellt. Cathepsin D knockout Fibroblasten ($CD^{-/-}$) lassen durch einen TNF vermittelten Stimulus kein DNA-Laddering erkennen. Dies konnte durch Cathepsin D Expression wieder hergestellt werden. Der Mechanismus zur Aktivierung der Caspasen durch die Lysosomen könnte somit wie folgt aussehen: Rezeptorgebundene Caspase 8 aktiviert nach Fusion des TNF-R1-Komplexes mit den Endo-Lysosomen die A-SMase. Deren Aktivität produziert durch Hydrolyse von membranständigem Sphingomyelin Ceramid. Cathepsin D kann dieses Ceramid binden und wird aktiviert. Nach einer Translokation ins Zytosol kann Cathepsin D Bid spalten. Das aktive tBid induziert über die Mitochondrien Caspase 9-Aktivität und leitet so nachgeschaltete Schritte in der Apoptose ein (*vgl. Schema 5*; publiziert Heinrich et al., 2004).

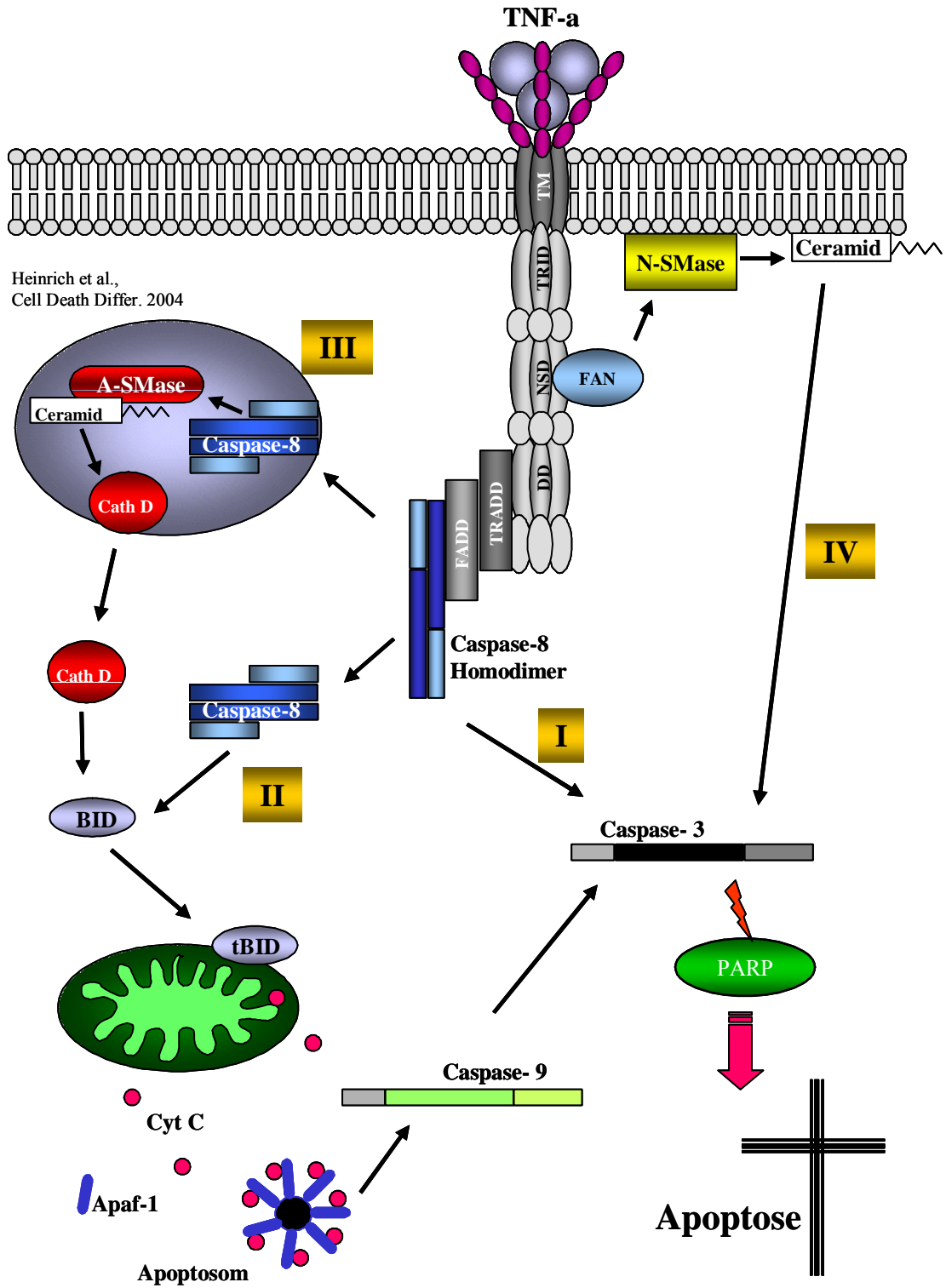


Schema 5: Cathepsin D abhängige Apoptose im Signalweg des TNF-R1: Vermittelt durch die am TNF-R1 assoziierte Caspase 8 wird eine Aktivierung des endolysosomalen Cathepsin D in Abhängigkeit von A-SMase induziert. Nachfolgend vermittelt Cathepsin D durch Spaltung von Bid, Caspase 9 und 3-Aktivierung (publiziert in Heinrich et al., 2004).

Vernetzung TNF-R1 vermittelter Signalwege in der Apoptose

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten mehrere von den zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 abhängige Induktionswege der Apoptose nach TNF-Behandlung dargestellt werden (vgl. *Schema 6*). Die nachgeschaltete Protease-Kaskade kann dabei auf unterschiedlichen Wegen induziert werden. So gibt es neben den in der Literatur beschriebenen Wegen I und II, wie bei der FasLigand und TRAIL vermittelten Apoptose, im Signalweg des TNF-R1 weitere Möglichkeiten, eine unumkehrbare Apoptose durchzusetzen. Dabei sind sowohl das Kompartiment der Lysosomen (Weg III; publiziert in Heinrich et al., 2004), als auch die Plasmamembranständige N-SMase (Weg IV; publiziert in Schneider-Brachert et al., 2004) involviert. Es kommt somit zu einer vernetzten Signalgebung in der Induktion des TNF-R1. Die Zelle hat so die Möglichkeit, durch Einbeziehung verschiedenster Komponenten eine Protease-Kaskade zur Selbst-Eliminierung einzusetzen. Die beschriebenen Wege I bis IV (vgl. *Schema 6*) scheinen sich dabei zu ergänzen, und einen Verstärkermechanismus auf nachgeschaltete Signalwege auszuüben. Der Verlust von A-SMase oder Cathepsin D führt zur Reduktion der Caspase-Aktivität während der Apoptose (*Abb.20 bis 23*). Die Apoptose wird jedoch damit nur verzögert und nicht vollständig blockiert. Dies impliziert einen möglichen Verstärkermechanismus der endolysosomalen Proteine während der Apoptose. Auch der TNF-R1 selbst kann direkt in diese Wege eingreifen, in dem in Abhängigkeit der involvierten Rezeptordomänen verschiedene Wege zur Protease-Kaskade genutzt werden können, wie z.B. Caspase 8-Rekrutierung und Aktivierung, oder die Aktivierung der membranständigen N-SMase.

Dieser vernetzte Verstärkermechanismus stellt für die physiologische Rolle der durch Todesrezeptoren induzierten Apoptose eine sinnvolle Ergänzung dar. Oft versuchen pathogene Erreger aktiv solche Wege auszuschalten, um so parasitär Zellen am Leben zu erhalten, nachdem sie durch spezialisierte Zellen wie T-Lymphozyten oder Natürliche Killer-Zellen erkannt wurden. Für die therapeutische Anwendung im Bereich Tumor- und Pathogenbekämpfung stellt der Kenntnisstand über die molekularen Mechanismen der Todesrezeptoren eine wichtige Grundlage dar.



Schema 6: Die Induktion der Apoptose durch den TNF-R1 kann auf vier unterschiedlichen Wegen (I-IV) eingeleitet werden, die redundant aber auch untereinander verstärkend wirken können.

5. Ausblick

Die Internalisierung des TNF-R1 nach Bindung seines Liganden TNF- α ist ein wichtiger Schritt zur Induktion des Zelltodes. Die in der Arbeitsgruppe Schütze etablierte Methodik der magnetischen Markierung und Isolierung von TNF-Rezeptoren erlaubt es, den TNF-R1 auf seinem Weg durch die Zelle verfolgen zu können (Schneider-Brachert et al., 2004). Isolierungen von Rezeptorkomplexen zu verschiedenen Stimulationszeiten könnten die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse weiter verifizieren. Die verschiedenen Deletionsmutanten des TNF-R1 könnten dabei zur näheren Charakterisierung der Fusionsprozesse des Rezeptorkomplexes mit intrazellulären Strukturen genutzt werden. Die Bestandteile magnetisch isolierter Rezeptorfusionskomplexe (Rezeptosomen) könnten in einer 2D-Elektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch anschließende massenspektroskopische Analysen könnten so neue Proteine identifiziert werden. Durch den Vergleich der verschiedenen Deletionsmutanten würden so Unterschiede in der Proteinexpression aufgedeckt werden. Die auf diese Weise neu identifizierten, differentiell exprimierten Proteine sind bezüglich ihrer möglichen Funktionen in den Signalwegen der TNF-R1 vermittelten Apoptose von Interesse. Ein solcher experimenteller Zugang erlaubt eine noch genauere Charakterisierung der TNF-R1 vermittelten Apoptose nach Bindung des Liganden TNF- α .

6. Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfasst eine weiterführende Charakterisierung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1) und seiner nachgeschalteten Signalwege in Abhängigkeit von den einzelnen zytoplasmatischen Domänen. Nach Bindung seines Liganden TNF- α kommt es zur Internalisierung des TNF-R1 und anschließend zur Rekrutierung und Aktivierung des DISC („death-inducing signalling-complex“). Die weitere Internalisierung dieses Signalkomplexes ist essentiell für die Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Eine Deletion der Todesdomäne (TNF-R1 Δ DD) im Rezeptor, über die der DISC rekrutiert wird, konnte eine Aktivierung von Caspasen inhibieren und damit eine Apoptose der Zelle verhindern. Durch Deletion des Internalisierungsmotivs des Rezeptors (TNF-R1 Δ TRID), wurde ein verzögerter DISC-unabhängigen Zelltod erreicht. Die Deletion dieses Motivs unterbindet die Aktivierung mitochondrialer Faktoren, die für den Verlauf der Apoptose mit verantwortlich sind. Der Verbleib des Rezeptors an der Zelloberfläche führt zu einer erhöhten Aktivität der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase), die ihrerseits in der Lage ist, durch Ceramidfreisetzung Caspase 3-Aktivität zu induzieren, die nicht über Caspase 8 oder 9 vermittelt ist. Diese Ceramidfreisetzung hat trotz Internalisierungsblockade den Tod der Zelle auf einem DISC-unabhängigen Signalweg zur Folge. Eine Doppeldeletion der NSD- (neutralen Sphingomyelinase-Domäne) und TRID-Domäne des TNF-R1 führte zu einer kompletten Apoptoseresistenz der Zellen.

Neben dem beschriebenen DISC-unabhängigen Zelltod über die Aktivierung der N-SMase, konnte noch ein weiterer Weg erstmals identifiziert werden. Nach Behandlung mit TNF- α kommt es durch Rekrutierung des DISC am Rezeptor zu einer Caspase 8-abhängigen Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) im endolysosomalen Kompartiment der Zelle. Abhängig von einer funktionalen A-SMase kommt es im Anschluss zur Aktivierung der Aspartat-Protease Cathepsin D. Es konnte durch Versuche an Cathepsin D defizienten Fibroblasten gezeigt werden, dass nach TNF-Behandlung nur Cathepsin D exprimierende Fibroblasten in der Lage sind das proapoptotische Bcl-2-Protein Bid zu spalten, um so nachgeschaltete Caspasen zu aktivieren. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 war demnach partiell von einer A-SMase und Cathepsin D Expression abhängig. Dies konnte durch entsprechende knock out Versuche dargestellt werden.

Es konnten somit im Signalweg des TNF-R1 zwei neue Wege identifiziert werden, die an der Einleitung von Apoptose beteiligt sind und mit den bereits bekannten Induktionswegen durch den Rezeptor redundant, aber auch untereinander verstärkend interagieren können.

Summary

The present study describes a detailed characterization of the signalling pathway following TNF-R1 (“tumor-necrosis-factor receptor 1”) activation with particular consideration for the distinct functions of the different domains of the receptor. After binding of TNF and following internalization, TNF-R1 recruits and activates the DISC (“death-inducing signalling-complex”). Internalization is essential for the progress of the intracellular signalling.

Formation of the DISC with consecutive activation of caspases and apoptosis is inhibited by deletion of the DD (“death domain”) of the TNF-R1. Deletion of TRID (“TNF-receptor internalization domain”) conveys a delayed, DISC-independent cell death by preventing the activation of mitochondrial factors relevant for apoptosis. If not internalized, TNF-R1 remains on the cell surface and activates N-SMase (“neutral sphingomyelinase”). This step leads to ceramide production, thereby inducing DISC-independent caspase 3 activity and finally cell death. A complete block of cell death was only achieved by double-deletion of TRID and NSD domains in TNF-R1.

Additional to DISC-independent cell death conveyed by activation of N-SMase as described above, another way of TNF induced cell death was described in this study. Treatment with TNF may result in DISC-dependent activation of endolysosomal A-SMase (“acidic sphingomyelinase”). A functional A-SMase induces activation of the aspartic protease cathepsin D.

Investigation of cathepsin D deficient and cathepsin D retransfected fibroblasts revealed for the first time the processing of the proapoptotic protein Bid, a member of the Bcl-2 family, by cathepsin D following TNF treatment. Bid cleavage led to activation of downstream caspases. This activation of caspases 9 and 3 was at least in part regulated by A-SMase and cathepsin D, as shown by investigations in knock out cells.

In addition to the already characterized and defined ways of TNF-R1 signaltransduction, two new pathways involved in apoptosis induction were identified in this study. These new pathways cooperate in a redundant and intensifying manner with already known TNF-R1 signalling pathways.

7. Literaturverzeichnis

- Adam,D., Wiegmann,K., Adam-Klages,S., Ruff,A. and Kronke,M. (1996). A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J. Biol. Chem.* *271*, 14617-14622.
- Adam-Klages,S., Adam,D., Wiegmann,K., Struve,S., Kolanus,W., Schneider-Mergener,J. and Kronke,M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* *86*, 937-947.
- Aggarwal,B.B. (1985). Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* *260*, 2345-2354.
- Aggarwal,B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745-756.
- Alexopoulou,L., Pasparakis,M. and Kollias,G. (1997). A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2588-2592.
- Ashkenazi,A. and Dixit,V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305-1308.
- Atkinson,E.A., Barry,M., Darmon,A.J., Shostak,I., Turner,P.C., Moyer,R.W. and Bleackley,R.C. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J. Biol. Chem.* *273*, 21261-21266.
- Barnhart,B.C., Pietras,E.M., Algeciras-Schimmich,A., Salmena,L., Sayama,K., Hakem,R. and Peter,M.E. (2005). CD95 apoptosis resistance in certain cells can be overcome by noncanonical activation of caspase-8. *Cell Death Differ.* *12*, 25-37.
- Baud,V. and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* *9*, 372-377.
- Bleackley,R.C. and Heibein,J.A. (2001). Enzymatic control of apoptosis. *Nat. Prod. Rep.* *18*, 431-440.
- Boatright,K.M. and Salvesen,G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 725-731.
- Buendia,B., Santa-Maria,A. and Courvalin,J.C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 11), 1743-1753.
- Caspari,T. (2000). How to activate p53. *Curr. Biol.* *10*, R315-R317.
- Chang,D., Xing,Z., Capacio,V.L., Peter,M. and Yang,X. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.* *22*, 4132-4142.
- Chosa,N., Kyakumoto,S., Kito,N., Kamo,M. and Sato,N. (2004). Mechanism of Fas-mediated cell death and its enhancement by TNF-alpha in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Eur. J. Oral Sci.* *112*, 338-346.

- Creagh,E.M. and Martin,S.J. (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 696-702.
- Danial,N.N. and Korsmeyer,S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205-219.
- De Stefanis,D., Reffo,P., Bonelli,G., Baccino,F.M., Sala,G., Ghidoni,R., Codogno,P., and Isidoro,C. (2002). Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of cathepsin D prior to onset of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Biol. Chem.* *383*, 989-999.
- Deiss,L.P., Galinka,H., Berissi,H., Cohen,O. and Kimchi,A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* *15*, 3861-3870.
- Demoz,M., Castino,R., Cesaro,P., Baccino,F.M., Bonelli,G. and Isidoro,C. (2002). Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNFalpha, not by etoposide, in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of cathepsin D. *Biol. Chem.* *383*, 1237-1248.
- Deveraux,Q.L., Leo,E., Stennicke,H.R., Welsh,K., Salvesen,G.S. and Reed,J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* *18*, 5242-5251.
- Diaz-Horta,O., Van Eylen,F. and Herchuelz,A. (2003). Na/Ca exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum stress, caspase-12 release, and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1010*, 430-432.
- Diment,S. and Leech,M.S. (1987). Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J.Biol.Chem.* *263*, 6901-6907.
- Earnshaw,W.C., Martins,L.M. and Kaufmann,S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 383-424.
- Egger,L., Schneider,J., Rheme,C., Tapernoux,M., Hacki,J. and Borner,C. (2003). Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ.* *10*, 1188-1203.
- Fischer,B., Coelho,D., Dufour,P., Bergerat,J.P., Denis,J.M., Gueulette,J. and Bischoff,P. (2003a). Caspase 8-mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *306*, 516-522.
- Fischer,U., Janicke,R.U. and Schulze-Osthoff,K. (2003b). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* *10*, 76-100.
- Foghsgaard,C., Wissing,D., Mauch,D., Lademann,U., Bastholm,L., Boes,M., Elling,F., Leist,M. and Jäätelä, M. (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell. Biol.* *153*, 999-1009.
- Ganten,T.M., Haas,T.L., Sykora,J., Stahl,H., Sprick,M.R., Fas,S.C., Krueger,A., Weigand,M.A., Grosse-Wilde,A., Stremmel,W., Krammer,P.H. and Walczak,H. (2004). Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ.* *11 Suppl 1*, S86-S96.

- Gomez-Munoz,A., Kong,J.Y., Salh,B. and Steinbrecher,U.P. (2004). Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J. Lipid. Res.* *45*, 99-105
- Gray,J., Haran,M.M., Schneider,K., Vesce,S., Ray,A.M., Owen,D., White,I.R., Cutler,P. and Davis,J.B. (2001). Evidence that inhibition of cathepsin-B contributes to the neuroprotective properties of caspase inhibitor Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone. *J. Biol. Chem.* *276*, 32750-32755.
- Gulbins,E. and Grassme,H. (2002). Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta* *1585*, 139-145.
- Hannun,Y.A. and Obeid,L.M. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 73-77.
- Heinrich,M., Neumeyer,J., Jakob,M., Hallas,C., Tchikov,V., Winoto-Morbach,S., Wickel,M., Schneider-Brachert,W., Trauzold,A., Hethke,A. and Schütze,S. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* *11*, 550-563.
- Heinrich,M., Wickel,M., Schneider-Brachert,W., Sandberg,C., Gahr,J., Schwandner,R., Weber,T., Saftig,P., Peters,C., Brunner,J., Kronke,M. and Schütze,S. (1999). Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* *18*, 5252-5263.
- Hsu,H., Xiong,J. and Goeddel,D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* *81*, 495-504.
- Ishisaka,R., Kanno,T., Akiyama,J., Yoshioka,T., Utsumi,K. and Utsumi,T. (2001). Activation of caspase-3 by lysosomal cysteine proteases and its role in 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)-induced apoptosis in HL-60 cells. *J. Biochem. (Tokyo)* *129*, 35-41.
- Jäättelä,M. (2002). Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann. Med.* *34*, 480-488.
- Johnson,D.E. (2000). Noncaspase protease in apoptosis. *Leukemia.* *14*, 1695-1703.
- Kaufmann,S.H., Desnoyers,S., Ottaviano,Y., Davidson,N.E. and 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., Enari,M., Talanian,R.V., Wong,W.W. and Nagata,S. (1998). Fas-induced DNA fragmentation and proteolysis of nuclear proteins. *Genes Cells* *3*, 297-306.
- Kelliher,M.A., Grimm,S., Ishida,Y., Kuo,F., Stanger,B.Z. and Leder,P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* *8*, 297-303.
- 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.
- Kidd,V.J., Lahti,J.M. and Teitz,T. (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *11*, 191-201.

- Kiessling,S., Muller-Newen,G., Leeb,S.N., Hausmann,M., Rath,H.C., Strater,J., Spottl,T., Schlottmann,K., Grossmann,J., Montero-Julian,F.A., Scholmerich,J., Andus,T., Buschauer,A., Heinrich,P.C. and Rogler,G. (2004). Functional expression of the interleukin-11 receptor alpha-chain and evidence of antiapoptotic effects in human colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 10304-10315.
- Kim,A. and Song,W. (2002). TNF-alpha-mediated apoptosis in chondrocytes sensitized by MG132 or actinomycin D. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 295, 937-944.
- Kischkel,F.C., Hellbardt,S., Behrmann,I., Germer,M., Pawlita,M., Krammer,P.H. and Peter,M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588.
- Kitano,S., Irimura,K., Sasaki,T., Abe,N., Baba,A., Miyake,Y., Katunuma,N. and Yamamoto,K. (2001). Suppression of gingival inflammation induced by *Porphyromonas gingivalis* in rats by leupeptin. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 84-91.
- Kleeff,J., Kornmann,M., Sawhney,H., Korc,M.Kreuz,S., Siegmund,D., Scheurich,P. and Wajant,H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell Biol.* 21, 3964-3973.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lazebnik,Y.A., Kaufmann,S.H., Desnoyers,S., Poirier,G.G. and Earnshaw,W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- Leist,M., Gantner,F., Kunstle,G., Bohlinger,I., Tiegs,G., Bluethmann,H. and 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.
- Li,H., Zhu,H., Xu,C.J. and Yuan,J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Lin,L., Tang,C.S. and Yuan,W.J. (2003). [Endoplasmic reticulum stress]. *Sheng Li Ke. Xue. Jin. Zhan.* 34, 333-335.
- Los,M., Mozoluk,M., Ferrari,D., Stepczynska,A., Stroh,C., Renz,A., Herceg,Z., Wang,Z.Q. and Schulze-Osthoff,K. (2002a). 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.
- Louagie,H., Schotte,P., Vral,A., Cornelissen,M., Thierens,H., Beyaert,R., De Ridder,L. and Philippe,J. (1999). Apoptosis induced by gamma irradiation in peripheral blood mononuclear cells is not mediated by cytochrome-c release and only partially involves caspase-3-like proteases. *Cell Biol. Int.* 23, 611-617.
- Luberto,C., Hassler,D.F., Signorelli,P., Okamoto,Y., Sawai,H., Boros,E., Hazan-Martin,D.J., Obeid,L.M., Hannun,Y.A. and Smith,G.K. (2002). Inhibition of Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death in MCF7 by a Novel Inhibitor of Neutral Sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 277, 41128-41139.

- Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C. and Wang,X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Macho,A., Blanco-Molina,M., Spagliardi,P., Appendino,G., Bremner,P., Heinrich,M., Fiebich,B.L. and Munoz,E. (2004). Calcium ionophoretic and apoptotic effects of ferutinin in the human Jurkat T-cell line. *Biochem. Pharmacol.* 68, 875-883.
- Maekawa,Y., Himeno,K., Ishikawa,H., Hisaeda,H., Sakai,T., Dainichi,T., Asao,T., Good,R.A. and Katunuma,N. (1998). Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 161, 2120-2127.
- Malagarie-Cazenave,S., Andrieu-Abadie,N., Sgui,B., Gouaz,V., Tardy,C., Cuvillier,O. and Levade,T. (2002). Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF--induced cell death. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2002, 1-15.
- McDonnell,T.J., Nunez,G., Platt,F.M., Hockenberry,D., London,L., McKearn,J.P. and Korsmeyer,S.J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol. Cell Biol.* 10, 1901-1907.
- McGrath,M.E. (1999). The lysosomal cysteine proteases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 181-204.
- Medema,J.P., Scaffidi,C., Kischkel,F.C., Shevchenko,A., Mann,M., Krammer,P.H. and Peter,M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16, 2794-2804.
- Micheau,O. and Tschopp,J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Monney,L., Olivier,R., Otter,I., Jansen,B., Poirier,G.G. and Borner,C. (1998). Role of an acidic compartment in tumor-necrosis-factor-alpha-induced production of ceramide, activation of caspase-3 and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 251, 295-303.
- Muzio,M., Chinnaiyan,A.M., Kischkel,F.C., O'Rourke,K., Shevchenko,A., Ni,J., Scaffidi,C., Bretz,J.D., Zhang,M., Gentz,R., Mann,M., Krammer,P.H., Peter,M.E. and Dixit,V.M. (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.
- Nakagawa,T. and Yuan,J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150, 887-894.
- Nakagawa,T., Zhu,H., Morishima,N., Li,E., Xu,J., Yankner,B.A. and Yuan,J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nakanishi,H., Zhang,J., Koike,M., Nishioku,T., Okamoto,Y., Kominami,E., von Figura,K., Peters,C., Yamamoto,K., Saftig,P. and Uchiyama,Y. (2001). Involvement of nitric oxide released from microglia-macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. *J. Neurosci.* 21, 7526-7533.

- Perfettini, J.L. and Kroemer, G. (2003). Caspase activation is not death. *Nat. Immunol.* *4*, 308-310.
- Pettus, B.J., Chalfant, C.E. and Hannun, Y.A. (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* *1585*, 114-125.
- Rathmell, J.C. and Thompson, C.B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 781-828.
- Ravagnan, L., Roumier, T. and Kroemer, G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell Physiol* *192*, 131-137.
- Roberg, K. (2001). Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* *81*, 149-158.
- Roberg, K., Kagedal, K. and Ollinger, K. (2002). Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am. J. Pathol.* *161*, 89-96.
- Roberg, K. and Ollinger, K. (1998). Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am. J. Pathol.* *152*, 1151-1156.
- Roberts, L.R., Kurosawa, H., Bronk, S.F., Fesmier, P.J., Agellon, L.B., Leung, W.Y., Mao, F. and Gores, G.J. (1997). Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology*. *113*, 1714-1726.
- Roberts, L.R., Adjei, P.N. and Gores, G.J. (1999). Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. *Cell Biochem. Biophys.* *30*, 71-88.
- Rodman, J.S., Levy, M.A., Diment, S. and Stahl, P.D. (1990). Immunolocalization of endosomal cathepsin D in rabbit alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *48*, 116-122.
- Saftig, P., Hetman, M., Schmahl, W., Weber, K., Heine, L., Mossmann, H., Koster, A., Hess, B., Evers, M., von Figura, K. and Peters, C. (1995). Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J.* *14*, 3599-3608.
- Sawada, M., Kiyono, T., Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T. and Sakai, N. (2004). Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced ceramide formation in human glioma cells: P53-mediated oxidant stress-dependent and -independent pathways. *Cell Death Differ.* *11*, 997-1008.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Kramer, P.H. and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* *17*, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Kramer, P.H. and Peter, M.E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 22532-22538.

- Schneider-Brachert,W., Tchikov,V., Neumeyer,J., Jakob,M., Winoto-Morbach,S., Held-Feindt,J., Heinrich,M., Merkel,O., Ehrenschwender,M., Adam,D., Mentlein,R., Kabelitz,D. and Schütze,S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* 21, 415-428.
- Schulze-Osthoff,K., Ferrari,D., Los,M., Wesselborg,S. and Peter,M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254, 439-459.
- Schütze,S., Machleidt,T., Adam,D., Schwandner,R., Wiegmann,K., Kruse,M.L., Heinrich,M., Wickel,M. and Kronke,M. (1999). Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 10203-10212.
- Schütze,S., Potthoff,K., Machleidt,T., Berkovic,D., Wiegmann,K. and Kronke,M. (1992). TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced „acidic“ sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 765-776.
- Schütze,S., Tchikov,V., Kabelitz,D. and Krönke,M. (2003). German patent DE 101 44 291
- Schwandner,R., Wiegmann,K. and Bernado,K. (1998). TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinases. *J. Biol. Chem.* 276, 442-448.
- Sergeev,I.N. (2004). Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90, 419-425.
- Sharpe,J.C., Arnoult,D. and Youle,R.J. (2004). Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 107-113.
- Sprick,M.R., Rieser,E., Stahl,H., Grosse-Wilde,A., Weigand,M.A. and Walczak,H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signaling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21, 4520-4530.
- Stefanis,L. (2005). Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist.* 11, 50-62.
- Stennicke,H.R. (2000). Caspases--at the cutting edge of cell death. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 52, 13-29.
- Stennicke,H.R. and Salvesen,G.S. (1997). Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* 272, 25719-25723.
- Stennicke,H.R. and Salvesen,G.S. (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* 6, 1054-1059.
- Sulston,J.E. and Horvitz,H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110-156.
- Tartaglia,L.A., Rothe,M., Hu,Y.F. and Goeddel,D.V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73, 213-216.

- Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Kabelitz, D. and Schütze, S. (2001). Adhesion of immunomagnetic particles targeted to antigens and cytokine receptors on tumor cells determined by magnetophoresis. *J. Magnetism and Magnetic Materials* 225, 285-293.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R. and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Galvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. and Nicholson, D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907-11
- Turk, B., Turk, D. and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 98-111.
- Turk, B., Turk, V. and Turk, D. (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* 378, 141-150.
- Utaisincharoen, P., Tangthawornchaikul, N., Ubol, S., Chaisuriya, P. and Sirisinha, S. (2000). TNF-alpha induces caspase 3 (CPP 32) dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 31, 167-170.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45-65.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922-2933.
- Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F. and Gores, G.J. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 283, G947-G956.
- Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D. and Kronke, M. (1994b). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005-1015.
- Wiegmann, K., Schwandner, R., Krut, O., Yeh, W.C., Mak, T.W. and Kronke, M. (1999). Requirement of FADD for tumor necrosis factor-induced activation of acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 274, 5267-5270.
- Wolf, B.B. and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 20049-20052.

Wolf,B.B., Schuler,M., Echeverri,F. and Green,D.R. (1999). Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J. Biol. Chem.* 274, 30651-30656.

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 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.

Zhang,T., Maekawa,Y., Sakai,T., Nakano,Y., Ishii,K., Hisaeda,H., Dainichi,T., Asao,T., Katunuma,N. and Himeno,K. (2001). Treatment with cathepsin L inhibitor potentiates Th2-type immune response in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Int. Immunol.* 13, 975-982.

Zhou,L.J. and Zhu,X.Z. (2000). Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 982-988.

Zou,H., Yang,R., Hao,J., Wang,J., Sun,C., Fesik,S.W., Wu,J.C., Tomaselli,K.J. and Armstrong,R.C. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* 278, 8091-8098.

Publikationen von Teilen der Arbeit

Heinrich,M., **Neumeyer,J.**, Jakob,M., Hallas,C., Tchikov,V., Winoto-Morbach,S., Wickel,M., Schneider-Brachert,W., Trauzold,A., Hethke,A. and Schütze,S. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* *11*, 550-563.

Schneider-Brachert,W., Tchikov,V., **Neumeyer,J.**, Jakob,M., Winoto-Morbach,S., Held-Feindt,J., Heinrich,M., Merkel,O., Ehrenschwender,M., Adam,D., Mentlein,R., Kabelitz,D. and Schütze,S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* *21*, 415-428.

Vorträge und Poster

Jakob,M., **Neumeyer,J.**, Heinrich,M., Wickel,M., Trauzold,A., Hethke,A. and Schütze,S. (2002). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 activation. *Signal Transduction.* *3-4*, 162.

Schütze,S., Tchikov,V., Held-Feindt,J., Heinrich,M., Winoto-Morbach,S., Jakob,M., **Neumeyer,J.**, Schneider-Brachert,W. and Kabelitz,D. (2003). K.20 Application of a novel preparative magnetic immunoaffinity system for the isolation of intracellular membrane compartments like TNF receptors. *Immunobiology* *208*.

Danksagung

Für die Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Bulfone-Paus recht herzlich bedanken.

Ebenso großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Schütze, in dessen Arbeitsgruppe ich die vorliegenden Ergebnisse erarbeitet habe, für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Finanzierung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Kabelitz als Leiter des Institutes für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und weitere finanzielle Unterstützung zur Durchführung meiner Arbeiten danken.

Für die Diskussionsbereitschaft und Erörterung technischer Probleme im Rahmen meiner Arbeit bedanke mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schütze, Dr. Cora Hallas, Marten Jakob, Andrea Hethke, Dr. Supandi Winoto-Morbach und Dr. Vladimir Tchikov, die stets ein angenehmes Arbeitsklima schafften.

Nicht zu vergessen ist meine langjährige Freundin und Traumfrau Cornelia Schneider, die mich stets in guten wie auch schlechten Zeiten treu umsorgte. Danke!

Letztendlich gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich weder Studium noch Promotion bewältigt hätte.

Lebenslauf

Name : **Jens Neumeyer**
 Wohnhaft : Herzog-Friedrich-Str.78, 24103 Kiel

PERSÖNLICHE ANGABEN

- geboren am 06.06.1973
- Geburtstort Wuppertal

SCHULAUSBILDUNG

- 1984 bis 1993 Hebelgymnasium, Pforzheim; Abschluss: Abitur 1993
- 1980 bis 1984 Grund- und Hauptschule Tiefenbronn

WEITERER WERDEGANG

- 03/2002 bis heute Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Schütze. Seit dieser Zeit Anfertigung einer Promotionsarbeit. Angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat. zum April 2005.
- 10/1996 bis 02/2002 Student an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Studiengang: Biologie mit Abschluss Diplom in den Fachrichtungen Zoologie, Anthropologie und Biochemie. Von März 2001 bis Februar 2002 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Immunologie der CAU zu Kiel.
Thema:
Untersuchungen zur Rolle von Cathepsin D und Cathepsin B in der Aktivierung von apoptotischen Proteasen der Caspasefamilie. Titel: Diplombiologe
- 09/1995 bis 09/1996 Student an der TH Karlsruhe . Studiengang: Bauingenieur
- 07/1993 bis 06/1994 Wehrdienst in der Fernmeldeausbildungskompanie 2/II in Dillingen an der Donau. Dienstgrad: Gefreiter.

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Ort: Kiel Datum: 11.03.2005

Jens Neumeyer