

Charakterisierung der TNF-Rezeptorinternalisierung und des intrazellulären Transports von TNF-Rezeptosomen

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

Vorgelegt von

Marten Jakob
aus Hildesheim

Kiel
2005

Referent/in: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Koreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,.....

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Apoptose	1
1.1.1	Apoptose, der programmierte Zelltod.....	1
1.1.2	Die physiologische Bedeutung der Apoptose	1
1.1.3	Todesrezeptoren	2
1.1.4	TNF- α und die TNF-Rezeptoren 1 und 2	4
1.1.5	Die intrazelluläre Signalweiterleitung von TNF-R1 und TNF-R2.....	5
1.1.6	Die Rolle von Proteasen in der Apoptose	6
1.1.6.1	Die Rolle der Caspasen	6
1.1.6.2	Die Rolle der Cathepsine	8
1.1.6.3	Cathepsin D in der Apoptose	9
1.1.7	Virale Mechanismen der Apoptoseinhibition	10
1.2	Endozytose und intrazelluläre Signalwege.....	11
1.2.1	Die Endozytose	11
1.2.2	Intrazellulärer Transport von Vesikeln – der endozytotische Weg.....	12
1.2.3	Die Fusion von Membranen und Vesikeln	15
1.3	Fragestellung der Arbeit	18
2.	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Verwendete Kits, Enzyme und Substrate.....	20
2.1.4	Allgemeine Lösungen.....	20
2.1.5	Antikörper	20
2.1.5.1	Primäre Antikörper	20
2.1.5.2	Sekundäre Antikörper	21
2.1.6	Vektoren und rekombinante Plasmide	21
2.1.6.1	Leervektoren	21
2.1.6.2	Rekombinante Plasmide	21
2.1.7	Zellkulturmaterialien	22
2.1.8	Zelllinien	22
2.1.8.1	Die Fibroblastenzelllinie COS-7	22
2.1.8.2	TNF-Rezeptor 1/2 defiziente Fibroblasten.....	22
2.1.8.2.1	Klonierung und Expression der TNF-R1 Konstrukte	22
2.1.8.3	Die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 und abgeleitete Zelllinien	23

	2.1.8.3.1	Adenovirus E3-14.7K exprimierende NIH3T3 Zellen.....	23
	2.1.8.4	Die humane Zelllinie H1299 und abgeleitete Zelllinien.....	23
	2.1.8.4.1	Adenovirus E3-14.7K exprimierende H1299 Zellen.....	24
	2.1.8.5	Die humane Epithelialzelllinie HeLa	24
	2.1.8.6	Die humane Lymphoblastenzelllinie U937.....	24
2.2		Methoden.....	24
	2.2.1	Zellkultur.....	24
	2.2.1.1	Haltung und Passage der Zellen	24
	2.2.1.2	Einfrieren, Lagerung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen	25
	2.2.1.3	Pharmakologische Behandlung der Zellkulturen	25
	2.2.2	Immunfluoreszenzmethoden.....	25
	2.2.2.1	Biotin-TNF/Avidin-FITC Internalisierung.....	25
	2.2.2.2	Indirekte Immunfluoreszenz.....	26
	2.2.2.3	Verwendung des Lysotrackers	27
	2.2.3	Biochemische Methoden.....	27
	2.2.3.1	Herstellung kernfreier Zelllysate	27
	2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
	2.2.3.3	Messung der Caspase-Aktivität.....	28
	2.2.3.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
	2.2.3.5	Western-Blot und Immunodetektion	29
	2.2.3.6	Durchflußzytometrische Analyse mit Hilfe von Annexin V- und Propidiumjodidfärbung.....	30
	2.2.3.7	Isolierung magnetisch markierter TNF-R1 Komplexe.....	30
	2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	31
	2.2.4.1	Transiente Transfektion adhärenter Zellen.....	31
	2.2.4.2	Transformation von <i>E.coli</i> und Plasmidpräparation.....	32
3.		Ergebnisse	33
	3.1	Untersuchungen zur Internalisierung und zum intrazellulären Transportprozess des TNF-R1	33
	3.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der TNF-R1 Internalisierung.....	33
	3.1.2	Der TNF-R1 kolokalisiert mit Markerproteinen für frühe Endosomen.....	34
	3.1.2.1	Der TNF-R1kolokalisiert mit Rab5.....	34
	3.1.2.2	Der TNF-R1kolokalisiert mit EEA1	35
	3.1.3	Der TNF-R1 kolokalisiert mit Markerproteinen für späte Endosomen / Lysosomen.....	37
	3.1.3.1	Der TNF-R1 kolokalisiert mit Vti1b	37
	3.1.3.2	Cathepsin D ist in Endosomen und Lysosomen lokalisiert.....	39

3.1.3.3	Der TNF-R1 kolokalisiert mit Cathepsin D.....	42
3.1.4	Der TNF-R1 kolokalisiert nicht mit Strukturen des Golgi-Apparates.....	43
3.1.4.1	Der TNF-R1 kolokalisiert nicht mit Rab9	43
3.1.4.2	Der TNF-R1 kolokalisiert nicht mit Vti1a.....	44
3.1.5	Der TNF-R1 kolokalisiert mit aktiver Caspase-8.....	46
3.1.6	A-SMase und aktive Caspase-8 befinden sich in magnetisch isolierten TNF-R1 Fraktionen	46
3.1.7	Bid ist vesikulär verteilt und kolokalisiert mit Cathepsin D an Endosomen	48
3.1.8	Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen.....	50
3.2	Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 für die Internalisierung und die Induktion der Apoptose	52
3.2.1	Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung in TNF-R1 exprimierenden Zellen.....	53
3.2.2	Untersuchung der Caspase-Aktivierung in TNF-R1 exprimierenden Zellen.....	56
3.2.2.1	Untersuchung der Caspase-3 Aktivität	56
3.2.2.2	Untersuchung der Caspase-9 Aktivität	57
3.2.3	Untersuchung der Apoptose in TNF-R1 exprimierenden Zellen.....	58
3.3	Die Funktion des adenoviralen Proteins Ad E3-14.7K in der TNF-induzierten Apoptose.....	61
3.3.1	Untersuchung Ad E3-14.7K exprimierender NIH3T3 Zellen	61
3.3.1.1	Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung.....	62
3.3.1.2	Untersuchung der Caspase-Aktivierung.....	65
3.3.1.3	Untersuchung der Apoptose im FACS.....	66
3.3.2	Untersuchungen zur TNF-R1 Internalisierung und zur internalisierungsabhängigen DISC-Rekrutierung anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen.....	70
3.3.2.1	Untersuchungen zur TNF-R1 Internalisierung.....	70
3.3.2.2	Untersuchungen zur internalisierungsabhängigen DISC-Rekrutierung.....	72
3.3.3	Untersuchung Ad E3-14.7K exprimierender H1299 Zellen.....	73
3.3.3.1	Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung.....	73
3.3.3.2	Untersuchung der Caspase-Aktivierung.....	76
3.3.3.3	Untersuchung der Apoptose im FACS.....	78
3.3.4	Untersuchungen zur internalisierungsabhängigen DISC-Rekrutierung anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen	81
3.4	Modell zur Internalisierung des TNF-R1 und der damit verbundenen Signalwege	83

4.	Diskussion	85
5.	Ausblick	97
6.	Zusammenfassung / Summary	98
7.	Literatur	100
	Publikationen von Teilen der Arbeit	115
	Danksagung	116
	Lebenslauf	117
	Erklärung	118

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
ADAM17	„ADAM metallopeptidase domain 17“
ALPS	Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom
AP-1	Adapter Proteinkomplex 1
AP-2	Adapter Proteinkomplex 2
AP-3	Adapter Proteinkomplex 3
Apaf-1	„apoptotic protease activating factor 1“
ARF	ADP-ribosylation factor
A-SMase	saure Sphingomyelinase
α -SNAP	soluble NSF accessory protein
ATP	Adenosin Triphosphat
Bax	„bcl-2 associated x protein“
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	„b-cell lymphoma protein 2“
Bid	„BH3-interacting domain death agonist“
Bp	Basenpaare
CARD	„caspase recruitment domain“
CatB	Cathepsin B
CatD	Cathepsin D
CCP	„clathrin coated pit“
CCV	„clathrin coated vesicle“
CD95	Fas/Apo-1
CD-MPR	Kation-abhängiger Mannose-6-Phosphat Rezeptor
cDNA	„complementary DNA“
CED-3	„cell death protein 3“
CHX	Cycloheximid
c-IAP1	„cellular inhibitor of apoptosis protein 1“
c-IAP2	„cellular inhibitor of apoptosis protein 2“
CI-MPR	Kation-unabhängiger Mannose-6-Phosphat Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A2
CrmB	„cytokine response modifier B“
CrmC	„cytokine response modifier C“
CrmD	„cytokine response modifier D“
DD	Todesdomäne, „death domain“
DED	„death effector domain“
DISC	„death inducing signaling complex“
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR3	„death receptor 3“; Apo-3
DR4	„death receptor 4“; TRAIL-R1
DR5	„death receptor 5“; TRAIL-R2
DR6	„death receptor 6“
ECL	„enhanced chemoluminescence light“
ECV	„endosomal carrier vesicle“
EDAR	„ectodysplasin-A receptor“
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
EEA-1	„early endosomal autoantigen-1“
EGF	„epidermal growth factor“
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
ERC	„endocytic recycling compartment“
FACS	„fluorescent activated cell sorter“
FADD	„factor associated via death domain“
FAN	„factor activating neutral sphingomyelinase“
Fas-L	Fas-Ligand; CD95-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FIP-1	„14.7K-interacting protein-1“
FIP-2	„14.7K-interacting protein-2“
FIP-3	„14.7K-interacting protein-3“; NEMO; IKK γ
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	„forward scatter“
GAP	„GTPase activating protein“
GDI	„GDP-dissociation inhibitor“
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„guaninidin nucleotide exchange factor“
GIP-1	„GTPase-interacting protein“
GPCR	„g-protein-coupled receptor“
Grb2	„growth-factor-receptor-bound protein 2“
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N`-(4-Butan-Sulfonsäure)
HRP	„horseradish peroxidase“
ICE	„interleukin-1 β -converting enzyme“
IGF-II	„insulin growth factor 2“
IFN- γ	Interferon-gamma
IKK- β	„inhibitor of κ B (I κ B) kinase“
IL-1	Interleukin-1
kD	Kilodalton

LAMP-1	„lysosomal membrane glycoprotein 1“
LAMP-2	„lysosomal membrane glycoprotein 2“
LDL	„low-density lipoprotein“
LV	Leervektor
MVB	„multivesicular body“
NEMO	„NF- κ B essential modulator“
NF- κ B	„nuclear factor kappa-B“
NGF	„nerve growth factor“
NGFR	„nerve growth factor receptor“
NIK	„NF- κ B-inducing kinase“
NSD	neutrale Sphingomyelinase Domäne
N-SMase	neutrale Sphingomyelinase
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein
p53	Transkriptionsfaktor Protein 53
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PLAD	„pre-ligand-binding assembly domain“
Rab	„ras-associated in brain“
RANKL	„receptor activator of NF- κ B ligand“
Ras	„rat sarcoma“
RID- α	„receptor internalization and degradation alpha“
RID- β	„receptor internalization and degradation beta“
Rim1	„regulating synapse membrane exocytosis 1“
RIP	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin Kinase 1
RPM	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Shc	„SH2 (Src-homology 2)-domain-containing transforming protein“
SNARE	soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein) accessory protein (SNAP) receptor“
SSC	„side scatter“
TACE	„TNF- α converting enzyme“; ADAM-17
tBid	„truncated Bid“; 17kD Isoform
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TGF- α	„transforming growth factor- α “
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TGN38	„Trans-Golgi-Network protein 38kD“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNFSF1A	„tumor necrosis factor superfamily member 1A“
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1

TNF-R2	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 2
TRADD	„TNF-receptor associated death domain“
TRAF1	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 1
TRAF2	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 2
TRID	TNF-Rezeptor Internalisierungs Domäne
TRAIL	„TNF-related apoptosis inducing ligand“
TRAIL-R1	„TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1“
TRANCE	„tumor necrosis factor-related activation induced cytokine“
t-SNARE	„target-membrane soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein) accessory protein (SNAP) receptor“
v-SNARE	„vesicle-membrane soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive-fusion protein) accessory protein (SNAP) receptor“
Vti1a	„vesicle transport through interaction with t-SNAREs homologue 1a“
Vti1b	„vesicle transport through interaction with t-SNAREs homologue 1b“

1. Einleitung

1.1 Die Apoptose

1.1.1 Apoptose, der programmierte Zelltod

Überschüssige oder krankhaft veränderte Zellen, die ihre Funktion im Organismus erfüllt haben, sterben nach einem genetisch festgelegten Programm. Dieser programmierte Zelltod wird als Apoptose bezeichnet. Bereits im 19. Jahrhundert erkannte man, dass Zellen durch einen „programmierten“ Tod sterben können (Vogt, 1842). Der Begriff der Apoptose wurde jedoch erst im Jahre 1972 durch Kerr et al. geprägt, der an toxinbehandelten Leberzellen eine den sterbenden Embryonalzellen ähnliche Morphologie beobachtete (Kerr et al., 1972).

Die Apoptose ist durch eine Vielzahl morphologischer und biochemischer Veränderungen apoptotischer Zellen definiert. Dazu zählt ein Ablösen der Zelle aus dem Gewebeverband hervorgerufen durch ein Schrumpfen infolge eines aktiven Ausstoßes von K^+ und Cl^- und einer Kontraktion von Mikrofilamenten. Weiterhin kommt es zu einer Kondensation des Chromatins, welches sich im weiteren Verlauf in der Zellkernperipherie sammelt. Die DNA wird durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen geschnitten, wodurch Fragmente von ca. 200bp Länge entstehen. Intrazellulär sind ein rapider Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und eine Ansäuerung des Zytoplasmas zu beobachten. Durch Verlust der Membranintegrität kommt es zu Ausstülpungen der Plasmamembran („membrane blebbing“) und zur Bildung membranumschlossener Zellbestandteile (sog. apoptotische Körperchen). Des Weiteren kommt es zur Exposition von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran, was zu einer Attraktion von Makrophagen führt, die die Zelle oder die entstandenen apoptotischen Körperchen phagozytieren (Krammer, 2000; Denecker et al., 2001).

Erste Hinweise auf die Existenz eines programmierten Zelltodes stammten aus Untersuchungen des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Während der Entwicklung dieses Nematoden sterben genau 131 der 1090 somatischen Zellen durch Apoptose. Dieser Prozess ist in jedem Individuum gleich und geschieht ohne eine Schädigung des Organismus. Durch Mutationsanalysen konnten in *C. elegans* verschiedene Gene identifiziert werden, die die Apoptose regulierend beeinflussen (Horvitz et al., 1983). In der Folgezeit wurden homologe Gene auch in Säugerzellen identifiziert (Zou et al., 1997).

1.1.2 Die physiologische Bedeutung der Apoptose

Seit der Entdeckung der Apoptose sind eine Vielzahl biologischer Prozesse mit der Apoptose in Verbindung gebracht worden. Die Apoptose ist der Hauptmechanismus, über den im Immunsystem autoreaktive oder nicht mehr benötigte Immunzellen entfernt werden (Shortman et al., 1990). T-Zellen, die potentiell autoreaktiv sind werden durch einen apoptotischen Prozess eliminiert, den man negative Selektion nennt (Fowlkes et al., 1988). Auf eine ähnliche Weise werden B-Zellen durch Apoptose beseitigt, die einen nicht funktionellen B-Zellrezeptor tragen (Osmond, 1993). Überschüssige T-Zellen, die nach Beendigung einer Immunantwort nicht mehr benötigt werden, werden durch einen

Mechanismus eliminiert, der aktivierungsinduzierter Zelltod genannt wird („activation induced cell death“, AICD) (Dhein et al., 1995; Peter et al., 1997).

Weiterhin spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der ontogenetischen Entwicklung von Vertebraten (Jacobson et al., 1997). So wird beispielsweise die Entwicklung der Phalangen in höheren Vertebraten durch Apoptose gesteuert, indem die Zellen zwischen den sich bildenden Phalangen eliminiert werden. Ebenfalls eine wichtige Funktion besitzt die Apoptose bei der Regulierung der Zellzahl in Organen. Im Nervensystem der Vertebraten werden Neuronen und Oligodendrozyten stets im Überschuss produziert. Ungefähr die Hälfte der gebildeten Zellen wird durch Apoptose entfernt (Barde, 1989; Oppenheim, 1991).

Eine der wichtigsten Aufgaben der Apoptose in Vertebraten ist die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Dazu zählt die Entfernung alter, entarteter, potentiell gefährlicher und infizierter Zellen (Jacobson et al., 1997). Diese Aufgabe übernehmen meist zytotoxische T-Zellen (Krammer, 2001).

Eine gestörte oder nicht funktionierende Apoptose ist Ursache vieler Krankheitssymptome (Krammer, 2001). Mäuse, die einen genetischen Defekt im CD95-Gen aufweisen und somit keine CD95-induzierte Apoptose mehr ausführen können, zeigen eine Vergrößerung von Lymphknoten und Milz, sowie Autoimmunsymptome. Auch beim Menschen sind Mutationen des CD95-Systems beschrieben (Fisher, 1995). Sie führen wie die Mausmutation zur Ausbildung eines autoimmun-lymphoproliferativen Syndroms (ALPS).

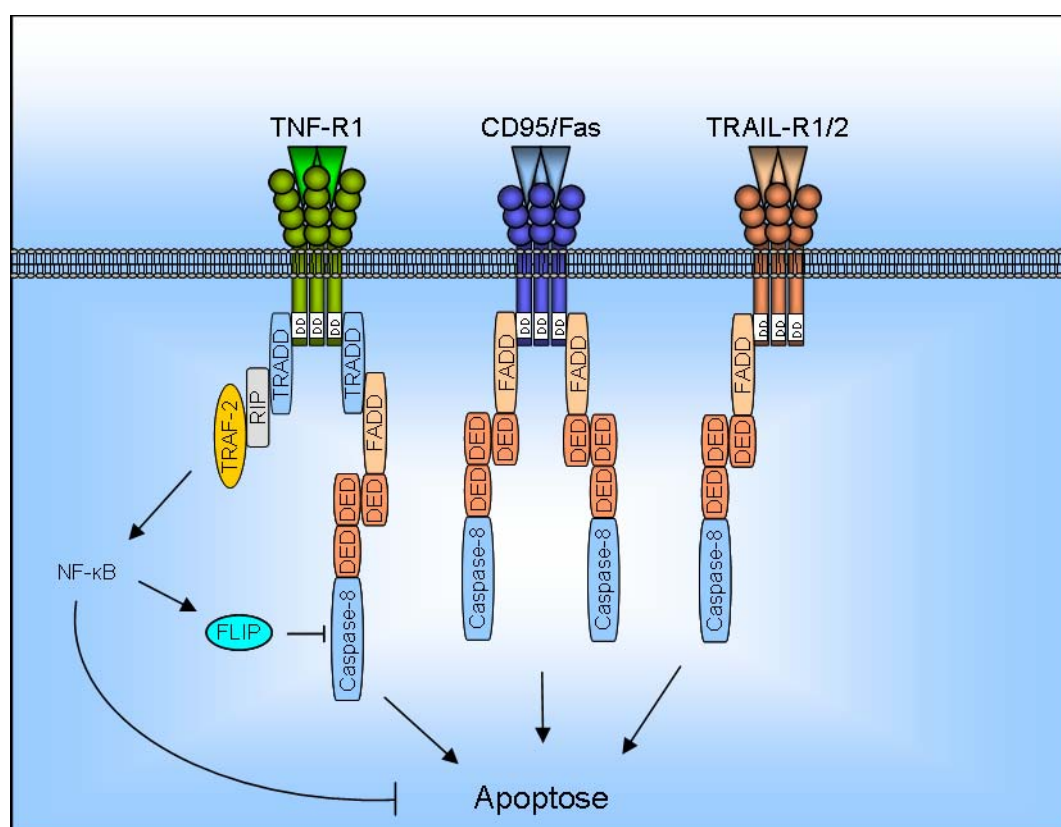
1.1.3 Todesrezeptoren

Apoptose kann in Zellen auf verschiedene Arten ausgelöst werden. Zum einen kann Apoptose passiv, z.B. durch Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden. Zum anderen führen aktive Mechanismen wie Rezeptor-Liganden Interaktion oder innere Schädigungen der Zellen zur Auslösung apoptotischer Programme.

Einer der Hauptwege zur Initiierung von Apoptose führt über membranständige Rezeptoren, so genannte Todesrezeptoren. Die Bindung der entsprechenden Liganden an diese Rezeptoren löst einen intrazellulären Signaltransduktionsprozess aus, an dessen Ende der apoptotische Zelltod steht. Diese Apoptose vermittelnden Liganden gehören zur so genannten TNF-Superfamilie der Zytokine. Die TNF-Superfamilie umfasst 19 bisher identifizierte Liganden wie z.B. TNF- α (Tumor Nekrose Faktor, TNF) und TNF- β , Fas-L, CD27, CD30, CD40, TRAIL, TRANCE und RANKL (Aggarwal, 2003). Viele dieser Zytokine, wie z.B. TNF und Fas-L werden als membranständige Formen synthetisiert und an die Plasmamembran transportiert. Durch Abspaltung eines Teils mittels Metalloproteinasen kommt es zur Freisetzung der löslichen Form in den extrazellulären Raum (Gearing et al., 1994).

Die Liganden der TNF-Superfamilie vermitteln ihre Signale über 29 bisher bekannte Rezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie. Zu dieser TNF-Rezeptor Superfamilie gehören Rezeptoren wie z.B. TNF-R1 und TNF-R2, CD95 (Fas), TRAIL-R1 und NGFR (Aggarwal, 2003). Die TNF-Rezeptor Superfamilie lässt sich in zwei Gruppen unterteilen: 1. Rezeptoren mit „death Domain“ (DD), welche als Todesrezeptoren bekannt sind, und 2. Rezeptoren ohne DD. Die DD ist eine ca. 80 Aminosäuren lange Domäne im zytoplasmatischen Teil der Todesrezeptoren und weist bei allen Mitgliedern eine

große Homologie auf. Bisher konnte eine DD bei acht Mitgliedern der TNF-Rezeptor Superfamilie identifiziert werden. Dazu zählen TNF-R1, CD95 (Fas), DR3, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DR6, EDAR und NGFR (Tartaglia et al., 1993; Schulze-Osthoff et al., 1998; Aggarwal, 2003). Die DD kann Adapterproteine binden, die ebenfalls eine DD besitzen. Die am besten charakterisierten Todesrezeptoren TNF-R1, CD95 sowie DR4 und DR5 vermitteln intrazelluläre Signale über einen Komplex, der als DISC („death inducing signaling complex“) bezeichnet wird. Nach Bindung des Liganden kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors und somit zu einer Konformationsänderung in dem zytoplasmatischen Teil, was die Rekrutierung des DISC an den Rezeptor auslöst. Nach Bindung des CD95 Liganden an den CD95 Rezeptor bindet das Adapterprotein FADD („Fas-associated via death domain“) an die DD des Rezeptors. Über seine DED („death effector domain“) kann FADD die Caspase-8 rekrutieren. Durch autoproteolytische Spaltung der Caspase-8 kommt es zu einer Aktivierung und im Folgenden zu einer Induktion nachgeschalteter Signalwege. Der DISC des TNF-R1 unterscheidet sich von dem DISC der anderen Rezeptoren, da nach Trimerisierung des Rezeptors zunächst das Adapterprotein TRADD („TNF-receptor associated death domain“) an den Rezeptor bindet. TRADD ist dann in der Lage FADD zu binden, wodurch die Aktivierung der Caspasen ausgelöst wird (s.o.).



Schema 1: Zusammensetzung des DISC bei den Todesrezeptoren TNF-R1, CD95/Fas und TRAIL-R1 und 2
Die Bindung von Liganden an die Todesrezeptoren TNF-R1, CD95/Fas und TRAIL-R1/2 initiiert die intrazelluläre Bindung von Adaptermolekülen an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors und führt zur Apoptose. (Danial et al., 2004, verändert)

1.1.4 TNF- α und die TNF-Rezeptoren 1 und 2

Das Zytokin TNF- α wurde erstmals 1985 aus einer humanen myeloiden Zelllinie isoliert und charakterisiert (Aggarwal et al., 1985). TNF- α wird als 233 Aminosäuren langes und 26kD großes Transmembranprotein hauptsächlich von aktivierten Makrophagen synthetisiert (McEwan, 2001). Nach Spaltung durch die Matrixmetalloproteinase TACE („TNF- α converting enzyme“, ADAM17) wird TNF- α von der Zelloberfläche losgelöst und liegt als lösliche 17kD Form vor (Aggarwal, 2003).

Die Wirkung von TNF- α auf den Organismus ist vielschichtig. Zum einen ist TNF- α eins der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine. Zum anderen besitzt TNF- α eine wichtige Funktion bei der Bekämpfung von Tumorzellen, bei der Differenzierung und Überwachung des Immunsystems, bei der Hämatopoiese und der erworbenen Immunität (Aggarwal, 2003). Weiterhin sichert TNF- α die Funktion zytotoxischer T-Zellen bei der Bekämpfung Virus infizierter Zellen und liefert eine Protektion gegen mikrobielle Infektionen.

Auf der anderen Seite kann TNF- α zur Tumorentstehung beitragen, indem es die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördert (Aggarwal, 2003).

Die zuerst beschriebene Funktion von TNF- α und somit auch die Namensgebung sind auf die antitumorale Wirkung von TNF- α auf murine Tumore zurückzuführen (Old, 1988). Aufgrund der starken Zytotoxizität von TNF- α gegenüber einigen Tumorzelllinien *in vitro* wurde lange angenommen, TNF- α sei ein breit einsetzbares antitumorales Agens (Sugarman et al., 1985). Heute ist jedoch bekannt, dass diese Wirkung von TNF- α mehr auf einer Zusammenarbeit zwischen TNF- α und einer funktionierenden Immunantwort beruht, als auf einer spezifischen tumorinhibierenden Aktivität von TNF- α (Hock et al., 1993).

Diese beschriebenen pleiotropen Wirkungen von TNF- α auf den Organismus werden über lediglich zwei Rezeptoren vermittelt. Diese zwei Rezeptoren TNF-R1 („TNF receptor type 1“; CD120a; p55/60) und TNF-R2 („TNF receptor type 2“; CD120b; p75/80) binden sowohl membrangebundenes TNF- α , als auch lösliches TNF- α (Wajant et al., 2003). Die Affinität zu löslichem TNF- α ist für den TNF-R1 wesentlich größer als für den TNF-R2, während umgekehrt die Affinität für membrangebundenes TNF- α für den TNF-R2 größer ist (Grell et al., 1998). Beide Rezeptoren sind durch das Vorhandensein von vier extrazellulären cysteinreichen Domänen gekennzeichnet, die den trimerisierten TNF- α Liganden binden (Naismith et al., 1998; Banner et al., 1993). Die distale cysteinreiche Domäne kann in Abwesenheit des Liganden zu einer Interaktion mehrerer TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche führen, weswegen sie auch als „preligand assembly domain“ (PLAD) bezeichnet wird (Chan et al., 2000). Während die extrazellulären Domänen von TNF-R1 und TNF-R2 eine hohe Homologie aufweisen, unterscheiden sich die intrazellulären Domänen sehr deutlich voneinander. Im zytoplasmatischen Teil des TNF-R1 nahe des N-Terminus liegt die ca. 80 AS lange „death domain“ (DD). Über die DD können Proteine gebunden werden, die ebenfalls eine DD besitzen. Einer der wesentlichen Unterschiede zwischen TNF-R1 und TNF-R2 ist das Fehlen einer „death domain“ im intrazellulären Teil des TNF-R2 (McEwan, 2002). Eine weitere C-terminal von der DD im TNF-R1 gelegene Domäne ist die „neutral SMase activation domain“ (NSD) (Adam et al., 1996). Die NSD bindet das Adapterprotein FAN („factor associated with neutral SMase activation“), welches die N-SMase aktiviert (Adam-Klages et al., 1996). N-terminal von der Transmembrandomäne konnte eine

weitere Domäne im TNF-R1 identifiziert werden. Die TRID Domäne (TRID: „TNF receptor internalization domain“) ist essentiell für die Internalisierung des TNF-R1 (Schneider-Brachert et al., 2004). Über die zytoplasmatischen Domänen des TNF-R2 ist nur wenig bekannt. Lange wurde angenommen, der TNF-R1 vermittele aufgrund der DD Apoptose und der TNF-R2 vermittele Proliferation aufgrund des Fehlens der DD. Andere Berichte gehen davon aus, dass die biologischen Funktionen beider Rezeptoren durch deren Interaktion vermittelt werden (Weiss et al., 1998). Der TNF-R1 von allen Körperzellen exprimiert, während der TNF-R2 nur auf Zellen des Immunsystems vorkommt (Wajant, 2003).

1.1.5 Die intrazelluläre Signalweiterleitung von TNF-R1 und TNF-R2

Nach Bindung des Liganden TNF- α an die TNF-Rezeptoren 1 oder 2 werden über deren zytoplasmatische Domänen diverse intrazelluläre Signalwege initialisiert. Da kein Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie eine enzymatische Aktivität besitzt, werden alle Signale über Adapterproteine vermittelt (Aggarwal, 2003). Eine direkte Bindung an die TNF-Rezeptoren konnte bisher für TRAF-Proteine und das Adapterprotein TRADD gezeigt werden. Die Gruppe der TRAF-Proteine („TNF-receptor-associated factor“) besteht aus bisher 6 bekannten Mitgliedern (McEwan, 2002). TRAF1 und TRAF2 binden direkt an die zytoplasmatische Domäne des TNF-R2 (Rothe et al., 1994). Über einen Heterokomplex aus TRAF1 und TRAF2 können die proapoptotischen Proteine c-IAP1 (IAP: „inhibitor of apoptosis protein“) und c-IAP2 an den TNF-R2 binden (Rothe et al., 1995). Eine direkte Bindung von TRAF-Proteinen an den TNF-R1 konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Das Adapterprotein RIP („receptor interacting protein“) wurde ursprünglich als Fas-Rezeptor bindendes Protein identifiziert, interagiert aber ebenfalls mit dem TNF-R1 (Hsu et al., 1996). RIP bindet TRAF2 und sorgt somit für die Bindung von TRAF2 an den TNF-R1. Das Adapterprotein TRADD („TNF-receptor-associated death domain“) bindet direkt an die „death domain“ des TNF-R1 (Hsu et al., 1995) und vermittelt unter anderem die Bindung von FADD („Fas associated death domain“) oder TRAF2 an den TNF-R1. Die Bindung von TRAF2 an den TNF-R1 induziert über einen nachgeschalteten Signalweg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B („nuclear factor- κ B“). NF- κ B transloziert nach Degradation des Inhibitors I κ B in den Nukleus und vermittelt dort zusammen mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 die Bildung antiapoptotischer Proteine (Micheau et al., 2001).

Während somit über TRAF-2 vorwiegend antiapoptotische Signalwege aktiviert werden, induziert die Bindung von TRADD und FADD an den TNF-R1 proapoptotische Signale. FADD besitzt neben der „death domain“, welche die Bindung an TRADD, und somit an den TNF-R1 vermittelt, eine „death effector domain“ (DED) (Chinnaiyan et al., 1995). Diese DED interagiert mit der DED der Caspase-8 und bildet somit den DISC am TNF-R1, bestehend aus TRADD, FADD und Caspase-8 (Muzio, 1996). Durch die Aktivierung der Caspase-8 am DISC werden zwei proapoptotische Signalwege initiiert, die als Typ1-Apoptose (extrinsischer Weg) und Typ2-Apoptose (intrinsischer Weg) bekannt sind (Scaffidi et al., 1998). Während der Typ1-Apoptose kommt es durch autokatalytische Spaltung der Procaspase-8 zur Generierung großer Mengen aktiver Caspase-8 am DISC. Die aktive Caspase-8 aktiviert daraufhin die Effektorcaspasen -3 und/oder -7, die zelluläre Strukturproteine spalten und somit für die Morphologie apoptotischer Zellen verantwortlich sind (Hirata et al., 1998; Peter und Kramer, 1998).

Im Rahmen der Typ2-Apoptose kommt es zu einer geringeren autokatalytischen Spaltung von Caspase-8 am DISC, da vermutlich der DISC nicht so effektiv gebildet werden kann (Peter und Kramer, 2003). Die Typ2-Apoptose verläuft in den Zellen über die Mitochondrien. Die aktive Caspase-8 spaltet Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie. Es entsteht eine 15kD große Spaltform tBid („truncated bid“) die an die Mitochondrien transloziert und dort über Bildung von Heterodimeren mit Bax die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum induziert (Gross et al., 1999; Desagher et al., 1999). Das freigesetzte Cytochrom c komplexiert im Zytoplasma mit dem Adapterprotein Apaf-1 („apoptotic protease activating factor 1“) und bildet zusammen mit ATP das so genannte Apoptosom (Green und Reed, 1998; Cain et al., 1999). Die aktivierte Caspase-9 vermittelt die Aktivierung der Caspase-3, welche dann wiederum weitere Caspasen aktiviert (Slee et al., 1999; Sun et al., 1999).

Schütze et al. 1999 konnten erstmals zeigen, dass die Internalisierung des TNF-R1 essentiell für die Auslösung der TNF-R1 induzierten Apoptose ist. Micheau und Tschopp beschrieben 2003 die räumliche Trennung von NF- κ B induzierenden Signalen und Apoptose induzierenden Signalen. Sie postulierten ein Modell, in dem nach Bindung von TNF an den TNF-R1 zwei TNF-R1 Komplexe, ein membranständiger Komplex 1 und ein intrazellulärer Komplex 2, unterschiedliche Signale induzieren. Komplex 1 ist an der Plasmamembran lokalisiert und besteht aus dem TNF-R1, RIP, TRADD und TRAF2 und vermittelt ein NF- κ B induzierendes Signal. RIP, TRADD und TRAF2 werden von dem TNF-R1 durch Modifikation abgelöst und binden im Zytoplasma an FADD und Caspase-8. Dies wird als Komplex 2 bezeichnet und vermittelt über die Aktivierung der Caspase-Kaskade Apoptose. Nach diesem Modell wird der TNF-R1 nach der Abtrennung der Adapterproteine internalisiert (Micheau und Tschopp, 2003) (s. Schema 2).

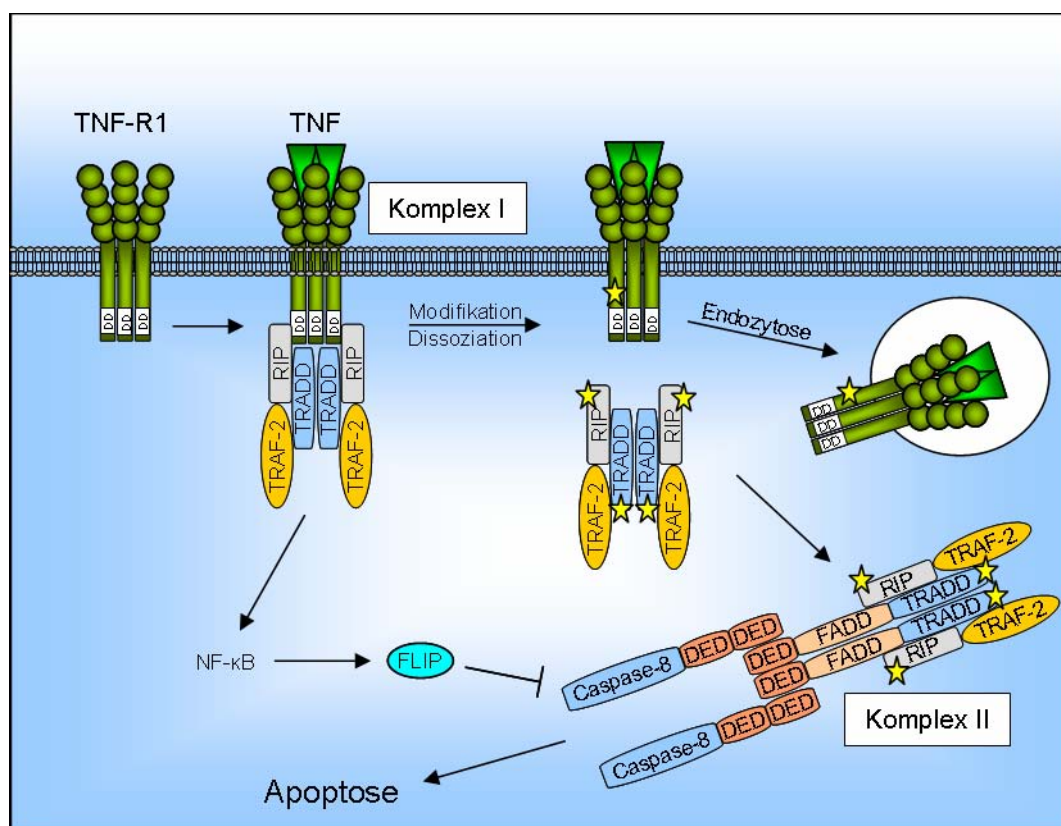
In letzter Zeit sind immer mehr Hinweise auf einen möglichen dritten über TNF- α und den TNF-R1 induzierten Signalweg bekannt geworden. Die Bindung von TNF- α an den TNF-R1 führt zu einer Aktivierung sowohl der neutralen Sphingomyelinase (N-SMase) als auch der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) (Schütze et al., 1992; Wiegmann et al., 1994; Cifone et al., 1995; Liu und Anderson, 1995). Das von der A-SMase gebildete Ceramid bindet an die lysosomale Protease Cathepsin D (CatD) und führt sowohl zu einer beschleunigten Autoproteolyse der 52kD Proform, als auch zu einer verstärkten enzymatischen Aktivität der aktiven 32kD Form (Heinrich et al., 2003). Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung lysosomaler Proteasen an der TNF-induzierten Apoptose.

1.1.6 Die Rolle von Proteasen in der Apoptose

1.1.6.1 Die Rolle der Caspasen

Frühe Studien an dem Nematoden *C.elegans* führten zur Entdeckung mehrerer Gene und Genprodukte, die für die Apoptose verantwortlich sind. Es zeigte sich, dass das in Nematoden proapoptotische Protein CED-3 eine Homologie zu dem in Säugern vorkommenden Protein „interleukin-1 β -converting-enzyme“ (ICE; Caspase-1) besitzt (Yuan et al., 1993; Thornberry et al., 1992). Diese Entdeckung führte in der darauf folgenden Zeit zu einer Identifizierung mehrerer ICE ähnlicher Proteine und deren Einordnung in die Proteinfamilie der Caspasen. Obwohl die Caspase-1 zwar nicht direkt etwas mit dem Zelltodgeschehen zu tun hatte, wurde doch klar, dass Caspasen eine

wichtige Rolle bei apoptotischen und inflammatorischen Prozessen spielen (Thornberry und Lazebnik, 1998).



Schema 2: Modell der Apoptoseinduktion durch den TNF-R1 nach Micheau und Tschopp, 2003

Die Bindung von TNF an den TNF-R1 führt zur Bildung eines Adapterproteinkomplexes „Komplex 1“, der zur Aktivierung von NF-κB beiträgt. Durch Modifikation spaltet sich der Komplex vom Rezeptor ab und bildet einen zytoplasmatischen „Komplex 2“, der die Apoptose induziert. Der TNF-R1 wird nach Abspaltung des Komplex 1 endozytiert. (Micheau und Tschopp, 2003, verändert)

Caspasen sind Enzyme, die ein Cystein im katalytisch aktiven Zentrum besitzen und spezifisch nach Aspartatresten schneiden (**Cytein-Aspartat-Proteinasen**) (Thornberry et al., 1997). Alle Mitglieder der Caspasefamilie besitzen Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz, der Molekülstruktur und ihrer Substratspezifität (Nicholson und Thornberry, 1997). Sie werden als Proenzyme, so genannte Zymogene gebildet, welche aus drei Untereinheiten bestehen: Einer NH₂-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (ca. 20kD) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10kD).

Aufgrund ihrer Funktion im apoptotischen Geschehen kann man 1. Initiatorcaspasen und 2. Effektorcaspasen unterscheiden: Initiatorcaspasen sind durch das Vorhandensein einer langen N-terminalen Prodomäne, einer DED („death effector domain“) Domäne oder einer CARD („caspase recruitment domain“) Domäne gekennzeichnet. Die DED Domäne vermittelt die Bindung der Caspasen an rezeptorgebundene Adapterproteine, die entsprechende Domänen tragen. Am Rezeptor kommt es aufgrund der lokal sehr hohen Konzentration von Procaspasen zu einer Aktivierung durch

autokatalytischen Spaltung (Hengartner, 2000). Die CARD Domäne vermittelt über CARD-CARD Bindungen die Komplexierung von Procaspasen mit intrazellulären Adaptermolekülen. Dieser Komplex aktiviert daraufhin die Procaspasen. Als Initiatorcaspasen werden heute die Caspasen 8, 9 und 10 angesehen (Earnshaw et al., 1999). Effektorcaspasen besitzen im Gegensatz zu den Initiatorcaspasen eine kurze N-terminale Prodomäne und sind durch das Fehlen von DED oder CARD Domänen gekennzeichnet. Sie liegen meist zytosolisch in inaktiven Heterodimeren vor und können durch Caspasen oder andere Proteasen gespalten und somit aktiviert werden. Nach erfolgter Aktivierung vermitteln Effektorcaspasen die Spaltung einer Reihe von Substraten wie Kern- und Strukturproteinen. Zur Gruppe der Effektorcaspasen zählt man die Caspasen 3, 6 und 7.

Die Aktivierung von Procaspasen kann durch drei Mechanismen vollzogen werden. Zum einen können die Procaspasen durch andere Caspasen oder Proteasen durch Proteolyse aktiviert werden. Die Procaspase wird zwischen der Prodomäne und der großen Untereinheit, sowie zwischen der großen und kleinen Untereinheit gespalten. Anschließend lagern sich die große und die kleine Untereinheit zu einem aktiven Heterodimer mit einem katalytischen Zentrum zusammen. Zwei Heterodimere bilden daraufhin ein Tetramer mit zwei unabhängig voneinander agierenden aktiven Zentren (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994; Rotonda et al., 1996). Dieser Aktivierungsmechanismus findet sich hauptsächlich bei der Gruppe der Effektorcaspasen, die durch Initiatorcaspasen aktiviert werden. Der zweite Mechanismus beschreibt die Aktivierung der Caspasen durch Bindung an Todesrezeptoren, wie z.B. Fas oder TNF-R1. Über diesen Mechanismus werden Initiatorcaspasen, wie z.B. Caspase-8 aktiviert. Die Procaspasen werden über Adapterproteine an die Todesrezeptoren gebunden, wobei es zu einer lokal stark erhöhten Caspasekonzentration kommt. Durch autokatalytische Spaltung aktivieren sich die Procaspasen gegenseitig. Diese Hypothese wird als „induced proximity model“ bezeichnet (Muzio et al., 1998). Der dritte Mechanismus der Caspaseaktivierung verläuft über intrazelluläre Adapterproteine, die mit Procaspasen komplexieren, und so eine Aktivierung der Caspasen hervorrufen. Über diesen Mechanismus wird die Caspase-9 aktiviert. Aus den Mitochondrien entlassenes Cytochrom c komplexiert im Zytoplasma mit dem Adaptermolekül Apaf-1, ATP und der Procaspase-9. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und vermittelt die Aktivierung von Caspase-9 (Cain et al., 1999).

1.1.6.2 Die Rolle der Cathepsine

Neben den Caspasen sind neuerdings viele andere Proteasen bekannt, die eine Funktion in der Apoptose ausüben. Zu diesen beteiligten Proteasen zählen Cathepsine, Calpaine und Granzyme.

Die Gruppe der Cathepsine umfasst 12 bekannte Mitglieder, die sich aufgrund ihrer Aminosäuren im aktiven Zentrum in drei Gruppen unterteilen lassen: 1. Serinproteasen (Cathepsin A und G), 2. Cysteinproteasen (Cathepsin B, C, H, K, L, S und T) und 3. Aspartatproteasen (Cathepsin D und E) (Johnson, 2000). Alle Cathepsine sind intralysosomale Proteasen.

Die Beteiligung der Lysosomen an der Apoptose konnte in den letzten Jahren für verschiedene Stimuli gezeigt werden. Eine Freisetzung lysosomaler Proteasen durch Behandlung mit Chemotherapeutika oder durch Bestrahlung induziert in verschiedenen Zellen Apoptose. Es kommt daraufhin zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), einer Freisetzung von Cytochrom c aus den

Mitochondrien, einer Spaltung von Bid sowie einer Aktivierung der Caspasen-3 und -9 (Öllinger und Brunk, 1995; Brunk et al., 1997, Vancompernelle et al., 1998; Reiners et al., 2002). Eine Beteiligung von Cathepsinen an der Apoptose durch Serumentzug konnte ebenfalls gezeigt werden. So kommt es in PC12 Zellen nach Serumentzug zu einer Freisetzung von Cathepsin B und D in das Zytoplasma, was in den Zellen Apoptose auslöst (Ohsawa et al., 1998; Shibata et al., 1998; Isahara et al., 1999). In den letzten Jahren konnte vielfach nachgewiesen werden, dass Cathepsin B (CatB) und Cathepsin D (CatD) bei der TNF-induzierten Apoptose aus den Lysosomen freigesetzt werden. Die Freisetzung von CatB in das Zytoplasma und die damit verbundene Apoptose konnte durch Behandlung mit CatB-Inhibitoren blockiert werden (Guicciardi et al., 2000). Hepatozyten aus CatB Knockout-Mäusen zeigten sich weniger anfällig für TNF-induzierte Apoptose, als Hepatozyten aus Wildtyp Mäusen.

1.1.6.3 Cathepsin D in der Apoptose

Die Aspartatprotease Cathepsin D (CatD) wird als 52kD Proform am rauen ER synthetisiert und über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor zu den Lysosomen transportiert. Hier erfolgt eine Prozessierung in die schwach enzymatisch aktive 48kD Isoform. Die Hauptaktivierung von CatD geschieht mit der Prozessierung der 48kD Isoform in die enzymatisch aktive 32kD Isoform (Diment et al., 1987). Wird diese weiter abgebaut, entsteht eine inaktive 14kD Isoform.

Der direkte erstmalige Nachweis einer proapoptotischen Funktion von CatD wurde durch Mikroinjektion in das Zytoplasma humaner Fibroblasten erbracht (Roberg et al., 2002). Dies führte unter anderem zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma und zur Aktivierung von Caspasen. Eine Beteiligung von CatD an der Apoptose nach Strahlenbehandlung oder chemotherapeutischer Behandlung konnte bereits in mehreren Fällen nachgewiesen werden (Wu et al., 1998). So führt eine Naphtazarin-induzierte Freisetzung von CatD aus den Lysosomen zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Roberg, 1999). Cathepsin D spielt ebenfalls eine Rolle bei der Apoptose von neuronalen Zellen nach Serumentzug (Isahara et al., 1999). Auch in der durch Todesrezeptoren induzierten Apoptose konnte eine Beteiligung von CatD nachgewiesen werden. So konnte die TNF und Fas-induzierte Apoptose in humanen Fibroblasten durch Inhibition von CatD mittels Antisense cDNA blockiert werden (Deiss et al., 1996).

Eine wesentliche Voraussetzung für die proapoptotische Funktion von CatD ist die Translokation aus den Lysosomen in das Zytoplasma. Diese Translokation konnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Zellen nach Behandlung mit oxidiertem LDL, aber auch nach Behandlung mit Naphtazarin gezeigt werden (Li et al., 1998; Roberg und Öllinger, 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden in Staurosporin behandelten Zellen gezeigt (Johansson et al., 2003).

CatD konnte als Ceramid-bindendes Protein in unserem Labor identifiziert werden (Heinrich et al., 1999). Ceramid wird nach Behandlung von Zellen mit exogenen Stimuli wie z.B. TNF- α , IFN- γ , IL-1, NGF oder Fas von Sphingomyelinasen gebildet. Zellen, die keine saure Sphingomyelinase (A-SMase) mehr besitzen, zeigten in diesen Experimenten eine verringerte CatD-Aktivität (Heinrich et al., 1999). Somit lässt sich eine direkte Verbindung zwischen der exogenen Stimulation von Zellen und intralysosomaler CatD Aktivität herstellen.

1.1.7 Virale Mechanismen der Apoptoseinhibition

Da Viren in ihrem Vermehrungsprozess auf Wirtszellen angewiesen sind, existieren mehrere virale Mechanismen, die die Wirtszelle vor Apoptose schützen. Dieser Schutz beginnt schon außerhalb der Zelle. Von Pockenviren ist bekannt, dass sie drei TNF-Rezeptor Homologe sezernieren (CrmB, CrmC und CrmD), die bereits außerhalb der Zelle an TNF und Lymphotoxin- α binden und somit eine TNF-induzierte Apoptose verhindern (Hu et al., 1994; Smith et al., 1996). Adenoviren codieren für eine Vielzahl von immunsupprimierenden oder -modulierenden Proteinen. Sieben dieser Proteine sind in der E3-Region des viralen Genoms kodiert und werden nach Infektion einer Wirtszelle sehr früh exprimiert. Dazu zählen die Proteine Ad E3-gp19K, Ad E3-6.7K, Ad E3-10.4K (RID- α), Ad E3-11.6K, Ad E3-14.5K (RID- β) und Ad E3-14.7K (Gooding et al., 1991). Eine direkte Beteiligung bei der Inhibition der Apoptose konnte den Proteinen Ad E3-6.7K, Ad E3-10.4K, Ad E3-14.5K und Ad E3-14.7K zugesprochen werden (Benedict et al., 2001; Gooding et al., 1988). Ad E3-10.4K (RID- α) und Ad E3-14.5K (RID- β) bilden einen Komplex, der als so genannter RID-Komplex bekannt ist (RID: „receptor internalisation and degradation“). Dieser RID Komplex sorgt für eine Inhibition der Apoptose durch Todesrezeptoren, wie z.B. TNF-R, Fas und TRAIL-R. Ad E3-6.7K wird eine Beteiligung an der Inhibition der TRAIL-vermittelten Apoptose zugesprochen. (Gooding et al., 1991; Benedict et al., 2001; Shisler et al., 1997). Ad E3-14.7K inhibiert die TNF-induzierte Lyse von Zellen (Gooding et al., 1990) und es zeigt sich, dass das Protein Ad E3-14.7K ein genereller Inhibitor der durch TNF oder Fas vermittelten Apoptose ist (Chen et al., 1998; Li et al., 1998). Deletionen oder Mutationen in dem 14.7K Gen führten dazu, dass Adenovirus infizierte Zellen sensibel gegenüber Fas- oder TNF-induzierter Apoptose wurden (Horton et al., 1991). Experimente mittels Yeast Two-Hybrid Verfahren konnten drei zelluläre Interaktionspartner des Ad E3-14.7K Proteins identifizieren: FIP-1, FIP-2 und FIP-3 (FIP: „14.7K interacting protein“) (Li et al., 1997, 1998, 1999). FIP-1 ist eine GTPase, die mit Mikrotubuli interagiert. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion ist noch nicht ausreichend untersucht. Es wird jedoch vermutet, dass die Interaktion bei der Exozytose von Viren benötigt wird (Lukashok et al., 2000). Ebenso ist die Funktion von FIP-2 noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass FIP-2 die TNF-induzierte Apoptose über RIP beeinflusst (Li et al., 1998). FIP-3 (NEMO/IKK γ) interagiert mit IKK β , RIP und NIK und reguliert die Aktivität von NF- κ B (Li et al., 1999). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Ad E3-14.7K mit der DED von Caspase-8 interagiert, obwohl Ad E3-14.7K selbst keine DED besitzt (Chen et al., 1998). Eine Inhibition der Caspase-8 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Diese Untersuchung liefert einen ersten Hinweis darauf, über welche Mechanismen Ad E3-14.7K die Todesrezeptor induzierte Apoptose blockieren könnte.

1.2 Endozytose und intrazelluläre Signalwege

1.2.1 Die Endozytose

Der Austausch von Makromolekülen mit anderen Zellen oder dem äußeren Milieu verläuft über Prozesse, die als Exozytose (Abgabe von Makromolekülen) und Endozytose (Aufnahme von Makromolekülen) bekannt sind. Die Endozytose beschreibt den Vorgang der Aufnahme von Plasmamembranproteinen, und Lipiden, extrazellulären Molekülen, Flüssigkeiten, Partikeln, Exosomen, Viren und Bakterien in die Zellen. Diese Vorgänge beinhalten auch die Degradation von Plasmamembranproteinen und Rezeptoren.

Allen endozytotischen Prozessen ist gemein, dass sich im Rahmen der Aufnahme extrazellulärer Stoffe Ausstülpungen der Plasmamembran ausbilden, welche sich im weiteren Verlauf von der Plasmamembran abschnüren und als intrazelluläre Vesikel vorliegen. Trotz dieser Gemeinsamkeit sind in Säugetieren mehrere Endozytosemechanismen bekannt. Man unterscheidet demnach die Clathrin vermittelte Endozytose, die Caveolae/Lipid raft vermittelte Endozytose, Clathrin und Caveolae/Lipid raft unabhängige Endozytose, Pinozytose und Phagozytose (Šamay et al., 2004). Die am besten charakterisierten Formen der Endozytose sind die Clathrin vermittelte Endozytose, sowie deren Unterform, die Rezeptor induzierte Clathrin vermittelte Endozytose. Bei dieser Form kommt es zur Ausbildung eines Clathrinkäfigs an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Diese Clathrinkonzentration wird „clathrin coated pit“ genannt. „Clathrin coated pits“ stülpen sich in das Zellinnere ein, werden durch akzessorische Proteine abgetrennt und werden somit zu so genannten „clathrin coated vesicles“ (CCVs) (Marsh et al., 1999)

Membranproteine, wie z.B. Membranrezeptoren, die in CCVs internalisiert werden, besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine oder mehrere Signalsequenzen. Zu diesen Signalsequenzen zählt man 1. Tyrosin-basierte Signale der Form FxNPxY oder YxxØ, 2. Dileucin (LL) enthaltende Signale der Form [DE]XXXL[LI] und DXXLL, 3. phosphorylierte Serinreste am C-terminalen Ende vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) sowie 4. Motive, die nach Liganden induzierter Phosphorylierung von Serinresten die Ubiquitylierung induzieren (Marsh et al., 1999).

Tyrosin-basierte Signale der Form YxxØ finden sich in vielen Transmembranrezeptoren wie z.B. dem EGF-Rezeptor, dem Transferrinrezeptor oder dem Asialoglycoproteinrezeptor und sind für deren Endozytose von der Plasmamembran verantwortlich (Canfield et al., 1991). Sie finden sich jedoch auch in intrazellulären Rezeptoren wie den Mannose-6-Phosphat Rezeptoren, integralen lysosomalen Membranproteinen wie LAMP-1 und LAMP-2 und in Proteinen des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN), wie z.B. TGN38 und Furin, wo sie unter anderem für den Transport von Rezeptoren zu Lysosomen verantwortlich sind (Bonifacino et al., 2003; Matter und Mellmann, 1994; Mellman, 1996).

Die zytoplasmatischen Sequenzen innerhalb der Transmembranrezeptoren können von verschiedenen Adapterproteinen erkannt werden. Im Falle des YxxØ Motivs bindet der Adapterproteinkomplex AP-2 an das Motiv (Marsh et al., 1999). Dies konnte durch Untersuchungen mittels Yeast Two-Hybrid System gezeigt werden, in denen nach Bindungspartnern für TGN38 gesucht wurde (Ohno et al., 1995).

Der Adapterproteinkomplex AP-2 besteht aus zwei ca. 100kD großen Untereinheiten (α -Adaptin, β 2-Adaptin), einer ca. 50kD großen Untereinheit (μ 2-Adaptin) und einer ca. 20kD großen Untereinheit (σ 2-Adaptin). Das μ 2-Adaptin konnte als direkter Bindungspartner des Yxx Φ Motivs identifiziert werden (Ohno et al., 1995). α -Adaptin vermittelt die Bindung weiterer für die Endozytose erforderlicher Proteine wie z.B. Amphiphysin (Marsh et al., 1999). Amphiphysin wiederum bindet die GTPase Dynamin, die für die Abschnürung invaginierter Plasmamembranen sorgt (s.u.). Außerdem scheint α -Adaptin für die Bindung des Proteinkomplexes an die Plasmamembran verantwortlich zu sein (Nakatsu und Ohno, 2003). Die kleinste Untereinheit des Proteinkomplexes, σ 2-Adaptin, ist vermutlich für die Stabilität des AP-2 Komplexes verantwortlich (Collins et al., 2002). β 2-Adaptin schließlich bindet direkt an Clathrin und ist somit essentiell für die Ausbildung der Käfigstruktur, die ein neu gebildetes Vesikel umgibt (Marsh et al., 1999).

Damit ein „clathrin coated pit“ zu einem „clathrin coated vesicle“ werden kann, müssen die eingestülpten Membranbestandteile von der Plasmamembran abgetrennt werden. Diese Funktion übernehmen GTPasen der Dynamin-Familie. Erste Befunde zur möglichen Funktion von Dynamin bei der Endozytose stammten aus Untersuchungen der Drosophila Mutante *shibire* (Tsuruhara et al., 1990). Mutationen im *shibire* Gen führten dazu, dass die Endozytose synaptischer Vesikel blockiert war. Das Produkt des *shibire* Gens wurde später als Dynamin identifiziert. Bei der Abschnürung von Vesikeln kommt es zu einer Ringbildung mehrerer Dynamin-Moleküle um die „Halsregion“ der Membraneinstülpung. Eine synchrone Konformationsveränderung der Dynaminmoleküle führt zu einer Schließung des Ringes und somit zur Abtrennung des Vesikels (Hinshaw und Schmid, 1995).

Kurz nach der Abtrennung neu gebildeter Vesikel werden die Hüllproteine von dem Vesikel entfernt. Dies ist eine Voraussetzung für die weitere Fusion mit anderen intrazellulären Vesikeln (Schlossman et al., 1984).

1.2.2 Intrazellulärer Transport von Vesikeln – der endozytische Weg

Internalisierte Makromoleküle und Rezeptoren liegen nach erfolgter Abschnürung von der Plasmamembran in kleinen Vesikeln vor. Diese Vesikel fusionieren schnell mit frühen Endosomen. Das frühe Endosom, auch „sorting endosome“ genannt, besteht aus tubulären und vesikulären Elementen und besitzt die Fähigkeit, mit anderen frühen Endosomen zu fusionieren (Gruenberg et al., 1989). Während die vesikulären Elemente als „endosomal carrier vesicles“ (ECVs) bekannt sind, die Stoffe aus dem frühen Endosom zur Degradation in späte Endosomen transportieren, findet in den tubulären Elementen das schnelle Recycling von Oberflächenrezeptoren statt. In Untersuchungen des LDL-Rezeptors (LDL: „low density lipoprotein“) konnte gezeigt werden, dass es in frühen Endosomen aufgrund einer Ansäuerung des Lumens zu einer Trennung der Rezeptor-Ligand Interaktion kommt (Goldstein et al., 1985). Andere Liganden, wie z.B. EGF, PDGF und NGF scheinen dagegen nicht von ihren Rezeptoren getrennt zu werden und liegen weiterhin als Komplexe in Endosomen vor (Sorkin et al., 1988, 1993). Die Bindung von Ligand und Rezeptor hält die Rezeptoren auch in Endosomen noch aktiv. So können die internalisierten Rezeptoren auch intrazellulär Signale induzieren. Zu dem frühen Endosom gehört ebenfalls das perinukleär lokalisierte und mit Mikrotubuli assoziierte „endocytic recycling compartment“ (ERC) (Yamashiro, 1984). Das ERC empfängt Material in Form von

Transportvesikeln aus dem „sorting endosome“ und transportiert es zur Plasmamembran weiter (Maxfield und McGraw, 2004).

Rezeptoren und Makromoleküle, die zur Degradation in Lysosomen vorgesehen sind, gelangen in die vesikulären Bereiche des frühen Endosoms und somit in ECVs. Diese ECVs schnüren sich vom frühen Endosom ab und wandern zu späten Endosomen, die weiter perinukleär lokalisiert sind. Die ca. 300-400nm großen ECVs unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur, als auch in ihrem pH-Wert deutlich von frühen als auch späten Endosomen (Gruenberg, 2001). ECVs werden auch als „multivesicular bodies“ (MVBs) bezeichnet, da sie zwei morphologisch sichtbare Membrandomänen besitzen: eine äußere Membran und innere Membraneinstülpungen (Gruenberg, 2001).

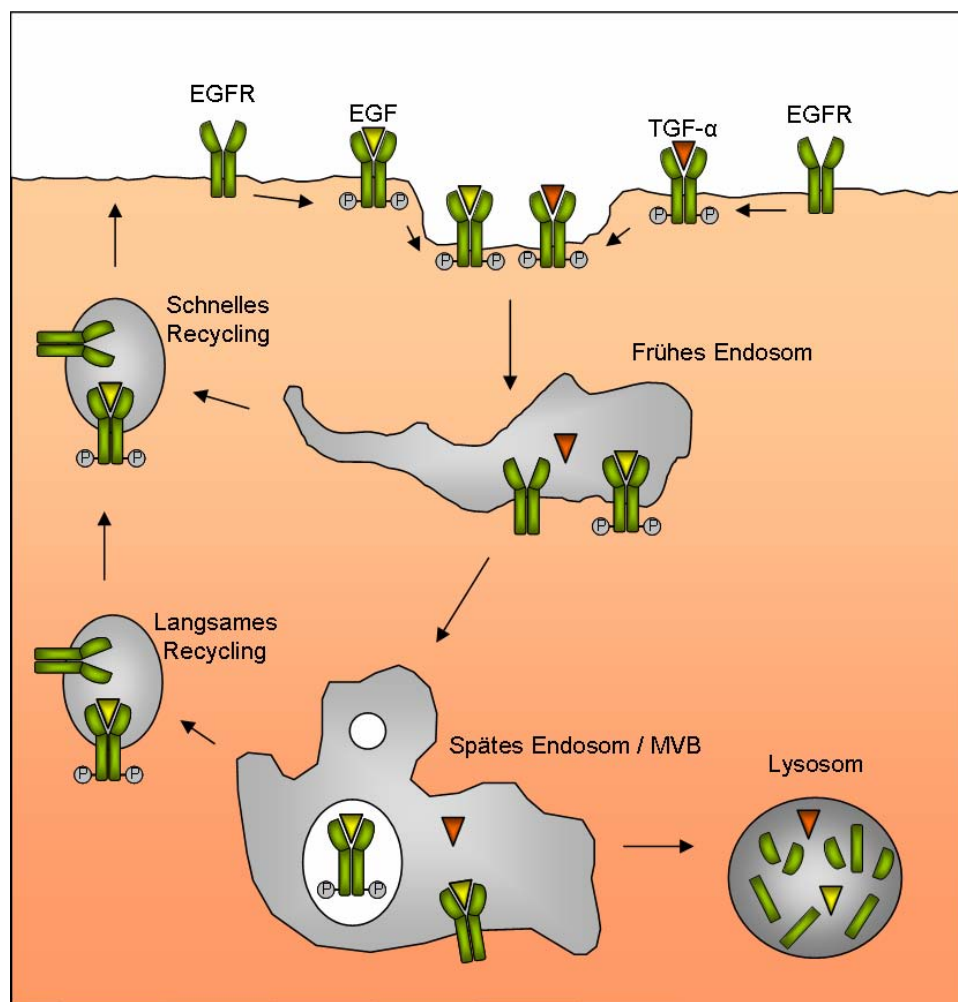
Rezeptoren und Makromoleküle, die zur Degradation in Lysosomen vorgesehen sind, liegen in multivesikulären ECVs hauptsächlich innerhalb der Membraneinstülpungen vor und sind für zytoplasmatische Proteine nicht mehr zugänglich. Dies führt automatisch zu einer Abschaltung des zytoplasmatischen Signallings (Sorkin und von Zastrow, 2001). In einem nächsten Schritt gelangt das Material aus den MVBs in späte Endosomen.

Während den frühen Endosomen und ECVs früher nur Funktionen beim Recycling und Abbau von Oberflächenrezeptoren und Makromolekülen zugesprochen wurden, geht man heute davon aus, dass diese Kompartimente eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion besitzen. So ist in manchen Zelltypen die Internalisierungsrate von Rezeptoren größer als deren Abbaurrate in Lysosomen. Man geht deshalb davon aus, dass sich ein Teil der endozytierten Rezeptoren lange in frühen Endosomen und MVBs aufhält, wo weitere Signalwege initiiert werden können (Sorkin et al., 1993; Zapf-Colby und Olefsky, 1998). So konnte für EGF- und Insulinrezeptoren gezeigt werden, dass deren Phosphorylierung und Kinaseaktivität auch in Endosomen bestehen bleibt (Baass et al., 1995). Des Weiteren konnten in Endosomen viele Rezeptor-interagierende Proteine, wie z.B. Grb2 („growth-factor-receptor-bound protein 2“) und Shc („SH2-domain-containing transforming protein“) gefunden werden, was die Funktion der Endosomen als Signalvesikel weiter unterstützt (Di Guglielmo et al., 1994; Oksvold et al., 2001).

Späte Endosomen sind perinukleär lokalisierte prälysosomale Kompartimente, die sich sowohl morphologisch als auch biochemisch von frühen Endosomen und Lysosomen unterscheiden (Piper und Luzio, 2001). Sie besitzen die Form multivesikulärer Strukturen und sind durch einen niedrigeren pH-Wert (pH 5-6) als in frühen Endosomen (pH 6) gekennzeichnet. Des Weiteren weisen sie hohe Konzentrationen an Mannose-6-Phosphat Rezeptor auf (Griffiths et al., 1990). Es ist noch immer nicht eindeutig geklärt, auf welchem Weg Stoffe aus den frühen Endosomen in späte Endosomen gelangen. Es werden zurzeit zwei unterschiedliche Modelle diskutiert. Das erste Modell geht von einer Reifung früh endosomaler Vesikel zu späten Endosomen aus. Das andere Modell vertritt die These, dass ECVs aus frühen Endosomen gebildet werden, die dann zu späten Endosomen wandern und mit ihnen fusionieren (Piper und Luzio, 2001).

Als gesichert gilt, dass eine Vielzahl lysosomaler Hydrolasen über den 46kD Kation abhängigen Mannose-6-Phosphat Rezeptor in Endosomen gelangen (Ghosh et al., 2003). Die Bindung an den Mannose-6-Phosphat Rezeptor findet im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt. Es kommt dort zu einer Rekrutierung von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren in „clathrin coated pits“ und über den Adapterkomplex AP-1 werden neu gebildete Vesikel vom TGN zu frühen Endosomen transportiert

(Hirst et al., 1998; LeBorgne und Hoflack, 1998). Von dort wird der Mannose-6-Phosphat Rezeptor mit den gebundenen Hydrolasen in späte Endosomen transportiert. Dort trennen sich Rezeptor und Hydrolasen voneinander. Der Mannose-6-Phosphat Rezeptor wird aus den späten Endosomen zurück zum TGN transportiert, während die Hydrolasen weiter in die Lysosomen wandern.



Schema 3: Rezeptor-vermittelte Clathrin-abhängige Endozytose am Beispiel des EGF-Rezeptors

Das intrazelluläre Trafficking des EGF-Rezeptors ist von der Art des gebundenen Liganden abhängig. Bindet EGF an den EGF-Rezeptor, so wird dieser endozytiert. In frühen Endosomen findet keine Trennung von Rezeptor und Ligand statt und es kommt entweder zu einem Recycling des Rezeptor-Ligandenkomplexes an die Plasmamembran, oder zu einem Transport in späte Endosomen. Dort kann der Rezeptor entweder recycelt oder durch Weitertransport in Lysosomen abgebaut werden. Bindet TGF- α an den EGF-Rezeptor, wird der Rezeptor-Ligandenkomplex ebenfalls endozytiert. Es kommt in frühen Endosomen zu einer Trennung von Rezeptor und Ligand. Der Rezeptor wird recycelt, während TGF- α in Lysosomen abgebaut wird. (Sorkin und von Zastrow, 2002, verändert)

Lysosomen stellen den Endpunkt des Endozytoseprozesses dar. Sie besitzen eine Größe von ca. 0,5 μ m Durchmesser und machen ca. 5-10% des Zellvolumens aus (Matteoni und Kreis, 1987).

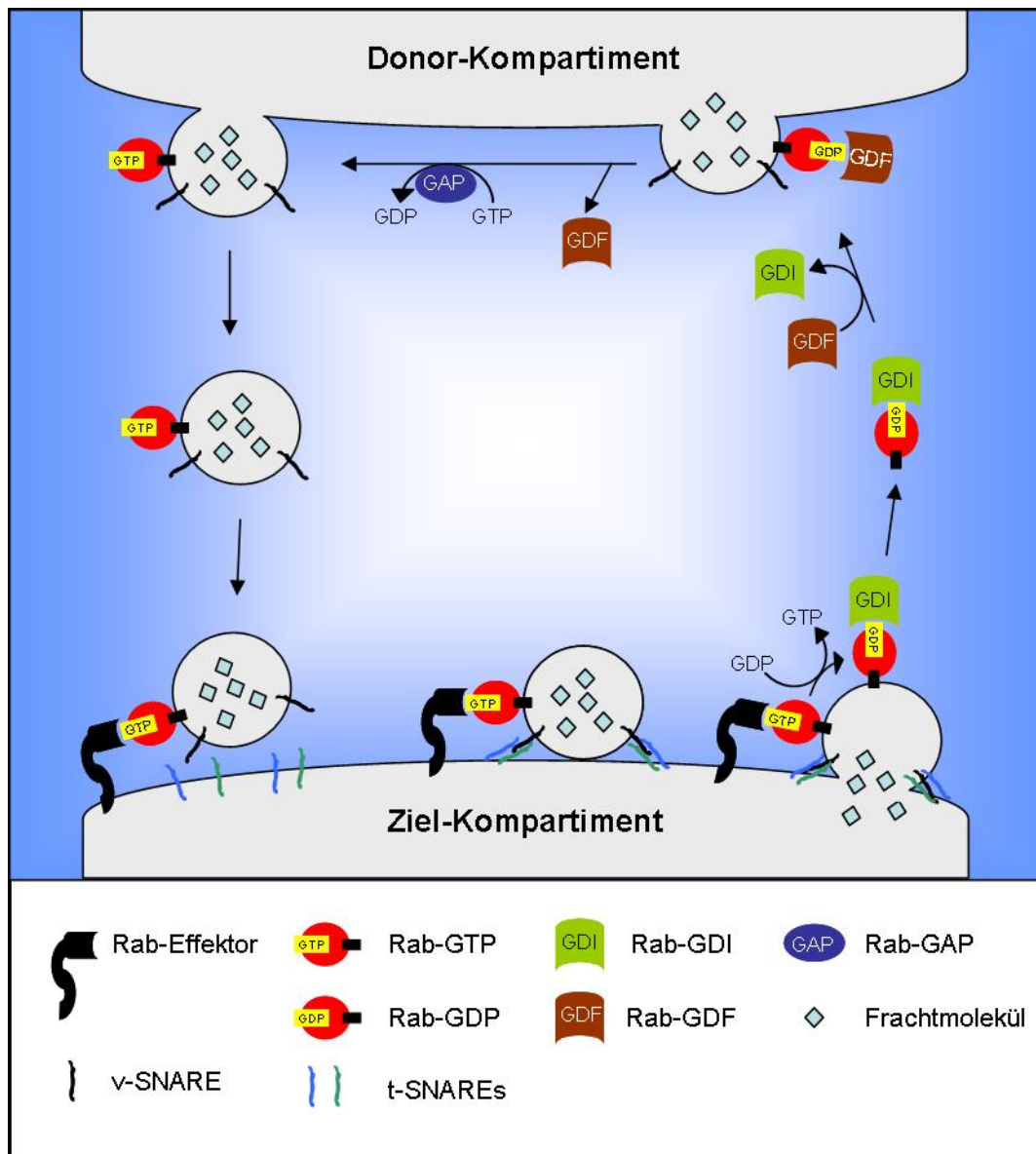
Lysosomen sind gekennzeichnet durch einen niedrigen pH-Wert (pH 5-5,5), integrale Membranglycoproteine wie z.B. LAMP-1 und das Fehlen von Mannose-6-Phosphat Rezeptor (Luzio et al., 2001). Neben ihrer Funktion als terminales Kompartiment des Endozytoseprozesses findet in Lysosomen die Degradation phagozytierter und autophagozytierter Materialien, sowie die Proteolyse zytosolischer Proteine statt (Funato et al., 1997; Lawrence und Brown, 1992; Cuervo und Dice, 1996). Der Transportprozess von späten Endosomen zu Lysosomen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zurzeit sind drei alternative Hypothesen im Gespräch, die den Transport von späten Endosomen zu Lysosomen zu erklären versuchen (Luzio et al., 2001). Das erste Modell geht von einem Austausch beider Kompartimente durch Transportvesikel aus. Dabei kommt es zu keiner Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen. Das zweite Modell beschreibt die so genannte „kiss and run“ Hypothese, bei der davon ausgegangen wird, dass späte Endosomen und Lysosomen kontinuierlich transient miteinander fusionieren und sich wieder trennen (Storrie und Desjardins, 1996). Die dritte Hypothese ist eine Erweiterung der „kiss and run“ Hypothese und beschreibt die komplette Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen. Aus diesem Hybridorganell entstehen neue Lysosomen, die den Prozess von neuem beginnen (Griffiths, 1996)

1.2.3 Die Fusion von Membranen und Vesikeln

Der typische Ablauf einer vesikulären Transportreaktion lässt sich in vier Schritte unterteilen. Der erste Schritt ist das Entstehen eines Transportvesikels aus dem „Donor-Kompartiment“. Der zweite Schritt ist die gesteuerte Bewegung des Transportvesikels zu seiner Zielstruktur. Der dritte Schritt beschreibt das Erkennen und Anheften des Transportvesikels an die Zielstruktur. Der vierte Schritt beschreibt schließlich die Fusion beider Membranen miteinander (Zerial und McBride, 2001).

Die Spezifität, mit der die Fusionsprozesse ablaufen, sichert die korrekte „Lieferung“ von Stoffen zum Zielkompartiment. Diese Spezifität wird im Wesentlichen von zwei Proteinfamilien vermittelt: Den Rab-Proteinen und den SNARE-Proteinen (s. Schema 4).

Die Familie der Rab Proteine („ras related in brain“) besteht aus ca. 60 bisher bekannten Mitgliedern, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen (Bock et al., 2001). Rab Proteine gehören zur Superfamilie der Ras GTPasen und besitzen wichtige Funktionen bei der Vesikelbildung, bei der gerichteten Bewegung von Vesikeln und bei der Anheftung von Vesikeln an deren Zielstrukturen (Zerial und McBride, 2001). Als GTPasen können Rab Proteine inaktiv in einem GDP gebundenen Stadium und in einem aktiven GTP gebundenen Stadium vorliegen. Nur im aktiven Zustand können sich Rab Proteine an Membranen anlagern. Diese Anlagerung wird von einer Reihe regulatorischer Proteine vermittelt. Konstitutiv befinden sich zwischen 10% und 50% der Rab Proteine in einem inaktiven Zustand an GDP gebunden in Zytosol (Takai et al., 2001). In diesem inaktiven Zustand sind Rab Proteine an Rab-GDI Proteine gebunden („GDP-dissociation inhibitor“). Rab-GDI vermittelt den Transport von Rab Proteinen an Membranen, wo sie sich von GDI abspalten und in den GTP gebundenen Zustand übergehen (Pfeffer und Aivazian, 2004). Dieser Austausch zwischen GDP und GTP wird von GEF Proteinen („guanine nucleotide exchange factor“) übernommen. Die Rab Proteine können nun mit Hilfe ihrer Geranylgeranylreste in die Membran inserieren und vermitteln dort im



Schema 4: Mechanismus des vesikulären Transports zwischen zwei Kompartimenten

Im Donor-Kompartiment werden Frachtmoleküle in Vesikel verbracht. Das Vesikel bewegt sich zum Zielkompartiment, wo aufgrund von Interaktionen zwischen Rab und Rab-Effektorproteinen zu einem Anheften an das Zielkompartiment kommt. v-SNARE und t-SNAREs bilden einen SNARE-Komplex und bewirken die Fusion der Vesikelmembran mit dem Ziel-Kompartiment. Das Rab-Protein wird von der Vesikelmembran abgelöst und steht für einen neuen Zyklus zur Verfügung. (Alberts et al., 2004, verändert)

aktiven Zustand die Interaktion mit Rab Effektorproteinen (Takai et al., 2001). Diese Effektorproteine sorgen für eine

Interaktion von Vesikeln mit Mikrotubuli oder sind wichtige Faktoren bei der Fusion von Vesikeln. Bisher sind einige Rab Effektorproteine wie z.B. p115, Rabaptin5, Rabenosyn-5, Rim1 oder EEA-1 („early endosomal autoantigen 1“) bekannt (Zerial und McBride, 2001). Die Inaktivierung von Rab Proteinen wird durch Rab-GAP Proteine („GTPase-activating protein“) katalysiert. Es kommt zur Hydrolyse von GTP und daraufhin zur Ablösung von Rab Proteinen von Membranen. Sie werden nun

wieder von Rab-GDI Proteinen gebunden und stehen für einen erneuten Zyklus zur Verfügung (Takai et al., 2001).

Im Gegensatz zu Rab Proteinen sind SNARE Proteine („soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors“) permanent in Membranen inseriert oder an Membranen angeheftet. Bisher sind über 30 SNARE Proteine bekannt, die alle eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation besitzen (Chen und Scheller, 2001). Man unterscheidet SNARE Proteine entweder aufgrund ihrer Lokalisation in v-SNAREs („vesicle SNAREs“) oder t-SNAREs („target SNAREs“) oder aufgrund ihrer biochemischen Zusammensetzung in R-SNAREs („arginine-containing SNAREs“) oder Q-SNAREs („glutamine-containing SNAREs“) (Söllner et al., 1993; Fasshauer et al., 1998). SNARE Proteine besitzen die Fähigkeit, Komplexe zu bilden. Ein funktioneller SNARE-Komplex besteht immer aus drei SNARE Proteinen und vier Helices, wobei zwei SNARE Proteine je eine Helix, und ein SNARE Protein zwei Helices in diesen Komplex einbringen. Dieser Komplex ist sehr stabil und kann nur durch akzessorische Proteine wie NSF und α -SNAP („soluble NSF attachment protein“) unter Hydrolyse von ATP wieder gelöst werden. Die Funktion des SNARE-Komplexes ist es, die Membranen in so engen Kontakt zu bringen, dass eine Fusion beider Membranen möglich ist. Ob die physikalische Nähe der Membranen ausreicht, um eine Fusion auszulösen, oder ob für diesen Prozess akzessorische Proteine benötigt werden, ist bis heute nicht geklärt (Chen und Scheller, 2001).

Aufgrund ihrer sehr spezifischen Lokalisation in Membranen intrazellulärer Kompartimente können SNARE-Proteine und Rab-Proteine als intrazelluläre Markerproteine genutzt werden.

1.3 Fragestellung der Arbeit

Das Zytokin TNF- α vermittelt über die TNF-Rezeptoren 1 und 2 sowohl pro- als auch antiapoptotische Signale (Aggarwal, 2003). Die Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) löst in Zellen intrazelluläre Signalwege aus, die sowohl zur Aktivierung des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B, als auch zur Aktivierung von Caspasen und somit zur Apoptose führen (Wajant, 2003; Micheau und Tschopp, 2003).

Es ist bekannt, dass die Behandlung von Zellen mit TNF- α zu einer Aktivierung der endo-lysosomal lokalisierten sauren Sphingomyelinase (A-SMase) führt (Schütze et al., 1992; Wiegmann et al., 1999). Diese Aktivierung verläuft über die TNF-R1 Adapterproteine TRADD und FADD (Schwandner et al., 1998). Das durch die endo-lysosomale A-SMase generierte Ceramid bindet und aktiviert die im gleichen Kompartiment lokalisierte Aspartat-Protease Cathepsin D (CatD) (Heinrich et al., 1999). Die proapoptotische Wirkung von CatD konnte durch Mikroinjektion in das Zytoplasma humaner Fibroblasten gezeigt werden (Roberg et al., 2002). Eine Blockierung der TNF-R1 Internalisierung durch Monodansylcadaverin (MDC) resultierte in einer inhibierten A-SMase Aktivität und einer Blockierung der TNF-induzierten Apoptose (Schütze et al., 1999). Die Internalisierung des TNF-R1 scheint somit kein Mechanismus zur Abschaltung des Signals zu sein, sondern initiiert im Gegenteil einen neuen intrazellulären Signalweg. Der molekulare Mechanismus der TNF-R1 Internalisierung und der intrazelluläre Transportvorgang, welcher zu einer Aktivierung der A-SMase und CatD führt, soll im ersten Teil dieser Arbeit näher untersucht werden.

Virus-infizierte Zellen exprimieren eine Reihe viraler Proteine, die die infizierte Zelle vor dem Immunsystem des Wirtes schützen. Im Genom der Adenoviren sind in der E3-Region Proteine codiert, die die Zelle vor der durch Todesrezeptoren wie TNF-R, FasR und TRAIL-R induzierten Apoptose schützen (Gooding et al., 1991). Das Adenovirale Protein Ad E3-14.7K führt in Zellen, in denen es exprimiert wird, zu einer Resistenz gegenüber der TNF- α und Fas-induzierten Apoptose (Gooding et al., 1990; Chen et al., 1998). Der Mechanismus der TNF- α Resistenz in Ad E3-14.7K exprimierenden Zellen soll im zweiten Teil dieser Arbeit näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
1D-Gelelektrophorese(Mini-Gel Twin)	Biometra
Agfa Curix 60	Agfa Photo GmbH
Avanti J-25 I Zentrifuge	Beckman Coulter
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG
FACS-Calibur	Becton Dickinson
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Fluoroskan II ELISA-Reader	Labsystems
Forma Scientific Cell Incubator	Forma Scientific
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss
LaminAir HB 2472 K	Hereaus
pH-Meter KNICK	KNICK GmbH
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories
Rollinkubator SRT-1	Stuart
Schüttelinkubator (GFL 3033)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Spectrophotometer (Smart Spec 3000)	Bio-Rad Laboratories
Tecan Reader (Modell: Sunrise)	Tecan Austria Gesellschaft
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
Transfer Cell Transblot SD	Bio-Rad Laboratories
Umwälzthermostat Haake DC3	Thermo Haake GmbH
Vortexer	Heidolph

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität pro analysis (p.a.) bezogen und verwendet. Die speziellen Chemikalien für einzelne Methoden sind zu Beginn jeder Methodenerläuterung aufgeführt.

2.1.3 Verwendete Kits, Enzyme und Substrate

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
BCA Proteinbestimmungskit	Pierce
Caspase-3 Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Biomol
Caspase-9 Substrat (Ac-LEHD-AMC)	Biomol
ECL Westernblot Detektionskit	Amersham Pharmacia
Human TNF- α /TNFSF1A Biotinylated Fluorokine Kit	R&D Systems
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH
Streptavidin Microbeads	Miltenyi Biotec
VECTASHIELD Mounting Medium	Vector Laboratories

2.1.4 Allgemeine Lösungen

DNA-Puffer	7,5mM Tris/HCl, pH 8,8
PBS	150nM NaCl, 8,3mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, pH7,4
TBST	150 mM NaCl, 50mM Tris/HCl, 0,1% Tween 20, pH7,5

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Adaptin alpha	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences
Anti-Adaptin beta	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences
Anti-Aktin	Ziege	1:1000	Santa Cruz
Anti-A-SMase	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Anti-Bid	Ziege	1:50 / 1:1000	Santa Cruz
Anti-Caspase 8	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Anti-Cathepsin D	Kaninchen	1:100 / 1:1000	Calbiochem
Anti-cleaved Caspase8	Maus	1:50 / 1:1000	Calbiochem
Anti-Clathrin	Maus	1:1000	BD Biosciences
Anti-Dynamin II	Maus	1:1000	BD Biosciences
Anti-EEA1	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences
Anti-FADD	Ratte	1:1000	Alexis
Anti-LAMP-1	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences
Anti-p47A	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences
Anti-Rab4	Kaninchen	1:50 / 1:1000	Santa Cruz
Anti Rab5b	Kaninchen	1:50 / 1:1000	Santa Cruz
Anti-Rab5	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences
Anti-Rab9	Ziege	1:50	Santa Cruz

Anti-RIP1	Maus	1:1000	BD Biosciences
Anti-TRAF2	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
Anti-Vti1a	Maus	1:50	BD Biosciences
Anti Vti1b	Maus	1:50 / 1:1000	BD Biosciences

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Kaninchen IgG, AlexaFluor 488	Esel, polyklonal	1:100	Molecular Probes
Anti-Kaninchen IgG, AlexaFluor 555	Esel, polyklonal	1:100	Molecular Probes
Anti-Kaninchen IgG, HRP	Ziege, polyklonal	1:10000	Dianova
Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 555	Esel, polyklonal	1:100	Molecular Probes
Anti-Maus IgG, HRP	Ziege, polyklonal	1:10000	Dianova
Anti-Ratte IgG HRP	Ziege, polyklonal	1:10000	Santa Cruz
Anti-Ziege, IgG Alexa Fluor 488	Esel, polyklonal	1:100	Molecular Probes
Anti-Ziege, IgG Alexa Fluor 555	Esel, polyklonal	1:100	Molecular Probes
Anti-Ziege, IgG HRP	Esel, polyklonal	1:10000	Santa Cruz

2.1.6 Vektoren und rekombinante Plasmide

2.1.6.1 Leervektoren

<u>Vektor</u>	<u>Resistenz</u>	<u>Herkunft</u>
pQCXIP	Ampicillin/Puromycin	BD Clontech

2.1.6.2 Rekombinante Plasmide

<u>Rekombinantes Plasmid</u>	<u>Vektor</u>
LAMP-1 wt	pEGFP-C1
Rab4 wt	pEGFP-C1
Rab5 wt	pEGFP-C1
Rab7 wt	pEGFP-C1
Rab9 wt	pEGFP-C1
Rab11 wt	pEGFP-C1

2.1.7 Zellkulturmaterialien

Produkt	Hersteller
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM+HEPES)	Gibco/Invitrogen
Fötiales Kälberserum	Biochrom KG
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen

2.1.8 Zelllinien

2.1.8.1 Die Fibroblastenzelllinie COS-7

Bei COS-7 handelt es sich um eine von der etablierten Affennieren-Zelllinie CV1 abgeleitete Zelllinie, die durch Transformation mit einer replikationsdefekten Mutante des Affenvirus [Simian Virus (SV)] 40 entstanden ist (Gluzman, 1981).

2.1.8.2 TNF-Rezeptor 1/2 defiziente Fibroblasten

Aus Hautgewebe einer TNF-Rezeptor 1 und TNF-Rezeptor 2 doppelt defizienten Maus wurden primäre Zellen isoliert und immortalisiert. Die so generierte Parentalzelllinie wurde in Kooperation mit PD Dr. Wulf Schneider-Brachert (Regensburg) retroviral mit dem humanen TNF-Rezeptor 1 transduziert. Außer dieser Zelllinie, die nur den humanen Wildtyp TNF-Rezeptor 1 trägt, wurden weitere Zelllinien generiert. Dazu wurden Deletionsmutanten und Punktmutaten des humanen TNF-R1 Konstruktes kloniert und ebenfalls retroviral in TNF-Rezeptor 1/2 defiziente Zellen transduziert.

In dieser Arbeit wurden folgende TNF-R1 Mutanten verwendet: TNF-R1 Wildtyp, Δ TRID (Deletion der „TNF-Rezeptor Internalisierungs-Domäne“), Δ DD (Deletion der „death domain“), YQRA (Punktmutation Tryptophan 218 Alanin in der TRID-Domäne)

2.1.8.2.1 Klonierung und Expression der TNF-R1 Konstrukte

Alle unter dieser Rubrik aufgeführten Arbeiten wurden von der Arbeitsgruppe PD Dr. Schneider-Brachert in Regensburg durchgeführt.

Der humane TNF-Rezeptor 1 wurde durch PCR aus dem Plasmid pEF-Bos TNF-R1 generiert und in die BamHI und XhoI Schnittstellen des retroviralen Vektors pQCXIP (BD Clontech) ligiert. Ebenso wurde mit den Deletionsmutanten Δ TRID (Δ AS 213-222), Δ DD (Δ ab AS 346) und der Punktmutante YQRA (A218W) verfahren. Alle generierten TNF-Rezeptor 1 Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

Je ein pQCXIP Konstrukt wurde zusammen mit dem „retrovirus passaging vector“ pCL-10A1 (Imgenex, Retromax System) durch Kalziumphosphat-Kotransfektion in 293T-Zellen eingebracht. Bei dieser Vorgehensweise wird in der „Passagierzelllinie“ 293T zum einen durch das Plasmid pQCXIP ein vollständiges virales genomisches Transkript gebildet, welches den CMV Promotor, das „gene of interest“ und ein zusätzliches Puromycin-Resistenzgen trägt. Zum anderen wird durch das Plasmid pCL-10A1 das virale Hüllprotein 10A1 gebildet, welches sich mit dem viralen Transkript zu funktionsfähigen Virionen zusammenlagert und von der „Passagierzelllinie“ exozytiert wird.

Nach 24 bis 48 Stunden nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und die Viren durch Filtration des Mediums weiter angereichert. Mit diesem viralen Überstand wurden nun die TNF-Rezeptor 1/2 defizienten Zellen transduziert. Die transduzierten Zellen wurden mit Puromycin (Sigma) selektioniert.

Während der Zellkultur wurden die Zelllinien im Abstand von ca.15 Passagen mit Puromycin selektioniert, um die Reinheit der Zellkulturen zu gewährleisten.

2.1.8.3 Die murine Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 und abgeleitete Zelllinien

Bei NIH-3T3 handelt es sich um eine murine embryonale Fibroblastenzelllinie, die mit dem SV40 Virus transformiert wurde. (Jainchill et al., 1969)

2.1.8.3.1 Adenovirus E3-14.7K exprimierende NIH-3T3 Zellen

Alle unter diesem Punkt aufgeführten Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe PD Dr. Schneider-Brachert in Regensburg durchgeführt.

Die Methode der retroviralen Expression von rekombinanten Plasmiden wurde bereits in Punkt 2.1.8.2.1 beschrieben.

In diesem Fall wurden NIH-3T3 Zellen mit den rekombinanten Plasmiden pQCXIP-E3-14.7K, einer Punktmutante des E3-14.7K Proteins pQCXIP-E3-PM14.7K, sowie dem Leervektor pQCXIP retroviral transduziert.

2.1.8.4 Die humane Zelllinie H1299 und abgeleitete Zelllinien

Bei H1299 handelt es sich um Zellen eines p53-negativen, humanen Lungenzellkarzinoms. (Mitsudomi et al., 1992)

2.1.8.4.1 Adenovirus E3-14.7K exprimierende H1299 Zellen

Das Prinzip wurde bereits in Punkt 2.1.8.2.1 beschrieben.

In diesem Fall wurden H1299 Zellen mit den rekombinanten Plasmiden pQCXIP-E3-14.7K, sowie dem Leervektor pQCXIP retroviral transduziert.

2.1.8.5 Die humane Epithelialzelllinie HeLa

Bei HeLa handelt es sich um Zellen eines epitheloiden Cervixkarzinoms. Diese Zellen wurden bereits 1951 isoliert (Scherer et al., 1953).

2.1.8.6 Die humane Lymphoblastenzelllinie U937

Bei U937 Zellen handelt es sich um Zellen eines humanen Lymphoms. Die Zellen sind Suspensionszellen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Haltung und Passage der Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Zellinkubator (Forma Scientific) bei einer Temperatur von 37°C, einem relativen CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% kultiviert.

Des Weiteren wurden alle verwendeten Zelllinien in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit HEPES (DMEM+HEPES, Invitrogen) kultiviert. Dem Medium wurde vor Gebrauch 10% FCS (Biochrom) und 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (Seromed) hinzugefügt.

Die Haltung der Zellen erfolgte in speziellen Zellkulturflaschen (Sarstedt). Zur Zellpassage adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Kulturflasche mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 4ml einer 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung (Seromed) hinzugefügt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10ml Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellsuspension aus der Kulturflasche entfernt. Abschließend wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1/5 – 1/10 auf neue Kulturflaschen verteilt. Zur Zellpassage von Suspensionszellen wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1/5 – 1/10 auf neue Zellkulturflaschen mit frischem Zellkulturmedium aufgeteilt.

2.2.1.2 Einfrieren, Lagerung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen

Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA aus der Zellkulturflasche herausgelöst. Die in Kulturmedium aufgenommene Zellsuspension wurde bei 1500 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Einfriermedium bestehend aus 80% Kulturmedium, 10% FCS und 10% DMSO aufgenommen und in ein Kryogefäß überführt (NUNC). Pro 1ml Einfriermedium wurden ca. 1×10^7 Zellen eingefroren. Die Kryogefäße wurden in einem speziellen Einfrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Zur Reaktivierung wurden die Kryogefäße nach Entnahme aus dem Stickstofftank möglichst schnell auf 37°C erwärmt und die Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt.

2.2.1.3 Pharmakologische Behandlung der Zellkulturen

Alle Zelllinien wurden zur Behandlung entweder in 12-well-Plates mit 2ml Kulturmedium, in 6-well-Plates mit 3ml Kulturmedium oder in 10cm Kulturschalen mit 10ml Kulturmedium kultiviert. Am Vortag der Behandlungen wurden in 12-well-Plates 2×10^4 Zellen ausplattiert, in 6-well-Plates 1×10^5 und in 10cm Kulturschalen 5×10^5 Zellen ausplattiert. Die Behandlung erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, durch das rekombinante humane Zytokin TNF- α in einer Konzentration von 100ng/ml. Zusätzlich zur Behandlung durch TNF- α wurde in bestimmten Versuchen der Proteinbiosyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) hinzu gegeben. CHX ist wasserlöslich und wurde in einer Konzentration von $3,6 \mu\text{M}$ eingesetzt. Parallel zu den behandelten Zellen wurden immer unbehandelte Kontrollzellen kultiviert.

2.2.2 Immunfluoreszenzmethoden

2.2.2.1 Biotin-TNF/Avidin-FITC Internalisierung

6-well plates	Greiner
Deckgläser, Fibronectin geocoated	BD Biosciences
Human TNF- α /TNFSF1A Biotinylated	
Fluorokine Kit	RD Systems
Formaldehyd, 7%	Formaldehyd 37% (Calbiochem), verdünnt in PBS
Objektträger	Menzel-Gläser
Permeabilisierungspuffer	0,2% Saponin, 0,2% BSA in PBS
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories

Die Zelllinien wurden auf Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 6-well-Plates in einem Volumen von 3ml Medium kultiviert. Am Vortag der Behandlung wurden 3×10^4 Zellen ausplattiert. Eine Stunde

vor Beginn des Experiments wurden pro Deckglas 1,25µl gelöstes Biotin-TNF mit 1,25µl gelöstem Avidin-FITC im Dunkeln vorinkubiert. Kurz vor Beginn der Inkubation wurde mit kaltem PBS auf ein Endvolumen von 50µl pro Deckglas aufgefüllt. Dies entspricht einer TNF-Konzentration von etwa 90ng/ml. Die 6-well-Plates wurden ca. 15 Minuten vor Beginn der Inkubation auf Eis abgekühlt. Die Deckgläser wurden mit kaltem PSB gewaschen und auf Eis für eine Stunde mit 50µl Biotin-TNF-Avidin-FITC Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit kaltem PBS gewaschen und in 6-well-Plates mit vorgewärmtem Medium überführt. Nach Beendigung der jeweiligen Stimulationszeit wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 7% Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen, mit einem Mounting Medium auf einen Objektträger aufgebracht und mit Nagellack luftdicht umschlossen. Sollte sich nach der Biotin-TNF Internalisierung noch eine Behandlung mit Antikörpern anschließen, so wurden die Deckgläser nach der Formaldehydfixierung mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit einem Permeabilisierungspuffer behandelt. Anschließend wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und bis zur Inkubation mit den Primärantikörpern bei 4°C dunkel gelagert.

2.2.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz

6-well plates	Greiner
Deckgläser, Fibronectin ge coated	BD Biosciences
Formaldehyd, 7%	Formaldehyd 37% (Calbiochem), verdünnt in PBS
Objektträger	Menzel-Gläser
Permeabilisierungspuffer	0,2% Saponin, 0,2% BSA in PBS
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Antikörper wurden in der jeweiligen Konzentration in PBS gelöst in einem Endvolumen von 50µl eingesetzt. Nach Beendigung der Primärantikörperinkubation wurden die Deckgläser für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Stunde im Dunkeln. Die jeweiligen Sekundärantikörper wurden alle in einer Konzentration von 1:100 in einem Endvolumen von 50µl eingesetzt. Nach der Sekundärantikörperinkubation wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben, auf Objektträgern fixiert. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.2.3 Verwendung des Lysotracker

6-well plates	Greiner
Deckgläser, Fibronectin beschichtet	BD Biosciences
Formaldehyd, 7%	Formaldehyd 37% (Calbiochem), verdünnt in PBS
Lysotracker Red DND-99	Invitrogen / Molecular Probes (1:10000) im Kulturmedium
Objektträger	Menzel-Gläser
Permeabilisierungspuffer	0,2% Saponin, 0,2% BSA in PBS
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories

Die Zelllinien wurden auf Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 6-well-Plates in einem Volumen von 3ml Medium kultiviert. Am Vortag der Behandlung wurden 3×10^4 Zellen ausplattiert. Zur Behandlung mit Lysotracker wurde das Kulturmedium abgenommen und durch neues Kulturmedium mit Lysotracker ersetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Deckgläser wurden mit PBS gewaschen, fixiert und anschließend direkt auf Objektträgern fixiert oder mit Antikörpern weiterbehandelt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung kernfreier Zelllysate

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

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Zu Beginn wurde der Zellkulturüberstand entnommen und in ein kaltes Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, welches anschließend dem Zellkulturüberstand hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA aus der Kulturschale gelöst und in dem dazugehörigen Zellkulturüberstand 5 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet nach vorsichtigem Resuspendieren in PBS erneut für 5 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in Homogenisationspuffer resuspendiert und auf Eis inkubiert. Die Eppendorfgefäße wurden anschließend mehrfach schnell über einen Eppendorfständer gezogen und anschließend für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

96-well-plates	Nunc
Homogenisationspuffer	10mM HEPES, pH7,4, 142mM KCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM EDTA, 0,2% NP-40

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit BCA-Reagenzien (Pierce) durchgeführt. Dabei kommt es durch Zugabe von Bicinchoninsäure während einer Inkubationszeit von 30 Min bei 37°C zu einer Farbreaktion, ausgelöst von Kupferionen mit Peptidbindungen der Proteine. Diese reduzierten Cu¹⁺ - Ionen reagieren mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem violett gefärbten Komplex. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in 96-well-plates (NUNC) mit einer 1:10 Verdünnung der Proben in Homogenisationspuffer. Für die Berechnung des Proteingehaltes wurde eine Eichreihe mit BSA 2mg/ml in Proteinkonzentrationen von 0-10µg/µl parallel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit einem ELISA-Reader (TECAN, Modell: Sunrise) bei einer Extinktionswellenlänge von 570nm.

2.2.3.3 Messung der Caspase-Aktivität

96-well-plates	Nunc
Homogenisationspuffer	10mM HEPES, pH7,4, 142mM KCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM EDTA, 0,2% NP-40
Caspase-Assaypuffer	50mM HEPES pH7,2, 10mM NaCl, 10mM DTT, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 0,1% CHAPS
Caspase-3 Substrat	15mM Ac-DEVD-AMC in DMSO
Caspase-9 Substrat	15mM Ac-LEHD-AMC in DMSO

Alle Proben, Puffer und Substrate, sowie die 96-well-Platte wurden bis zum Beginn der Messung auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität wurden kernfreihe Zelllysate mit einem Gesamtproteingehalt von 50µg verwendet. Die Proben wurden mit Homogenisationspuffer auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 100µl (Probe + Assaypuffer + 1µl Substrat). Die Reaktionen erfolgten in einer 96-well-Platte (Fluoronunc (weiß), NUNC). Als Kontrolle wurden Assaypuffer + Substrat + Homogenisationspuffer und Probe + Assaypuffer mit analysiert. Die Auswertung erfolgte in einem Fluorometer (Fluoroscan II, Labsystems and Life Sciences Int. LTD, UK) bei einer Anregungswellenlänge von 380nm. Die Platte wurde in dem Gerät auf 37°C erwärmt, um die enzymatische Reaktion zu starten. Durch die Spaltung des Substrates wird von dem Farbstoff Amino-Methyl-Coumarin (AMC) Emissionslicht von 460nm Wellenlänge emittiert. Diese Fluoreszenz wurde von dem Fluorometer 3 Stunden lang in Messintervallen von 0,1 Sekunden alle 3 Minuten aufgezeichnet. Die Messwerte wurden parallel mit Genesis II (Labsystems an Life

Science Int. LTD, UK), einem PC basierten Steuersystem des Fluorometers gespeichert und konnten später mit MS Excel ausgewertet werden.

2.2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3x Probenpuffer	50mM Tris pH6,8, 4M Harnstoff, 1% SDS, 15% Glycerol, 0,01%Bromphenolblau 2% β -Mercaptoethanol
Elektrophoresepuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS
Homogenisationspuffer	10mM HEPES, pH7,4, 142mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 0,2% NP-40

Die elektrophoretische Auftrennung zellulärer Proteine erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Durch die Verwendung des Detergens SDS kommt es zu einer Denaturierung der Proteine und einer Anlagerung von Anionen abhängig von der Molekülgröße. Somit ist eine elektrophoretische Auftrennung gezielt anhand der Proteingröße durchführbar. Als Trägermedium für die SDS-PAGE wurden Polyacrylamidgele verwendet, deren Porengröße sich variieren lässt, indem man unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylbisacrylamid einsetzt. In dieser Arbeit wurden Trenngele der Konzentrationen 10% und 15% verwendet und Sammelgele der Konzentration 5%.

Die Elektrophorese fand in MiniGel-Kammern (Biometra) statt. Als Proben wurden kernfreie Zelllysate bzw. magnetisch isolierte TNF-R1 Fraktionen eingesetzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit 3x Probenpuffer vermischt und nach dem Aufkochen auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25mA pro Gel (Power Pack200, BioRad) für ca.1-1,5h abhängig von der Gelkonzentration durchgeführt.

2.2.3.5 Western Blot und Immunodetektion

Blotpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol
Blockpuffer	1x TBST, 5% Milchpulver, 1% BSA

Die Proteine wurden mit Hilfe des SemiDry Blotting Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham) geblottet. Dazu wurden die 1mm dicken Polyacrylamidgele in Blotpuffer äquilibriert und in einen SemiDry Blotter (Biometra) überführt. Der Blotvorgang wurde für 60 Minuten bei einer Stromstärke von 30mA/cm (PowerPack200, BioRad) durchgeführt. Anschließend wurden die Nitrocellulosemembranen für 1 Stunde in Blockpuffer inkubiert, um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu blockieren.

Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Primärantikörper wurden in 5ml TBST +1% Milchpulver verdünnt und die Nitrocellulosemembranen darin inkubiert. Anschließend

wurden die Membranen für 3 x 20 Minuten bei RT in TBST gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden in 10ml TBST verdünnt und zusammen mit den Membranen für 1 Stunde darin RT inkubiert. Die Detektion der Antigene erfolgte mit Hilfe der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase. Die Reaktion der Meerrettichperoxidase mit einer ECL-Lösung (ECL-Detektions-Kit, Amersham Biosciences) produziert Lumineszenz, welches mit einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Nach der Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper wurde diese für 3x10 Minuten in TBST gewaschen und die Membran anschließend für 1 Min mit ECL-Lösung behandelt. Die Detektion des Lumineszenzlichtes erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen (Hyperfilm. Amersham Life Science).

2.2.3.6 Durchflußzytometrische Analyse mit Hilfe von Annexin V- und Propidiumjodidfärbung

6-well-plates	Greiner
Annexin-V-Fluos-Lösung	Boehringer/Roche 20µl in 1000µl Inkubationspuffer + 10µl PI-Lösung
Inkubationspuffer	10mM HEPES/NaOH, pH7,4, 140mM NaCl, 5mM CaCl ₂
Propidium-Iodid (PI)-Lösung	100ng/ml PI (Sigma-Aldrich) Stammlösung in PBS/EDTA (5mM)
1xTrypsin/EDTA	Stammlösung 10x (Invitrogen) 1:10 verdünnt in sterilem H ₂ O

Der Zellkulturüberstand wurde aus den Kulturschalen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und dem jeweiligen Zellkulturüberstand hinzugefügt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert, in PBS gewaschen, in einem 5ml FACS-Röhrchen (BD Falcon) mit 100µl der Annexin-V-Fluos-Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei RT dunkel inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte an einem FACS-Calibur („*Fluorescence Activated Cell Sorter*“, BD Biosciences). Alle Kanaleinstellungen wurden für jede Zelllinie individuell eingestellt und abgespeichert. Jede Zelllinie wurde im Vorwärtsstreulicht („*forward scatter*“, FSC) und im Seitwärtsstreulicht („*side scatter*“, SSC) individuell gegatet. Die Darstellung der gemessenen Zellen erfolgte im sog. Dot Plot.

2.2.3.7 Isolierung magnetisch markierter TNF-R1 Komplexe

Homogenisationspuffer	0,25M Sucrose, 15mM HEPES, 0,5mM MgCl ₂ (pH 7,4)
-----------------------	--

Die Isolierung magnetisch markierter TNF-R1 Komplexe wurde von Dr. Vladimir Tchikov durchgeführt.

Die Zellen wurden auf Eis aus den Kulturgefäßen entfernt und nach einmaligem waschen in PBS in einem Volumen von 250µl PBS aufgenommen. Nach Zugaben von 100µl (400ng) Biotin-TNF wurden die Zellen 1 Stunde auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200µl MACS Streptavidin Microbeads (Miltenyi Biotec) auf Eis und eine weitere Lagerung für 1 Stunde auf Eis. Die Internalisierung wurde durch Erwärmung der Zellen auf 37°C für verschiedene Zeitpunkte eingeleitet. Nach Beendigung der Behandlungszeit wurden die Zellen bei 4°C 10 Minuten und 1000 x g abzentrifugiert und in Homogenisationspuffer aufgenommen. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von Glaskugeln und anschließendem Vortexen der Zellsuspension. Ein postnukleärer Überstand wurde durch Zentrifugation der Zellsuspension für 10 Minuten bei 1000 x g gewonnen. Dieser postnukleäre Überstand wurde in einer Free-Flow Magnetkammer zur Isolierung magnetisch markierter TNF-R1 Komplexe eingesetzt. Die gewonnenen TNF-R1 Fraktionen wurden zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Transiente Transfektion adhärenter Zellen

6-well-plates	Greiner
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen

Adhärente Zellen lassen sich effizient durch Liposomen transfizieren. Dabei entstehen DNA beladene Phospholipidpartikel, deren Inhalt von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wird. Für die Transfektion wurden Zellen auf Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 6-well plates in einem Volumen von 3ml kultiviert. Dabei wurden am Vortag 1×10^4 Zellen pro well und Deckglas ausplattiert. 4 Stunden vor Beginn der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand entfernt und durch neues Zellkulturmedium mit einem FCS-Gehalt von 5% ohne Antibiotika ersetzt.

30 Minuten vor Beginn der Transfektion wurden DNA und Lipofectamine separat in DMEM ohne Zusätze in Eppendorfgefäßen verdünnt. Die Menge an Medium, DNA und Lipofectamine ist in der unten stehenden Tabelle beschrieben. Die verdünnte DNA und das verdünnte Lipofectamine wurden miteinander vermengt und zur Ausbildung der DNA-beladenen Phosphopartikel 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in das Kulturmedium zu den Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. 16 Stunden nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand entfernt und durch frisches Zellkulturmedium mit einem FCS-Gehalt von 10% und Antibiotikazusatz ersetzt. Die Gesamtinkubationszeit betrug für alle eingesetzten Plasmide 36 Stunden ab der Transfektion, bevor die Zellen weiterverwendet wurden.

<u>Kulturgefäß</u>	<u>Zellzahl</u>	<u>DNA (µg) in Medium (µl)</u>	<u>Lipofectamine (µl) in Medium (µl)</u>
6-well plate	1×10^4	1,5 in 100	4 in 100

2.2.4.2 Transformation von *E.coli* und Plasmidpräparation

Ampicillin	Sigma
DNA-Puffer	7,5mM Tris/HCl, pH 8,8
Luria-Bertani (LB) Medium	10g/l Bactotryptone, 5g/l Bacto-yeast extract, 5g/l NaCl, pH 7,0, in H ₂ O
Kanamycin	Sigma
NovaBlue GigaSingles	
Competent Cells	Novagen
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen GmbH
SOC-Medium	Novagen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente *E.coli* eingesetzt. Die Bakterien wurden nach dem Auftauen auf Eis gelagert. Anschließend wurde 1µg Plasmid-DNA zu 25µl *E.coli*-Suspension in ein Eppendorfgefäß gegeben und für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden nun für 30 Sek. in ein auf 42°C vorgewärmtes Wasserbad getaucht und anschließend sofort auf Eis gelagert. Der Suspension wurden 100µl SOC-Medium hinzugefügt und anschließend für 1 Stunde in einem auf 37°C vorgewärmten Schüttler (Thermomix comfort, Eppendorf) bei 300 RPM inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in einen Glaskolben mit 300 ml auf 37°C vorgewärmten LB-Medium gegeben, dem vorher ein spezifisches Selektionsantibiotikum hinzugefügt wurde (Kanamycin). Der Kolben wurde in einem Schüttelinkubator (Gesellschaft für Labortechnik GmbH) für 16 Stunden bei 37°C und 250 RPM inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Die Plasmidpräparation wurde mit dem QIAprep Spin Maxiprep Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde nach Abschluss der Präparation in DNA-Puffer bei 4°C aufbewahrt. Die Messung des DNA-Gehalts erfolgte in einem Spektrophotometer (Bio-Rad Laboratories).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Internalisierung und zum intrazellulären Transportprozess des TNF-R1

Der 55kD TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) kann nach Bindung des Liganden TNF- α (TNF) Apoptose induzieren. Nach Bindung von TNF werden Adaptermoleküle an die zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 rekrutiert, von wo aus sie weitere Signalkaskaden initiieren können. Der TNF-R1 wird nach Ligandenbindung von der Zelloberfläche internalisiert, der Mechanismus und die Funktion dieser Internalisierung sind jedoch bisher ungeklärt.

Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Experimente sollen zeigen, ob es möglich ist, den TNF-R1 nach Internalisierung intrazellulär zu lokalisieren, um den intrazellulären vesikulären Transport der Vesikel zu verfolgen. Weiterhin soll geklärt werden, ob der TNF-R1 nach bestimmten Zeitpunkten der Internalisierung mit intrazellulären Markern kolokalisiert, die die Reifung und mögliche Fusion mit anderen intrazellulären Kompartimenten anzeigen.

3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der TNF-R1 Internalisierung

In COS-7 Zellen wurden zunächst Versuche zur Internalisierung des TNF-R1 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf 4°C heruntergekühlt und mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Dabei stellte sich heraus, dass der TNF-R1 bei einer Temperatur von 4°C nicht internalisiert, wie in Abb. 1A zu sehen ist. Dieser Schritt ermöglicht die Beladung möglichst vieler Rezeptoren auf der Plasmamembran. Anschließend erfolgte die synchronisierte Internalisierung des TNF-R1 bei 37°C. Nach jedem zu untersuchenden Zeitpunkt wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops ausgewertet. In Abb. 1B-E ist zu sehen, dass der TNF-R1 nach Inkubation bei 37°C von der Zelloberfläche internalisiert. Dabei bilden sich zunächst kleine Vesikel in der Nähe der Plasmamembran aus. Diese kleinen Vesikel wandern rasch in das Zellinnere, wobei sie an Größe zunehmen. Diese Größenzunahme ist in Abb. 1E* dargestellt und ist wahrscheinlich mit der Fusion vieler kleiner Vesikel zu erklären, die auf dem Weg in das Zellinnere größere Vesikel ausbilden.

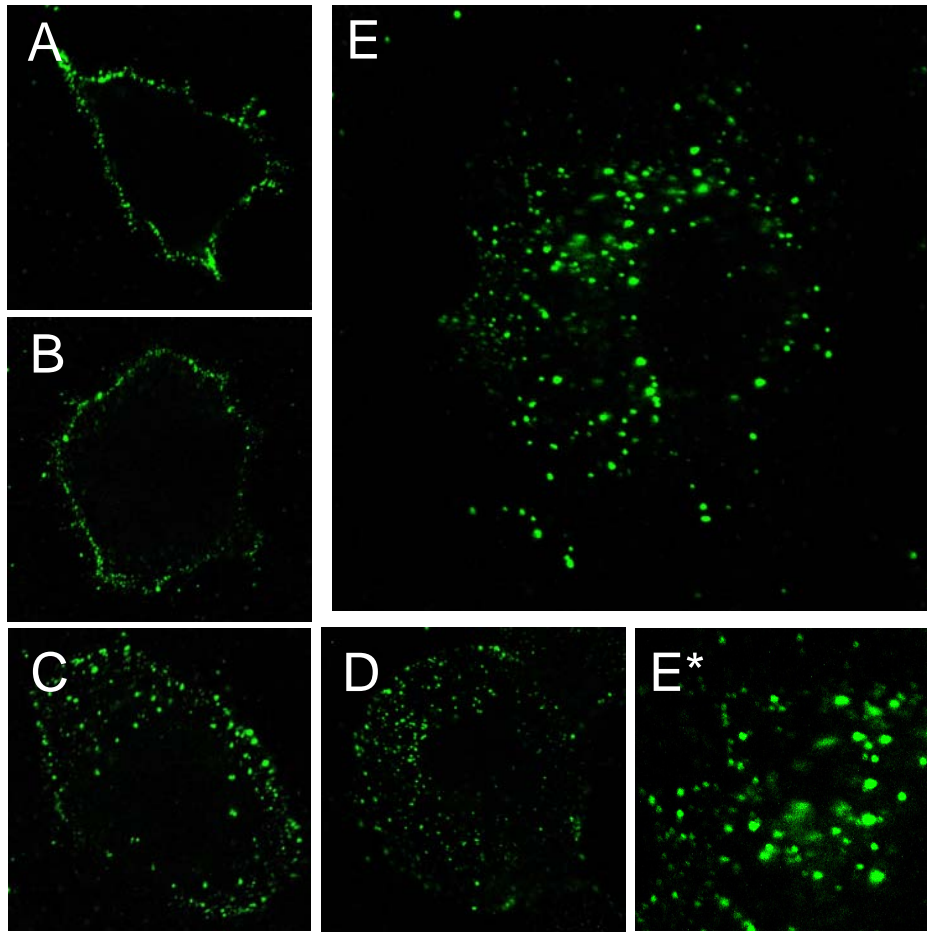


Abb. 1: Untersuchung der Internalisierung des TNF-R1

COS-7 Zellen wurden 1 Stunde bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 15 Minuten bei 37°C (B), nach 30 Minuten bei 37°C (C), nach 60 Minuten bei 37°C (D) und nach 120 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 1E* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 1E dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Der TNF-R1 kolokalisiert mit Markerproteinen für frühe Endosomen

3.1.2.1 Der TNF-R1 kolokalisiert mit Rab5

Verschiedene membranständige Rezeptoren, wie z.B. EGFR können von der Zelloberfläche durch Clathrin vermittelte Endozytose internalisiert werden. Dabei werden die Rezeptoren zunächst in ein intrazelluläres Kompartiment transportiert, welches als frühes Endosom bezeichnet wird. Die frühen Endosomen werden durch Anwesenheit verschiedenster akzessorischer Proteine charakterisiert. Eine wichtige Rolle bei der Bildung, Fusion und dem Transport von frühen Endosomen spielt die GTPase Rab5. Rab5 rekrutiert akzessorische Proteine in die Nähe der frühen Endosomen, die essentiell für die Vesikelfusion und den Vesikeltransport sind. Aus diesem Grund soll in Zellen einer TNF-Rezeptor 1

und 2 defizienten Maus, die mit dem Wildtyp TNF-R1 rekonstituiert wurden, untersucht werden, ob eine mögliche Interaktion von endozytierten TNF-R1 Vesikeln mit Rab5 zu beobachten ist.

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt und für verschiedene Zeitpunkte bei 37°C inkubiert, um eine Internalisierung des TNF-R1 zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Detektion von Rab5 erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Die Auswertung dieses Experiments erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops.

Abb. 2 zeigt die Zellen im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. In grüner Farbe sind die TNF-R1 Komplexe dargestellt, die intrazelluläre Rab5 Färbung ist in rot dargestellt. Eine Kolokalisation ist an der gelben Farbe zu erkennen.

In Abb. 2A ist zu sehen, dass sich der TNF-R1 bei 4°C erwartungsgemäß an der Plasmamembran befindet. Die Färbung von Rab5 deutet auf eine vesikuläre Verteilung im Zellinneren hin. Die angefärbten Vesikel sind in nahezu der gesamten Zelle verteilt. Nach 15-minütiger Internalisierung der TNF-R1 Komplexe kommt es zu einer intrazellulären Kolokalisation mit Rab5-positiven Vesikeln (Abb. 2C+C*). Diese Kolokalisation ist an nahezu allen endozytierten TNF-R1 Vesikeln zu beobachten, die sich noch in der Zellperipherie befinden. Die größeren Vesikel in der Nähe des Zellkerns zeigen keine Kolokalisation mit Rab5. Zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten findet keine Kolokalisation mit Rab5 statt (Abb. 2A, B, D, E).

3.1.2.2 Der TNF-R1 kolokalisiert mit EEA1

Ein weiteres mit frühen Endosomen assoziiertes Protein ist EEA1 („early endosomal autoantigen 1“). EEA1 steht in direkter Interaktion mit Rab5 und wird als ein so genanntes Rab5-Effektorprotein beschrieben. Es wird vermutet, dass EEA1 die Interaktion von frühen Endosomen mit Mikrotubuli vermittelt. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob zu einer Interaktion von TNF-R1 Vesikeln mit EEA1 kommt.

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie auf eine Interaktion von TNF-R1 und EEA1 untersucht. In grüne Farbe sind die TNF-R1 Komplexe dargestellt, die intrazelluläre EEA1-Färbung ist in roter Farbe zu sehen. Eine Kolokalisation äußert sich in einer Gelbfärbung.

Die Färbung von EEA1 deutet auf eine vesikuläre Verteilung im Zellinneren hin. Die EEA1 gefärbten Vesikel befinden sich mehr in Zellkernnähe und weniger in der Zellperipherie. Die EEA1-positiven Vesikel sind meist größer als die oben beschriebenen Rab5 positiven Vesikel. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Rab5-positive und EEA1-positive Vesikel nicht identisch sind. Nach 15-minütiger Internalisierung ist eine Kolokalisation zwischen TNF-R1 enthaltenden Vesikeln und EEA1 positiven Vesikeln zu erkennen (Abb. 3C+C*). Diese sehr deutliche Kolokalisation findet weit im Zellinneren statt. Auch nach 30-minütiger Internalisierung (Abb. 3D) und nach 60-minütiger Internalisierung (Abb. 3E) findet eine Kolokalisation zwischen TNF-R1 und EEA1-positiven Vesikeln statt.

Der TNF-R1 kolokalisiert nach Internalisierung zunächst mit frühen Endosomen. Dabei wird vermutlich zuerst Rab5 an die neu gebildeten Vesikel rekrutiert. Diese Rekrutierung ist nur kurzfristig, da eine Kolokalisation nur nach 15 Minuten auftritt. Anschließend wird EEA1 als Rab5-Effektor an die frühen

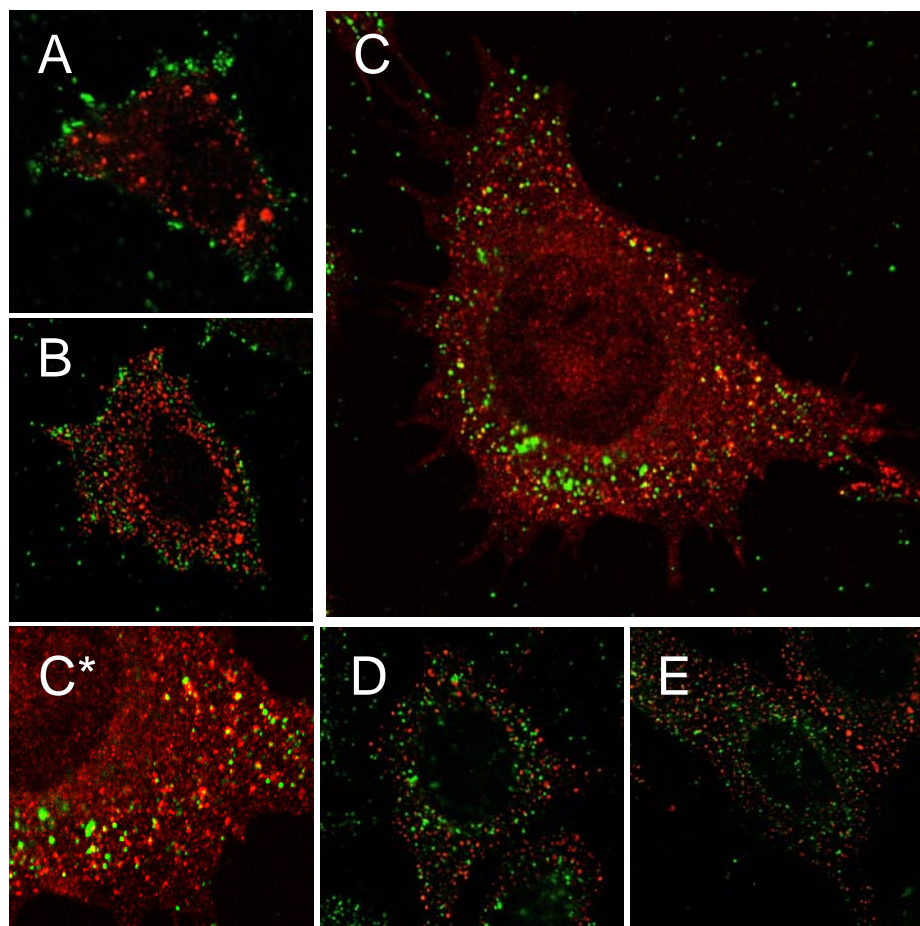


Abb. 2: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und Rab5

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-Rab5-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 2C* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 2C dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Endosomen angelagert und vermittelt dort vermutlich die Interaktion mit Mikrotubuli. Die Kolokalisation von TNF-R1 und EEA1 dauert deutlich länger und ist auch nach 60-minütiger Internalisierung noch zu beobachten.

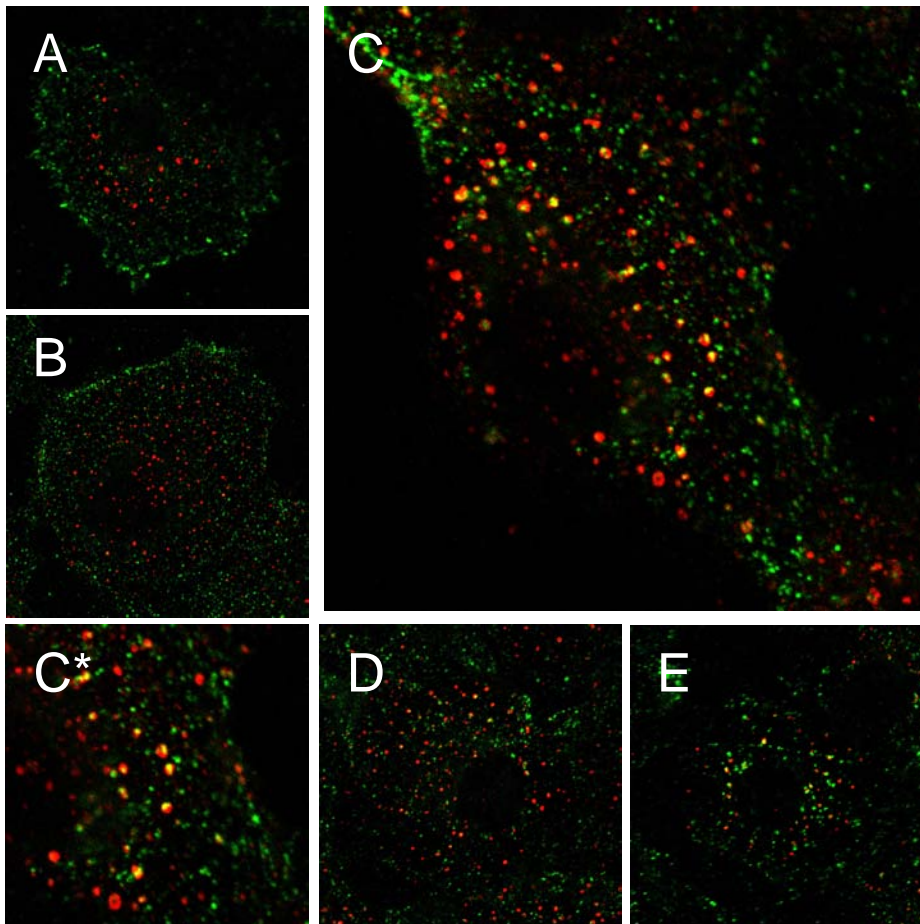


Abb. 3: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und EEA1

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-EEA1-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 3C* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 3C dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Der TNF-R1 kolokalisiert mit Markerproteinen für späte Endosomen / Lysosomen

3.1.3.1 Der TNF-R1 kolokalisiert mit Vti1b

Neben den Rab Proteinen, die akzessorische Proteine an die Vesikelmembran binden können, sind die SNARE Proteine essentiell für die direkte Vesikelfusion. SNARE Proteine sind membranassoziiert und bilden bei der Vesikelfusion Komplexe aus. Diese SNARE Komplexe sind spezifisch für bestimmte intrazelluläre Kompartimente. Somit können SNARE Proteine als intrazelluläre Marker verwendet werden. Das SNARE Protein Vti1b ist mit späten Endosomen assoziiert und bildet dort mit zwei weiteren SNARE Proteinen einen Komplex aus, der für die Fusion später Endosomen wichtig ist (Kreykenbohm et al., 2002)

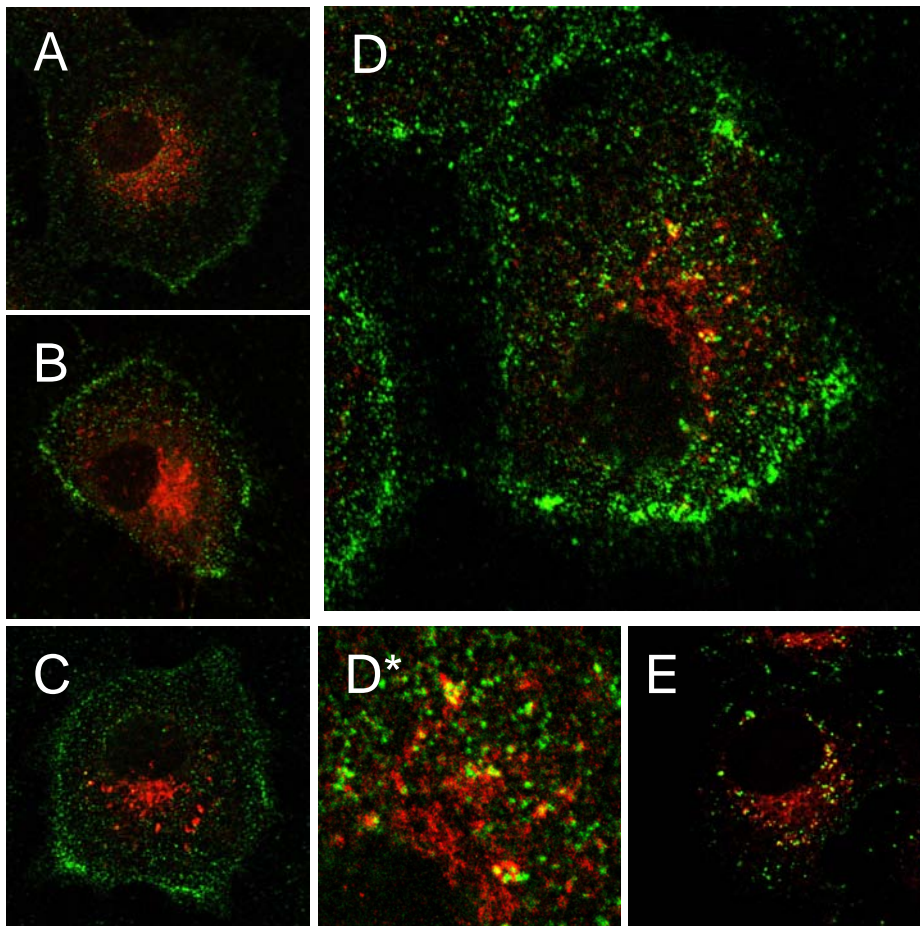


Abb. 4: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und Vti1b

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-Vti1b-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Dargestellt sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 4D* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 4D dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In Abb. 4 ist zunächst zu erkennen, dass sich Vti1b stark in Zellkernnähe konzentriert. Vti1b liegt dort anscheinend vesikulär oder tubulär assoziiert vor. Die Lokalisation von Vti1b verändert sich im Laufe der Behandlung mit TNF nicht. Dies spricht dafür, dass die TNF-R1 enthaltenden Vesikel weitergeleitet werden, die einzelnen Kompartimente, die sie durchlaufen jedoch nicht verändert werden.

Nach 30-minütiger Internalisierung sind einige der TNF-R1 enthaltenden Vesikel bis in Zellkernnähe vorgedrungen (Abb. 4D). Dort kommt es zu einer deutlichen Kolokalisation der TNF-R1 und Vti1b enthaltenden Vesikel (Abb. 4D+D*). Diese Kolokalisation ist auch nach 60-minütiger Internalisierung zu beobachten (Abb. 4E). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der TNF-R1 länger in späten Endosomen lokalisiert ist.

3.1.3.2 Cathepsin D ist in Endosomen und Lysosomen lokalisiert

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die lysosomale Aspartatprotease Cathepsin D (CatD) durch TNF aktivierbar ist. In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Bid, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie von Cathepsin D aktivierend gespalten wird (Heinrich et al., 2004). Bid ist wesentlich an der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien beteiligt. Als intralysosomales Protein wird CatD im Golgi-Apparat als 52kD Isoform synthetisiert und über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor zunächst in Endosomen transportiert. Aus diesen wird CatD weiter in die Lysosomen transportiert, wo die Protease weiter zur aktiven 48kD Isoform und zur aktiven 32kD Isoform prozessiert wird (Diment et al., 1987).

Mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie soll zunächst untersucht werden, ob CatD mit den in dieser Arbeit verwendeten Markerproteinen für Endosomen und Lysosomen kolokalisiert.

Rab4, Rab5 und Rab7 sind GTPasen, die an unterschiedlichen Endosomen lokalisiert sind. Rab4 ist an frühen Endosomen lokalisiert und spielt eine Rolle beim Recycling internalisierter Rezeptoren und Makromoleküle durch Recycling-Endosomen. Rab5 ist ebenfalls an frühen Endosomen lokalisiert und sorgt dort für den Transport von endozytierten Materialien zu frühen Endosomen, für die homotypische Fusion von frühen Endosomen und den Transport von Proteinen zu späten Endosomen. Rab7 ist an späten Endosomen lokalisiert und vermittelt dort den Weitertransport von Material zu Lysosomen. Rab9 ist ein Rab-Protein, das an späte Endosomen assoziiert ist. Dort vermittelt Rab9 vor allem den Rücktransport von Mannose-6-Phosphat Rezeptor zum Trans-Golgi-Netzwerk. Rab11 spielt eine Rolle beim Recycling von Zelloberflächenrezeptoren und ist an perinukleären Recycling-Endosomen lokalisiert. LAMP-1 ist ein membranständiges lysosomales Protein und somit hauptsächlich in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert. Der LysoTracker ist ein zellpermeables Reagenz, welches in sauren Kompartimenten akkumuliert und dort fluoreszent angeregt werden kann. Bei höheren pH-Werten emittiert der LysoTracker keine Fluoreszenz und ist somit ein Indikator für saure Kompartimente. COS-7 und HeLa Zellen wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die COS-7 Zellen wurden zunächst transient transfiziert und anschließend mit Antikörpern gegen CatD kofärbt. Die HeLa Zellen wurden in einer Kofärbung mit Antikörpern gegen CatD und intrazellulären Markern behandelt. Beide Zelllinien wurden anschließend im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet.

Abb. 5 zeigt das Ergebnis der intrazellulären Kofärbungen. CatD ist in roter Farbe dargestellt, die intrazellulären Markerproteine wurden in grüner Farbe dargestellt. In Abb. 5A a, c und e sind COS-7 Zellen zu sehen, die mit Rab4-EGFP (Abb. 5Aa), Rab5-EGFP (Abb. 5Ac) oder Rab7-EGFP (Abb. 5Ae) transfiziert wurden. Eine Kofärbung gegen intrazelluläres CatD zeigt, dass CatD nicht mit Rab4 positiven Vesikeln kolokalisiert. Dagegen findet mit Rab5 positiven und Rab7 positiven Vesikeln eine Kolokalisation statt. Die Kofärbung von CatD und Antikörpern gegen Rab4 (Abb. 5Ab), Rab5 (Abb. 5Ad) und Rab7 (Abb. 5Af) in HeLa Zellen kommt zu dem gleichen Ergebnis. Auch hier kolokalisiert CatD nur mit Rab5 und Rab7.

Abb. 5Ba-c zeigt COS-7 Zellen, die mit Rab9-EGFP (Abb. 5Ba), Rab11-EGFP (Abb. 5Bb), LAMP-1-EGFP (Abb. 5Bc) transfiziert wurden oder in denen mittels indirekter Immunfluoreszenz EEA1 und CatD (Abb. 5Be) nachgewiesen wurden. Abb. 5Bd zeigt HeLa Zellen, die mit LysoTracker (Abb. 5Bd)

behandelt wurden. Es ist zu erkennen, dass CatD in COS-7 Zellen mit Rab9, LAMP-1, LysoTracker und EEA1 kolokalisiert.

Eine Kolokalisation mit Rab11 kann dagegen nicht beobachtet werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass CatD hauptsächlich in frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen vorkommt. Eine Lokalisation von CatD in Recycling-Endosomen ist jedoch nicht nachzuweisen.

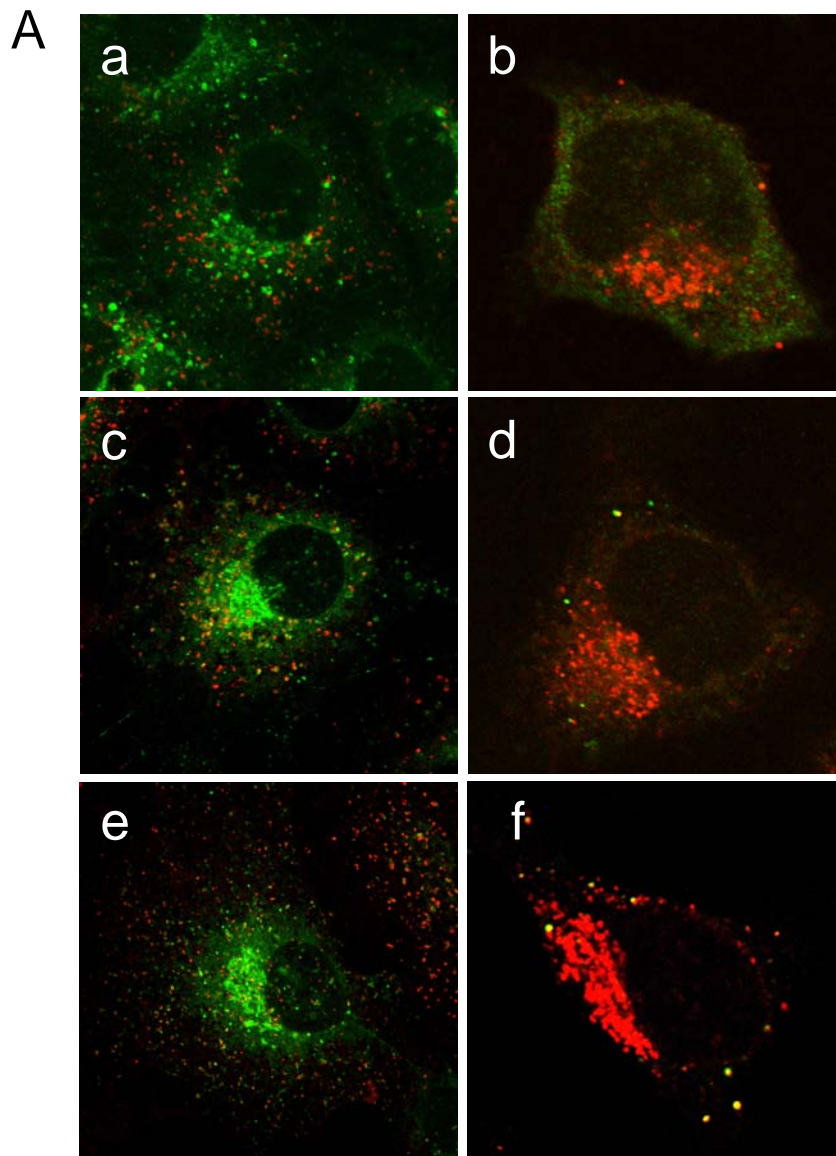


Abb. 5A: Untersuchung zur Lokalisation von Cathepsin D in COS-7 und HeLa Zellen

COS-7 Zellen (a, c, e) wurden mit Rab4-EGFP (a), Rab5-EGFP (c) oder Rab7-EGFP (e) transient transfiziert. Anschließend erfolgte die Lokalisation von CatD mit Hilfe von Antikörpern.

In HeLa Zellen (b, d, f) wurden zunächst Rab4 (b), Rab5 (d) oder Rab7 (f) und dann Cathepsin D mit Hilfe von Antikörpern lokalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

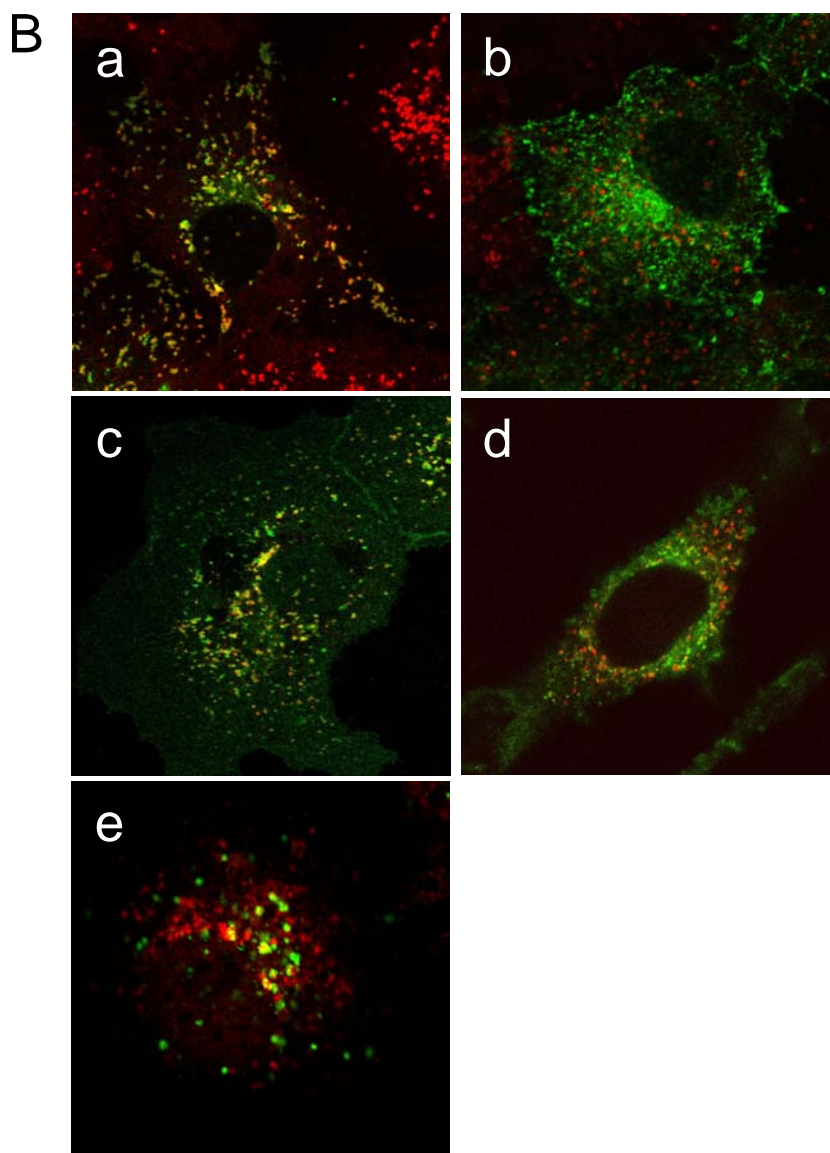


Abb. 5B: Untersuchung zur Lokalisation von Cathepsin D in COS-7 und HeLa Zellen

COS-7 Zellen (a, b, c, e) wurden mit Rab9-EGFP (a), Rab11-EGFP (b) oder LAMP1-EGFP (c) transient transfiziert oder mit Antikörpern gegen EEA1 (e) behandelt. Anschließend erfolgte die Lokalisation von CatD mit Hilfe von Antikörpern. HeLa Zellen (d) wurden zunächst mit Lysotracker behandelt. Anschließend erfolgte die Lokalisation von Cathepsin D mit Hilfe von Antikörpern. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3.3 Der TNF-R1 kolokalisiert mit Cathepsin D

In Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die mit TNF behandelt wurden, eine verstärkte Prozessierung der 52kD Vorform von Cathepsin D (CatD) zu den aktiven 48kD und 32kD Isoformen stattfand (Heinrich et al., 1999). Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob es zu einer intrazellulären Kolokalisation von TNF-R1 und CatD kommt.

In TNF-R1 Wildtyp Zellen wurde eine Behandlung mit Biotin-TNF/Avidin-FITC durchgeführt. Anschließend erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz die Lokalisation von CatD in den Zellen. In grüner Farbe sind die TNF-R1 Komplexe dargestellt, die CatD Färbung ist in rot dargestellt. Eine Kolokalisation ist an der gelben Farbe zu erkennen.

In Abb. 6 ist zu erkennen, dass CatD deutlich vesikulär verteilt ist. Die CatD enthaltenden Vesikel sind überwiegend in Zellkernnähe lokalisiert. Einzelne Vesikel sind aber auch in der Zellperipherie zu finden. Die Lokalisation von CatD ändert sich im Laufe der Behandlung nicht. Nach 15- und 30-minütiger Internalisierung des TNF-R1 kommt es zu vereinzelt Kolokalisationen innerhalb der Zelle (Abb. 6C+D). Diese Kolokalisationen werden nach 60-minütiger Internalisierung deutlich zahlreicher (Abb. 6E+E*). Alle Kolokalisationen finden in zellkernnahen Bereichen statt.

Dieses Experiment zeigt, dass es im Laufe der TNF-R1 Internalisierung zu einer direkten Interaktion von TNF-R1 Vesikeln mit CatD enthaltenden Vesikeln kommt. Die Zeit, nach der die TNF-R1 enthaltenden Vesikel mit CatD kolokalisieren, spricht dafür, dass das Zusammentreffen beider Vesikel zwischen dem Stadium des frühen Endosoms und dem späten Endosom geschieht.

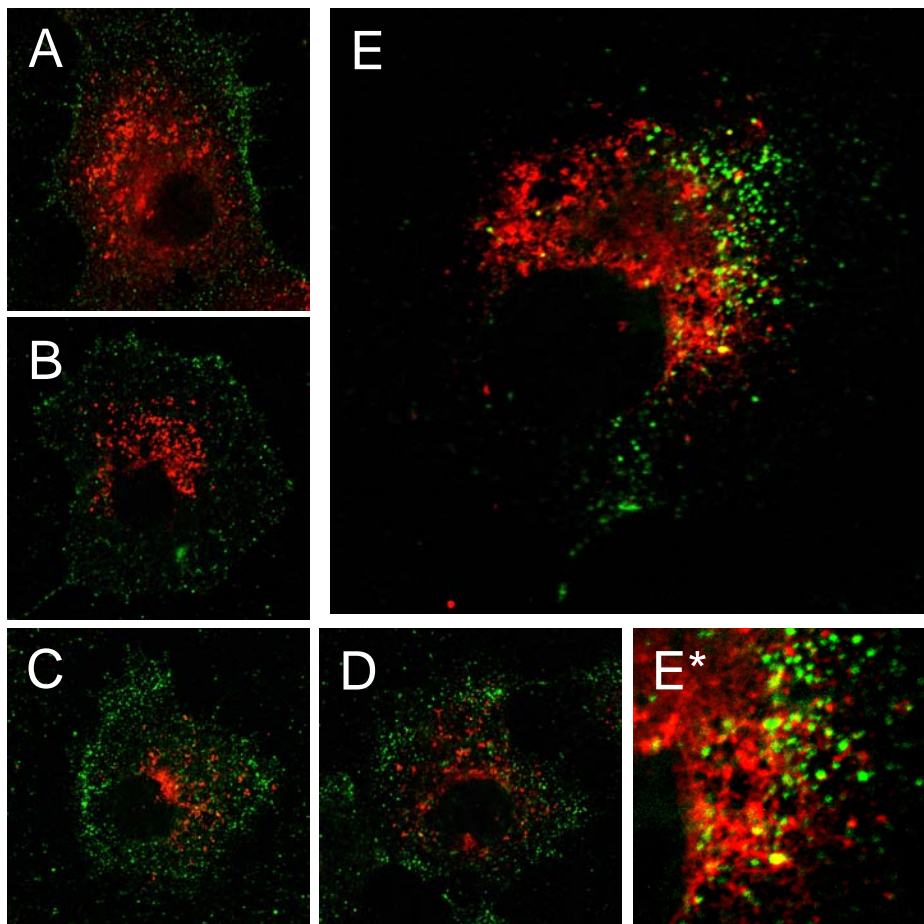


Abb.6

Abb. 6: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und CatD

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-CatD-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 6E* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 6E dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.4 Der TNF-R1 kolokalisiert nicht mit Strukturen des Golgi-Apparates**3.1.4.1 Der TNF-R1 kolokalisiert nicht mit Rab9**

Intralysosomale Proteasen wie CatD werden über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor Transportweg in Endosomen geleitet. In späten Endosomen werden Mannose-6-Phosphat Rezeptor und Protease voneinander getrennt. Während die Protease weiter zum Lysosom transportiert wird, wird der Mannose-6-Phosphat Rezeptor von späten Endosomen zurück zum Golgi-Apparat transportiert, wo er einen weiteren Transportzyklus beginnt.

Der Rücktransport von Materialien zum Golgi-Apparat wird durch Rab9 gesteuert (Ganley et al., 2004). In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass CatD ebenfalls mit Rab9 kolokalisiert (Abb. 5). Es soll nun untersucht werden, ob es im Verlauf der TNF-T1 Internalisierung zu einer Kolokalisation von TNF-R1 mit Rab9 kommt.

In Abb. 9 ist zu sehen, dass Rab9 deutlich vesikulär in Zellkernnähe verteilt ist. Dies weist auf eine Beteiligung beim Transport von späten Endosomen und dem Golgi-Apparat hin. Zu keinem Zeitpunkt ist eine Kolokalisation internalisierter TNF-R1 Vesikel mit Rab9 positiven Vesikeln zu beobachten.

Auch nach 60 Minuten kommt es zu keiner deutlichen Kolokalisation von Vesikeln (Abb. 7E + 7E*). Diese Befunde sprechen dafür, dass der TNF-R1 aus späten Endosomen zu Lysosomen weitergeleitet wird und es nicht zu einem Recyclingprozess oder einem Rücktransport zum Golgi-Apparat kommt.

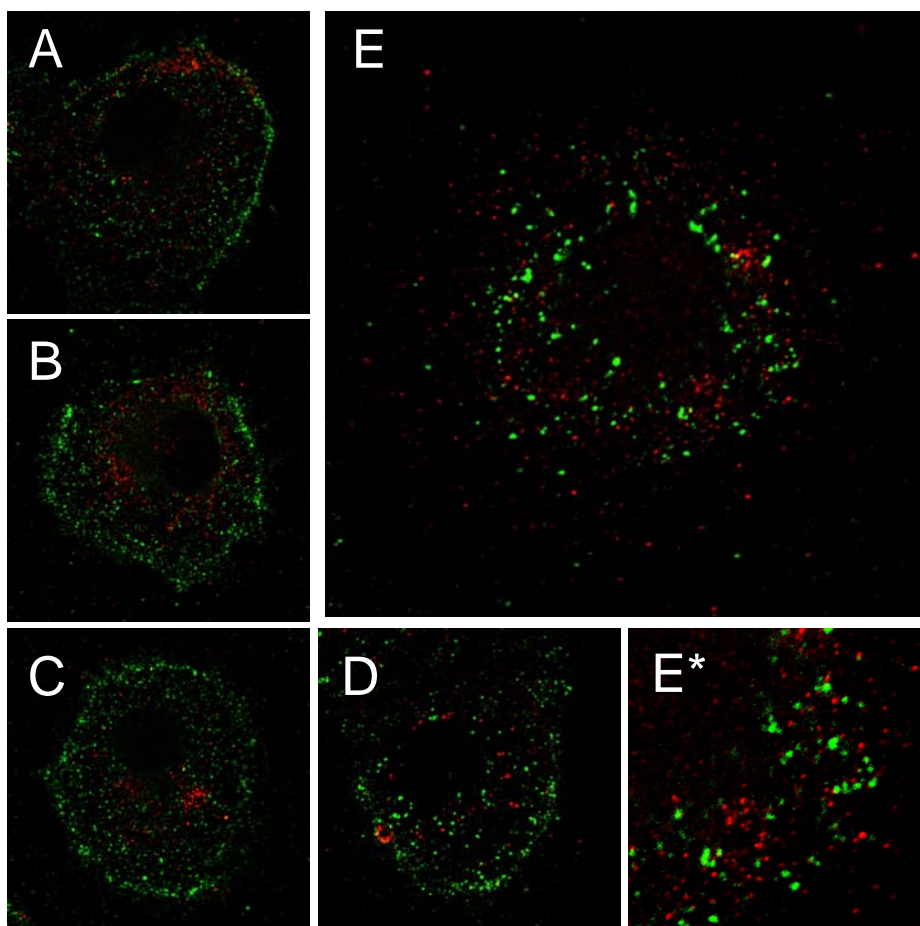


Abb. 7: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und Rab9

COS-7 Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-Rab9-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 6E* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 6E dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.4.2 Der TNF-R1 kolokalisiert nicht mit Vti1a

In den vorangegangenen Experimenten konnte unter anderem gezeigt werden, dass internalisierte TNF-R1 Vesikel mit dem an späten Endosomen und am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisierten SNARE Protein Vti1b kolokalisieren. Das SNARE Protein Vti1a ist dem Vti1b nahe verwandt, kommt jedoch ausschließlich am TGN und im Golgi-Apparat vor. Hier soll nun untersucht werden, ob internalisierte TNF-R1 mit Strukturen des TGN fusionieren

In Abb. 8 ist das Ergebnis des Kolokalisationsexperiments zu sehen. Die Verteilung von Vti1a deutet auf eine Assoziation mit Elementen des TGN hin, da sich Vti1a in den Zellen fast ausschließlich in einem kernnahen Kompartiment befindet. Einige Vti1a positive Vesikel befinden sich jedoch außerhalb des vermuteten TGN.

Es kommt zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zu einer Kollokalisierung von TNF-R1 mit Vti1a positiven Vesikeln. Auch nach 60-minütiger Internalisierung des TNF-R1 (Abb. 8E+E*) ist keine Kollokalisierung zu erkennen. Die Zahl der internalisierten TNF-R1 Vesikel hat deutlich zugenommen, sie sind nunmehr fast im gesamten zytoplasmatischen Raum verteilt. In Abb. 8E und E* ist deutlich zu sehen, dass die Vesikel sehr eng beieinander liegen, es jedoch zu keiner Überlagerung kommt.

Es kann somit festgehalten werden, dass es während der Internalisierung zu keiner direkten Assoziation mit Vesikeln des TGN kommt.

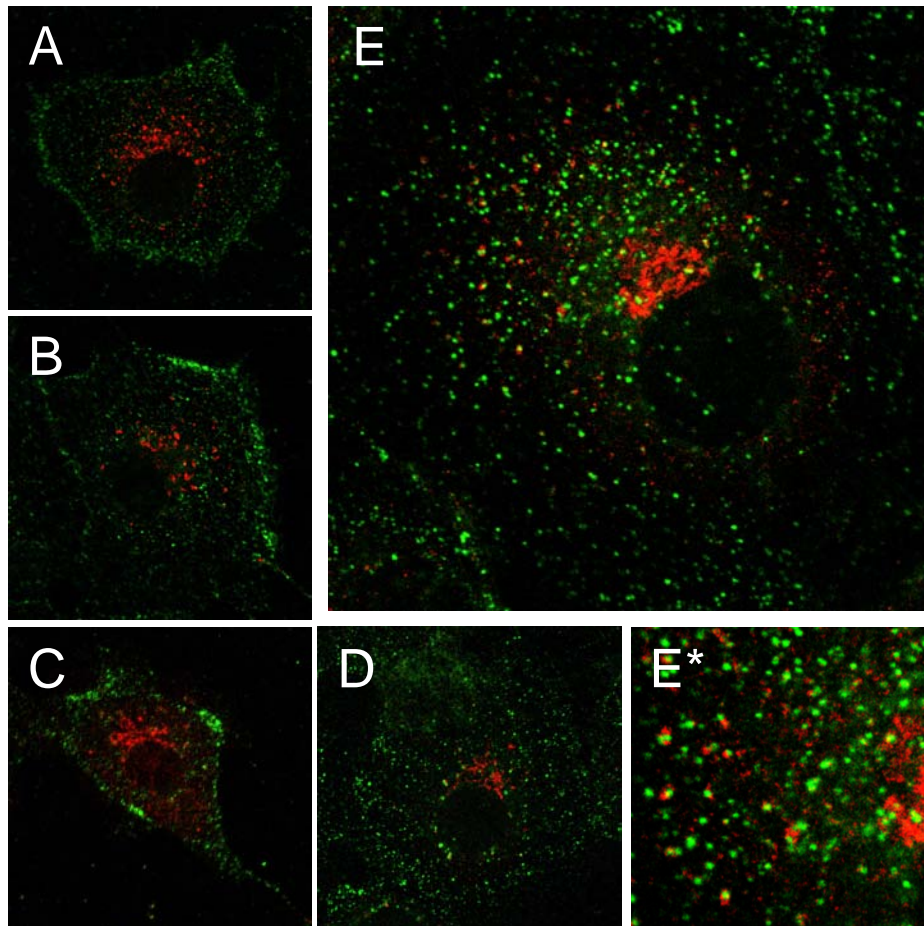


Abb. 8: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und Vti1a

TNF-R1 Wildtyp Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-Vti1a-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Dargestellt sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 8E* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 8E dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.5 Der TNF-R1 kolokalisiert mit aktiver Caspase 8

Die Caspase-8 spielt als Initiatorcaspase eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Caspase-Kaskade. Die am TNF-Rezeptor prozessierte Caspase-8 liegt als aktives Heterodimer im Zytosol vor, wo sie entweder Caspase-3 aktiviert oder die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c durch die Spaltung von Bid induziert. Es soll in dem folgenden Experiment untersucht werden, ob es nach erfolgter Internalisierung des TNF-R1 zu einer möglichen Kolokalisation mit der aktiven Caspase-8 kommt.

In TNF-R1 Wildtyp Zellen wurde eine Behandlung mit Biotin-TNF/Avidin-FITC durchgeführt. Anschließend erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz die Lokalisation von aktiver Caspase-8 in den Zellen. In grüner Farbe sind die TNF-R1 Komplexe dargestellt, die intrazelluläre Caspase-8 Färbung ist in rot dargestellt. Eine intrazelluläre Kolokalisation ist an der gelben Farbe zu erkennen.

In Abb. 9 ist zunächst zu sehen, dass die aktive Caspase-8 deutlich vesikulär bzw. Granulär verteilt ist. Bei 4°C ist in den Zellen keine aktive Caspase-8 zu erkennen. Der TNF-R1 befindet sich auf der Zelloberfläche (Abb. 9A). Nach 15-minütiger Internalisierung haben sich bereits einige Vesikel von der Plasmamembran gelöst (Abb. 9B). Ebenso hat in den Zellen der Anteil aktiver Caspase-8 zugenommen. Sie ist nun in Form kleiner Vesikel erkennbar. Sie befinden sich nun konzentrierter in Zellkernnähe. Auch die Zahl der Caspase-8 enthaltenden Vesikel hat deutlich zugenommen. Nach 45-minütiger Internalisierung findet erstmals eine Kolokalisation von TNF-R1 und Caspase-8 enthaltenden Vesikeln statt (Abb. 9D*). Nicht alle der TNF-R1 Vesikel kolokalisieren mit aktiver Caspase-8. Nach 60-minütiger Internalisierung hat die Größe der TNF-R1 enthaltenden Vesikel deutlich zugenommen. Diese Beobachtung spricht für die Lokalisation des TNF-R1 in „multivesicular bodies“, die deutlich größer als frühe Endosomen sind. Die meisten der Caspase-8 enthaltenden Vesikel sind nun mit TNF-R1 enthaltenden Vesikeln kolokalisiert (Abb. 9E).

Die aktive prozessierte Caspase-8 befindet sich in diesem Experiment nicht im Zytoplasma sondern ist deutlich an Vesikel angelagert. Weiter ist zu erkennen, dass eine Behandlung mit TNF zu einer Aktivierung der Caspase-8 führt, da die Menge der Vesikel zunimmt. Diese Vesikel kolokalisieren mit dem internalisierten TNF-Rezeptor.

3.1.6 A-SMase und aktive Caspase-8 befinden sich in magnetisch isolierten TNF-R1 Fraktionen

In den Untersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass der internalisierte TNF-R1 mit der aktiven Caspase-8 intrazellulär in vesikulären Strukturen kolokalisiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der TNF-R1 mit CatD kolokalisiert. CatD wird als über das Trans-Golgi Netzwerk (TGN) vermutlich zu frühen Endosomen transportiert. Über denselben Weg gelangt die Proform der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) in frühe Endosomen. Die A-SMase produziert, hervorgerufen durch TNF-Behandlung, aus Sphingomyelin Ceramid, welches dann wiederum CatD aktiviert. In magnetisch isolierten TNF-R1 Fraktionen soll nun untersucht werden, ob sich die A-SMase und die aktive Caspase-8 in denselben TNF-R1 Fraktionen befinden.

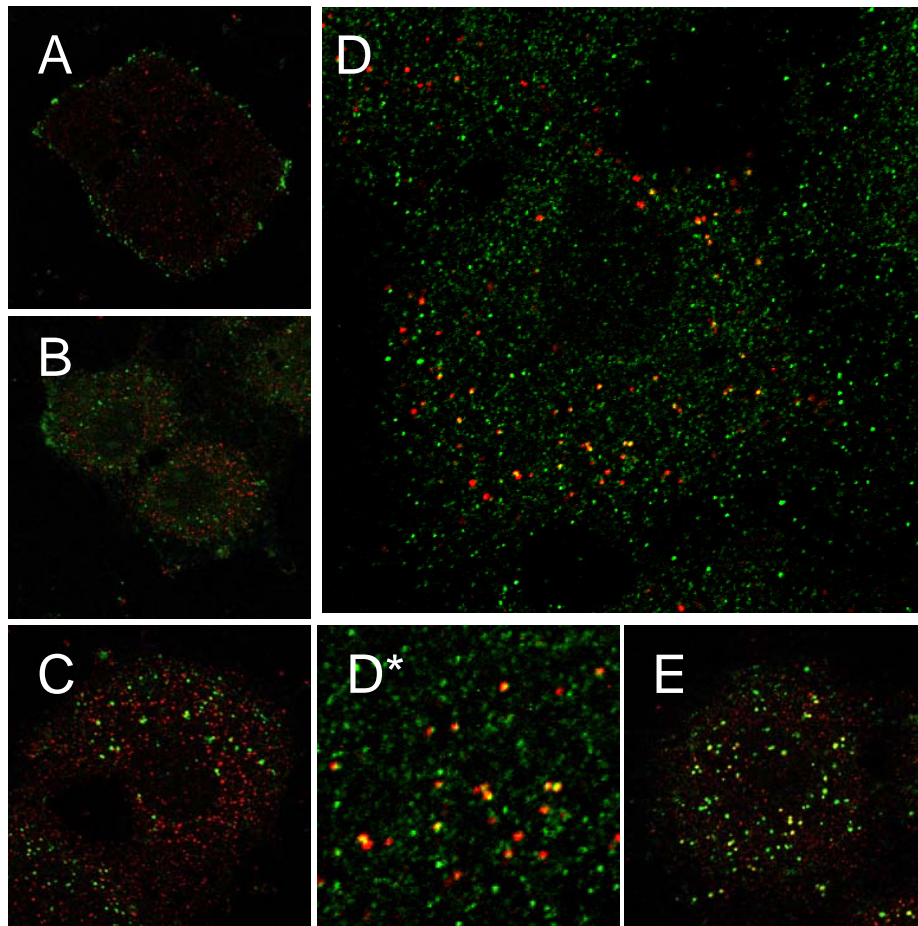


Abb. 9: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von TNF-R1 und aktiver Caspase-8

COS-7 Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Avidin-FITC behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten bei 37°C wurden die Zellen fixiert, mit Anti-cleaved-Caspase8-Antikörpern behandelt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach 1 Stunde bei 4°C (A), nach 5 Minuten bei 37°C (B), nach 15 Minuten bei 37°C (C), nach 30 Minuten bei 37°C (D) und nach 60 Minuten bei 37°C (E). In Abb. 9D* ist eine Ausschnittsvergrößerung der Abb. 9D dargestellt. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Dazu wurden aus COS-7 Zellen TNF-R1 Fraktionen magnetisch isoliert und im Western-Blot untersucht.

In Abb. 10 ist zu sehen, dass sich die Proform der A-SMase und die aktive Form der Caspase-8 in den TNF-R1 Fraktionen nachweisen lassen. Die 72/70 kD Proform ist nach 5- und 15-minütiger Internalisierung in den TNF-R1 Fraktionen vorhanden und anschließend nicht mehr nachweisbar. Während nach 5- und 15-minütiger Internalisierung nur eine geringe Menge der aktiven Caspase-8 vorhanden ist, zeigt sich nach 30- und 60-minütiger Internalisierung eine deutliche Zunahme der aktiven Caspase-8 in den TNF-R1 Fraktionen. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen, die eine Kolokalisation von internalisierten TNF-R1 Vesikeln und Vesikeln mit aktiver Caspase-8 zeigen konnten (Abb. 9). Mit der Zunahme der aktiven Caspase-8 in den TNF-R1 Fraktionen nimmt die A-SMase Proform ab. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Aktivierung der A-SMase durch

proteolytische Spaltung der Proform und Generierung der enzymatisch aktiven 63kD Form durch die aktive Caspase-8.

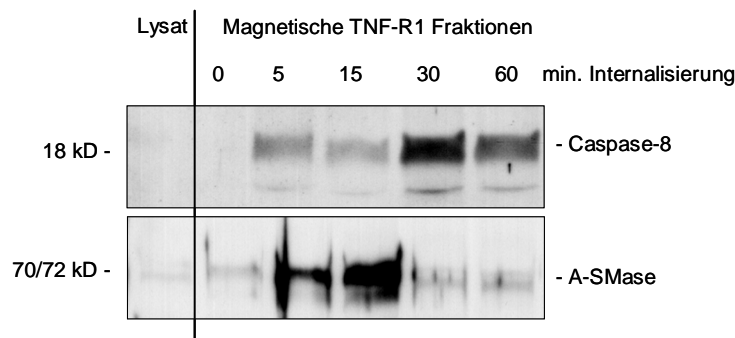


Abb. 10: Western-Blot Analyse magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen aus COS-7 Zellen zur Untersuchung der A-SMase und aktiver Caspase-8

COS-7 Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und magnetischen Streptavidin-Microbeads behandelt. Nach 0min, 5, 15, 30 und 60min Internalisierung bei 37°C wurden die Zellen schonend homogenisiert und magnetisch markierte TNF-R1 mit einer Free-Flow-Magnetkammer isoliert. Die TNF-R1 Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Kontrolle wurde ein Lysat aus COS-7 Zellen aufgetragen. Die Behandlung der Membran erfolgte mit α -A-SMase und α -cleaved-Caspase-8-Antikörpern.

3.1.7 Bid ist vesikulär verteilt und kolokalisiert mit Cathepsin D an Endosomen

Das proapoptotische Protein Bid spielt im Rahmen der TNF-induzierten Cytochrom-c Freisetzung aus den Mitochondrien eine wichtige Rolle, indem es zusammen mit anderen proapoptotischen Bcl-2 Proteinen die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert. Es ist bekannt, dass Bid im Zuge der TNF-induzierten Apoptose von Caspase-8 geschnitten wird und anschließend zu den Mitochondrien transloziert.

In Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass Bid ein Substrat für CatD darstellt (Heinrich et al., 2002). Die direkte räumliche Assoziation beider Proteine ist für eine aktivierende Spaltung von Bid durch CatD essentiell. Es soll nun geklärt werden, in welchen intrazellulären Kompartimenten sich Bid befindet und ob eine Interaktion von Bid mit CatD auch in Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden kann.

HeLa und COS-7 Zellen wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen auf die intrazelluläre Verteilung von Bid, Rab4, Rab5, CatD und LysoTracker untersucht. Bid ist jeweils in grüner Farbe dargestellt, die intrazellulären Marker sind an der roten Farbe zu erkennen. Eine Kolokalisation ist in gelber Farbe dargestellt.

Abb. 11A zeigt die Verteilung von Bid und Rab4 in HeLa Zellen. Die Verteilung von Rab4 deutet auf eine vesikuläre Verteilung, aber auch auf eine partiell zytosolische Lokalisation hin. Bid ist deutlich mit Vesikeln assoziiert. Beide Proteine kolokalisieren nicht miteinander. Abb. 11B zeigt eine COS-7 Zelle,

die mit Antikörpern gegen Rab5 und Bid gefärbt wurde. Deutlich ist die vesikuläre Verteilung beider Proteine zu erkennen. Bid und Rab5 kolokalisieren partiell miteinander in Vesikeln, die sich im Zytoplasma verteilt befinden. Diese Befunde zeigen, dass Bid zum Teil mit Rab5-positiven Endosomen assoziiert ist. Eine Assoziation mit Rab4-positiven Endosomen konnte nicht gezeigt werden.

Abb. 11D zeigt die Verteilung von Bid und CatD in COS-7 Zellen. Deutlich ist zu sehen, dass eine Kolokalisation von Bid und CatD in perinukleären Bereichen stattfindet. Da CatD in Endosomen und Lysosomen auftritt, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass Bid ebenfalls mit Endosomen oder Lysosomen assoziiert sein könnte. In Abb. 11C ist die Verteilung von Bid und Lysotracker in HeLa Zellen dargestellt. Hier ist keine Kolokalisation zwischen lysosomalen Kompartimenten und Bid zu erkennen. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass Bid mit frühen oder späten Endosomen kolokalisiert, nicht aber mit Lysosomen. Somit kann eine direkte räumliche Interaktion zwischen dem TNF-R1, der ebenfalls durch diese Kompartimente transportiert wird, prozessierter Caspase-8, CatD und Bid hergestellt werden.

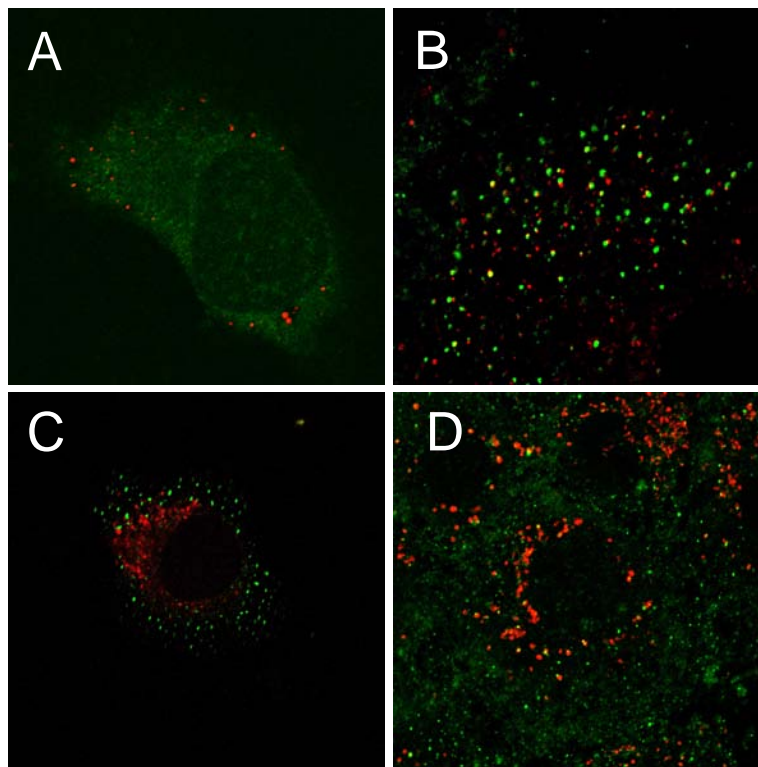


Abb. 11: Untersuchung zur Lokalisation von Bid in COS-7 und HeLa Zellen

COS-7 Zellen (B, D) wurden mit Anti-Bid Antikörpern und mit Anti-Rab5 (B) oder Anti-Cathepsin D-Antikörpern (D) behandelt. HeLa Zellen (A, C) wurden mit Lysotracker behandelt (C) oder unbehandelt gelassen (A) und mit Anti-Bid Antikörpern und Anti-Rab4 Antikörpern behandelt. Die Zellen in Abb. 11 C wurden ausschließlich mit Anti-Bid Antikörpern behandelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.8 Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen

Die Untersuchungen zum intrazellulären Transport internalisierter TNF-R1 Vesikel mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie haben gezeigt, dass der TNF-R1 nach seiner Internalisierung mit intrazellulären Proteinen, welche für die Regulation des vesikulären Transports verantwortlich sind, kolokalisiert. Dazu zählten Markerproteine für frühe Endosomen, wie z.B. Rab5 und EEA1 und Markerproteine für späte Endosomen bzw. Lysosomen wie z.B. Vti1b und CatD. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der TNF-R1 nach Internalisierung mit wichtigen funktionalen Proteinen der TNF-Signaltransduktion kolokalisiert, wie z.B. aktiver Caspase-8 und Cathepsin D.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse soll anhand immuno-magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen im Western-Blot untersucht werden, ob nach Internalisierung des TNF-R1 Proteine isoliert werden können, die in mit den TNF-R1 enthaltenden Vesikeln assoziiert sind.

Dazu wurden U937 Zellen bei 4°C mit Biotin-TNF und Streptavidin-MACS Microbeads behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 10, 30 und 60 Minuten bei 37°C inkubiert und schonend homogenisiert. Aus dem Homogenat wurden magnetisch TNF-R1 Fraktionen isoliert und im Western-Blot untersucht. Als Kontrolle wurde ein Totallysat aus U937 Zellen mit aufgetragen. Als Nachweis für den intrazellulären Transportprozess des TNF-R1 wurden mehrere Markerproteine des endo-lysosomalen Transportweges untersucht. Dazu zählen die frühendosomalen Markerproteine Rab4 und Rab5, sowie Clathrin, das an der Bildung von „clathrin coated pits“ beteiligt ist. Weiterhin wurden zwei Proteine der für das intrazelluläre Trafficking wichtigen AP-Komplexe untersucht: β -Adaptin, was in allen AP-Komplexen vorkommt und p47A, ein Bestandteil des AP-3 Komplexes, welcher den Transport von Molekülen vom Trans-Golgi-Netzwerk zu späten Endosomen und zu Lysosomen reguliert. Als Markerproteine für späte Endosomen und Lysosomen wurden die bereits beschriebenen Proteine Vti1b, LAMP-1 und CatD verwendet. Außerdem wurde untersucht, ob das proapoptotische Protein Bid mit den internalisierten TNF-R1 assoziiert ist.

In Abb. 12 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Zusammensetzung der isolierten TNF-R1 Fraktionen nach jedem untersuchten Zeitpunkt deutlich unterscheidet. So dominieren nach 10-minütiger Internalisierung die Markerproteine für den früh endosomalen Transport, wie z.B. Clathrin, Rab4 und Rab5. Während Clathrin und Rab4 nach 60-minütiger Internalisierung nicht mehr in den TNF-R1 Fraktionen enthalten sind, befindet sich Rab5 zu allen untersuchten Zeitpunkten in den Fraktionen. β -Adaptin, ein Bestandteil aller AP-Komplexe ist zu allen Zeitpunkten in den TNF-R1 Fraktionen zu finden. Nach 10-minütiger Internalisierung befinden sich bereits sowohl die aktive 32kD Form von CatD, als auch die Proform von Bid in den Fraktionen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sowohl aktives CatD als auch Bid in frühen Endosomen vorkommen.

Mit zunehmender Internalisierungszeit finden sich zunehmend spät endosomale oder lysosomale Proteine in den TNF-R1 Fraktionen. Erstmals nach 30-minütiger Internalisierung lassen sich die Proteine p47A und LAMP-1 nachweisen, was für das Vorkommen von TNF-R1 in späten Endosomen und die Fusion von Vesikeln des TGN mit späten Endosomen spricht. Nach 60-minütiger Internalisierung sind die früh endosomalen Markerproteine Rab4 und Clathrin, als auch das AP-3

Protein p47A nicht mehr zu identifizieren. Die Menge von LAMP-1 und aktivem CatD hat deutlich zugenommen.

Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang das Vorkommen von Bid in den TNF-R1 Fraktionen. Bid ist bereits nach 10-minütiger Internalisierung vorhanden und nimmt nach 60-minütiger Internalisierung deutlich ab. Dies könnte ein Hinweis auf eine Spaltung von Bid durch z.B. CatD an den späten Endosomen sein.

Dieses Experiment zeigt komplementär und unterstützend zu den Ergebnissen der intrazellulären Kollokationen den Ablauf der TNF-R1 Internalisierung und der vesikulären Reifung von TNF-Rezeptosomen. Während nach 10-minütiger Internalisierung vor allem früh endosomale Markerproteine dominieren, finden sich nach 30- und 60-minütiger Internalisierung vor allem spät endosomale und lysosomale Proteine.

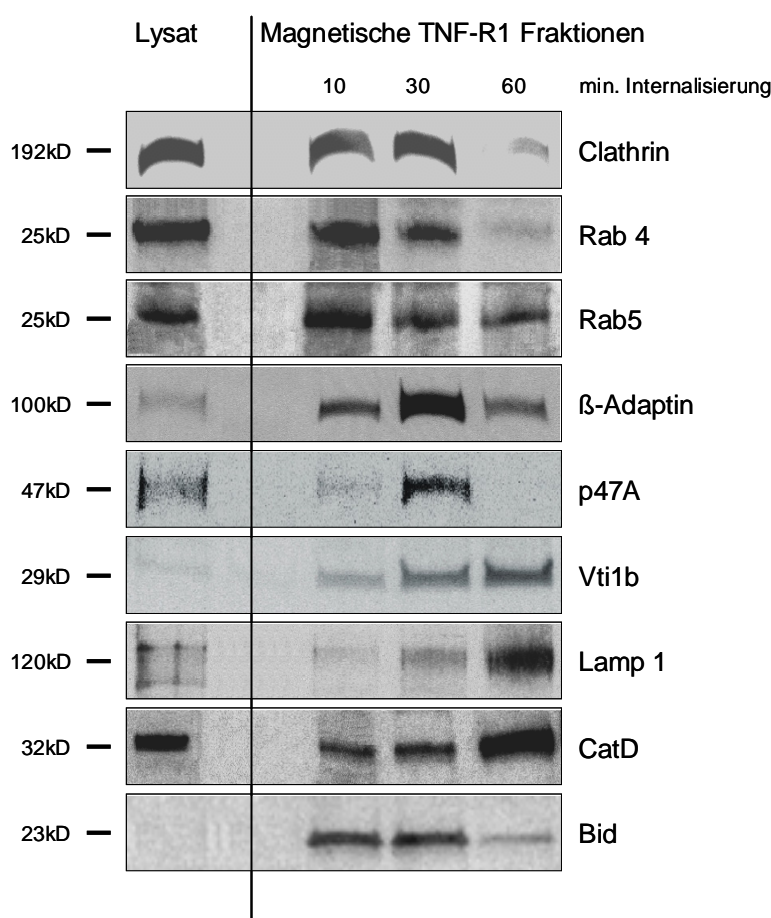


Abb. 12: Western-Blot Analyse magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen aus U937 Zellen zur Untersuchung des intrazellulären Transportprozesses von TNF-R1 Vesikeln

U937 Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Streptavidin-Microbeads behandelt. Nach 10 min, 30 min und 60 min Internalisierung bei 37°C wurden die Zellen schonend homogenisiert und magnetisch markierte TNF-R1 mit einer Free-Flow-Magnetkammer isoliert. Die TNF-R1 Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Kontrolle wurde ein Totallysat aus der jeweiligen Zelllinie aufgetragen. Die Behandlung der Membran erfolgte mit Antikörpern gegen die oben genannten Proteine.

3.2 Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 für die Internalisierung und die Induktion der Apoptose

Seit längerem ist bekannt, dass über die intrazellulären Domänen, wie z.B. die „death domain“ (DD) des TNF-R1 apoptotische Signale weitergeleitet werden, und dass der TNF-R1 nach Bindung von TNF- α internalisiert. Durch Vorarbeiten von Schütze et al., 1992 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der TNF-R1 Internalisierung zu einer reduzierten Apoptose führte. Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Versuche sollen Aufschluss darüber geben, welche Rolle die einzelnen zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 bei der Internalisierung des TNF-R1, bei der Aktivierung proapoptotischer Caspasen und bei der Induktion von Apoptose spielen.

Die in diesem Punkt beschriebenen Experimente wurden mit Zellen einer TNF-Rezeptor 1 und 2 defizienten Maus durchgeführt. In diesen Zellen wurde durch retrovirale Transduktion sowohl der TNF-R1 Wildtyp, als auch verschiedene Mutationen des TNF-R1 exprimiert. Eine Übersicht der verschiedenen TNF-R1 Mutationen ist in Abb.13 zu sehen.

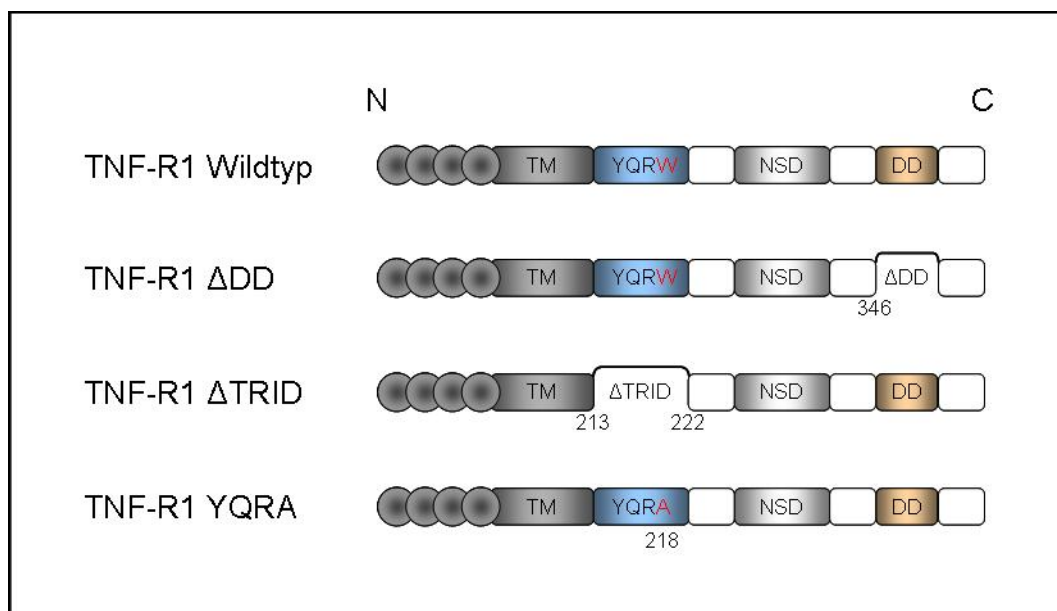


Abb. 13: Schematische Darstellung des TNF-R1 und der verwendeten Rezeptormutanten

Bedeutung der Abkürzungen: TM = Transmembrandomäne, TRID = TNF-Rezeptor Internalisierungs Domäne (AS 213-222), NSD = neutrale Sphingomyelinase Domäne, DD = Death Domain (ab AS 346), YQRA = Punktmutation der AS 218 Tryptophan→Alanin, N = N-terminal, C = C-terminal

3.2.1 Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung in TNF-R1 exprimierenden Zellen

TNF-R1 Wildtyp oder verschiedene Mutanten des TNF-R1 exprimierende Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Anschließend erfolgte die synchrone Internalisierung bei 37°C. Die Auswertung dieses Experiments erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

Wie in Abb. 14 A zu sehen ist, löst die Bindung von TNF an den TNF-R1 Wildtyp dessen Internalisierung aus. Bei 4°C befindet sich der TNF-R1 noch an der Plasmamembran (Abb. 14 Aa). Eine 5-minütige Inkubation bei 37°C führt zu einer beginnenden Internalisierung des TNF-R1 (Abb. 14 Ab). Es ist zu erkennen, dass sich bereits einige kleine Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt haben, die in das Zellinnere wandern. Nach einer 15-minütigen Inkubation sind viele größere Vesikel zu sehen, die sich nun deutlich im Zellinneren befinden (Abb. 14 Ac). Weiterhin ist eine verstärkte Vesikelbildung an der Plasmamembran zu beobachten. Das Auftreten größerer Vesikel im Zellinneren deutet auf eine bereits erfolgte Fusion vieler kleiner Vesikel hin, aus denen größere entstanden sind. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C ist sowohl eine Zunahme der Vesikelmenge, als auch der Vesikelgröße im Zellinneren zu beobachten (Abb. 14 Ad). Nach 60 Minuten sind alle angefärbten TNF-Rezeptoren von der Plasmamembran internalisiert worden und befinden sich in intrazellulären Vesikeln (Abb. 14 Ae). Viele Vesikel befinden sich deutlich in Zellkernnähe.

Die im zytoplasmatischen Teil des TNF-R1 lokalisierte „death domain“ (DD) ist wesentlich an der TNF-induzierten Aktivierung von Caspase-8 beteiligt. So binden zunächst die Adapterproteine TRADD und FADD an die DD. Über die DED („death effector domain“) des Proteins FADD kommt es zur Interaktion mit der DED der Caspase-8.

Die Untersuchung der TNF-R1 Δ DD exprimierenden Zellen ergab, dass die Deletion der „death domain“ (DD) keinen Einfluss auf die Internalisierung des TNF-R1 hat. Das Ergebnis ist in Abb. 14 B zu sehen. Bei 4°C befinden sich alle gefärbten TNF-R1 auf der Zelloberfläche. Nach 15, 30 und 60 Minuten bei 37°C ist eine deutliche Internalisierung des TNF-R1 Δ DD zu erkennen (Abb. 14 Bc-e). Nach 60-minütiger Internalisierung befinden sich die meisten Vesikel in Zellkernnähe. Ebenso hat die Deletion der DD anscheinend keinen Einfluss auf die Fusion der Vesikel, denn nach 30- und 60-minütiger Behandlung bei 37°C sind größere, perinukleär verteilte Vesikel zu erkennen.

Die TRID-Domäne ist eine 9AS lange Domäne, welche sich C-terminal an die Transmembrandomäne (TM) anschließt (Abb. 12, Schneider-Brachert et al., 2004).

Die Untersuchung der TNF-R1 Δ TRID exprimierenden Zellen ist in Abb. 14 C zu sehen. Hier ist deutlich zu erkennen, dass der TNF-R1 nach Deletion der TRID Domäne nicht mehr zur Internalisierung befähigt ist. Im untersuchten Zeitraum von 5, 15, 30 und 60 Minuten bei 37°C sind keine intrazellulären Vesikel zu beobachten (Abb. 14 Cb-e). Alle angefärbten TNF-R1 Komplexe befinden sich nach Inkubation bei 37°C auf der Zelloberfläche.

Durch Sequenzvergleiche des TNF-R1 mit anderen Rezeptoren konnte in dem Abschnitt, der als TRID-Domäne bezeichnet wird, ein Tyrosin-basiertes Internalisierungsmotiv gefunden werden (YQRW). Durch Punktmutationen in der letzten Stelle dieses Motivs soll untersucht werden, ob das YQRW-Motiv essentiell für die Internalisierung des TNF-R1 ist.

A TNF-R1 Wildtyp

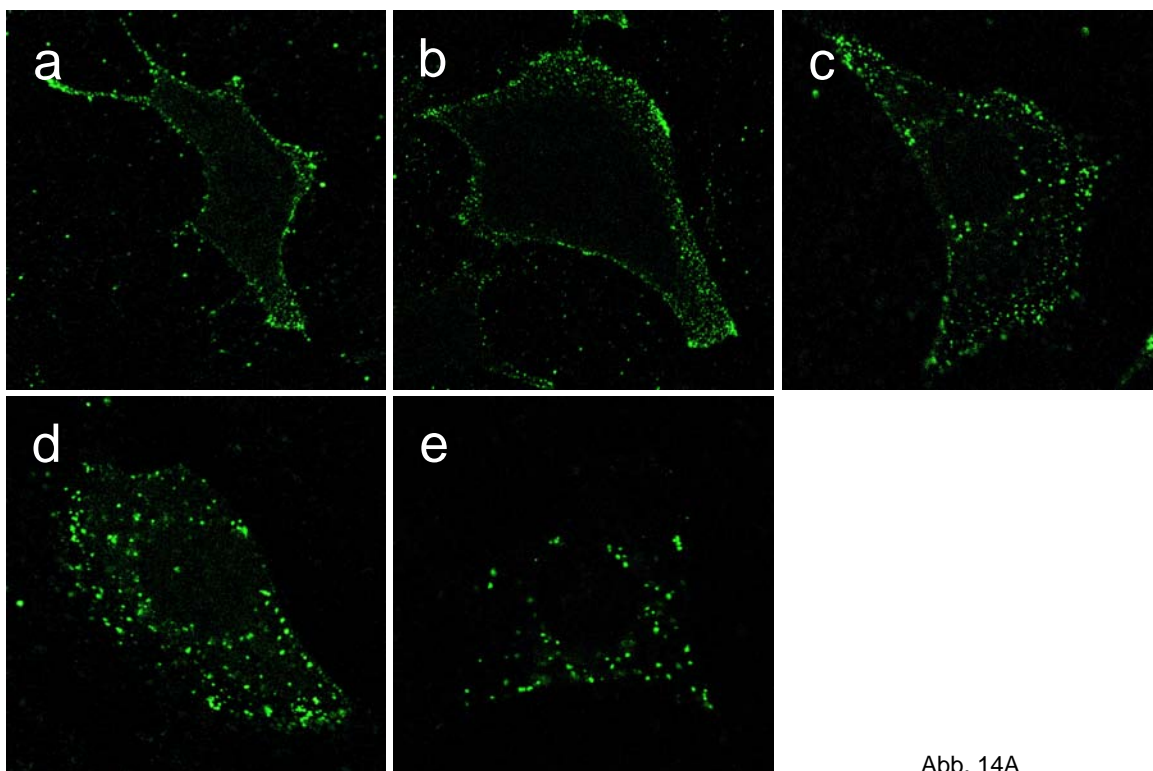


Abb. 14A

B TNF-R1 Δ DD

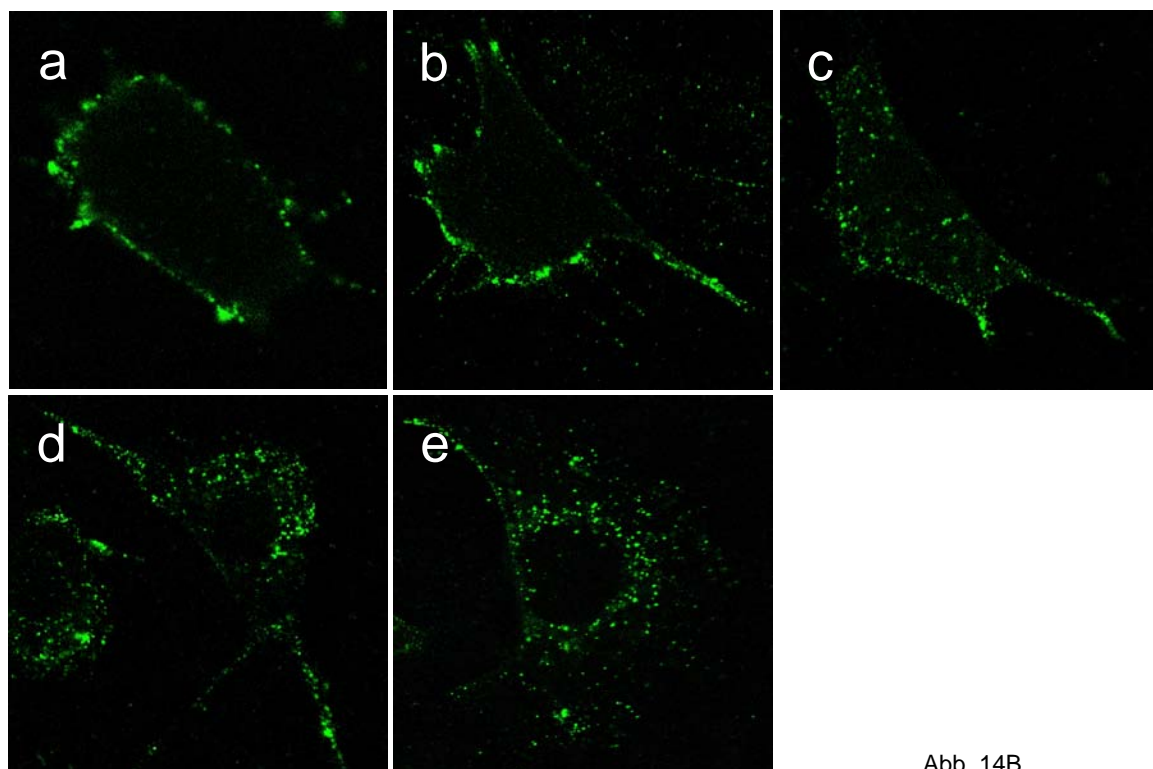


Abb. 14B

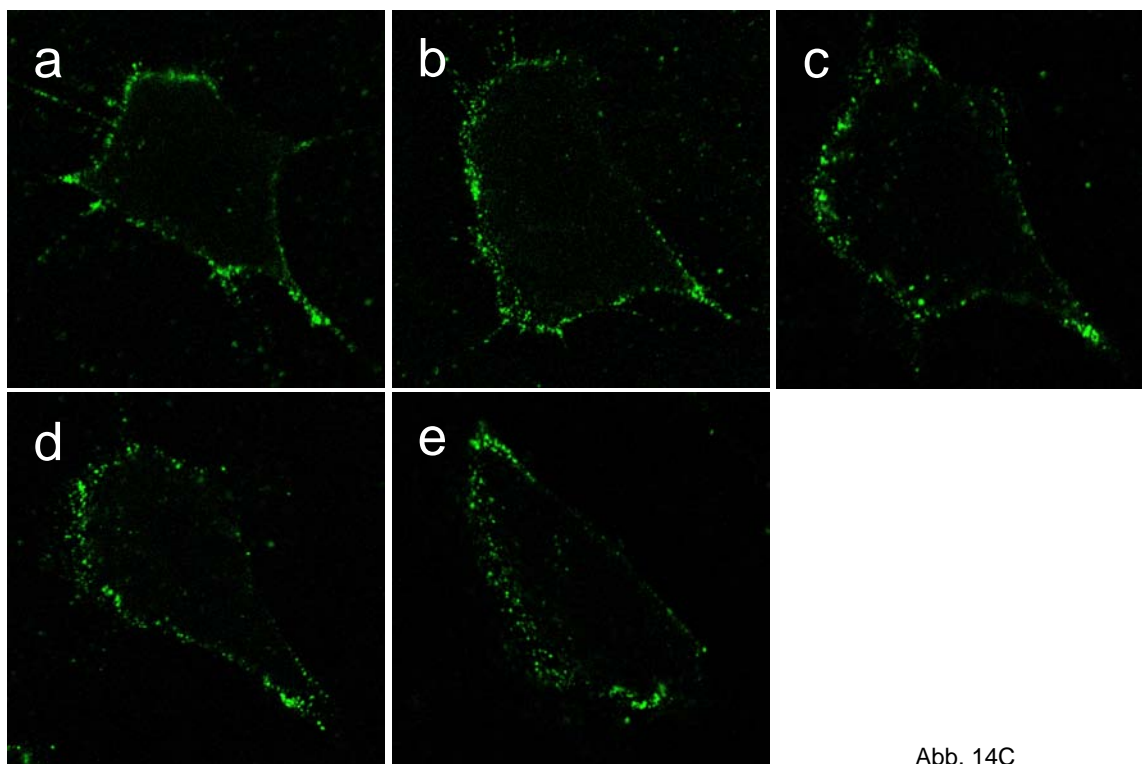
C TNF-R1 Δ TRID

Abb. 14C

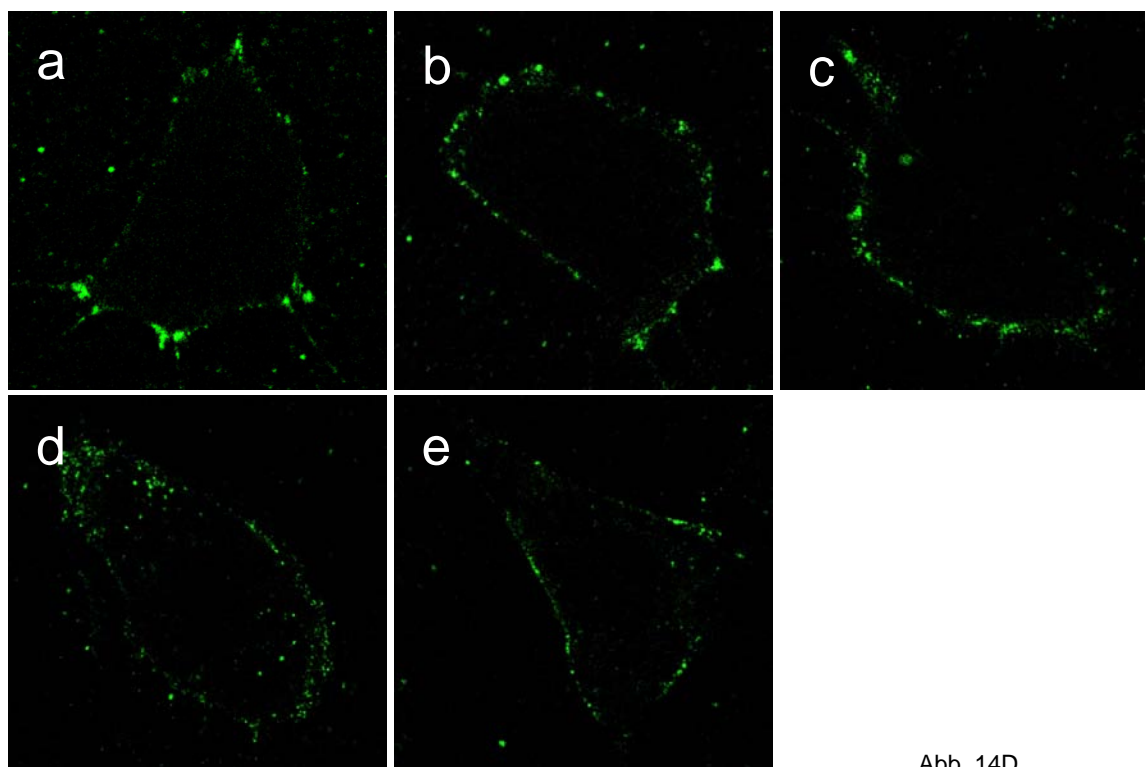
D TNF-R1 YQRA

Abb. 14D

Abb. 14: Darstellung der TNF-R1 Internalisierung in TNF-R1 exprimierenden Zellen

TNF-R1 Zellen (A: TNF-R1 Wildtyp; B: TNF-R1 Δ DD; C: TNF-R1 Δ TRID; D: TNF-R1 YQRA) wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume auf 37°C erwärmt und anschließend mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops ausgewertet. Zu sehen sind Zellen nach einer einstündigen Behandlung bei 4°C (a), nach 5 Minuten bei 37°C (b), nach 15 Minuten bei 37°C (c), nach 30 Minuten bei 37°C (d) und nach 60 Minuten bei 37°C (e). Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In Abb. 14 D ist die Untersuchung von YQRA-exprimierenden Zellen zu sehen. Durch Punktmutation wurde die AS Tryptophan gegen die AS Alanin ausgetauscht. Es ist zu erkennen, dass die Punktmutation YQRA die Internalisierung des TNF-R1 ebenso wie die Deletion der TRID Domäne blockiert. Nach den untersuchten Zeitpunkten 5, 15, 30 und 60 Minuten bei 37°C (Abb.14 D b-e) sind keine internalisierten Vesikel zu beobachten. Alle angefärbten TNF-R1 Komplexe befinden sich an der Plasmamembran.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das in der TRID-Domäne vorkommende Motiv YQRW essentiell für die Internalisierung des TNF-R1 ist. Eine Deletion der Domäne oder eine Mutation der Aminosäure Tryptophan in diesem Motiv blockiert die Internalisierung vollständig.

3.2.2 Untersuchung der Caspase-Aktivierung in TNF-R1 exprimierenden Zellen

3.2.2.1 Untersuchung der Caspase-3 Aktivität

Um die Bedeutung der Internalisierung des TNF-R1 für die Induktion der Apoptose zu untersuchen, wurden in TNF-R1 exprimierenden Zellen die Aktivitäten der proapoptotischen Caspasen-3 und -9 bestimmt. Zur Untersuchung der Caspase-Aktivität wurden die TNF-R1 Wildtyp Zellen, sowie alle weiteren mutierten TNF-R1 Zellen mit 100ng/ml TNF behandelt und anschließend kernfreie Lysate erstellt. In diesen Lysaten wurde die Aktivität von Caspase-3 bestimmt.

In TNF-R1 Wildtyp Zellen führt die Behandlung mit TNF nach 8, 16 und 24 Stunden zu einer gesteigerten Caspase-3 Aktivität (Abb. 15). Nach 24 Stunden nimmt die Caspase-3 Aktivität im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten geringfügig ab. In den Kontrollzellen ist nur eine sehr geringe Caspase-3 Aktivität zu beobachten.

In TNF-R1 Δ DD Zellen kommt es dagegen nach 8, 16 und 24 Stunden zu keiner gesteigerten Caspase-3 Aktivität. Dies ist auf das Fehlen der DD zurückzuführen, da die Caspase-8 nicht mehr am TNF-R1 aktiviert werden kann und es somit auch zu keiner Aktivierung von Effektorcaspasen kommt. Die internalisierungsdefizienten TNF-R1 Δ TRID Zellen zeigen nach 8, 16 und 24 Stunden eine leicht erhöhte Caspase-3 Aktivität. Diese Aktivität ist jedoch wesentlich geringer als in Zellen, die den Wildtyp Rezeptor exprimieren. Eine Behandlung mit TNF führt in TNF-R1 YQRA Zellen nur nach 8-stündiger Behandlung zu einer erhöhten Caspase-3 Aktivität.

Eine Behandlung mit TNF führt nur in TNF-R1 Wildtyp Zellen, die den TNF-R1 internalisieren können zu einer vollständigen Caspase-3 Aktivierung. Allerdings ist in diesen Zellen eine umgekehrte Kinetik

zu erkennen. TNF-R1 Δ DD Zellen können aufgrund der fehlenden DD keine Caspasen aktivieren. In den internalisierungsdefizienten TNF-R1 Δ TRID und YQRA Zellen ist nach TNF-Behandlung nur eine geringe Aktivierung der Caspase-3 zu beobachten.

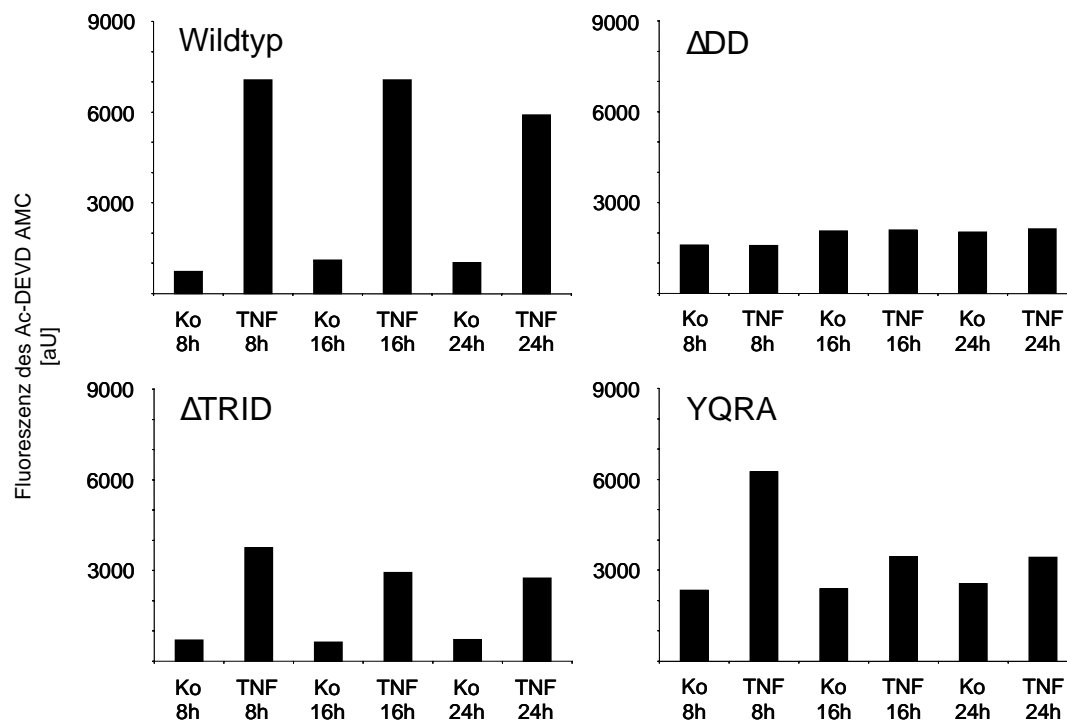


Abb. 15: Darstellung der Caspase-3 Aktivität in TNF-R1 exprimierenden Zellen

Die TNF-R1 Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100ng/ml behandelt. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurde in einem Enzymassay eingesetzt. Nach 180 Minuten wurde die Substratumsetzung durch Caspase-3 gemessen. Die Fluoreszenz [aU] wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz des Substrates dargestellt.

3.2.2.2 Untersuchung der Caspase-9 Aktivität

Zur Untersuchung der Caspase-9 Aktivität wurden die TNF-R1 Wildtyp Zellen, sowie alle weiteren mutierten TNF-R1 Zellen mit 100ng/ml TNF behandelt und anschließend kernfreie Lysate erstellt. In diesen Lysaten wurde die Aktivität von Caspase-9 bestimmt.

In TNF-R1 Wildtyp Zellen führt die Behandlung mit TNF nach 8, 16 und 24 Stunden zu einer deutlich erhöhten Caspase-9 Aktivität (Abb. 16). In TNF-R1 Δ DD Zellen ist dagegen nach TNF Behandlung keine gesteigerte Aktivität der Caspase-9 zu beobachten. Eine Behandlung mit TNF führt in TNF-R1 Δ TRID Zellen nach 8, 16 und 24 Stunden zu einer leicht erhöhten Caspase-9 Aktivität. Eine Behandlung der TNF-R1 YQRA Zellen mit TNF führt nur nach 8 Stunden zu einer erhöhten Caspase-9 Aktivität. Die Aktivierung von Caspase-3 und -9 ist abhängig von den intrazellulären Domänen und der daraus resultierenden Internalisierung des TNF-R1. So zeigen nur TNF-R1 Wildtyp Zellen eine vollständige Aktivierung von Caspase-3 und -9. Die internalisierungsdefizienten TNF-R1 Δ TRID und

YQRA zeigen dagegen nur eine geringe Aktivierung von Caspase-3 und -9. Durch das Fehlen der DD können in TNF-R1 Δ DD Zellen keine Caspasen aktiviert werden.

Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss der veränderte zeitliche Verlauf bzw. die verringerte Intensität der Caspase-Aktivierung auf die Induktion der Apoptose besitzt.

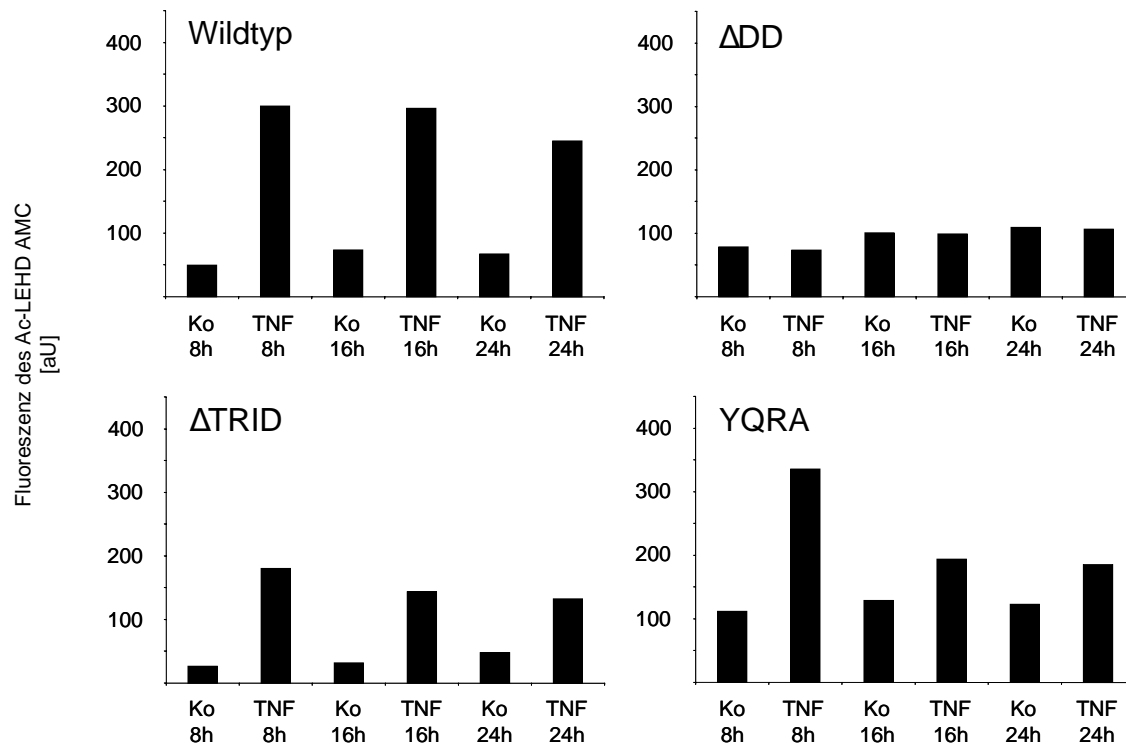


Abb. 16: Darstellung der Caspase-9 Aktivität in TNF-R1 exprimierenden Zellen

Die TNF-R1 Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100ng/ml behandelt. 50 μ g kernfreies Proteinlysate wurde in einem Enzymassay eingesetzt. Nach 180 Minuten wurde die Substratumsetzung durch Caspase-9 gemessen. Die Fluoreszenz [aU] wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz des Substrates dargestellt.

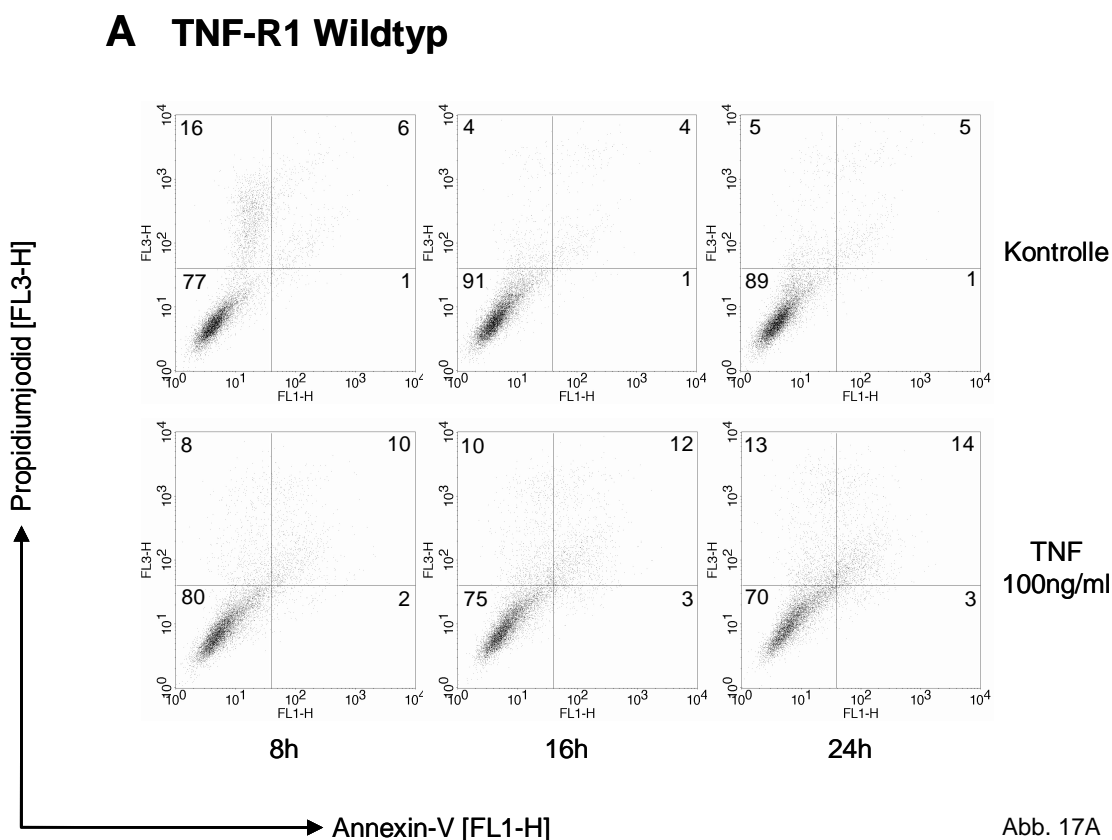
3.2.3 Untersuchung der Apoptose in TNF-R1 exprimierenden Zellen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit TNF in TNF-R1 Wildtyp Zellen Caspase-3 und -9 aktiviert werden. Verschiedene Mutanten des TNF-R1 zeigten nach TNF Behandlung unterschiedliche Resultate. So fand in Δ DD, Δ TRID und YQRA Zellen keine bzw. nur eine geringfügige Aktivierung der Caspasen statt. Die Aktivierung von Caspasen ist ein wichtiges Merkmal der TNF-induzierten Apoptose. In Folgenden soll nun untersucht werden, welchen Einfluss eine veränderte Caspaseaktivierung in TNF behandelten Zellen auf die Apoptose hat. Dazu wurden TNF-R1 Zellen mit TNF 100ng/ml behandelt und anschließend für eine Messung der Apoptose im FACS („fluorescence activated cell sorter“) vorbereitet. Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurde

FITC-gekoppeltes Annexin V und Propidiumjodid verwendet. Annexin V bindet an Phosphatidylserinreste der Plasmamembran, die während der Apoptose von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite externalisiert werden. Propidiumjodid interkaliert mit Kern-DNA in toten Zellen.

Abb. 17 zeigt das Ergebnis nach TNF-Behandlung aller TNF-R1 Zellen nach Auswertung im FACS. Es ist zu erkennen, dass die Behandlung mit TNF sowohl in TNF-R1 Wildtyp (A), als auch in TNF-R1 Δ TRID (C) und TNF-R1 YQRA (D) Zellen Apoptose auslöst. TNF-R1 Δ DD (B) Zellen zeigen nach TNF Behandlung keine Apoptose. Es fällt auf, dass in TNF-R1 Δ TRID und TNF-R1 YQRA Zellen der Zelltod reduziert ist. So beträgt die Summe apoptotischer und verstorbener Zellen nach 24 stündiger Behandlung in TNF-R1 Wildtyp Zellen 17%, in TNF-R1 Δ TRID Zellen 10% und in TNF-R1 YQRA Zellen 12%.

Es zeigte sich, dass eine Deletion der „death domain“ (DD) verglichen mit dem Wildtyprezeptor zu keiner inhibierten Internalisierung führt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Deletion eine vollständige Inhibition der Caspase Aktivierung sowie eine blockierte Apoptose zu Folge hat. Eine Deletion der TRID-Domäne oder eine Punktmutation (YQRA) des Internalisierungsmotivs führt dagegen verglichen mit dem Wildtyp TNF-R1 zu einer blockierten TNF-R1 Internalisierung sowie zu einer verringerten Caspase-Aktivierung und zur Inhibition der Apoptose.



B TNF-R1 ΔDD

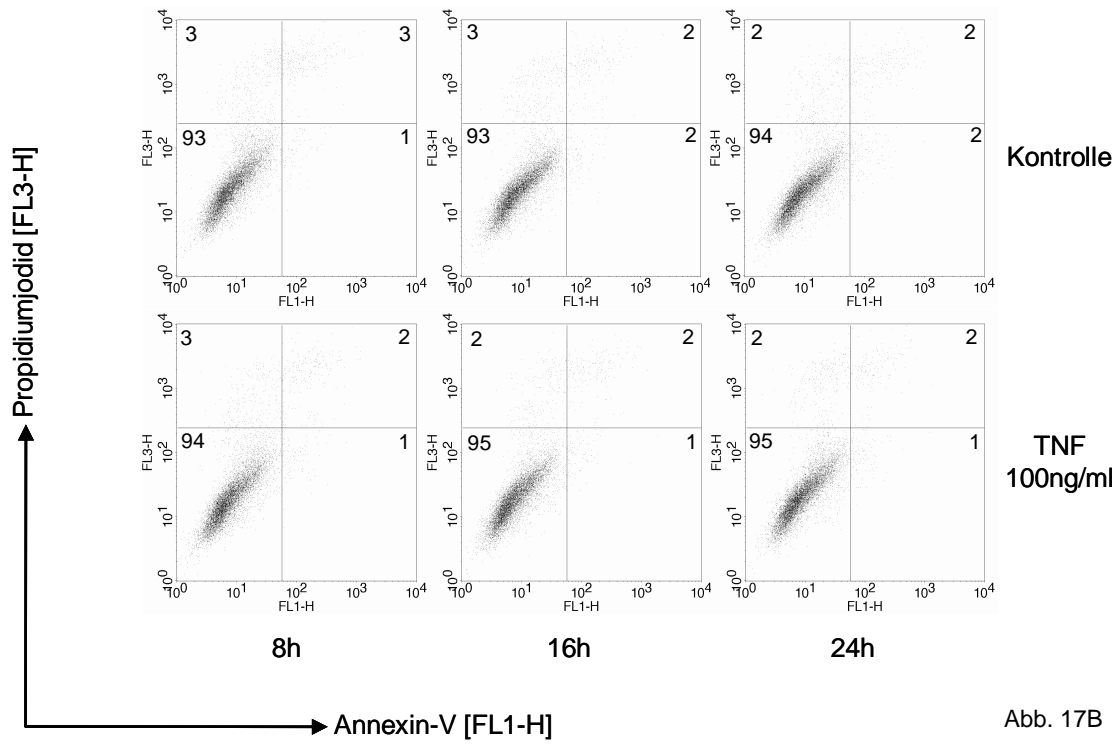


Abb. 17B

C TNF-R1 ΔTRID

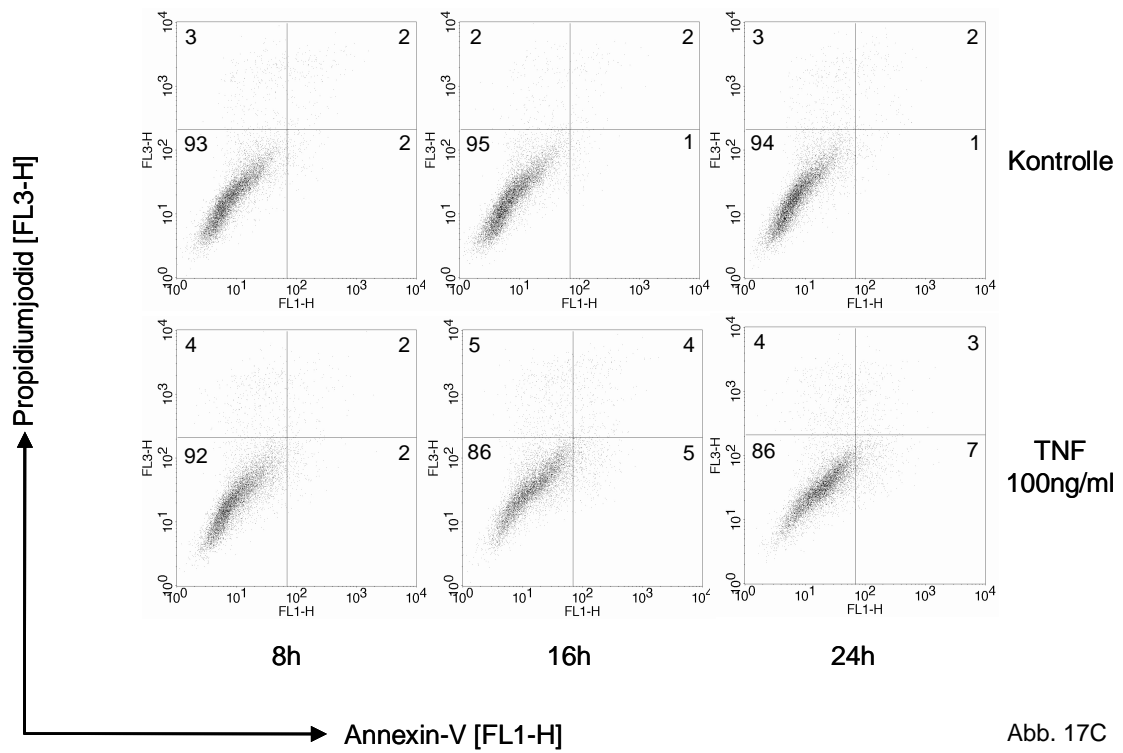


Abb. 17C

D TNF-R1 YQRA

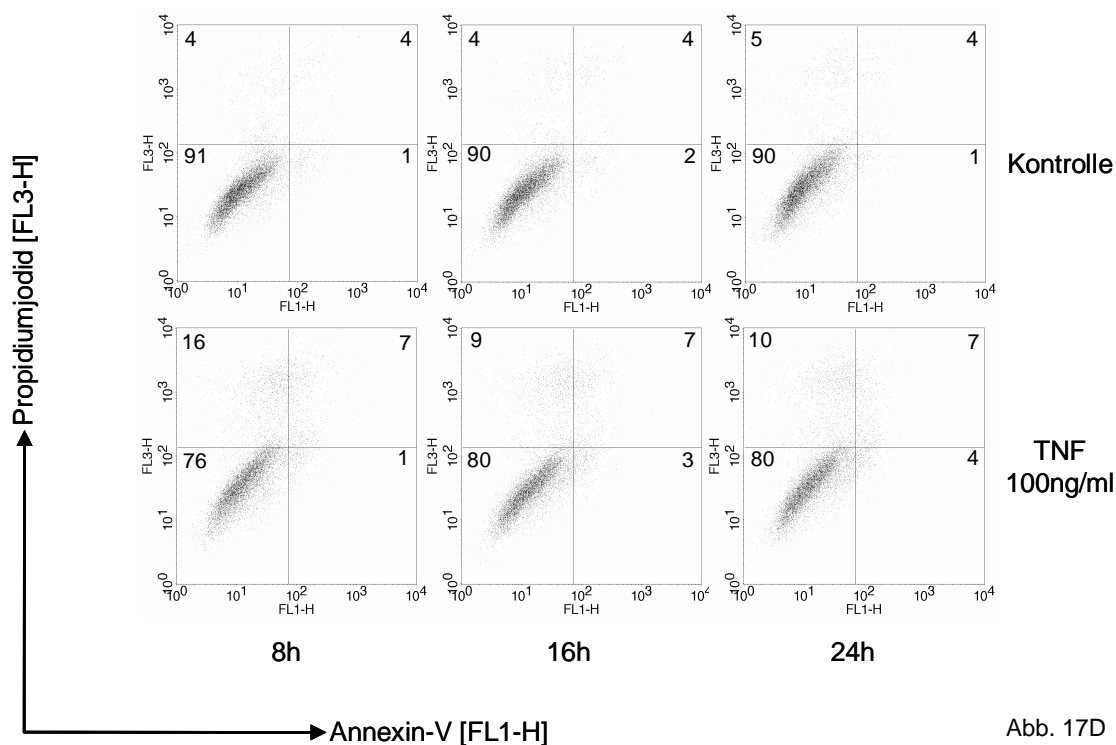


Abb. 17D

Abb. 17: Darstellung der FACS-Analyse der TNF-R1 Zellen

Die Zellen (A: TNF-R1 Wildtyp; B: TNF-R1 Δ DD; C: TNF-R1 Δ TRID; D: TNF-R1 YQRA) wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100ng/ml behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V angefärbt und im FACS dargestellt. Im Dot-Plot Diagramm wurde Annexin-V gegen Propidiumjodid aufgetragen. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3 Die Funktion des adenoviralen Proteins Ad E3-14.7K in der TNF-induzierten Apoptose

3.3.1 Untersuchung Ad E3-14.7K exprimierender NIH3T3 Zellen

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von TNF an den TNF-R1 zu dessen Internalisierung führt. Dies resultiert daraufhin in einer Aktivierung der proapoptotischen Caspasen-3 und -9 und somit zur Auslösung von Apoptose.

Das Protein Ad E3-14.7K ist ein dem Adenovirus Typ 2 entstammendes Protein, welches in der frühen Transkriptionsregion 3 (E3) des viralen Genoms codiert ist. Es ist bekannt, dass das Protein Ad E3-14.7K den TNF induzierten Zelltod blockiert (Horton et al., 1991).

Es soll im Folgenden untersucht werden, welche Rolle das Protein Ad E3-14.7K bei der TNF-R1 Internalisierung und der darauf folgenden Auslösung der Apoptose spielt. Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente wurden in NIH3T3 Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden retroviral sowohl mit dem Ad E3-14.7K Wildtypprotein, der funktionslosen Punktmutante des Proteins Ad E3-PM14.7K, als auch dem Leervektor pQCXIP transduziert. Als weitere Kontrolle wurden nicht transduzierte NIH3T3 Parentalzellen untersucht.

3.3.1.1 Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung

Die Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Anschließend erfolgte die synchronisierte Internalisierung bei 37°C. Die Auswertung dieses Experiments erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

Wie in Abb. 18 Aa zu sehen ist befindet sich in NIH3T3 Parentalzellen der TNF-R1 bei 4°C an der Plasmamembran. Bereits nach 15-minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C haben sich viele Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt und sind weit in das Zellinnere vorgedrungen (Abb. 18 Ab). Nach 30-minütiger Behandlung der Zellen bei 37°C hat die Zahl der internalisierten Vesikel deutlich zugenommen (Abb. 18 Ac). Nach 60-minütiger Behandlung der Zellen bei 37°C sind nahezu keine TNF-R1 Komplexe an der Plasmamembran lokalisiert. Die Konzentration der Vesikel in Zellkernnähe hat weiter zugenommen. Nach 120-minütiger Behandlung der Zellen bei 37°C ist der Internalisierungsprozess von der Plasmamembran nahezu abgeschlossen (Abb. 18 Ae). Eine Infektion der NIH3T3 Zellen mit dem pQCXIP Leervektor (LV) hat keine Veränderung der TNF-R1 Internalisierung zur Folge (Abb. 18 Bb-e). Nach 60-minütiger Behandlung der Zellen bei 37°C sind viele der internalisierten Vesikel in Zellkernnähe lokalisiert. Des Weiteren scheint die Expression des LV keinen Einfluss auf die Fusion von Vesikel zu haben, da die Größe der Vesikel im Zellinneren deutlich zunimmt.

In Abb. 18 C ist zu sehen, dass die Expression des Ad E3-14.7K Proteins in NIH3T3 Zellen zu einer Blockierung der TNF-R1 Internalisierung führt. Nach 5-, 15-, 30- und 60-minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C kann keine Internalisierung des TNF-R1 beobachtet werden. Alle angefärbten TNF-R1 Komplexe befinden sich an der Plasmamembran.

Im Gegensatz dazu führt die Expression des Ad E3-14.7K PM Proteins zu keiner Inhibition der TNF-R1 Internalisierung (Abb. 18 Da-e). Nach 15-minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C beginnt der Internalisierungsprozess, in dem sich kleine Vesikel von der Plasmamembran abschnüren und in das Zellinnere wandern. Nach 60-minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C befinden sich nahezu keine angefärbten TNF-R1 Komplexe auf der Plasmamembran.

Die Expression des Ad E3-14.7K Proteins führt in NIH3T3 Zellen zu einer Inhibition der TNF-R1 Internalisierung. Eine Expression des Leervektors oder der Punktmutante Ad E3-14.7K PM führt zu keiner Inhibition der Internalisierung. In den folgenden Experimenten soll nun geklärt werden, ob die Expression des Ad E3-14.7K Proteins Auswirkungen auf die Aktivierung von Caspasen und die Induktion der Apoptose hat.

A NIH3T3 Parental

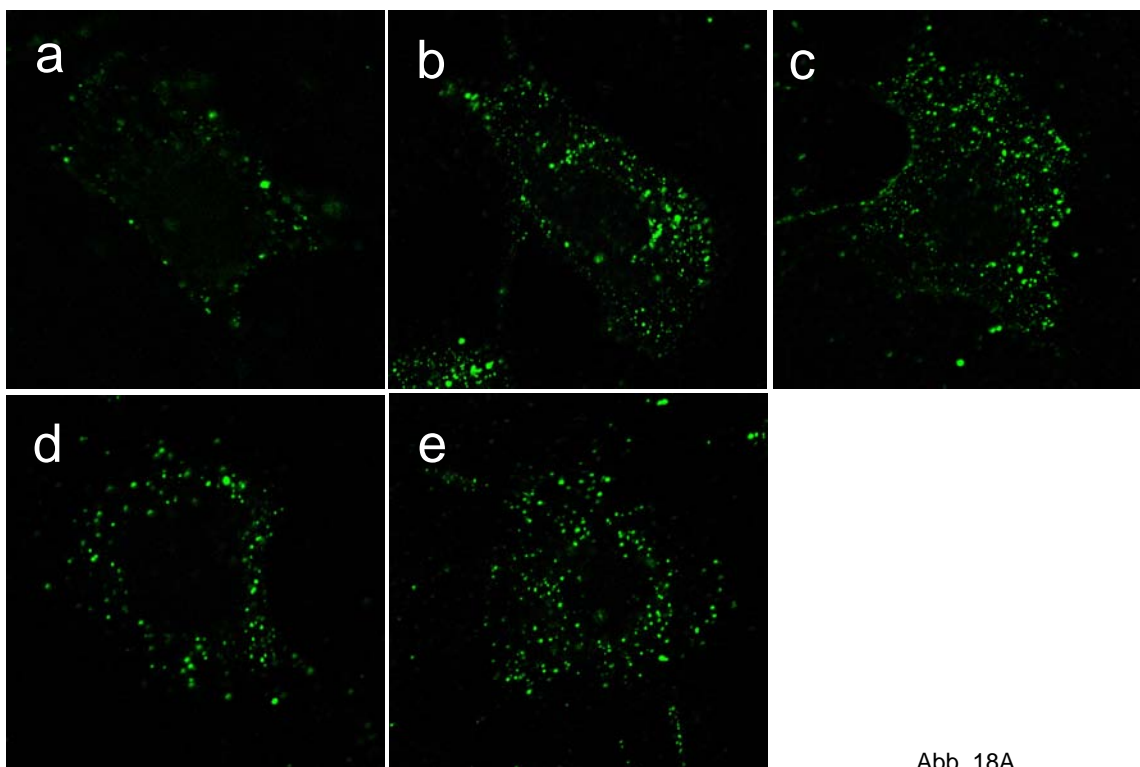


Abb. 18A

B NIH3T3 LV

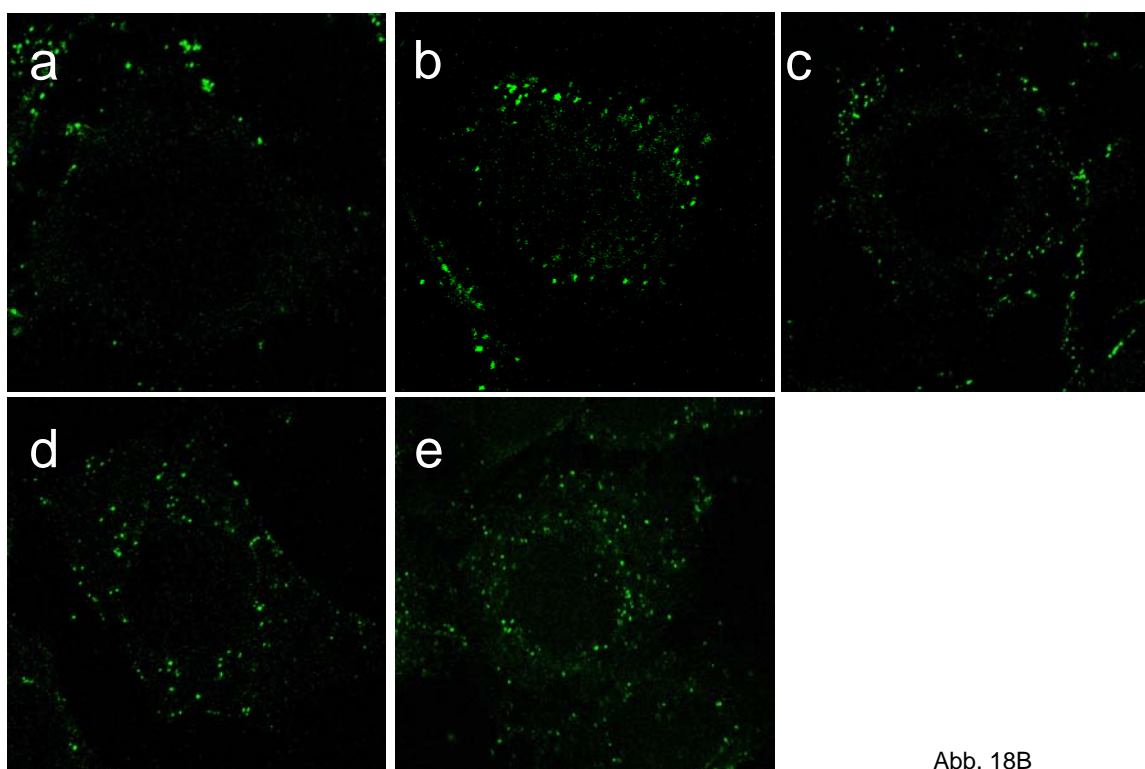


Abb. 18B

C NIH3T3 14.7K

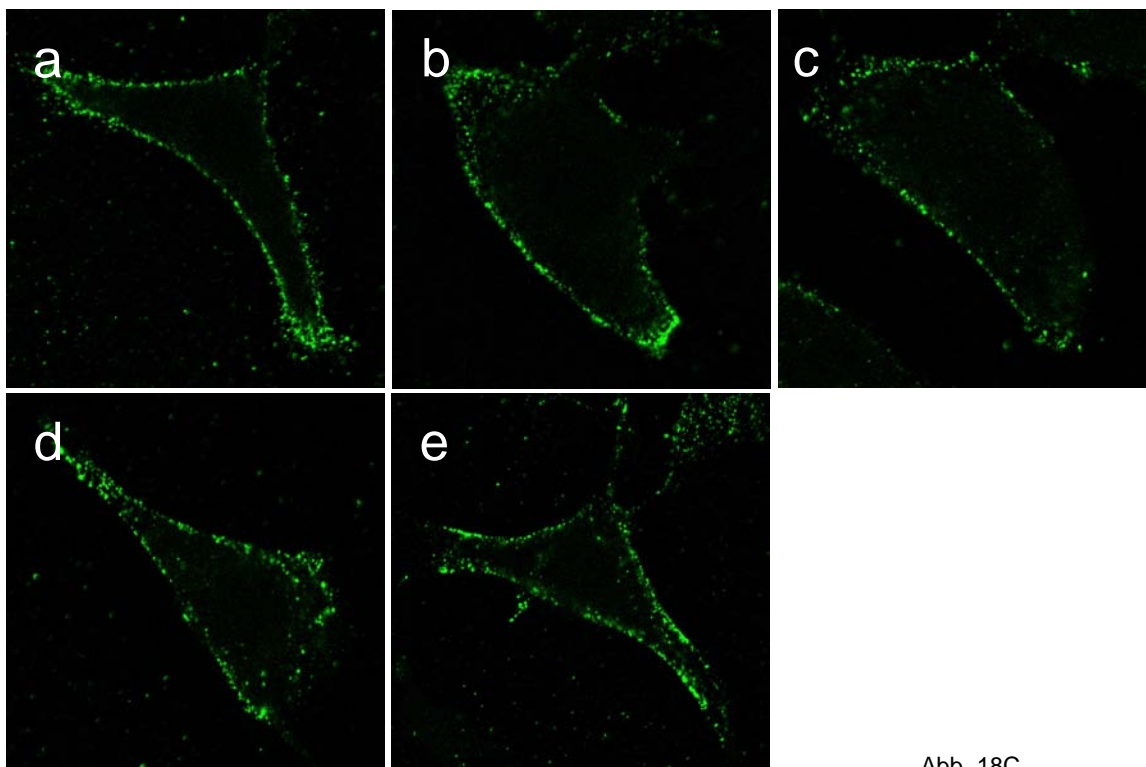


Abb. 18C

D NIH3T3 PM14.7K

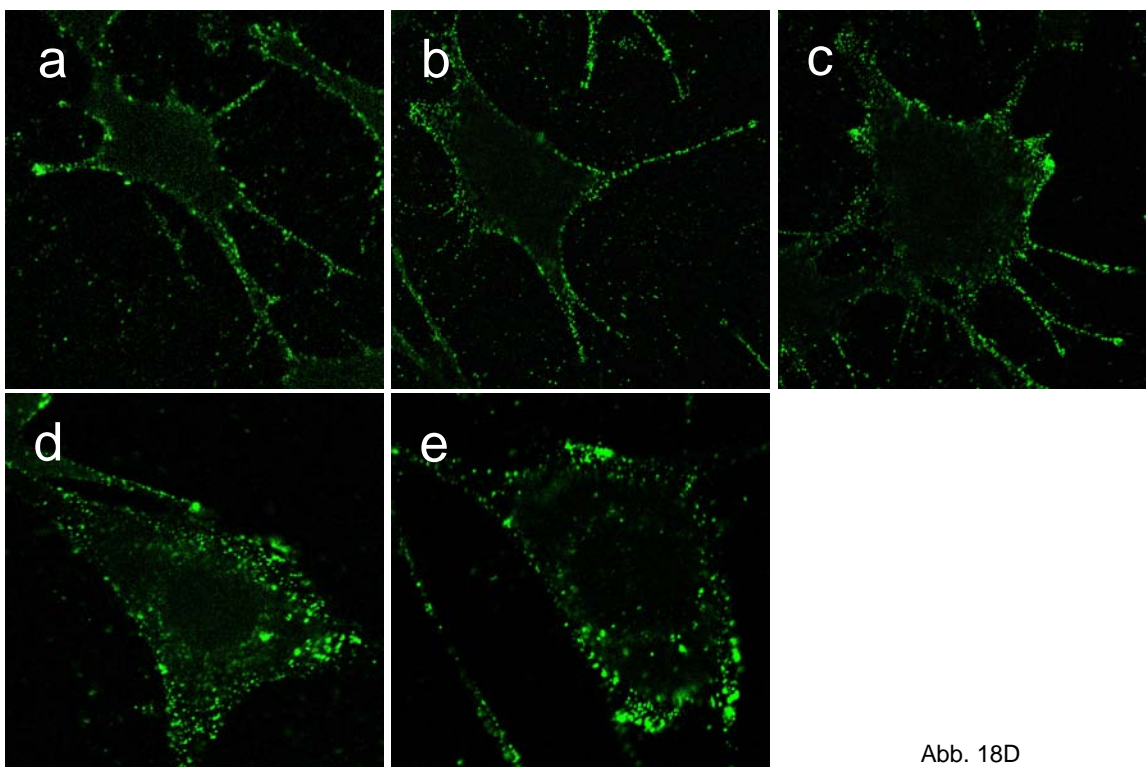


Abb. 18D

Abb. 18: Darstellung der TNF-R1 Internalisierung in NIH3T3 Zellen

NIH3T3 Parental (A), LV (B), 14.7K (C) und PM14.7K (D) Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Zu sehen sind Zellen nach einer einstündigen Behandlung bei 4°C (a), nach 5 Minuten bei 37°C (b), nach 15 Minuten bei 37°C (c), nach 30 Minuten bei 37°C (d) und nach 60 Minuten bei 37°C (e). Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.1.2 Untersuchung der Caspase-Aktivierung

In Kap. 3.1.1 konnte gezeigt werden, dass die Expression des Ad E3-14.7K Proteins eine blockierte TNF-R1 Internalisierung zur Folge hat. Es soll nun untersucht werden, ob die Expression des LV, des 14.7K Proteins oder des PM14.7K Proteins zu einer veränderten Aktivierung proapoptotischer Caspasen führt.

Dazu wurden NIH3T3 Parental, LV, 14.7K und PM14.7K Zellen mit 100ng/ml TNF behandelt und anschließend kernfrei Lysate erstellt. In diesen Lysaten wurde die Aktivität von Caspase-3 und Caspase-9 bestimmt.

In Abb. 19 ist zu erkennen, dass eine Behandlung sowohl von NIH3T3 Parental Zellen, als auch von NIH3T3 LV und NIH3T3 PM14.7K Zellen mit TNF zu einer deutlich gesteigerten Aktivität der Caspase-3 führt. Dabei ist die Aktivität der Caspase-3 in NIH3T3 Parental Zellen nach 8-Stunden am höchsten. NIH3T3 LV und NIH3T3 PM14.7K Zellen zeigen eine deutlich verringerte Caspase-3 Aktivierung. In NIH3T3 14.4K Zellen ist nach allen untersuchten Zeitpunkten keine gesteigerte Aktivität der Caspase-3 sichtbar. Somit lässt sich festhalten, dass nur in NIH3T3 Parental Zellen die Caspase-3 vollständig aktiviert wird. In NIH3T3 LV und NIH3T3 PM14.7K Zellen ist eine verringerte Caspase-3 Aktivierung zu verzeichnen und in NIH3T3 wird die Caspase-3 Aktivität vollständig inhibiert.

Eine ähnliche Situation lässt sich für die Aktivität der Caspase-9 Aktivität nach TNF-Behandlung feststellen (Abb. 20). Auch hier zeigt sich, dass nur in NIH3T3 Parental Zellen die Caspase-9 vollständig aktiviert werden kann. Ebenso wie die Aktivität der Caspase-3 ist auch die Caspase-9 Aktivität nach 8-stündiger Behandlung am höchsten. In NIH3T3 LV und NIH3T3 PM14.7K Zellen führt die Behandlung mit TNF zu einer deutlich verringerten Caspase-9 Aktivierung verglichen mit den Parental Zellen. In den NIH3T3 PM14.7K Zellen ist sogar erst nach 24-stündiger Behandlung eine gering erhöhte Caspase-9 Aktivität feststellbar. Eine Behandlung der NIH3T3 14.7K Zellen mit TNF führt zu keinem untersuchten Zeitpunkt zu einer Erhöhung der Caspase-9 Aktivität.

Somit kann festgestellt werden, dass eine Expression des Ad E3 14.7K Proteins zu einer Inhibition der Caspase-3 und Caspase-9 Aktivierung führt. Eine Expression des Leervektors oder der Punktmutante Ad E3-PM14.7K führt zu einer deutlich verringerten Aktivierung der Caspasen-3 und -9.

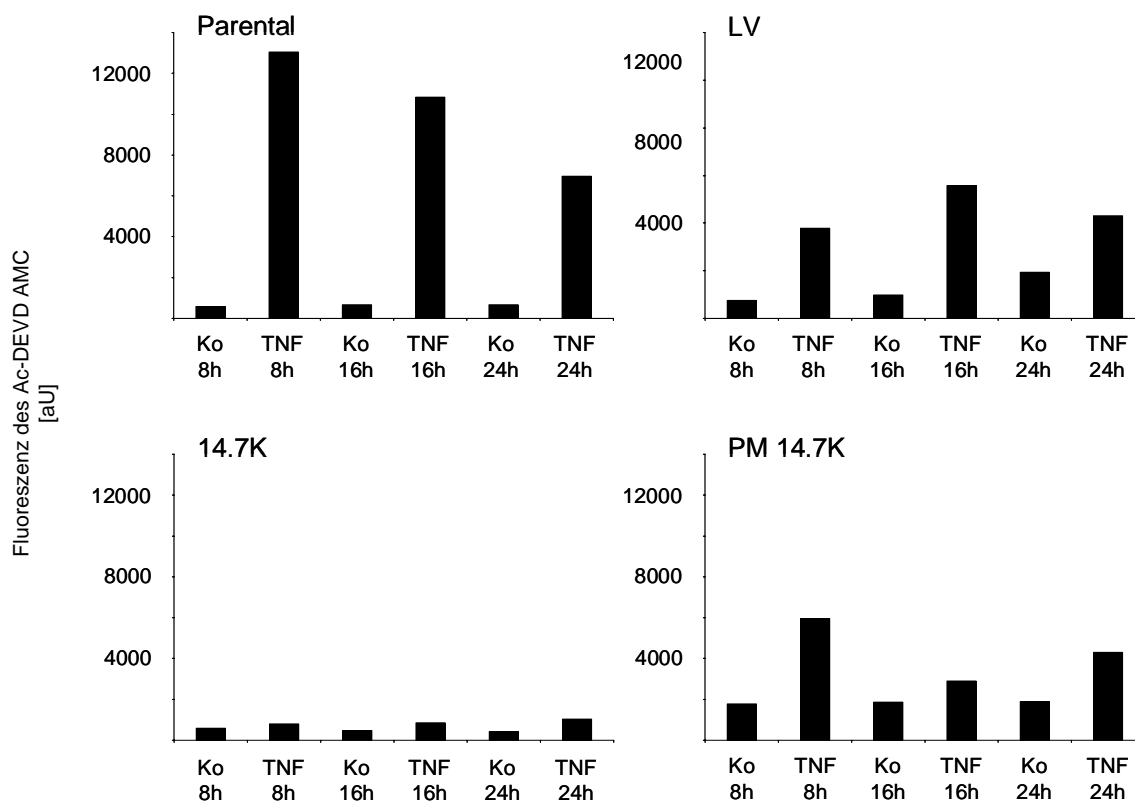


Abb. 19: Darstellung der Caspase-3 Aktivität in NIH3T3 Zellen

NIH3T3 Parental, LV, 14.7K und PM14.7K Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100ng/ml behandelt. 50µg kernfreies Proteinlysate wurde in einem Enzymassay eingesetzt. Nach 180 Minuten wurde die Substratumsetzung durch Caspase-3 gemessen. Die Fluoreszenz [aU] wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz des Substrates dargestellt.

3.3.1.3 Untersuchung der Apoptose im FACS

Dazu wurden Zellen mit TNF 100 ng/ml behandelt und anschließend für eine Messung der Apoptose im FACS („fluorescence activated cell sorter“) vorbereitet. Zur Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und bereits verstorbenen Zellen wurden FITC-gekoppeltes Annexin V sowie Propidiumjodid verwendet. Annexin V bindet an die während der Apoptose externalisierten Phosphatidylserinreste der Plasmamembran. Propidiumjodid interkaliert mit der Kern-DNA von toten bzw. nekrotischen Zellen.

Im FACS wurden die Zellen in einem Dot-Plot Diagramm untersucht. Dabei wurde die grüne Fluoreszenz des Annexin V-FITC (FL1-H) gegen die rote Fluoreszenz des Propidiumjodids (FL-3H) aufgetragen.

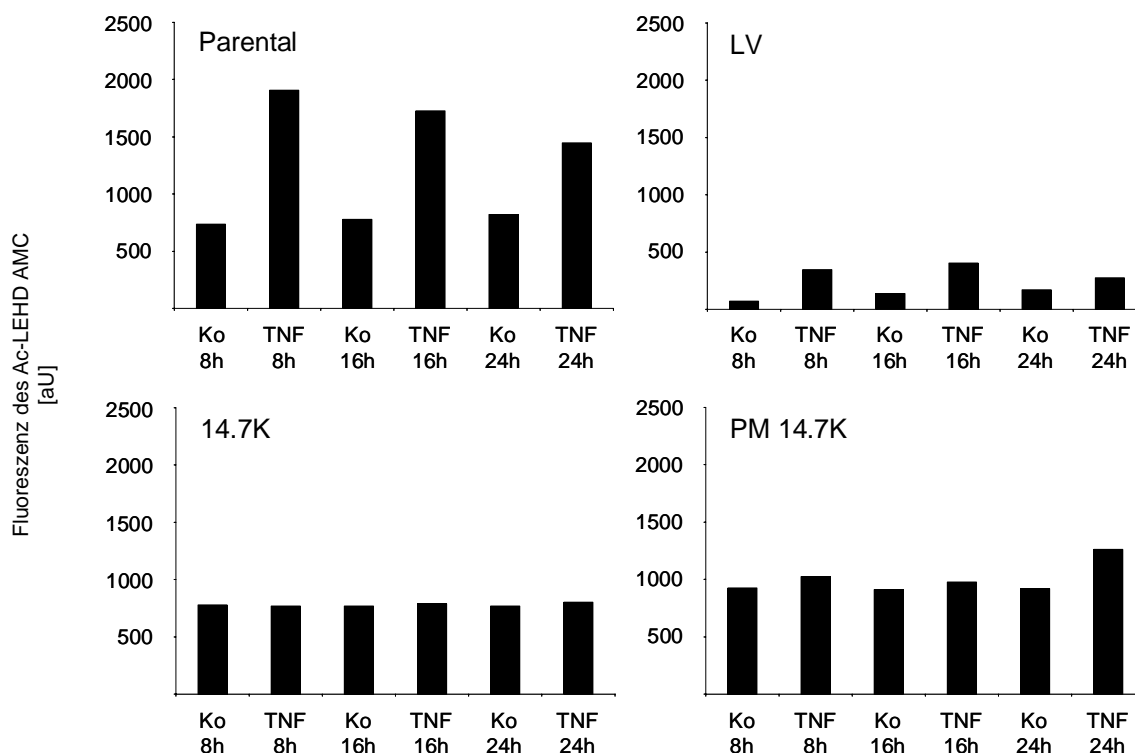


Abb. 20: Darstellung der Caspase-9 Aktivität in NIH3T3 Zellen

NIH3T3 Parental, LV, 14.7K und PM14.7K Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100ng/ml behandelt. 50µg kernfreies Proteinlysate wurde in einem Enzymassay eingesetzt. Nach 180 Minuten wurde die Substratumsetzung durch Caspase-9 gemessen. Die Fluoreszenz [aU] wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz des Substrates dargestellt.

Die Lage der Quadranten wurde so gewählt, dass im unteren linken Quadranten die lebenden Zellen (Annexin V-negativ, Propidiumjodid-negativ) zu sehen sind, während sich die apoptotischen Zellen (Annexin V-positiv, Propidiumjodid-negativ) im unteren rechten Quadranten befinden. Im rechten oberen Quadranten kamen die toten Zellen (Annexin V und Propidiumjodid-positiv) zur Darstellung. Zellfragmente und angefärbte Zellkerne (Annexin V-negativ, Propidiumjodid-positiv) wurden im oberen linken Quadranten dargestellt. Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Quadranten wurde festgehalten und in das Dot-Plot Diagramm übertragen.

Abb. 21 zeigt das Ergebnis der Behandlung von NIH3T3 Parental (A), LV (B), 14.7K (C) und PM14.7K (D) Zellen mit und ohne TNF. Eine Behandlung mit TNF führt in NIH3T3 Parental, LV und PM14.7K Zellen zur Apoptose. Dies lässt sich an der Zunahme apoptotischer und toter Zellen im Dot-Plot beobachten. Eine Behandlung der NIH3T3 14.7K Zellen führt dagegen nicht zur Apoptose. In NIH3T3 Parentalzellen ist die prozentuale Zahl der apoptotischen bzw. verstorbenen Zellen nach Behandlung mit TNF nur moderat angestiegen. Die Zahl der apoptotischen Zellen hat sich nach 24-stündiger TNF-Behandlung von 1% auf 7% erhöht, die Zahl der bereits verstorbenen Zellen von 1% auf 13%. Verglichen mit den NIH3T3 Parental Zellen zeigen NIH3T3 LV Zellen eine deutlich stärkere Apoptose. So ist nach 24-stündiger Behandlung mit TNF der Anteil apoptotischer Zellen von 1% auf 16% gestiegen, die Zahl der verstorbenen Zellen stieg von 2% auf 20%. Die NIH3T3 PM14.7K Zellen

A NIH3T3 Wildtyp

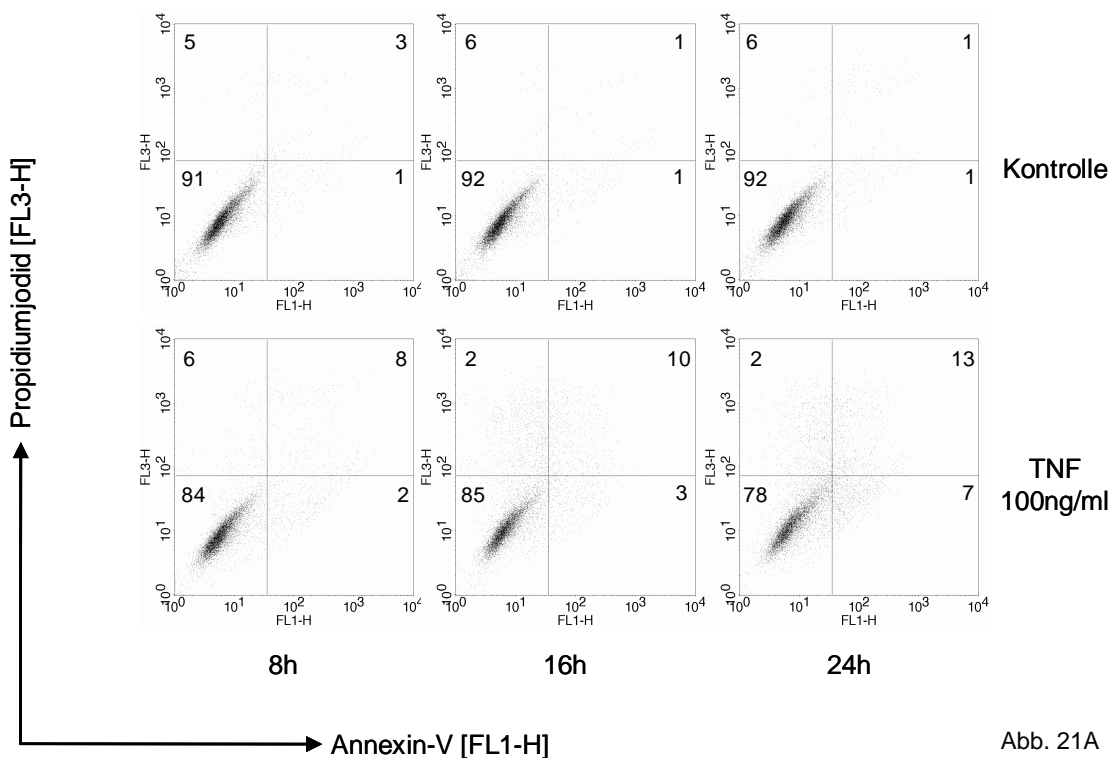


Abb. 21A

B NIH3T3 LV

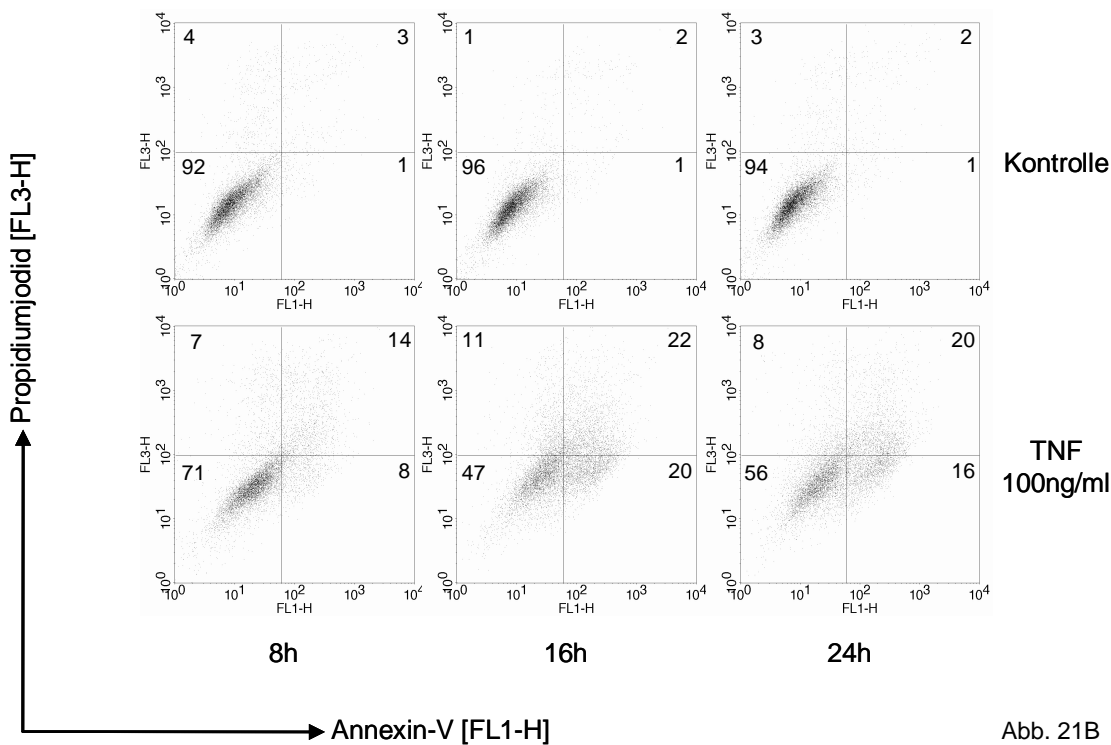


Abb. 21B

C NIH3T3 14.7K

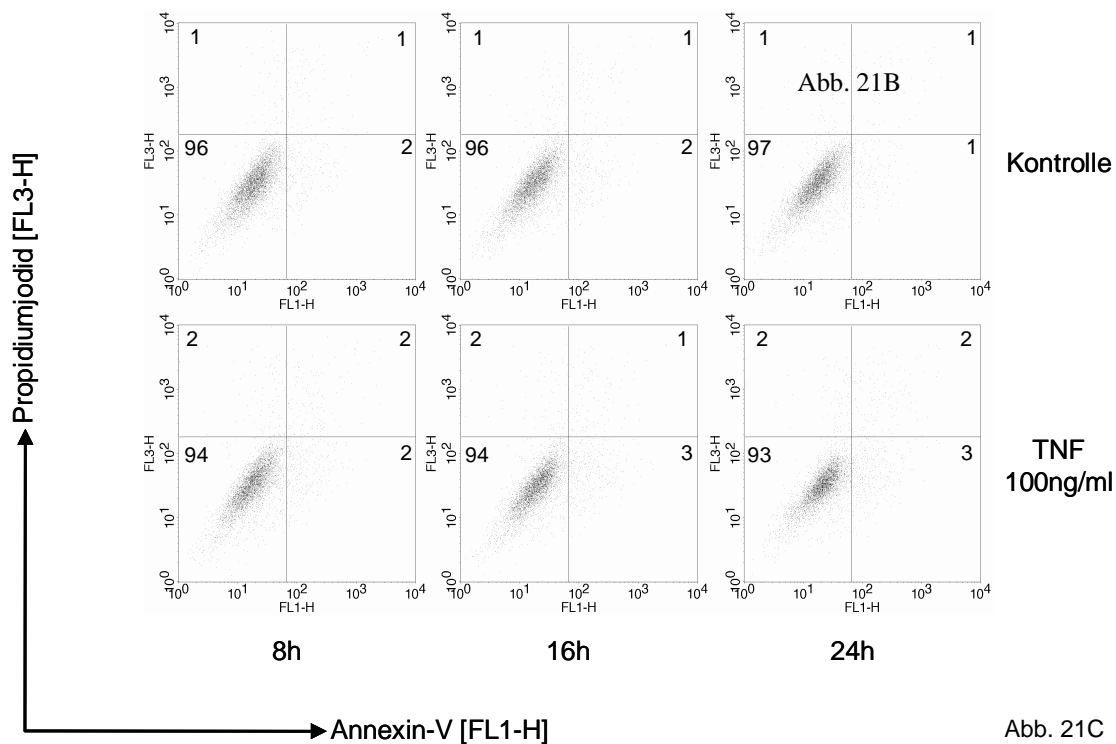


Abb. 21C

D NIH3T3 PM14.7K

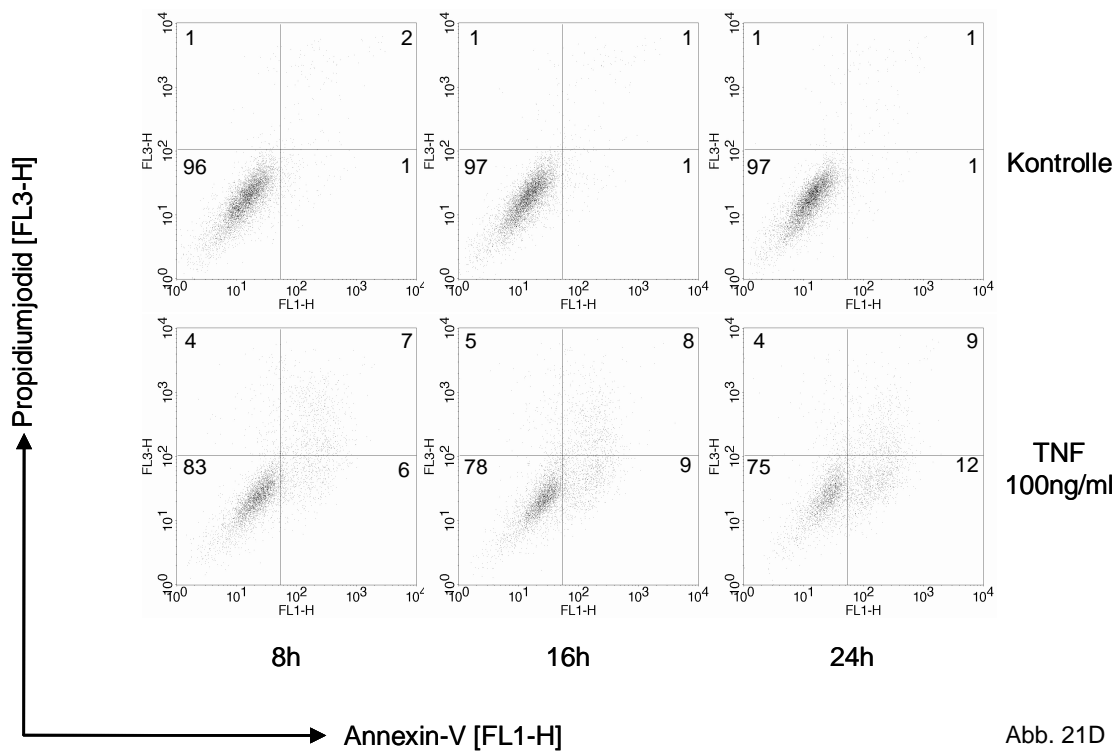


Abb. 21D

Abb. 21: Darstellung der FACS-Analyse der NIH3T3 Zellen

NIH3T3 Parental (A), LV (B), 14.7K (C) und PM14.7K (D) Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100 ng/ml behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid gefärbt und im FACS dargestellt. Im Dot-Plot wurde Annexin-V gegen Propidiumjodid aufgetragen. Die prozentuale Verteilung der Zellen wurde in jedem Quadranten angegeben. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

zeigen dagegen in etwa die gleiche prozentuale Verteilung nach TNF Behandlung wie die NIH3T3 Parental Zellen. Die Zahl der apoptotischen Zellen stieg nach 24 Stunden von 1% auf 12%, die Zahl der verstorbenen Zellen von 1% auf 9%. NIH3T3 14.7K Zellen zeigen nach TNF-Behandlung keine Anzeichen von Apoptose. Nach 24-stündiger Behandlung liegt die Zahl der apoptotischen Zellen bei 3%, die Zahl der toten Zellen bei 2%.

Die in diesem Teil der Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Expression des Ad E3-14.7K Proteins die TNF-induzierte Apoptose blockiert. Der TNF-R1 zeigt in NIH3T3 14.7K Zellen nach Bindung des Liganden keine Internalisierung. Des Weiteren werden in diesen Zellen nach TNF Behandlung keine Caspasen aktiviert und es kommt zu keiner verstärkten Apoptose. Im Folgenden soll der mögliche Mechanismus der Inhibition der TNF-R1 Internalisierung näher untersucht werden.

3.3.2 Untersuchungen zur TNF-R1 Internalisierung und zur internalisierungsabhängigen DISC-Rekrutierung anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen**3.3.2.1 Untersuchungen zur TNF-R1 Internalisierung**

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die Expression des Proteins Ad E3-14.7K zu einer Inhibition der TNF-R1 Internalisierung führt. Des Weiteren findet nach Behandlung mit TNF keine Aktivierung von Caspasen und keine Apoptose mehr statt. Anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen soll nun näher untersucht werden, welcher Mechanismus dem zu Grunde liegen könnte.

Dazu wurden aus NIH3T3 PM14.7K und NIH3T3 14.7K Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten TNF-R1 Fraktionen isoliert und im Western-Blot untersucht.

In Abb. 22A ist die Western-Blot Analyse der NIH3T3 PM14.7K Zellen zu sehen. Zwischen 3 Minuten und 10 Minuten Internalisierung findet eine Zunahme des Aktin Gehalts statt. Dies spricht für eine verstärkte Rekrutierung von Mikrotubuli an die sich bildenden Vesikel. Ebenso befindet sich das Protein Adaptin- α nach allen untersuchten Internalisierungszeitpunkten in ungefähr gleichem Maße in den TNF-R1 Fraktionen. Adaptin- α ist Bestandteil des AP-2 Komplexes, der bei Endozytosevorgängen mitbestimmend für die Ausbildung des Clathringerüsts ist. Die bei der Vesikelbildung wichtige GTPase Dynamamin II befindet sich ebenfalls in den isolierten TNF-R1 Fraktionen, ist jedoch nach 30-minütiger Internalisierung nicht mehr in den TNF-R1 Fraktionen nachweisbar. Dies lässt sich mit der Funktion von Dynamamin II erklären, denn Dynamamin II ist verantwortlich für die Vesikelabschnürung von der

Plasmamembran. Rab5 als Markerprotein für frühe Endosomen befindet sich fast ausschließlich nach 3-minütiger Internalisierung in den TNF-R1 Fraktionen.

In Abb. 22B ist die Western-Blot Analyse der NIH3T3 14.7K Zellen dargestellt. Nach allen untersuchten Zeitpunkten findet sich Aktin und Adaptin- α und in den TNF-R1 Fraktionen.

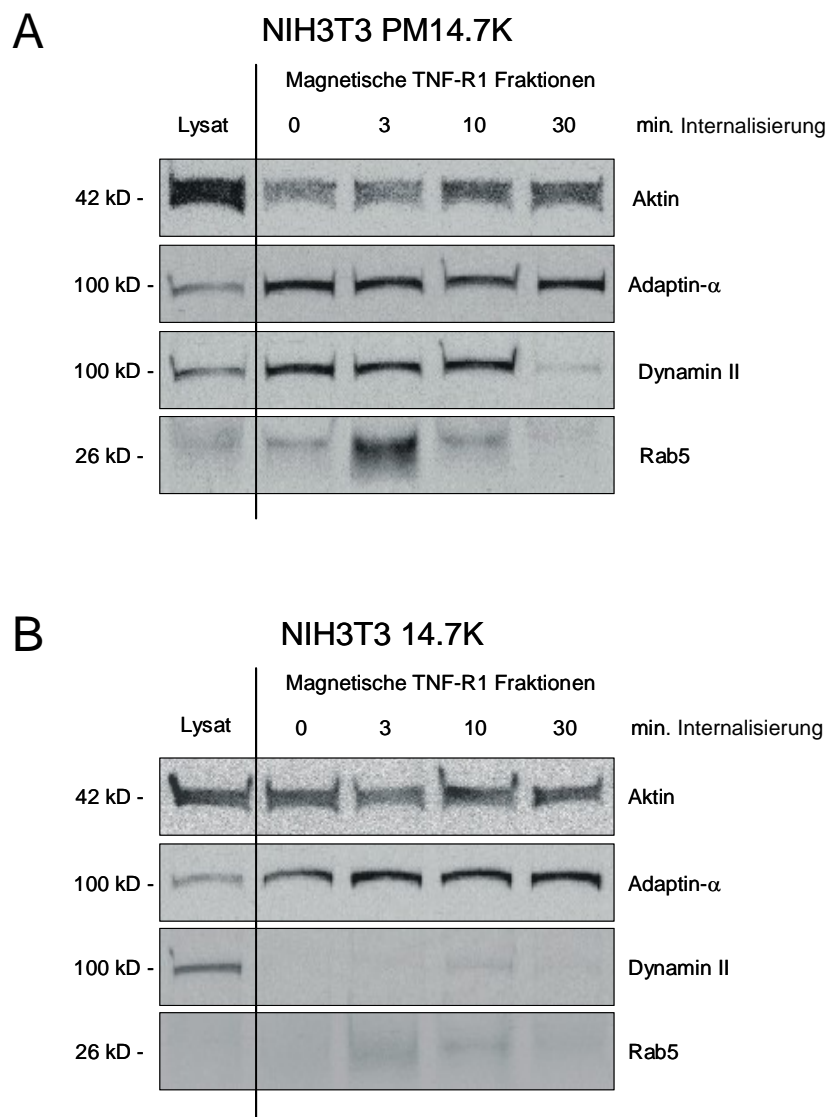


Abb. 22: Western-Blot Analyse magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen aus NIH3T3 PM und NIH3T3 14.7K Zellen zur Untersuchung des TNF-R1 Internalisierungsprozesses

NIH3T3 PM (A) und NIH3T3 14.7K (B) Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und magnetischen Streptavidin-Microbeads behandelt. Nach 0 min, 3 min, 10 min und 30 min Internalisierung bei 37°C wurden die Zellen schonend homogenisiert und magnetisch markierte TNF-R1 mit einer Free-Flow-Magnetkammer isoliert. Die TNF-R1 Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Zur Kontrolle wurde ein Totallysat aus der jeweiligen Zelllinie aufgetragen. Die Behandlung der Membran erfolgte mit den in der Abbildung angegebenen Antikörpern.

Dies entspricht somit dem Befund in NIH3T3 PM14.7K Zellen. Ein Unterschied zwischen beiden Zelllinien bezüglich der Proteine Aktin und Adaptin- α und kann nicht festgestellt werden. Die GTPasen Dynamin II und Rab5 sind zu keinem Zeitpunkt in den Fraktionen vorhanden. Beide Proteine spielen bei der Internalisierung eine wichtige Rolle. Somit ist das Fehlen der für die Internalisierung wichtigen Proteine Dynamin II und Rab5 eine mögliche Ursache für den Internalisierungsdefekt, da ohne diese Proteine vermutlich keine Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt werden können.

3.3.2.2 Untersuchungen zur internalisierungsabhängigen DISC-Rekrutierung

Die Aktivierung von Caspase-8 und damit die Induktion von Apoptose durch den TNF-R1 verläuft über die Adapterproteine TRADD und FADD, die sich an den TNF-R1 anlagern. Ist diese Assoziation der Adapterproteine an den TNF-R1 gestört, z.B. durch eine Deletion der DD, so kann keine Apoptose mehr induziert werden.

In NIH3T3 14.7K Zellen ist sowohl die TNF-R1 Internalisierung, als auch die Caspase-Aktivierung und Apoptose blockiert. In magnetisch isolierten TNF-R1 Fraktionen soll deshalb untersucht werden, ob alle zur Aktivierung von Caspasen nötigen Proteine an den TNF-R1 binden.

Dazu wurden aus NIH3T3 PM14.7K und NIH3T3 14.7K Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten TNF-R1 Fraktionen isoliert und im Western-Blot untersucht.

In Abb. 23A ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der NIH3T3 PM14.7K Zellen zu sehen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten findet sich das für die Internalisierung notwendige Protein Clathrin in den TNF-R1 Fraktionen. Die detektierte Menge von Clathrin verringert sich nach 60-minütiger Internalisierung. Das Weiteren finden sich die TNF-R1 Adapterproteine TRADD und FADD in den TNF-R1 Fraktionen. Dabei ist TRADD nach 0-minütiger Internalisierung nur sehr schwach vorhanden, nimmt aber mit fortschreitender Internalisierung zu. Das Adapterprotein FADD ist erst nach 3-minütiger Internalisierung in den Fraktionen zu finden, nimmt aber nach 30- und 60-minütiger Internalisierung weiter zu. Weiterhin findet sich Caspase-8 in den TNF-R1 Fraktionen. Nach 3-minütiger Internalisierung ist sie am stärksten in den Fraktionen vorhanden und nimmt dann mit zunehmender Zeit leicht ab. Es lässt sich also Schlussfolgern, dass der für die Apoptose essentielle DISC bereits nach 3-minütiger Internalisierung vorhanden ist und sich weiterhin nicht verändert.

In Abb. 23B ist das Ergebnis der Western-Blot Analyse der NIH3T3 14.7K Zellen zu sehen. Es ist zu erkennen, dass sich zu allen Zeitpunkten weder die Adapterproteine TRADD und FADD, noch die Caspase-8 in den TNF-R1 Fraktionen befinden. Der DISC ist somit in NIH3T3 14.7K Zellen nicht vorhanden. Dies erklärt die fehlende Caspase-Aktivierung und eine blockierte Apoptose.

Somit konnte gezeigt werden, dass in NIH3T3 14.7K Zellen die Internalisierung des TNF-R1 durch das Fehlen von Dynamin II und Rab5 inhibiert ist, da sich neu gebildete Vesikel nicht von der Plasmamembran abschnüren können. Am TNF-R1 wird kein DISC gebildet, was in einer blockierten Caspase-Aktivierung und im Endeffekt zu einer Inhibition der Apoptose führt. Diese Befunde zeigen deutlich, dass die Internalisierung des TNF-R1, die Bildung des DISC und somit die Aktivierung von Caspasen und die Initiierung von Apoptose in NIH3T3 Zellen miteinander verknüpft sind.

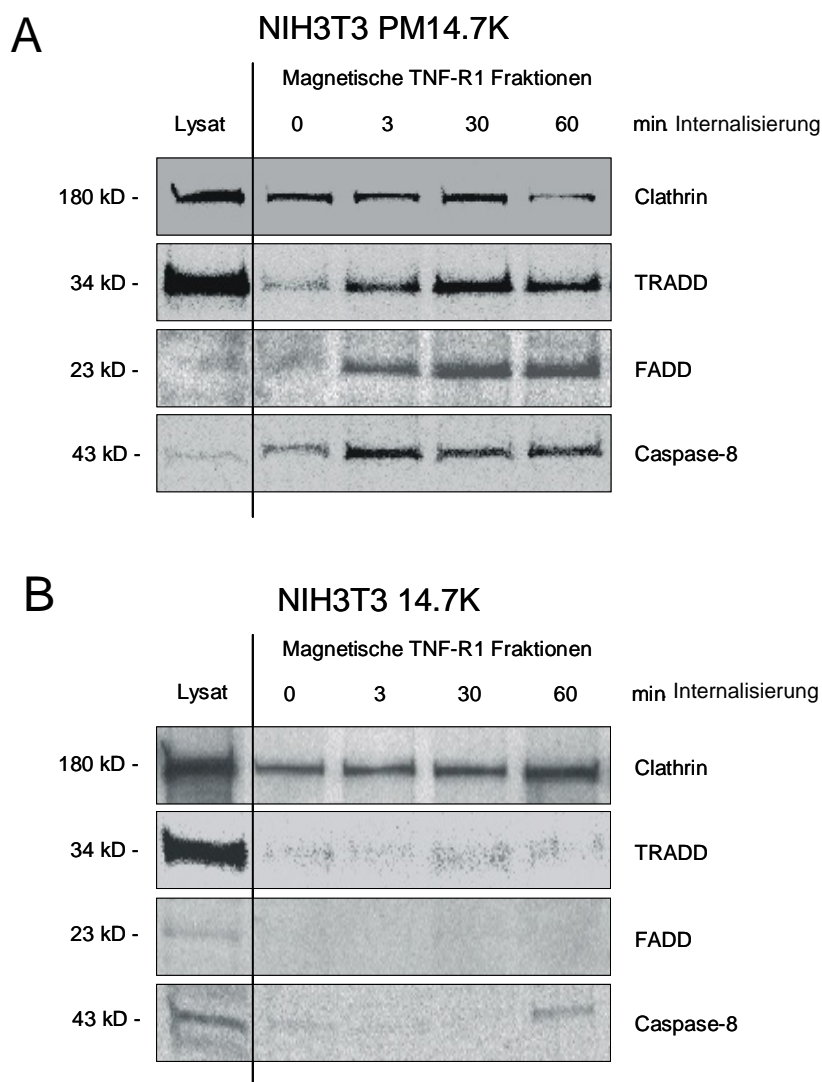


Abb. 23: Western-Blot Analyse magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen aus NIH3T3 PM und NIH3T3 14.7K Zellen zur Untersuchung internalisierungsabhängiger DISC-Rekrutierung

NIH3T3 PM14.7K (A) und NIH3T3 14.7K (B) Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Streptavidin-Microbeads behandelt. Nach 0 min, 3 min, 30 min und 60 min Internalisierung bei 37°C wurden die Zellen schonend homogenisiert und magnetisch markierte TNF-R1 mit einer Free-Flow-Magnetkammer isoliert. Die TNF-R1 Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Zur Kontrolle wurde ein Totallysate aus der jeweiligen Zelllinie aufgetragen. Die Behandlung der Membran erfolgte mit den in der Abbildung angegebenen Antikörpern.

3.3.3 Untersuchung Ad E3-14.7K exprimierender H1299 Zellen

3.3.3.1 Untersuchung der TNF-R1 Internalisierung

Die bisher durchgeführten Experimente zeigen, dass die Expression des Proteins Ad E3-14.7K in NIH3T3 Zellen die TNF-R1 Internalisierung blockiert, sowie die Aktivierung von Caspasen inhibiert und somit die Apoptose blockiert. Diese Experimente wurden in murinen NIH3T3 Zellen durchgeführt. Es

ist bekannt, dass humanes TNF- α in murinen Zellen nur an den TNF-R1 bindet. Somit kann eine kostimulatorische Wirkung des TNF-R2 ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen, ob in der humanen Zelllinie H1299 ähnliche Effekte auftreten, wurden die Internalisierung des TNF-R1, die Aktivierung von Caspasen und die Apoptose untersucht. Es soll geklärt werden, ob die Expression des Ad E3-14.7K Proteins in einem humanen Zellsystem, in dem beide TNF-Rezeptoren funktional sind und TNF- α binden können, zu ähnlichen Ergebnissen wie in murinen NIH3T3 Zellen führt.

Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit H1299 Parental (A), H1299 Leervektor (LV) (B) und H1299 14.7K (C) Zellen durchgeführt. H1299 LV wurden retroviral mit dem Leervektor pQCXIP transduziert, H1299 14.7K Zellen wurden mit dem Ad E3-14.7K Protein retroviral transduziert.

Die Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Anschließend erfolgte eine synchrone Internalisierung des TNF-R1 bei 37°C. Die Auswertung dieses Experiments erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

In Abb. 24 A ist zu sehen, dass eine Inkubation der Zellen bei 37°C eine Internalisierung des TNF-R1 in H1299 Parental Zellen hervorruft. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei 37°C beginnen einzelne Vesikel von der Plasmamembran in das Zellinnere zu wandern (Abb. 24 Ac). Nach einer 30-minütigen Inkubation hat die Zahl der internalisierten Vesikel deutlich zugenommen (Abb. 24 Ad). Außerdem sind einzelne große Vesikel wahrzunehmen. Nach 60-minütiger Inkubation sind noch TNF-R1 Komplexe vorhanden, die nicht internalisiert wurden. Die bereits internalisierten Vesikel befinden sich nunmehr in der Nähe des Zellkerns. Verglichen mit NIH3T3 Parental Zellen (Abb. 18) verläuft die Internalisierung des TNF-R1 in H1299 Parental Zellen deutlich langsamer. Im Gegensatz zu den NIH3T3 Zellen befinden sich auch nach 60-minütiger Internalisierung TNF-R1 Komplexe an der Zellmembran. Dies könnten möglicherweise TNF-R2 Komplexe sein, die das TNF- α gebunden haben. In H1299 LV findet ebenfalls eine Internalisierung des TNF-R1 bei 37°C statt. Nach 60-minütiger Behandlung der Zellen bei 37°C haben sich mehrere Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt und liegen nun deutlich intrazellulär vor (Abb. 24 Be). Ein großer Anteil der TNF-R1 Komplexe befindet sich jedoch nach wie vor an der Plasmamembran. Die Expression des Leervektors (LV) führt in H1299 Zellen zu keiner veränderten TNF-R1 Internalisierung. Auch hier ist erneut zu bemerken, dass die Internalisierung des TNF-R1 deutlich langsamer als in NIH3T3 LV Zellen verläuft. Abb. 24 C zeigt weiterhin das Ergebnis der Untersuchungen zur TNF-R1 Internalisierung in H1299 14.7K Zellen. Eine 1-stündige Behandlung mit Biotin-TNF/Avidin-FITC führt dazu, dass ein sehr geringer Teil der an der Zelloberfläche lokalisierten TNF-R1 Komplexe internalisiert wird (Abb. 24 Ca). Eine Erwärmung auf 37°C hat keinen verstärkenden Einfluss auf die TNF-R1 Internalisierung. Zu allen untersuchten Zeitpunkten werden einzelne Vesikel von der Plasmamembran internalisiert (Abb. 24 Cb-e). Jedoch verbleibt der Hauptanteil der gefärbten TNF-R1 Komplexe an der Plasmamembran. Die Expression des Ad E3-14.7K Protein bewirkt in H1299 Zellen eine nahezu vollständige Inhibition der TNF-R1 Internalisierung. Verglichen mit den NIH3T3 14.7K Zellen kommt es in H1299 14.7K Zellen zu einer leicht verstärkten Internalisierung des TNF-R1. Der Mechanismus dieser leicht erhöhten Internalisierung konnte jedoch nicht geklärt werden.

A H1299 Parental

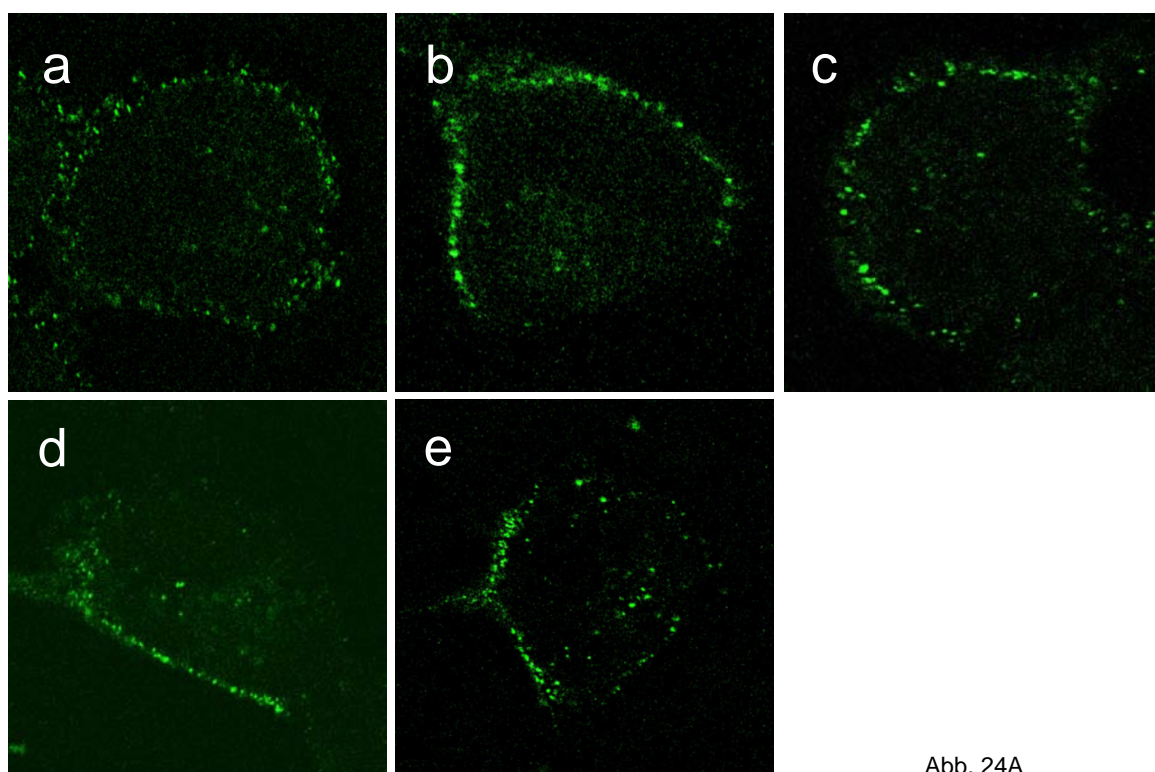


Abb. 24A

B H1299 LV

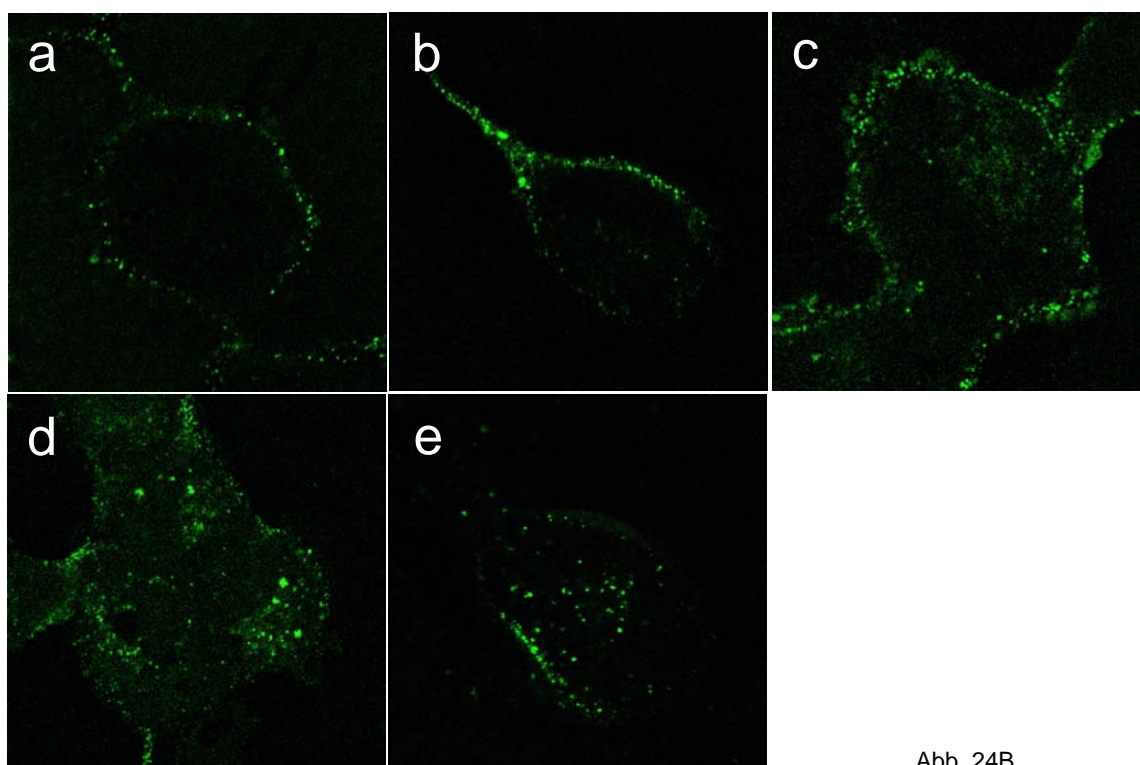


Abb. 24B

C H1299 14.7K

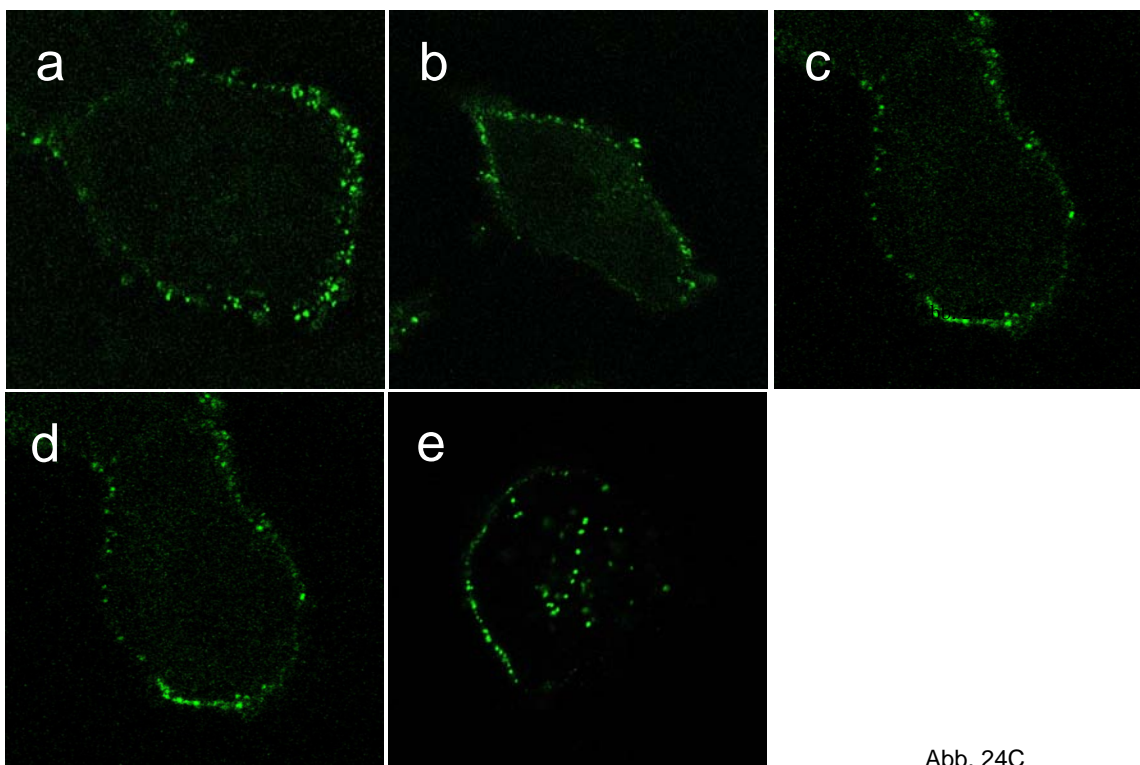


Abb. 24C

Abb. 24: Darstellung der TNF-R1 Internalisierung in H1299 Zellen

H1299 Parental (A), LV (B) und 14.7K (C) Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelt. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Zu sehen sind Zellen nach einer einstündigen Behandlung bei 4°C (a), nach 5 Minuten (b), 15 Minuten (c), 30 Minuten (d) und nach 60 Minuten bei 37°C (e).

Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3.2 Untersuchung der Caspase-Aktivierung

Die Untersuchung der NIH3T3 14.7K Zellen hat gezeigt, dass in diesen Zellen nach Behandlung mit TNF keine Aktivierung von Caspase-3 und -9 mehr stattfindet, da NIH3T3 14.7K Zellen nach Internalisierung des TNF-R1 keinen funktionalen DISC ausbilden. In H1299 Zellen soll nun die Aktivität von Caspasen in den Zellen vor und nach Behandlung mit TNF gemessen werden, um zu untersuchen, ob die Expression des Ad E3-14.7K Proteins in H1299 Zellen eine ähnliche Funktion auf die Aktivierung von Caspasen ausübt. H1299 Parental, LV und 14.7K Zellen wurden mit 100ng/ml TNF behandelt und anschließend wurden kernfreie Lysate erstellt. In diesen Lysaten wurde die Aktivität von Caspase-3 und Caspase-9 bestimmt. Die Aktivitäten wurden in Prozent der Kontrolle angegeben. Dabei wurde der jeweilige Kontrollwert gleich 100% gesetzt.

In Abb. 25A ist zu sehen, dass die Behandlung aller H1299 Zellen mit TNF nach 8, 16 und 24 Stunden eine Aktivierung der Caspase-3 zur Folge hat. Jedoch unterscheidet sich sowohl der zeitliche Verlauf

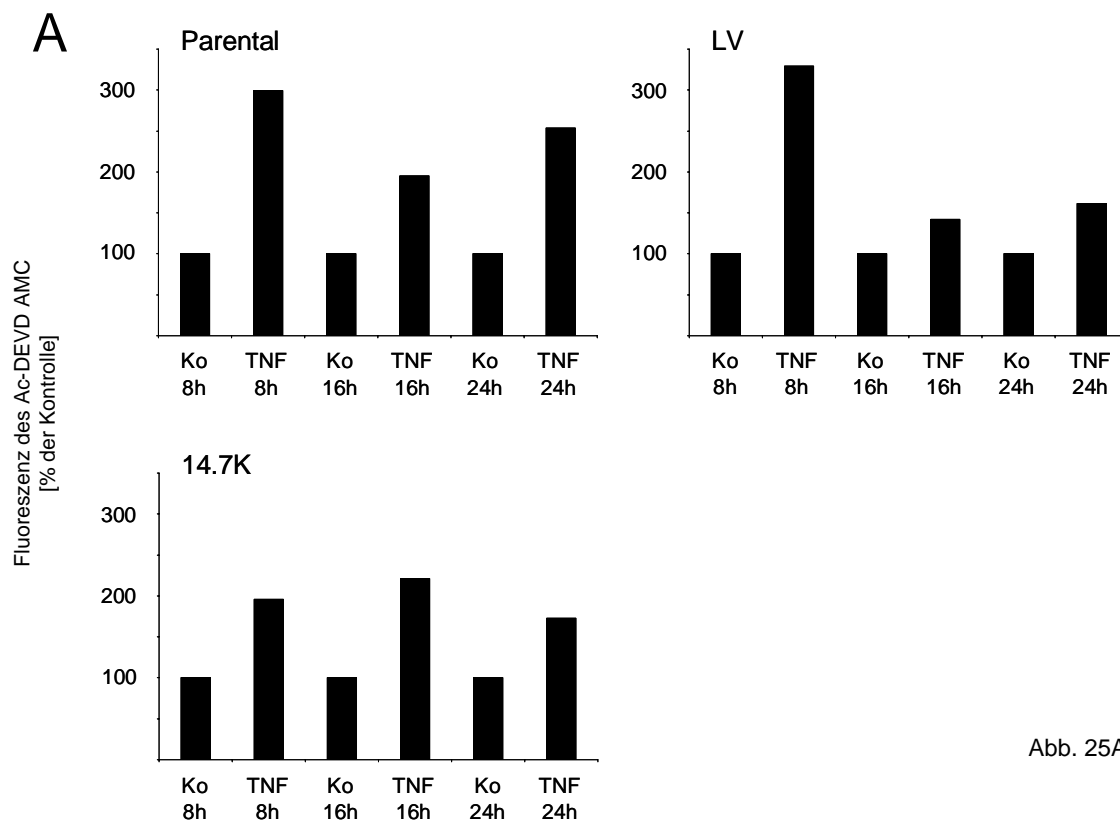


Abb. 25A

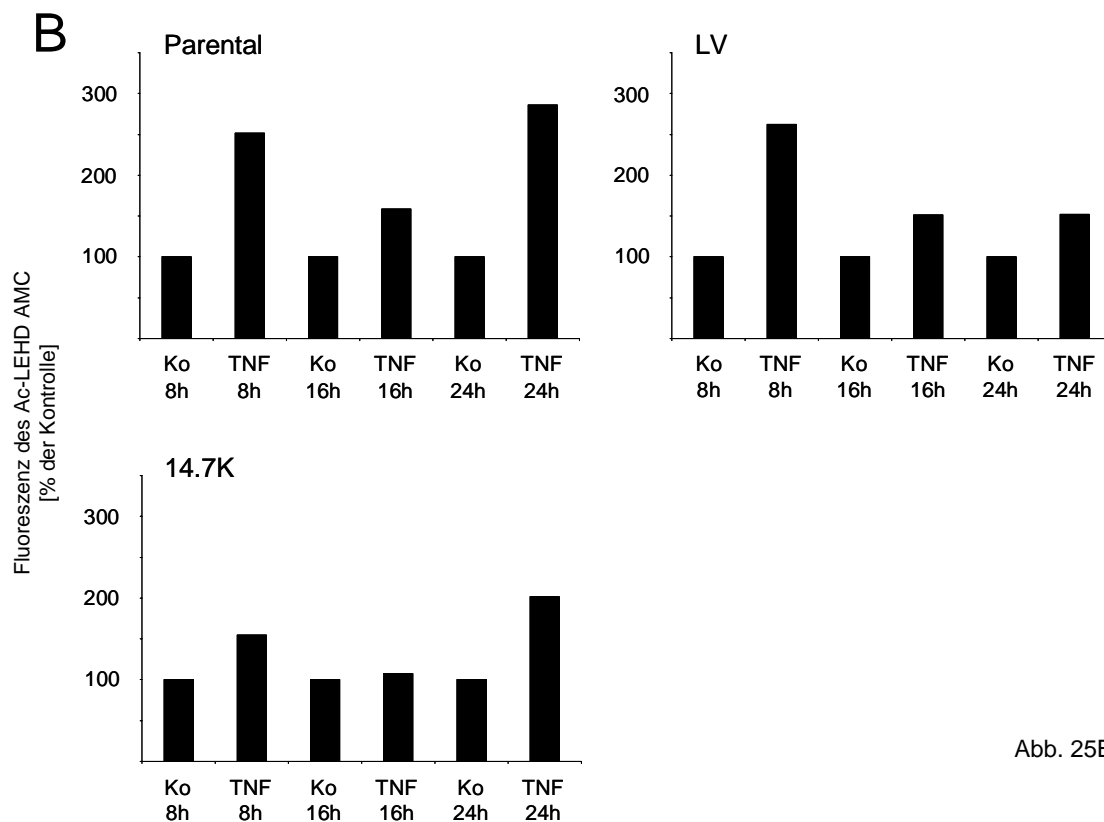


Abb. 25B

Abb. 25: Darstellung der Caspase-3 und-9 Aktivität in H1299 Zellen

Die Zellen wurden für 8, 16 und 24 Stunden mit TNF 100ng/ml behandelt. 50µg kernfreies Proteinlysate wurde in einem Enzymassay eingesetzt. Nach 180 Minuten wurde eine Endpunktmessung der Substratumsetzung durch Caspase-3 und -9 durchgeführt. Die relative Fluoreszenz [aU] wurde abzüglich der Eigenfluoreszenz des Substrates in Prozent der Kontrolle dargestellt. Zu sehen ist die Aktivität der Caspase-3 (A) und die Aktivität der Caspase-9 (B).

als auch die Intensität der Aktivierung. In H1299 Parental Zellen ist nach allen Zeitpunkten eine deutlich gesteigerte Caspase-Aktivität zu sehen. H1299 LV Zellen zeigen dagegen nur nach 8 Stunden eine deutliche Aktivierung. Auch in H1299 Parental Zellen ist die Aktivität nach 8 Stunden am höchsten. Verglichen mit den NIH3T3 Zellen ist zu sehen, dass die Caspase-Aktivierung in H1299 LV Zellen deutlich geringer ausfällt, als in NIH3T3 LV Zellen. H1299 Parental und NIH3T3 Parental Zellen zeigen jedoch ungefähr denselben Aktivitätsverlauf. Im Vergleich zu den H1299 Parental und H1299 LV Zellen zeigen die H1299 14.7K Zellen nach allen Zeitpunkten eine deutlich reduzierte Aktivierung der Caspase-3. Diese Verringerung der Caspase-Aktivität fällt jedoch nicht so deutlich aus, wie in NIH3T3 14.7K Zellen verglichen mit NIH3T3 Parental Zellen.

In Abb.25 B ist zu sehen, dass in allen H1299 Zellen nach Behandlung mit TNF eine gesteigerte Caspase-9 Aktivität vorhanden ist. In H1299 Parentalzellen kommt es nach TNF-Behandlung zu einer deutlich gesteigerten Caspase-9 Aktivität. Nach 24 Stunden ist der höchste Wert erreicht. Dieser Befund unterscheidet sich von den Ergebnissen in NIH3T3 Parental Zellen. Dort war mit zunehmender Behandlungszeit eine Abnahme in der Caspase-Aktivität zu verzeichnen. In H1299 LV Zellen ist ebenfalls nach TNF-Behandlung eine gesteigerte Caspase-9 Aktivität zu beobachten. Verglichen mit den NIH3T3 LV Zellen nimmt auch hier die Aktivität mit zunehmender Zeit ab. In H1299 14.7K Zellen ist nach 24-stündiger Behandlung mit TNF eine gesteigerte Caspase-9 Aktivität zu beobachten. Es kommt hier also, im Gegensatz zu den NIH3T3 14.7K Zellen zu einer leicht erhöhten Aktivität.

Insgesamt betrachtet bestätigen diese Ergebnisse die Untersuchungen in NIH3T3 Zellen. Auch in H1299 Zellen führt die Expression des Ad E3-14.7K Proteins zu einer verringerten Caspase-Aktivierung. Jedoch ist in H1299 14.7K Zellen nach Behandlung mit TNF sowohl eine leicht gesteigerte Caspase-3 Aktivität, als auch nach 24 Stunden eine gesteigerte Caspase-9 Aktivität zu messen. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen, die mit NIH3T3 14.7K Zellen zu beobachten waren.

Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob es in H1299 14.7K Zellen, ähnlich wie in NIH3T3 14.7K Zellen zu einer verringerten Apoptose nach Behandlung mit TNF kommt.

3.3.3.3 Untersuchung der Apoptose im FACS

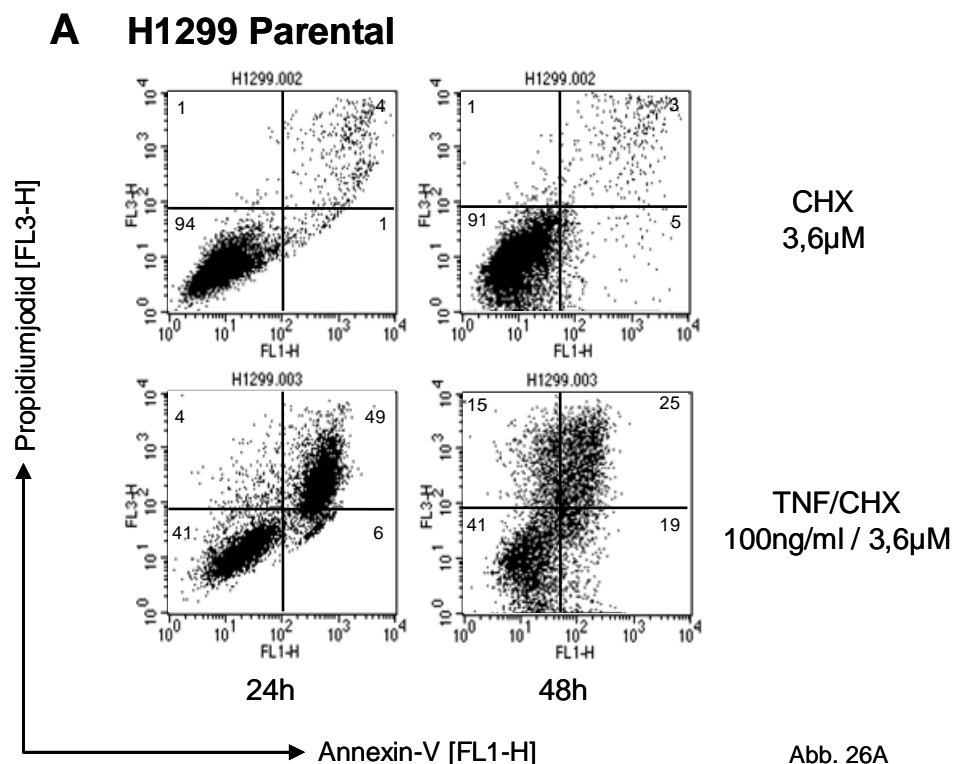
In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in NIH3T3 14.7K Zellen die mit TNF behandelt wurden, der Zelltod deutlich reduziert war. Außerdem konnte in H1299 14.7K Zellen gezeigt werden, dass die Internalisierung des TNF-R1 und die Caspase-Aktivierung inhibiert ist. Es soll nun in

H1299 Zellen untersucht werden, ob das Ad E3-14.7K Protein hier, wie in NIH3T3 14.7K Zellen beobachtet, einen Effekt auf die Apoptose ausübt.

H1299 Parental (A), LV (B) und 14.7K (C) Zellen wurden mit TNF 100ng/ml und Cycloheximid (CHX, 3,6 μ M) behandelt und anschließend für eine Messung der Apoptose im FACS vorbereitet. Wie in Kap. 3.3.3 beschrieben erfolgte eine Kofärbung der Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid. Die Auswertung erfolgte in einem Dot-Plot Diagramm.

In Abb. 26 ist zu sehen, dass die Behandlung mit TNF/CHX sowohl in H1299 Parental als auch in H1299 LV Zellen Apoptose auslöst. Dies ist allerdings erst nach Zugabe des Proteinbiosyntheseinhibitors CHX (Cycloheximid) möglich. CHX allein induziert in keiner der untersuchten Zellen Apoptose. In H1299 14.7K Zellen wird durch Behandlung mit TNF/CHX nach 24 und 48 Stunden keine Apoptose ausgelöst. Diese Ergebnisse decken sich mit den in NIH3T3 14.7K Zellen durchgeführten Experimenten. Dagegen hat die Transduktion von H1299 und NIH3T3 Zellen mit dem Leervektor keinen Einfluss auf die Apoptose.

Die bisher durch geführten Experimente in humanen H1299 Zellen zeigen, dass die Expression des Ad E3-14.7K Proteins die Internalisierung des TNF-R1 inhibiert, zu einer leichten Abschwächung der Caspase-Aktivität führt und die Apoptose blockiert. Diese Befunde gleichen den in murinen NIH3T3 14.7K erzielten Ergebnissen. Im Folgenden soll anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen untersucht werde, ob nach Bindung von TNF an den TNF-R1 der DISC gebildet werden kann.



B H1299 LV

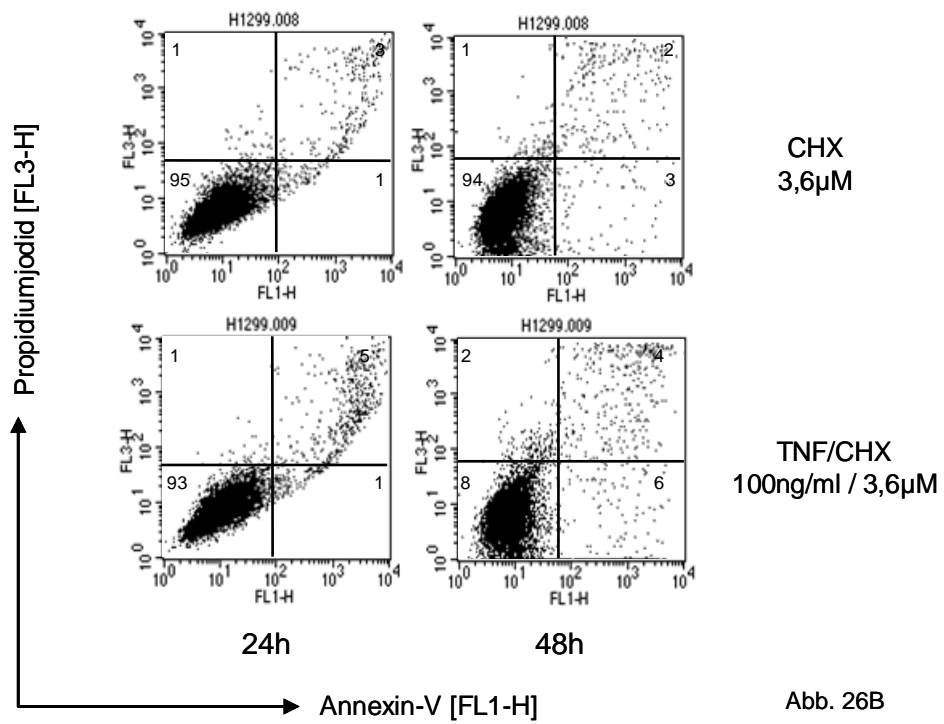


Abb. 26B

C H1299 14.7K

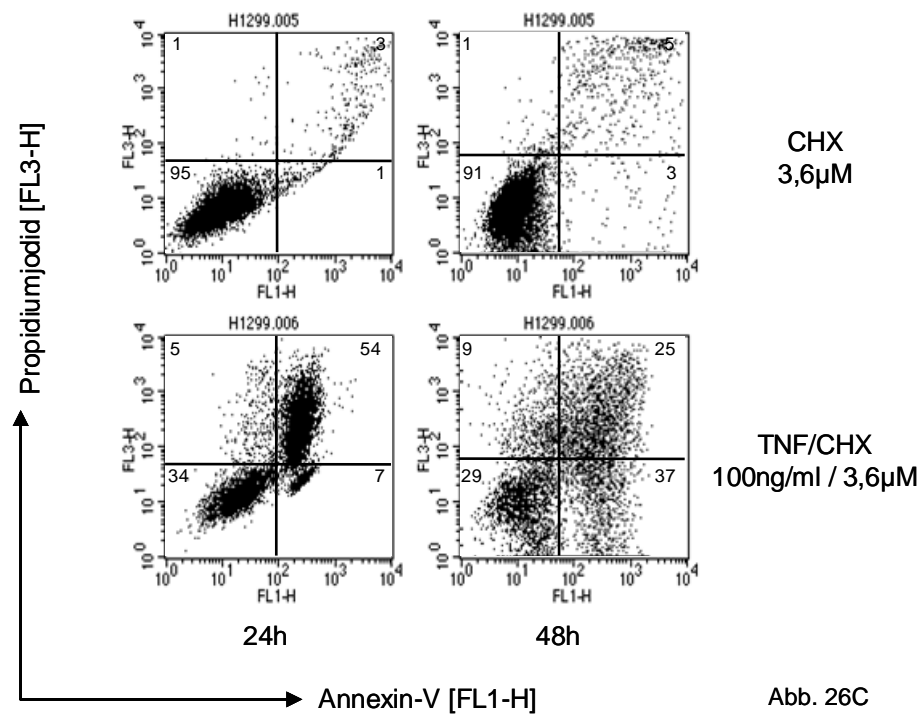


Abb. 26C

Abb. 26: Darstellung der FACS-Analyse der H1299 Zellen

H1299 Parental (A), LV (B) und 14.7K (C) Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit TNF/CHX 100ng/ml / 3,6 μ M behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid gefärbt und im FACS dargestellt. Im Dot-Plot wurde Annexin-V gegen Propidiumjodid aufgetragen. Die prozentuale Verteilung der Zellen wurde in jedem Quadranten angegeben. Repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Untersuchungen zur internalisierungsabhängigen DISC-Rekrutierung anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen

Die Untersuchungen zur internalisierungsabhängigen Caspase-Aktivierung in NIH3T3 Zellen haben gezeigt, dass in NIH3T3 14.7K Zellen sowohl die Adapterproteine TRADD und FADD am TNF-R1 fehlen, als auch die Caspase-8 nicht mehr am TNF-R1 aktiviert werden kann. Dies führt dazu, dass in NIH3T3 Zellen keine Caspase-Aktivierung mehr stattfinden kann und somit keine Apoptose auftritt. Die Untersuchungen in H1299 Zellen haben bisher gezeigt, dass die Expression des Ad E3-14.7K Proteins zu einer verringerten Caspase-Aktivierung und einer blockierten Apoptose führt. Es soll im Folgenden in H1299 Zellen untersucht werden, ob in magnetisch isolierten TNF-R1 Fraktionen aus diesen Zellen nach Behandlung mit TNF die zur Caspase-Aktivierung notwendigen Adapterproteine des DISC vorhanden sind.

Dazu wurden aus H1299 Parental, H1299 LV und H1299 14.7 TNF-R1 Fraktionen magnetisch isoliert und im Western-Blot untersucht.

In den H1299 Parentalzellen finden sich zum Zeitpunkt 0 geringe Mengen der Proteine TRADD und FADD (Abb. 27). Die Menge der Proteine in den Fraktionen nimmt nach 30-minütiger Internalisierung zu. Ebenfalls nach 30-minütiger Internalisierung findet sich die 43/41kD Isoform der Caspase-8 in den Fraktionen. In den H1299 LV Zellen finden sich wie in der Parentalzelllinie nach 30-minütiger Internalisierung die Proteine TRADD und FADD, sowie die 43/41kD Isoform der Caspase-8. Somit kann festgehalten werden, dass in H1299 Parental und LV Zellen nach 30-minütiger Internalisierung alle DISC Proteine in den TNF-R1 Fraktionen vorhanden sind. In beiden Zelllinien findet sich ebenfalls nach 30-minütiger Internalisierung die ubiquitylierte Form von TRADD. Die Ubiquitylierung von TRADD spricht dafür, dass TRADD nach Internalisierung proteasomal abgebaut wird. Ob auch andere Proteine des DISC so reguliert werden, ist nicht bekannt.

In den H1299 14.7K Zellen finden sich zum Zeitpunkt 0 und nach 30-minütiger Internalisierung nur geringe Mengen von TRADD und FADD. Es finden sich zu beiden Zeitpunkten die Isoformen der Procaspase-8 in den Fraktionen, nicht jedoch die 43/41kD Isoformen. Dies bedeutet, dass in H1299 14.7K Zellen die Proteine des DISC nicht an den TNF-R1 angelagert werden können bzw. der DISC nicht gebildet wird. Zwar befindet sich die Procaspase-8 am TNF-R1, eine Aktivierung ist aber nicht möglich. Zu beiden Zeitpunkten befindet sich die ubiquitylierte Isoform von TRADD in den TNF-R1 Fraktionen. Dies ist ein Unterschied zu den H1299 Parental und LV Zellen. Dort taucht die ubiquitylierte Form von TRADD erst nach 30-minütiger Internalisierung auf.

Diese Befunde sprechen dafür, dass die blockierte Aktivierung von Caspasen in H1299 14.7K Zellen ihre Ursache darin hat, dass der Zelltod-induzierende Signalkomplex („death inducing signaling complex“, DISC) in diesen Zellen nicht gebildet werden kann.

In allen Zelllinien finden sich die für die NF- κ B-Aktivierung notwendigen Proteine RIP und TRAF2 sowohl nach 0 Minuten als auch nach 30 Minuten am TNF-R1. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung von NF- κ B nicht von der Internalisierung des TNF-R1 abhängt.

Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass sowohl in murinen NIH3T3 Zellen als auch in humanen H1299 Zellen eine Expression des Ad E3-14.7K Proteins dazu führt, dass 1. die Internalisierung des TNF-R1 blockiert ist, 2. die zur Aktivierung der Procaspase-8 notwendigen DISC-Proteine nicht an den Rezeptor angelagert werden und somit keine Aktivierung proapoptotischer Caspasen stattfindet und 3. die durch TNF induzierte Apoptose blockiert ist.

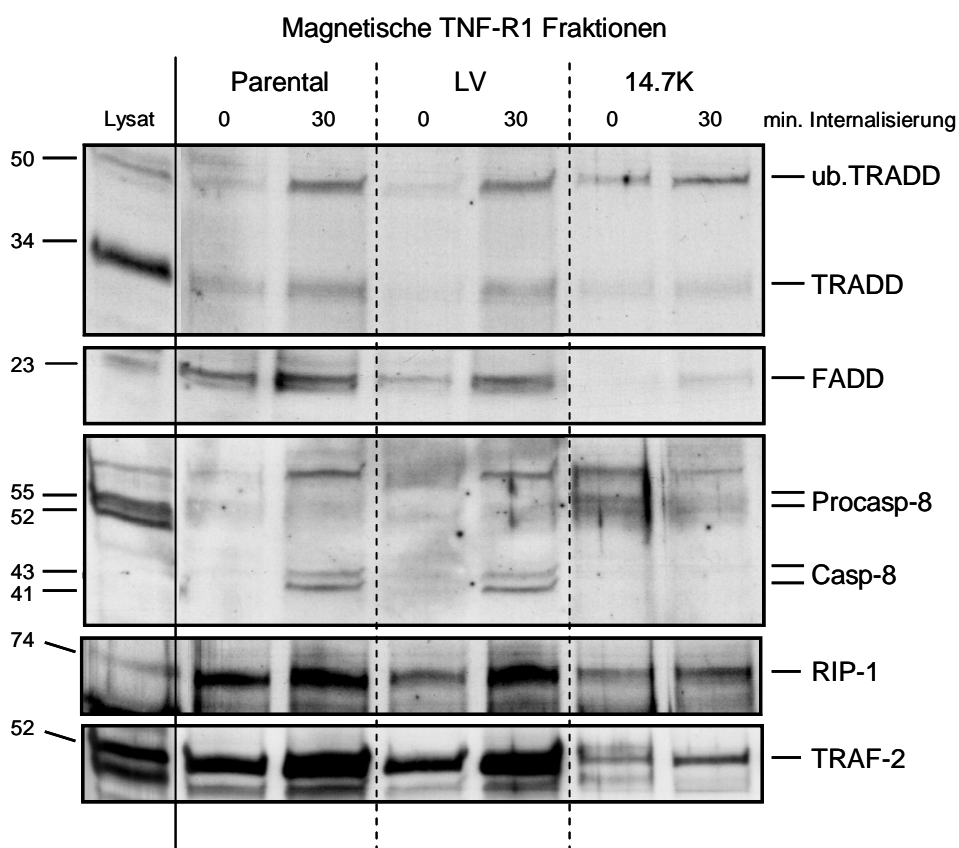
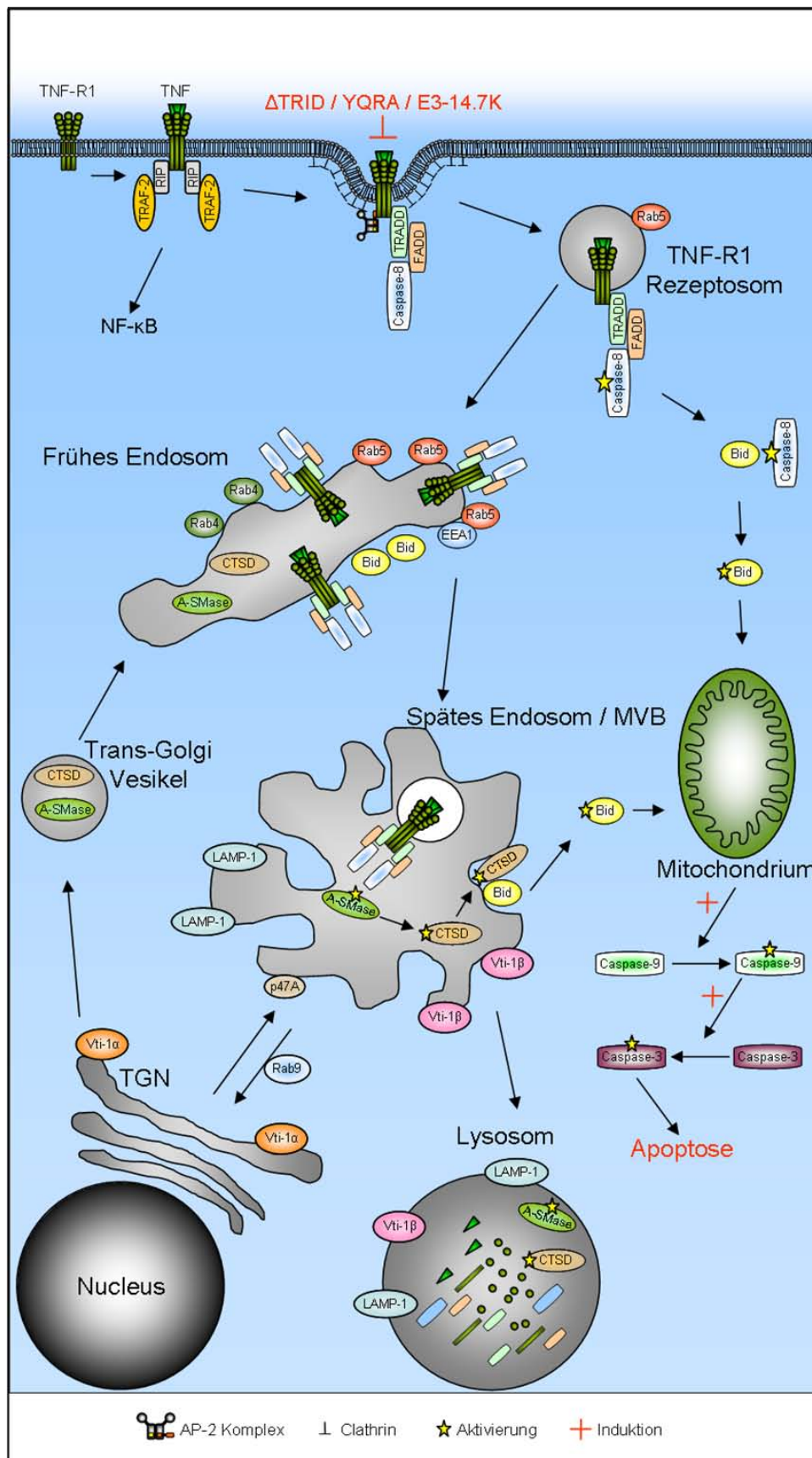


Abb. 27: Western-Blot Analyse magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen aus H1299 Wildtyp, LV und 14.7K Zellen zur Untersuchung internalisierungsabhängiger Caspase-Aktivierung

H1299 Wildtyp, LV und 14.7K Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Streptavidin-Microbeads behandelt. Nach 0 min und 30 min Internalisierung bei 37°C wurden die Zellen schonend homogenisiert und magnetisch markierte TNF-R1 mit einer Free-Flow-Magnetkammer isoliert. Die TNF-R1 Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Zur Kontrolle wurde ein Totallysat aus H1299 Parental Zellen aufgetragen. Die Behandlung der Membran erfolgte mit den in der Abbildung angegebenen Antikörpern.

3.4 Modell zur Internalisierung des TNF-R1 und der damit verbundenen Signalwege



Schema 5: Die Internalisierung des TNF-R1 und die damit verbundenen Signalwege, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurden

Der TNF-R1 wird nach Bindung des Liganden TNF- α durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert. Diese Internalisierung ist essentiell für die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 und somit essentiell für die Initiierung der Apoptose. Eine Inhibition der Internalisierung führt zu einer blockierten Apoptose. Nach der Internalisierung wird der TNF-R1 durch frühe Endosomen und späte Endosomen zu den Lysosomen transportiert. In frühen Endosomen kommt es zum Zusammentreffen des TNF-R1 mit den Proformen von Cathepsin D (CatD) und A-SMase. In späten Endosomen kolokalisieren aktive Caspase-8 und der TNF-R1 miteinander. Es kommt zur Aktivierung von A-SMase und CatD und zu einer Spaltung von Bid an späten Endosomen. Die Spaltung von Bid initiiert die mitochondriale Apoptose und die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Internalisierung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors 1 (TNF-R1) und dessen intrazellulärer Transport charakterisiert. Nach Bindung des Liganden verbleibt der TNF-R1 nicht an der Zelloberfläche, sondern wird sehr schnell internalisiert (Schütze et al., 1999; Schneider-Brachert et al., 2004). Diese Internalisierung ist essentiell für die Bildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (DISC) und die Aktivierung proapoptotischer Caspasen. Nach der Internalisierung fusioniert der TNF-R1 mit frühen Endosomen. Diese frühen Endosomen enthalten die durch TNF aktivierbare Aspartatprotease Cathepsin D (CatD) und kolokalisieren mit dem proapoptotischen Bcl-2 Protein Bid (Heinrich et al., 2004). Der TNF-R1 wird aus den frühen Endosomen in späte Endosomen transportiert, wo er mit dem aktiven Heterodimer der Caspase-8 kolokalisiert. In späten Endosomen kommt es zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (A-SMase) durch Caspase-8. Dies führt weiterhin zu einer Aktivierung von Cathepsin D und zur Spaltung von Bid. Im Anschluss daran wird der TNF-R1 zu den Lysosomen transportiert. Eine Deletion der TRID Domäne oder eine Punktmutation in dem Internalisierungsmotiv (YQRA) resultiert in einer Blockade der TNF-R1 Internalisierung. Dies hat zur Folge, dass es zu einer reduzierten Aktivierung von Caspasen und zu einer verringerten Apoptose in diesen Zellen kommt. Die Expression des adenoviralen Proteins Ad E3-14.7K in murinen und humanen Zellen resultiert ebenfalls in einer Internalisierungsblockade des TNF-R1. Ad E3-14.7K Expression führt zu einem Fehlen der für die Internalisierung wichtigen Proteine Dynamin II und Rab5, wodurch sich neu gebildete Vesikel nicht von der Plasmamembran abschnüren können. Der DISC kann somit nicht gebildet werden und es kommt auch hier zu keiner Aktivierung von Caspasen und keiner Apoptose.

Somit konnte sowohl in einem genetischen als auch in einem physiologischen Modell gezeigt werden, dass die Internalisierung und der intrazelluläre Transport des TNF-R1 essentiell für die Apoptose sind.

Endozytose und intrazellulärer Transport des TNF-R1

Der TNF-R1 wird von allen somatischen Zellen im humanen Organismus exprimiert und ist ein hoch affiner Rezeptor für lösliches TNF- α (TNF) (Aggarwal, 2003). Die Bindung von TNF an den TNF-R1 führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Es kommt daraufhin zu einer Anlagerung intrazellulärer Adapterproteine an den TNF-R1, was zur Initiierung intrazellulärer Signalwege führt (Wajant et al., 2003). Nach erfolgter Bindung von TNF an den TNF-R1 wird dieser von der Plasmamembran endozytiert. Anhand von radioaktiv markiertem TNF konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Halbwertszeit von TNF-Rezeptoren an der Plasmamembran von KYM Myosarcomzellen ca. 2 Stunden beträgt. Nach Bindung von TNF verringert sich die Halbwertszeit auf ca. 30 Minuten (Watanabe et al., 1988). In Untersuchungen an murinen L929 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von murinem TNF die Internalisierung des TNF-Rezeptorkomplexes über „clathrin coated pits“ auslöst (Mosselmans et al., 1988).

In mit Biotin-TNF/Avidin-FITC behandelten COS-7 Zellen konnte die Internalisierung und der intrazelluläre Transport des TNF-R1 in dieser Arbeit näher charakterisiert werden, und es zeigte sich, dass der fluoreszent markierte TNF-TNF-R1-Komplex internalisiert wird (s. Abb. 1). Anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen und mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie konnte in

dieser Arbeit der intrazelluläre Transportweg des TNF-R1 nach erfolgter Internalisierung anhand spezifischer Markerproteine charakterisiert werden (s. Schema 5). Magnetisch isolierte TNF-R1 Fraktionen enthalten Clathrin (s. Abb. 12). Dies bestätigt, dass es sich um eine Clathrin-vermittelte Rezeptor-abhängige Endozytose handelt, die bereits für mehrere Rezeptortypen nachgewiesen werden konnte. So werden beispielsweise Rezeptortyrosinkinasen wie EGF-Rezeptor oder NGF-Rezeptor, aber auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie der β 2-Adrenergene Rezeptor über „clathrin coated pits“ (CCPs) internalisiert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bei beiden Rezeptortypen jedoch verschieden. Während der β 2-Adrenergene Rezeptor nach Aktivierung über das Adapterprotein β -Arrestin in CCPs akkumuliert und anschließend internalisiert wird, sorgt im Falle des EGFR ein Tyrosin-basiertes Internalisierungsmotiv für die Anlagerung des AP-2 Komplexes, der durch Bindung von Clathrin die Internalisierung vermittelt (McPherson et al., 2001). Die Bindung von EGF an den Rezeptor führt zu einer Dimerisierung und damit vermutlich zu einer Konformationsveränderung im zytoplasmatischen Teil. Das Internalisierungsmotiv ist nun für den AP-2 Proteinkomplex zugänglich. Die Bindung von AP-2 an den Rezeptor führt zu einer Anlagerung von Clathrin an den AP-2 Komplex und zur Ausbildung der charakteristischen Käfigstruktur (Schmid, 1997). Durch Analyse der Aminosäuresequenz des TNF-R1 konnte im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors ebenfalls ein Tyrosin-basiertes Internalisierungsmotiv (YQRW) gefunden werden (s. Abb.13) (Schneider-Brachert et al., 2004). In isolierten TNF-R1 Fraktionen können sowohl Clathrin als auch β -Adaptin, ein Bestandteil des AP-2 Komplexes, nachgewiesen werden (s. Abb. 12). Dies bestätigt, dass es sich auch im Falle des TNF-R1 um eine AP-2 abhängige Endozytose handelt. Eine Punktmutation des Internalisierungsmotivs (YQRW→YQRA) resultiert in einer vollständigen Blockade der TNF-R1 Internalisierung (s. Abb.14). Durch die Mutation des Internalisierungsmotivs wird die Bindung des AP-2 Komplexes an den Rezeptor blockiert. Auch dieser Befund ist ein Beweis für eine Clathrin/AP-2 abhängige Internalisierung des TNF-R1.

Nach erfolgter Internalisierung von Rezeptoren wird die Clathrinhülle der Vesikel entfernt. Der Verlust der Clathrinhülle ist eine Voraussetzung für die Fusion mit anderen Vesikeln. In isolierten TNF-R1 Fraktionen ist eine Abnahme von Clathrin erst nach 30-60 Minuten zu beobachten (s. Abb. 12). Die Tatsache, dass Clathrin auch nach 30-minütiger Internalisierung noch in den TNF-R1 Fraktionen zu finden ist, kann mit einer nicht synchron verlaufenden Internalisierung des Rezeptors erklärt werden, da sich die Abspaltung der Clathrinhülle im Allgemeinen innerhalb der ersten Minuten nach Internalisierung vollzieht (Marsh et al., 1999). In Abb. 1 ist zu sehen, dass sich nach 30 Minuten noch ein Teil der TNF-R1 Komplexe an der Plasmamembran befinden, während weitere Komplexe in der Nähe des Zellkerns sichtbar sind.

Die Fusion der TNF-R1 enthaltenden Vesikel mit frühen Endosomen kann in isolierten TNF-R1 Fraktionen durch die Anwesenheit von Rab4 und Rab5 dargestellt werden (s. Abb. 12) und mikroskopisch durch eine Kolokalisation internalisierter TNF-R1 Vesikel mit Rab5 (s. Abb. 2) und EEA1 nach 15 Minuten (Abb. 3). Das frühe Endosom wird häufig als „sorting endosome“ bezeichnet (Maxfield und McGraw, 2004). Innerhalb des „sorting endosome“ entscheidet sich, ob internalisierte Rezeptoren zurück zur Plasmamembran transportiert, oder in Lysosomen degradiert werden. Das frühe (sorting) Endosom besitzt tubuläre und vesikuläre Strukturen, die diese unterschiedlichen Funktionen ausüben. Die GTPasen Rab4 und Rab5 sind als früh endosomale Markerproteine etabliert

(Zerial und McBride, 2001). Es gilt heute als erwiesen, dass sich Rab4 und Rab5 an frühen Endosomen in verschiedenen Domänen aufhalten (McCaffrey et al., 2001). In den tubulären Domänen, die überwiegend Rab4 enthalten, findet das Recycling von internalisierten Molekülen statt, während in Rab5-positiven vesikulären Domänen Moleküle zum Weitertransport in späte Endosomen akkumulieren. Für den EGFR sind diese zwei möglichen Wege bereits beschrieben worden (Sorkin, 1991). Nach Bindung von EGF wird der EGFR internalisiert und in frühe Endosomen transportiert (Miller et al., 1986). Dort bleiben Rezeptor und Ligand weiterhin gebunden und werden zunächst zu späten Endosomen und anschließend zu Lysosomen transportiert und abgebaut. Der EGFR kann jedoch auch TGF α binden, was ebenfalls zur Internalisierung des Rezeptors und einem Transport in frühe Endosomen führt. Dort erfolgt die Trennung von Rezeptor und Ligand und der EGFR wird wieder zur Plasmamembran recycelt (McPherson, 2001). Für den TNF-R1 konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nach erfolgter Internalisierung nicht recycelt wird, sondern Rezeptor und Ligand in Lysosomen degradiert werden (Watanabe et al., 1988). Ein weiteres früh endosomales Protein, welches durch Kolo-kalisation mit TNF-R1-Komplexen gefunden wurde ist EEA1 („early endosomal autoantigen 1“) (s. Abb. 3). EEA1 kolokalisiert nach 15 Minuten mit internalisierten TNF-R1-Komplexen (s. Abb. 3C), eine schwache Kolo-kalisation ist aber auch nach 30 und 60 Minuten noch vorhanden. In endosomalen Transportweg vermittelt EEA1 zusammen mit Rab5 die homotypische Fusion früher Endosomen miteinander (Simonsen et al., 1998). Außerdem kann EEA1 an Myosin binden und vermittelt so die Bewegung früher Endosomen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die lang andauernde Kolo-kalisation mit internalisierten TNF-R1-Komplexen sein.

Rezeptoren, die zu Lysosomen transportiert werden sollen, verlassen die frühen Endosomen in so genannten „endosomal carrier vesicles“ (ECVs) (Gruenberg, 2001). Diese ECVs besitzen zwei unterscheidbare Membranen, eine äußere Membran und innere Membraninvaginationen, weshalb sie auch, zusammen mit späten Endosomen als „multivesicular bodies“ (MVBs) bezeichnet werden. Durch Mikrotubuli abhängigen Transport gelangen sie zu den späten Endosomen, mit denen sie fusionieren. Internalisierte TNF-R1-Komplexe sind nach ca. 30 Minuten in späten Endosomen zu lokalisieren (s. Abb. 4, Abb. 12). Dies konnte anhand von Kolo-kalisationen mit dem mit späten Endosomen assoziierten SNARE-Protein Vti1b nach 30-60 Minuten gezeigt werden (s. Abb. 4). Außerdem lässt sich Vti1b in isolierten TNF-R1 Fraktionen nach 30 Minuten deutlich nachweisen. Vti1b ist als SNARE Protein essentiell für die homotypische Fusion später Endosomen sowie für die Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen (Antonin et al., 2000). Kolo-kalisationen von TNF-R1 und Vti1b sind ausschließlich in der Nähe des Zellkerns zu sehen. Es bilden sich größere Komplexe aus mehreren TNF-enthaltenden und Vti1b positiven Vesikeln, was für die Lokalisation von TNF-R1-Komplexen in MVBs spricht. In der Arbeit von Schneider-Brachert et al. aus unserer Arbeitsgruppe konnte anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen gezeigt werden, dass der mit Biotin-TNF/Avidin-Gold markierte TNF-R1 nach 30 Minuten in multivesikulären Endosomen lokalisiert ist. Dort liegt der TNF-R1 innerhalb der inneren Membran vor. Eine ähnliche Beobachtung konnten Mosselmans et al. 1988 machen, die Gold markiertes TNF nach 30 Minuten in MVBs lokalisieren konnten.

Der internalisierte EGFR konnte in MVBs hauptsächlich in der inneren Membran lokalisiert werden, was zu der Annahme führte, die inneren Membranen enthielten nur Stoffe, die in Lysosomen

degradiert werden sollen (Futter et al., 1996). Im Gegensatz zu dem EGF- Rezeptor und anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren führt die Lokalisation des TNF-R1 in inneren Membranen der MVBs nicht zu einer Abschaltung der Signalweiterleitung, sondern induziert einen weiteren Signalweg, wie die folgenden Ergebnisse und die Veröffentlichung der Arbeitsgruppe (Schneider-Brachert et al., 2004) zeigen. In TNF-behandelten Zellen konnte nach 30 Minuten eine Aktivierung der endosomal/lysosomal vorkommenden sauren Sphingomyelinase (A-SMase) gezeigt werden. In internalisierungsdefizienten TNF-R1 Δ TRID Zellen konnte dagegen keine Aktivierung der A-SMase festgestellt werden.

Der Transport von intralysosomalen Proteinen als auch von lysosomalen Membranproteinen vom Trans-Golgi Netzwerk zu den Lysosomen verläuft über die Endosomen (Bonifacino, 2003). Dabei können zwei Transportwege unterschieden werden, die vom Trans-Golgi-Netzwerk zu frühen oder späten Endosomen führen und über die Adapterproteinkomplexe AP-1 und AP-3 gesteuert werden. LAMP-1 ist ein integrales lysosomales Membranprotein und kommt in späten Endosomen und in Lysosomen vor (Griffiths et al., 1988). Der Transport von LAMP-1 und anderen lysosomalen Membranproteinen vom Golgi-Apparat zu den späten Endosomen wird vermutlich über den AP-3 Komplex vermittelt (Nakatsu und Ohno, 2003). Ein Bestandteil des AP-3 Komplexes ist p47A (Bonifacino et al., 2003). p47A ist nach 30 Minuten in TNF-R1 Fraktionen vorhanden und später nicht mehr detektierbar (s. Abb. 12). Des Weiteren ist nach 30 Minuten LAMP-1 in den TNF-R1 Fraktionen vorhanden. Das Vorhandensein von p47A und LAMP-1 spricht für eine Fusion von Endosomen mit Vesikeln, die über einen AP-3 vermittelten Transport vom Golgi-Apparat zu späten Endosomen transportiert werden und somit für eine Lokalisation von TNF-R1-Komplexen in späten Endosomen. Ausgehend von späten Endosomen existiert ein Transportweg, der Proteine zum TGN transportiert. Dieser Transportweg wird hauptsächlich von den Mannose-6-Phosphat Rezeptoren benutzt, die in späten Endosomen akkumulieren und von dort zurück zum TGN transportiert werden, um für erneute Transportschritte zur Verfügung zu stehen (Ghosh et al., 2003). Rab9 reguliert diesen Rücktransport von Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (Ganley et al., 2004). Ein Transport von internalisierten TNF-R1-Komplexen von späten Endosomen zum Golgi-Apparat konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. In mikroskopischen Untersuchungen konnte keine Koloalokalisation mit Rab9 oder Vti1a, einem am TGN lokalisierten SNARE-Protein, gefunden werden (s. Abb. 7, 8). In unserer Veröffentlichung konnten in isolierten TNF-R1 Fraktionen ebenfalls keine Markerproteine für den Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Schneider-Brachert et al., 2004).

Eine Zunahme von LAMP-1 und Vti1b in isolierten TNF-R1 Fraktionen spricht für den Weitertransport der TNF-Komplexe zu den Lysosomen nach ca. 60 Minuten. Biotin-TNF/Avidin-Gold markierte TNF-R1 konnten nach 60 Minuten in Lysosomen nachgewiesen werden (Schneider-Brachert et al., 2004). Ebenso konnten Mosselmans et al. 1988 Gold markiertes TNF nach 120-minütiger Internalisierung mittels Elektronenmikroskopie in Lysosomen lokalisieren.

Die Bedeutung der TNF-R1 Internalisierung für die Aktivierung von CTSD

Wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, internalisiert der TNF-R1 nach Bindung von TNF- α und fusioniert während des intrazellulären Transports mit Endosomen und Lysosomen. Dieser Schritt wurde lange Zeit als Abschaltmechanismus für den TNF-R1 und dessen Signalweiterleitung

betrachtet. Lysosomen geraten in letzter Zeit als mögliche proapoptotische Kompartimente immer mehr in den Mittelpunkt (Bursch, 2001). Speziell die intralysosomalen Proteasen Cathepsin B (CatB) und Cathepsin D (CatD) wurden als proapoptotische Faktoren identifiziert. Der Beweis für eine proapoptotische Wirkung von CatD wurde mit Hilfe einer Mikroinjektion von CatD in das Zytoplasma humaner Fibroblasten erbracht, was dazu führte, dass unter anderem Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt und Caspasen aktiviert wurden (Roberg et al., 2002). Eine Freisetzung von CatD aus den Lysosomen konnte für weitere Apoptose induzierende Stimuli wie z.B. Chemotherapeutika, Strahlenbehandlung oder Entzug von Serum oder Wachstumsfaktoren gezeigt werden (Li et al., 1998; Roberg und Öllinger, 1998; Johansson et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte die intrazelluläre Lokalisation von CatD charakterisiert werden (s. Schema 5). Mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie und Kofärbung von CatD und intrazellulären Markerproteinen konnte gezeigt werden, dass sich CatD in frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen befindet. Cathepsin D wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und liegt nach Abspaltung der Signalsequenz als 52kD Proform vor. Diese Form wird im Golgi-Apparat glykosyliert, an den Mannose-6-Phosphat Rezeptor gebunden und über diesen zu den Endosomen transportiert. Von dort erfolgt der Weitertransport zu den Lysosomen (Fusek und Větvička, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CatD mit Rab5 und EEA-1 positiven frühen Endosomen kolokalisiert (s. Abb. 5). CatD ist weiterhin in Rab7, Rab9 und LAMP-1 positiven späten Endosomen und in LAMP-1 und Lyotracker positiven Lysosomen vorhanden. CatD konnte dagegen nicht in Recycling-Endosomen gefunden werden (s. Abb. 5). Eine Kofärbung mit Markerproteinen für frühe Recycling-Endosomen (Rab4) oder späte Recycling-Endosomen (Rab11) zeigte keine Kolokalisationen. Somit kann folgender Transportweg für CatD festgehalten werden: Die Proform von CatD wird über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in frühe Endosomen transportiert. Der Komplex wird weiter in späte Endosomen transportiert, wo sich aufgrund der vesikulären Ansäuerung Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und CatD voneinander trennen. Der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor wird anschließend zum TGN recycelt, während CatD zu den Lysosomen transportiert wird (s. Schema 5).

Der Transport neu synthetisierter lysosomaler Hydrolasen vom TGN zu den Lysosomen wird durch zwei Mannose-6-Phosphat Rezeptoren (MPR) vermittelt (von Figura und Hasilik, 1986; Kornfeld, 1986). Der Kationen-abhängige Mannose-6-Phosphat Rezeptor (CD-MPR) ist ca. 46 kD groß und vermittelt hauptsächlich den Transport neu synthetisierter Hydrolasen. Der Kationen-unabhängige Mannose-6-Phosphat Rezeptor (CI-MPR) ist ca. 300 kD groß und besitzt neben der gleichen Funktion wie der CD-MPR zusätzlich die Funktion eines Rezeptors für den „insulin-like growth factor II“ (IGF-II) (Ghosh et al., 2003). Beide MPR finden sich sowohl im TGN, in frühen Endosomen, späten Endosomen, Recycling-Endosomen sowie an der Plasmamembran. Der Eintrittspunkt für neu synthetisierte Hydrolasen in den endozytotischen Weg sind hauptsächlich die frühen Endosomen (Ludwig et al., 1991; Press et al., 1998; Waguri et al., 2003). Somit entsprechen die Beobachtungen zur Lokalisation von CatD den bisher bekannten Befunden zum Transportweg lysosomaler Hydrolasen und der MPR.

Die Behandlung von Zellen mit TNF, IL-1 oder FasL führt zur Aktivierung zweier Sphingomyelinasen (SMasen): Der an der Plasmamembran gebundenen neutralen SMase (N-SMase) und der endo-lysosomal lokalisierten sauren SMase (A-SMase) (Schütze et al., 1992; Wiegmann et al., 1994; Cifone

et al., 1995; Liu und Anderson et al., 1995). SMasen produzieren durch Hydrolyse von Sphingomyelin Ceramid (Spiegel und Merrill, 1996). Heinrich et al. konnten 1999 zeigen, dass CatD an Ceramid bindet. Diese Bindung führte zu einer verstärkten Prozessierung der 52kD Proform zu den aktiven 48kD und 32kD Isoformen. Die verstärkte Aktivität der A-SMase führt somit zur endo-lysosomalen Aktivierung von CatD. In A-SMase defizienten Zellen konnte dagegen keine Aktivierung von CatD nach TNF-Behandlung festgestellt werden (Heinrich et al., 2004). Diese Befunde zeigen die direkte Verbindung zwischen der Initiierung des Todessignals am TNF-R1 und der darauf folgenden Aktivierung von CatD.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TNF-R1 nach erfolgter Internalisierung mit CatD kolokalisiert (s. Abb. 6). Diese sehr deutliche Kolokalisation findet nach 60 Minuten in Vesikeln nahe dem Zellkern statt. Aufgrund des untersuchten zeitlichen Verlaufs der TNF-R1 Internalisierung (s. Abb.1, Abb. 12) findet die Kolokalisation wahrscheinlich in späten Endosomen statt. Vereinzelt sind einige Kolokalisationen auch nach 15 und 30 Minuten, vermutlich in frühen Endosomen, zu beobachten (s. Abb. 6). Eine Untersuchung isolierter TNF-R1 Fraktionen zeigte, dass die aktive 32kD CatD Isoform bereits nach 10 Minuten in den TNF-R1 Fraktionen zu finden ist, aber erst nach 30 Minuten zunimmt, was dafür spricht dass die CatD-Proformen bereits in frühen Endosomen lokalisiert sind und mit zunehmender Zeit prozessiert werden. In isolierten TNF-R1 Fraktionen konnte nach 30 Minuten eine Aktivierung der A-SMase gezeigt werden (Schneider-Brachert et al., 2004). Aufgrund des zeitlichen Verlaufs der TNF-R1 Internalisierung findet die Aktivierung der A-SMase in späten Endosomen statt. Aufgrund der multivesikulären Struktur der späten Endosomen ist dort die Möglichkeit geboten, dass TNF-R1 Adapterproteine und A-SMase direkt miteinander interagieren können und es somit zu einer Aktivierung der A-SMase kommt (s. Schema 5). Die Aktivität der A-SMase erklärt den Anstieg der 32kD Isoform von CatD, da das von der A-SMase gebildete Ceramid CatD aktiviert.

Die Lokalisation von Bid

Bid konnte im Rahmen der Fas und TNF induzierten Apoptose als Substrat für aktive Caspase-8 identifiziert werden (Li et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass das gesplattene 15kD Fragment (tBid) an die Mitochondrien transloziert, und dort den Ausstrom von Cytochrom c induziert (Gross et al., 1999; Kim et al., 2000; Grinberg et al., 2002). Bid konnte ebenfalls als Substrat intralysosomaler Proteasen identifiziert werden (Stoka et al., 2001). Die Schnittstelle durch lysosomale Proteasen unterschied sich von der durch Caspase-8 hervorgerufenen Spaltung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bid ein Substrat für CatD darstellt (Heinrich et al., 2004).

Mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Bid nicht diffus zytosolisch sondern granulär lokalisiert ist (Abb. 11). Bid ist an frühen Endosomen lokalisiert und kolokalisiert dort mit CatD (Abb. 11). Dagegen konnte Bid nicht an frühen Recycling-Endosomen oder an Lysosomen gefunden werden. Anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen ließ sich feststellen, dass die 23kD Proform von Bid in den TNF-R1 Fraktionen enthalten ist (Abb. 12). Nach 60 Minuten ist die 23kD Isoform nur noch schwach in den TNF-R1 Fraktionen detektierbar. Diese Abnahme der Proform spricht für eine Spaltung von Bid zu tBid und somit für eine Aktivierung, die durch CatD verursacht sein könnte. Die Aktivierung von Bid durch lysosomale

Proteasen gilt als Schnittstelle zwischen den Lysosomen und der mitochondrialen Apoptose (Jäätelä, 2004). Eine wichtige Voraussetzung für die Spaltung von Bid durch intralysosomale Proteasen wie z.B. CatD ist die Freisetzung aus Endosomen bzw. Lysosomen. Diese Freisetzung und eine darauf folgende mitochondriale Apoptose konnte bisher für eine Reihe Apoptose-induzierender Stimuli wie p53-Aktivierung, Staurosporin-Behandlung und Sphingosin-Behandlung gezeigt werden (Nilsson et al., 1997; Kagedal et al., 2001; Yuan et al., 2002). Eigene Vorarbeiten haben gezeigt, dass CatD in Zellen nach Behandlung mit TNF oder Ceramid im Zytoplasma zu finden ist (Heinrich et al., 2004). Die Behandlung von Zellen mit TNF oder Ceramid führte zu einer Aktivierung der Caspasen-3 und -9 sowie zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Weiterhin konnte in einem *in vitro* Assay gezeigt werden, dass Bid ein Substrat für CatD darstellt. Diese Spaltung ist pH abhängig und bereits ab pH 6,2 wurden 60% der 23kD Proform von Bid gespalten. Das bedeutet, dass das aus den Endosomen/Lysosomen freigesetzte CatD in der Lage ist, das an Endosomen assoziierte Bid auch bei höherem pH-Wert als in Lysosomen zu spalten. In Zellen von CatD Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass es nach TNF Behandlung zu keiner Spaltung von Bid kam. In diesen Zellen konnte nach Behandlung mit TNF eine verringerte Caspase-3 und -9 Aktivität festgestellt werden. Was diese Freisetzung von CatD aus den Endosomen/Lysosomen induziert, ist noch nicht ausreichend geklärt. Möglicherweise ermöglicht die Bindung von CatD an das Neutrallipid Ceramid in Endosomen einen erleichterten Durchlass durch die vesikuläre Membran. Aber auch andere Möglichkeiten müssen in Betracht gezogen werden. Eine mögliche Rolle bei der Freisetzung lysosomaler Proteasen aus Vesikeln spielt das proapoptotische Bcl-2 Protein Bax. Bax induziert an isolierten Lysosomen die Freisetzung von Proteasen. Nach Behandlung mit Staurosporin konnte eine Assoziation von Bax mit Lysosomen festgestellt werden (Kagedal et al., 2005).

Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domänen für die TNF-R1 Internalisierung und die TNF-induzierte Apoptose

Die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren führt zur Initiierung intrazellulärer Signalwege. Der erste Schritt besteht in der Bindung von Adaptermolekülen an die Rezeptoren. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Proteinkomplexes, der DISC („death inducing signaling complex“) genannt wird. Die Bildung des DISC konnte bisher für den Fas-Rezeptor und TRAIL-R1/2 gezeigt werden (Kischkel et al., 1995; Sprick et al., 2000). Am DISC kommt es durch autokatalytische Spaltung zur Aktivierung der Procaspase-8 (Medema et al., 1997). Die aktive Caspase-8 wird in das Zytoplasma entlassen, wo sie entweder weitere Caspase-Zymogene spaltet oder durch Spaltung von Bid die mitochondriale Apoptose einleitet. Aufgrund der Sequenzhomologien innerhalb der „death domain“ wird ein solcher DISC ebenfalls für den TNF-R1 vermutet. Ein direkter Nachweis konnte bisher noch nicht erbracht werden (Wajant, 2003). Micheau und Tschopp konnten 2003 anhand von Immunpräzipitationen eine Interaktion von TRADD, FADD und Caspase-8 demonstrieren. Eine Beteiligung des TNF-R1 konnte dagegen in diesem Komplex nicht nachgewiesen werden. Sie kamen zu dem Schluss, dass es zwei unabhängig voneinander wirkende Signalkomplexe geben müsse. Komplex I besteht aus dem TNF-R1, TRADD, RIP und TRAF2. Dieser Komplex ist verantwortlich für die Aktivierung von NF- κ B. Durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Ubiquitynylierung kommt es zu einer Abspaltung von TRADD und RIP vom TNF-R1. TRADD und RIP binden an FADD und Caspase-8 und bilden den

Komplex II, der für die Apoptose verantwortlich ist. Der direkte Nachweis der DISC-Bildung am TNF-R1 konnte von unserer Arbeitsgruppe erstmals erbracht werden (Schneider-Brachert et al., 2004). In den hier ebenfalls beschriebenen TNF-R1 exprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass die Bildung des DISC und somit die Initiierung der Apoptose von der Internalisierung abhängt.

In dieser Arbeit konnte die Internalisierung des TNF-R1 in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Domänen näher charakterisiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung in einer Aktivierung der Caspasen-9 und -3 resultiert und somit zur Apoptose führt. In Zellen, die den Wildtyp TNF-R1 exprimieren (TNF-R1 Wildtyp), führt die Bindung von TNF an den TNF-R1 zu einer Internalisierung des TNF-TNF-R1 Komplexes (s. Abb. 14). Die Internalisierung unterscheidet sich morphologisch nicht von anderen untersuchten Zellmodellen wie COS-7, NIH3T3 und H1299, die nur den endogenen Rezeptor exprimieren (s. Abb. 1, 18, 24). Nach Behandlung mit TNF kommt es in TNF-R1 Wildtyp Zellen zu einer gesteigerten Aktivität der Caspasen-9 und -3 (s. Abb. 15) und zur Apoptose (Abb. 16). In diesem Zellmodell konnte gezeigt werden, dass es nach Internalisierung des TNF-R1 zur Bildung des DISC kommt (Schneider-Brachert et al., 2004). In isolierten TNF-R1 Fraktionen ließen sich TRADD, FADD und Caspase-8 nachweisen. Die aktive Caspase-8 ist daraufhin in der Lage, direkt Caspase-3 zu aktivieren oder über den intrinsischen Weg Caspase-9 zu aktivieren. Dieses Signalwege konnten auch für andere Todesrezeptoren beschreiben werden (Aggarwal, 2003; Danial et al., 2004).

In TNF-R1 Δ DD Zellen induziert TNF ebenfalls die Internalisierung des TNF-R1 (s. Abb. 14). In TNF behandelten Zellen konnte jedoch keine Aktivierung von Caspasen (s. Abb. 15) und keine vermehrte Apoptose nachgewiesen werden (s. Abb. 16). In TNF-R1 Δ DD Zellen ist die Bildung des DISC inhibiert. Die Inhibition der DISC-Bildung resultiert in diesen Zellen in einer Inhibition der Caspase-Aktivierung. Die Deletion der DD führt aber zu keiner Inhibition der Internalisierung (Schneider-Brachert et al., 2004).

Innerhalb des zytoplasmatischen Teils des TNF-R1 konnte eine 10 Aminosäure lange Domäne (TRID) identifiziert werden, die ein Tyrosin-basiertes Internalisierungsmotiv mit der Sequenz YQRW beinhaltet (Schneider-Brachert et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNF-R1 Δ TRID Zellen den TNF-R1 nach Bindung von TNF nicht internalisieren können (s. Abb. 14). In TNF behandelten TNF-R1 Δ TRID Zellen findet eine geringere Aktivierung von Caspasen (s. Abb. 15) und eine verringerte Apoptose (s. Abb. 16) verglichen mit TNF-R1 Wildtyp Zellen, statt. Aufgrund der Inhibition der Internalisierung wird am TNF-R1 kein DISC gebildet (Schneider-Brachert et al., 2004). Somit ist eine Aktivierung der Caspasen über den DISC in diesen Zellen ausgeschlossen. Die Behandlung von TNF-R1 Δ TRID Zellen führte jedoch zu einer verstärkten Aktivität der N-SMase. Die N-SMase wird über das Protein FAN aktiviert, welches direkt an die NSD des TNF-R1 bindet (Adam-Klages et al., 1996; Adam et al., 1996). Wird der TNF-R1 internalisiert, kommt es vermutlich zur Beendigung der N-SMase Aktivierung. Verbleibt der TNF-R1 jedoch länger an der Plasmamembran, kann es zu einer verlängerten N-SMase Aktivierung und somit zu einer erhöhten Ceramidproduktion kommen. Es handelt sich bei dieser Form von Apoptose möglicherweise um eine Form des DISC-unabhängigen Zelltods, ausgelöst durch die Bildung von Ceramid durch die N-SMase.

Die für die Aktivierung von NF- κ B und somit für die protektive Funktion von TNF notwendigen akzessorischen Proteine RIP und TRAF2 konnten nach Bindung von TNF am TNF-R1 sowohl in TNF-

R1 Wildtyp, als auch in TNF-R1 Δ TRID Zellen identifiziert werden (Schneider-Brachert et al., 2004). Somit ist die NF- κ B induzierende Signalweiterleitung unabhängig von der Internalisierung. Durch Mutation des in der TRID Domäne enthaltenen Internalisierungsmotivs YQRW konnte eine Rezeptormutante erzeugt werden: TNF-R1 YQRA. Wie in dieser Arbeit gezeigt, löst die Bindung von TNF an den TNF-R1 in TNF-R1 YQRA Zellen keine Rezeptorinternalisierung aus (s. Abb. 14). Der Austausch der Aminosäuren Tryptophan gegen Alanin am Ende des Internalisierungsmotivs ist verantwortlich für die Inhibition der Internalisierung. Durch Mutagenese-Studien am Internalisierungsmotiv des Transferrinrezeptors (YXRF) konnten die für die Internalisierung notwendigen Aminosäuren lokalisiert werden. Die Mindestanforderung für eine Internalisierung ist somit: Tyr-X-groß/polar-hydrophob (X: jede AS) (Throwbridge und Collawn, 1993). Die Abfolge dieser Aminosäureeigenschaften ist essentiell, um eine Bindung des Rezeptors an die μ_2 -Untereinheit des AP-2 Komplexes zu gewährleisten. Die Aminosäuresequenz des TNF-R1 YQRW (Tyrosin-Glutamin-Arginin-Tryptophan) entspricht somit genau diesen Mindestanforderungen. Hier scheint jedoch Tryptophan am Ende des Motivs die wesentliche Rolle für die Internalisierung des TNF-R1 zu spielen. In TNF-R1 YQRA Zellen konnte nach Behandlung mit TNF im Vergleich zu den Wildtyp Zellen eine geringere Aktivität der Caspasen-9 und -3 (s. Abb. 15), sowie eine verringerte Apoptose festgestellt werden (s. Abb. 16). Nur nach 8-stündiger Behandlung zeigte sich eine Aktivierbarkeit der Caspasen. Diese erhöhte Caspase-Aktivität könnte wie in TNF-R1 Δ TRID Zellen mit einer vermehrten Ceramidproduktion durch die membranständige N-SMase zusammenhängen.

Die aktive Caspase-8 und die A-SMase sind in internalisierten TNF-R1 Komplexen lokalisiert

In der Arbeit von Schneider-Brachert et al. 2004 konnten wir zeigen, dass es nach Bindung von TNF an den TNF-R1 zur Bildung des DISC am zytoplasmatischen Teil des TNF-R1 kommt. Dabei bindet das 52kD Caspase-8 Zymogen nach Abspaltung des p12 Fragments als 43kD Isoform an FADD. Das p12 Fragment wird sofort in ein p10 Fragment konvertiert. Von der nun rezeptorgebundenen 43kD Isoform spaltet sich das p18 Fragment ab und bildet mit dem p10 Fragment ein aktives Heterodimer. Am Rezeptor verbleibt das p26 Fragment (Lavrik et al., 2003). Bisher konnte gezeigt werden, dass sich die 43kD und die 26kD Isoformen der Caspase-8, sowie zu einem sehr geringen Teil auch das p18 Fragment in internalisierten TNF-R1 Komplexen befinden (Schneider-Brachert et al., 2004). Micheau und Tschopp gingen bisher davon aus, dass der DISC zwar intrazellulär, aber unabhängig vom TNF-R1 gebildet wird (Micheau und Tschopp, 2003). Sie postulierten, dass nach Bindung von TNF an den TNF-R1 der intrazelluläre Teil des Rezeptors abgespalten wird und intrazellulär mit FADD und Caspase-8 interagiert und somit den DISC bildet.

Mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie sowie Untersuchungen an isolierten TNF-R1 Fraktionen kann nun gezeigt werden, dass sich das aktive p18 Fragment der Caspase-8 in TNF-R1 Fraktionen befindet (s. Abb. 10) bzw. mit TNF-R1 Komplexen kolokalisiert (s. Abb. 9). Das aktive p18 Fragment liegt im Zytoplasma nicht diffus sondern granulär verteilt vor (s. Abb. 9). Nach 45 und 60 Minuten ist eine Kolokalisation zwischen internalisierten TNF-R1 Komplexen und der aktiven Caspase-8 zu beobachten. Aufgrund des Zeitpunktes ist zu vermuten, dass die Kolokalisationen in späten Endosomen bzw. Lysosomen stattfinden. In isolierten TNF-R1 Fraktionen konnte weiterhin die Proform der A-SMase nachgewiesen werden (s. Abb. 10). Die Abnahme der Proform korreliert mit

dem Auftauchen der aktiven Caspase-8 in den TNF-R1 Fraktionen (s. Abb. 10). Dies spricht für eine Aktivierung der A-SMase durch die Caspase-8 nach 30 Minuten. Diese Vermutung wird unterstützt durch die frühere Beobachtung, dass eine Behandlung mit TNF in FADD-defizienten Fibroblasten zu keiner Aktivierung der A-SMase führte (Wiegmann et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Caspase-8 in einer reduzierten Aktivität der A-SMase resultierte (Schwandner et al., 1998). Wie hier gezeigt, findet in isolierten TNF-R1 Fraktionen nach 30 Minuten eine deutliche Zunahme der aktiven Form von CatD statt, und es kommt nach 60 Minuten zu einer Spaltung von Bid (s. Abb. 12). Es ist zu vermuten, dass die Lokalisation von aktiver Caspase-8 an demselben Kompartiment zu einer Aktivierung der A-SMase führt, welche daraufhin über die Bildung von Ceramid CatD aktiviert. CatD induziert anschließend die Spaltung von Bid und führt somit zu einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs. Somit ergeben sich für die aktive Caspase-8 zwei unterschiedliche Wege. Zum einen kann die aktive Caspase-8 kurz nach erfolgter Internalisierung in das Zytoplasma entlassen werden, wo sie die Spaltung von Caspase-3 induziert. Zum anderen kann die aktive Caspase-8 mit dem TNF-R1 Komplex in späten Endosomen kolokalisieren, wo sie die A-SMase aktiviert und über CatD und Bid die mitochondriale Apoptose induziert (s. Schema 5). Diese Hypothese wird durch den Befund unterstützt, dass in TNF-R1 Δ DD und TNF-R1 Δ TRID Zellen keine Aktivierung der A-SMase stattfindet (Schneider-Brachert et al., 2004). Wahrscheinlich ist, dass beide Wege parallel stattfinden. Somit konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zum Modell von Micheau und Tschopp die Bildung des DISC am TNF-R1 geschieht. Nach der Internalisierung des TNF-R1 wird die aktive Caspase-8 entweder ins Zytoplasma entlassen oder kolokalisiert später mit dem TNF-R1 in vermutlich späten Endosomen.

Um die physiologische Bedeutung der TNF-R1 Internalisierung für die Biologie von TNF zu überprüfen, wurde im Folgenden der Mechanismus der Apoptose-Resistenz von Adenovirus- E3-14.7K-Protein transduzierten Zellen untersucht.

Die Expression von Ad E3-14.7K verhindert die TNF-R1 Internalisierung und die TNF-induzierte Apoptose

Viren konnten im Laufe der Evolution diverse Möglichkeiten entwickeln, sich dem Immunsystem des von ihnen infizierten Organismus zu entziehen. Eine Möglichkeit des „Immunescape“ besteht in der Entfernung immunregulatorischer Rezeptoren von der Plasmamembran der infizierten Zelle, eine andere Möglichkeit ist die Inhibition der Apoptose in infizierten Zellen. Adenoviren exprimieren kurz nach Infektion einer Wirtszelle diverse Proteine, die diesen Immunescapemechanismus vermitteln. Sieben dieser Proteine sind in der E3 Region des Adenovirusgenoms codiert und vermitteln vor allem die Herabregulation und die Inhibition der Signalübertragung der Todesrezeptoren Fas, TRAIL-R1 und 2 und TNF-R1.

Das adenovirale Protein Ad E3-14.7K inhibiert nach Expression in verschiedenen Zellmodellen die durch Fas und TNF-induzierte Apoptose (Chen et al., 1998; Li et al., 1998). Des Weiteren interagiert Ad E3-14.7K mit der DED der Caspase-8, induziert jedoch keine Hemmung der Caspase-8 Aktivität (Chen et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Ad E3-14.7K auf die Internalisierung und den intrazellulären Transport des TNF-R1 in murinen und humanen Fibroblasten näher untersucht. Die Bindung von TNF

an den TNF-R1 in murinen NIH3T3 Zellen führt zu dessen Internalisierung (s. Abb. 18). Dabei ist kein Unterschied zu den bisher untersuchten Zelllinien COS-7 und TNF-R1 Wildtyp zu beobachten. NIH3T3 Fibroblasten exprimieren beide murine TNF-Rezeptoren. Humanes TNF- α bindet spezifisch an den murinen TNF-R1, nicht an den TNF-R2. Somit kann ein möglicher regulatorischer Effekt seitens des TNF-R2 in diesen Zellen ausgeschlossen werden. Die humane Zelllinie H1299 exprimiert beide TNF-Rezeptoren. In H1299 Zellen führt die Bindung von TNF an den TNF-R1 ebenfalls zur Internalisierung des TNF-R1 (s. Abb. 24). Die Internalisierung verläuft in H1299 Zellen deutlich langsamer, als in den NIH3T3 Zellen. Die Behandlung mit TNF bzw. TNF/CHX induziert sowohl in NIH3T3 als auch in H1299 Zellen eine verstärkte Aktivität von Caspasen (s. Abb. 19, 20, 25) und führt daraufhin zur Apoptose (s. Abb. 21, 26). Anhand isolierter TNF-R1 Fraktionen konnte gezeigt werden, dass sowohl in NIH3T3, als auch in H1299 Zellen nach TNF-Behandlung der DISC am TNF-R1 gebildet wird (s. Abb. 23, 26). Die Aktivierung der Caspase-8 führt daraufhin zur Aktivierung der Caspasen-3 und -9 und somit zur Apoptose. Eine Expression des Leervektors pQCXIP hatte in NIH3T3 und H1299 Zellen keinen Einfluss auf die Internalisierung des TNF-R1 sowie auf die Aktivierung von Caspasen und die Initiierung der Apoptose (s. Abb. 18-21, 24-26). In H1299 LV Zellen konnte nach TNF-Behandlung der DISC am TNF-R1 nachgewiesen werden (s. Abb. 27).

Die Expression von Ad-E3 14.7K führt in NIH3T3 als auch in H1299 Zellen zu einer Inhibition der TNF-R1 Internalisierung (s. Abb. 18, 24). Anhand magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen konnte die Ursache des Internalisierungsdefekts in Ad E3-14.7K exprimierenden Zellen geklärt werden (s. Abb. 22). Es zeigte sich, dass die zur Internalisierung notwendigen Proteine Dynamin II und Rab5 in Ad E3-14.7K exprimierenden Zellen nicht in den TNF-R1 Fraktionen zu finden sind. Während der Clathrin-abhängigen Endozytose ist Dynamin II für die Abspaltung eines Vesikels von der Plasmamembran notwendig. Fehlt dieses wichtige Enzym, kommt es zwar zur Bildung von „clathrin coated pits“ und zur Einstülpung von Membranen, diese können sich jedoch nicht von der Plasmamembran abspalten. Dynamin II bindet über das Adaptermolekül Amphiphysin an den Adapterkomplex AP-2 (Wigge et al., 1997). Die Bindung von AP-2 an den TNF-R1 ist jedoch in Ad E3-14.7K exprimierenden Zellen nicht gestört (s. Abb. 22). So ist möglicherweise eine nicht funktionierende Rekrutierung von Amphiphysin ein Grund für die inhibierte Anlagerung von Dynamin II an den Rezeptorkomplex. Rab5 ist im Endozytoseprozess für die Fusion neuer Vesikel mit frühen Endosomen verantwortlich (Gruenberg, 2001). In NIH3T3 Zellen wurde zusätzlich eine Punktmutation des Ad E3-14.7K Proteins exprimiert (Ad E3-PM14.7K), bei der an Position 119 des Ad E3-14.7K Proteins ein Basenaustausch von Cystein zu Serin vorgenommen wurde. In TNF-Zytotoxizitätsuntersuchungen führte die Behandlung von Ad E3-PM14.7K exprimierenden Zellen mit TNF zu deren Lyse (Ranheim et al., 1993). In Ad E3-PM14.7K exprimierenden Zellen befindet sich Rab5 in isolierten TNF-R1 Fraktionen, in Ad E3-14.7K exprimierenden Zellen fehlt Rab5 jedoch völlig (s. Abb. 22). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es in Ad E3-14.7K exprimierenden Zellen nicht zu einer Abschnürung von „clathrin coated vesicles“ kommt.

Der molekulare Mechanismus der Interaktion des Ad E3-14.7K Proteins mit der TNF-R1 Internalisierung bleibt jedoch weiterhin unklar. Es konnte nicht gezeigt werden, ob eine direkte Interaktion des Ad E3-14.7K Proteins mit Proteinen der TNF-R1 Internalisierung vorliegt, oder ob der Mechanismus der Internalisierungsinhibition auf einer indirekten Interaktion beruht. Chen et al. 1998

konnten zeigen, dass das Ad E3-14.7K Protein mit der DED der Caspase-8 interagiert, dort aber zu keiner Inhibition der Caspase-8 Aktivität führt. Die Expression des Ad E3-14.7K Proteins resultiert weiterhin in einer Inhibition der Translokation der cPLA₂ („cytosolic phospholipase A₂“) an die Plasmamembran nach TNF-Behandlung (Krajcsi et al., 1996). Bisher konnten 3 Proteine nachgewiesen werden, die direkte Bindungspartner von E3-14.7K sind: FIP-1, FIP-2, und FIP-3 (Li et al., 1997, 1998, 1999). FIP-3 (IKK γ /NEMO) bindet an die für die NF- κ B-Aktivierung essentiellen Kinasen RIP und NIK und inhibiert somit das NF κ B Transkriptionssignal. Die Funktion von FIP-2 dagegen ist noch weitgehend ungeklärt. FIP-1 ist ein Protein mit Ras und ARF Homologien. Es bindet über eine GTPase Bindungsdomäne an Ad E3-14.7K und kolokalisiert mit Ad E3-14.7K am Golgi-Apparat und an der Plasmamembran. FIP-1 wiederum bindet an GIP-1 („GTPase interacting protein-1“), eine Komponente der leichten Untereinheit von Dynein (Lukashok et al., 2000). FIP-1 bindet dabei gleichzeitig Ad E3-14.7K und GIP-1 und bildet somit einen Komplex aus diesen drei Proteinen. Obwohl die Interaktion von Ad E3-14.7K mit Dynein keinen direkten Einfluss auf die Internalisierung des TNF-R1 zu haben scheint, so ist es doch vorstellbar, dass es weitere, bisher unentdeckte Interaktionspartner von Ad E3-14.7K gibt, die in ähnlicher Weise funktionieren.

Ad E3-PM14.7K exprimierende NIH3T3 Kontrollzellen zeigen nach Bindung von TNF eine Internalisierung des TNF-R1 (s. Abb. 18). In isolierten TNF-R1 Fraktionen konnten Dynamin II und Rab5 nachgewiesen werden (s. Abb. 22). Ebenso führte die Behandlung mit TNF zur Bildung des DISC am TNF-R1 (s. Abb. 23). TNF behandelte NIH3T3 Ad E3-PM14.7K exprimierende Zellen zeigten eine Aktivierung von Caspasen und eine verstärkte Apoptose (Abb. 19, 20, 21). Die Expression eines nicht funktionalen Ad E3-14.7K Proteins interagiert weder mit der TNF-Internalisierung, noch mit der DISC-Bildung und somit der Aktivierung von Caspasen und der Apoptose.

Trotz blockierter Internalisierung konnten in TNF-R1 Fraktionen von NIH3T3 und H1299 Zellen RIP-1 und TRAF-2 nachgewiesen werden. Somit lässt sich auch in adenoviral infizierten Zellen eine Zweiteilung der TNF-R1 Signalweiterleitung feststellen. Wie in den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Internalisierung von den zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 mittels genetisch veränderten TNF-R1 bereits gezeigt werden konnte, werden vom TNF-R1 pro- und antiapoptotische Signale unterschiedlich initiiert. Die Bindung von RIP-1 und TRAF-2 an den TNF-R1 ist allerdings unabhängig von der Internalisierung des Rezeptors. Dies zeigt, dass die Struktur der DD intakt ist, und selektiv nur die DISC-Proteine in Abhängigkeit von der TNF-R1 Internalisierung rekrutiert werden. In internalisierungsdefizienten Zelllinien wie TNF-R1 Δ TRID, TNF-R1 YQRA, NIH3T3 Ad E3-14.7K und H1299 Ad E3-14.7K kann das Signal zur Aktivierung von NF- κ B initiiert werden, die Apoptose ist jedoch abhängig von der Internalisierung des TNF-R1. In den internalisierungsdefizienten Zellen konnte entweder eine verringerte Aktivierung von Caspasen oder eine Verringerung der Apoptose festgestellt werden.

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen zum Mechanismus der TNF-Resistenz Ad E3-14.7K transduzierter Zellen die physiologische Bedeutung der TNF-R1 Internalisierung, wie sie im ersten Teil der Arbeit beschrieben ist.

5. Ausblick

In dieser Arbeit konnten sowohl die Internalisierung des TNF-Rezeptors 1, als auch einige an der Internalisierung beteiligte Proteine näher charakterisiert werden. Durch die weiterführende Untersuchung magnetisch isolierter TNF-R1 Fraktionen könnte ein noch genaueres Bild der frühen TNF-R1 Internalisierung entstehen. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und Proteom-Analyse könnten weitere, an der Clathrin-vermittelten Internalisierung beteiligte Proteine identifiziert werden, die für die Regulation der TNF-R1 Endozytose verantwortlich sind. In Ad E3-14.7K transduzierten Zellen könnte mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und magnetisch isolierten TNF-R1 Fraktionen geklärt werden, welche Faktoren die Anlagerung von Dynamin II an den TNF-R1 verhindern. An der Clathrin-vermittelten Endozytose ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, die den Endozytoseprozess regulieren. Durch Expression mutierter Proteine, wie z.B. Adaptin-alpha, Dynamin II, Rab5 oder Vti1b könnte geklärt werden, ab welchem Punkt die Apoptose nicht mehr inhibierbar ist, bzw. ab welchem Zeitpunkt die DISC-Bildung abgeschlossen ist. Weiterhin könnte geklärt werden, ob der intrazelluläre Transport des TNF-R1 an bestimmten Punkten selektiv blockiert werden kann, und ob ein blockierter Transport eine Auswirkung auf die Signalweiterleitung zur Apoptose besitzt. Auch der Mechanismus der TNF- und Ceramid-induzierten Freisetzung von Cathepsin D aus den Endosomen bzw. Lysosomen ist noch nicht eindeutig geklärt und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten die Internalisierung und der intrazelluläre Transportprozess des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors 1 (TNF-R1) näher charakterisiert werden. Die Internalisierung des TNF-R1 ist essentiell für die Einleitung intrazellulärer apoptotischer Signale. Nach Bindung des Liganden TNF- α (TNF) wird der TNF-R1 über „clathrin coated pits“ und Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert und gelangt zunächst in frühe Endosomen. In frühen Endosomen kommt es zum Zusammentreffen des TNF-R1 mit den Proformen von Cathepsin D (CatD) und der sauren Sphingomyelinase (A-SMase). Von dort wird der TNF-R1 zunächst weiter zu späten Endosomen und anschließend zu Lysosomen transportiert. Dieser intrazelluläre Transport des TNF-R1 ist essentiell für die Initiierung der mitochondrialen Apoptose. An späten Endosomen kommt es zu einer Kolo-kalisation der aktiven Caspase-8 mit internalisierten TNF-R1 Komplexen. Die Proform der A-SMase wird gespalten und aktive A-SMase generiert, woraufhin nachfolgend CatD aktiviert wird. Damit verbunden ist eine Spaltung von endosomal lokalisiertem Bid.

Die Internalisierung und die damit verbundene Initiierung apoptotischer Signalwege ist von distinkten zytoplasmatischen Domänen des TNF-R1 abhängig. Eine Deletion der „death domain“ im TNF-R1 (TNF-R1 Δ DD) führt zu einer völligen Inhibition der Caspaseaktivierung und somit zu einer Blockierung der Apoptose. Eine Deletion der Internalisierungsdomäne (TNF-R1 Δ TRID) oder eine Mutation des Tyrosin-basierten Internalisierungsmotivs (TNF-R1 YQRA) führt dazu, dass die Internalisierung des TNF-R1 unterbunden wird. In diesen Zellen kann eine verringerte Caspase-Aktivierung und eine verringerte Apoptose festgestellt werden.

Die physiologische Relevanz der TNF-R1 Internalisierung kann in Zellen gezeigt werden, die das adenovirale Protein Ad E3-14.7K exprimieren. In diesen Zellen ist die Internalisierung des TNF-R1 vollständig blockiert. Durch die Inhibition der Internalisierung wird in diesen Zellen der DISC nicht gebildet, was dazu führt, dass Ad E3-14.7K exprimierende Zellen nach Behandlung mit TNF nicht durch Apoptose versterben. Der Grund für die Internalisierungsdefizienz ist das Fehlen der für die Endozytose essentiellen Proteine Dynamin II und Rab5 am TNF-R1. Die Inhibition der TNF-R1 Internalisierung und die damit verbundene Resistenz gegenüber TNF stellen einen neuen Mechanismus des viralen „Immunesca-*pes*“ dar.

Summary

This study describes the internalization and intracellular trafficking of the TNF receptor 1 (TNF-R1). Internalization of the TNF-R1 is essential for initiation of intracellular apoptotic signals. After binding of the ligand TNF- α (TNF), the TNF-R1 is internalized in clathrin coated pits by clathrin dependent endocytosis and is transported to early endosomes, late endosomes and lysosomes. The early endosome is the point of fusion between the TNF-R1 and the proforms of cathepsin D (CatD) and acidic sphingomyelinase (A-SMase). The intracellular transport of the TNF-R1 is essential for initiation of mitochondrial apoptosis. Active caspase-8 colocalizes with the TNF-R1 in late endosomes. The proform of A-SMase is cleaved and active A-SMase is generated, which subsequently leads to an activation of CatD. This results in the cleavage and activation of endosomal localized bid.

Internalization and initiation of apoptosis depend on distinct intracellular domains of the TNF-R1. Deletion of the death domain (TNF-R1 Δ DD) results in inhibition of caspase activation and apoptosis. Deletion of the internalization domain (TNF-R1 Δ TRID) or mutation of the tyrosine-based internalization motif (TNF-R1 YQRA) results in inhibition of TNF-R1 internalization. These cells show reduced caspase activation and reduced apoptosis.

The physiological relevance of TNF-R1 internalization is demonstrated in adenoviral Ad E3-14.7K protein expressing cells. In these cells, internalization of the TNF-R1 is totally blocked. Due to the inhibition of receptor internalization, the DISC is not formed at the TNF-R1 and these cells do not die due to apoptosis. The reason for this internalization deficiency lies in the absence of Dynamin II and Rab5 from the TNF-R1 membrane complexes. These are essential proteins needed for internalization. Inhibition of TNF-R1 internalization resulting in resistance to TNF mediated apoptosis represents a novel mechanism of viral immune escape.

7. Literaturverzeichnis

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., & Krönke, M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell* **86**, 937-947.

Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A., & Krönke, M. (1996). A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *J.Biol.Chem.* **271**, 14617-14622.

Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., & Harkins, R. N. (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.

Antonin, W., Holroyd, C., Fasshauer, D., Pabst, S., von Mollard, G. F., & Jahn, R. (2000). A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J.* **19**, 6453-6464.

Baass, P. C., Di Guglielmo, G. M., Authier, F., Posner, B. I., & Bergeron, J. J. (1995). Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol.* **5**, 465-470.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., & Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445.

Barde, Y. A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* **2**, 1525-1534.

Benedict, C. A. & Ware, C. F. (2001). Virus targeting of the tumor necrosis factor superfamily. *Virology* **289**, 1-5.

Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., & Scheller, R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839-841.

Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu.Rev.Biochem.* **72**, 395-447.

- Brunk, U. T., Dalen, H., Roberg, K., & Hellquist, H. B. (1997). Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radic.Biol.Med.* **23**, 616-626.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death.Differ.* **8**, 569-581.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., & Cohen, G. M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J.Biol.Chem.* **274**, 22686-22692.
- Canfield, W. M., Johnson, K. F., Ye, R. D., Gregory, W., & Kornfeld, S. (1991). Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J.Biol.Chem.* **266**, 5682-5688.
- Chan, F. K. (2000). The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann.Rheum.Dis.* **59 Suppl 1**, i50-i53.
- Chen, P., Tian, J., Kovsdi, I., & Bruder, J. T. (1998). Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **273**, 5815-5820.
- Chen, Y. A. & Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 98-106.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Cifone, M. G., Roncaioli, P., De Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G., & Testi, R. (1995). Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J.* **14**, 5859-5868.
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**, 523-535.
- Cuervo, A. M. & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**, 501-503.
- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.

- Deiss, L. P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., & Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* **15**, 3861-3870.
- Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2001). Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol.Life Sci.* **58**, 356-370.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., & Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J.Cell Biol.* **144**, 891-901.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M., & Krammer, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438-441.
- Di Guglielmo, G. M., Baass, P. C., Ou, W. J., Posner, B. I., & Bergeron, J. J. (1994). Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J.* **13**, 4269-4277.
- Earnshaw, W. C. (1999). Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* **397**, 387, 389.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 15781-15786.
- Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., & Puck, J. M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946.
- Funato, K., Beron, W., Yang, C. Z., Mukhopadhyay, A., & Stahl, P. D. (1997). Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 16147-16151.
- Fusek, M. & Vetvicka, V. (2005). Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.* **149**, 43-50.
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J., & Hopkins, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J.Cell Biol.* **132**, 1011-1023.
- Ganley, I. G., Carroll, K., Bittova, L., & Pfeffer, S. (2004). Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol.Biol.Cell* **15**, 5420-5430.

Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., & . (1994). Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* **370**, 555-557.

Ghosh, P., Dahms, N. M., & Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 202-212.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.

Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W., & Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu.Rev.Cell Biol.* **1**, 1-39.

Gooding, L. R., Elmore, L. W., Tollefson, A. E., Brady, H. A., & Wold, W. S. (1988). A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**, 341-346.

Gooding, L. R., Sofola, I. O., Tollefson, A. E., Duerksen-Hughes, P., & Wold, W. S. (1990). The adenovirus E3-14.7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytolysis. *J.Immunol.* **145**, 3080-3086.

Gooding, L. R., Ranheim, T. S., Tollefson, A. E., Aquino, L., Duerksen-Hughes, P., Horton, T. M., & Wold, W. S. (1991). The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J.Virol.* **65**, 4114-4123.

Green, D. R. & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., & Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 570-575.

Griffiths, G., Matteoni, R., Back, R., & Hoflack, B. (1990). Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells. *J.Cell Sci.* **95 (Pt 3)**, 441-461.

Griffiths, G. M. (1996). Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. *Trends Cell Biol.* **6**, 329-332.

Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E., & Gross, A. (2002). tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J.Biol.Chem.* **277**, 12237-12245.

Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Millman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J.Biol.Chem.* **274**, 1156-1163.

Gruenberg, J., Griffiths, G., & Howell, K. E. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J.Cell Biol.* **108**, 1301-1316.

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 721-730.

Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J.Clin.Invest* **106**, 1127-1137.

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

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

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.

Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.

Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., & Sasada, M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* **187**, 587-600.

Hirst, J., Futter, C. E., & Hopkins, C. R. (1998). The kinetics of mannose 6-phosphate receptor trafficking in the endocytic pathway in HEp-2 cells: the receptor enters and rapidly leaves multivesicular endosomes without accumulating in a prelysosomal compartment. *Mol.Biol.Cell* **9**, 809-816.

Hock, H., Dorsch, M., Kunzendorf, U., Qin, Z., Diamantstein, T., & Blankenstein, T. (1993). Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 2774-2778.

Horton, T. M., Ranheim, T. S., Aquino, L., Kusher, D. I., Saha, S. K., Ware, C. F., Wold, W. S., & Gooding, L. R. (1991). Adenovirus E3 14.7K protein functions in the absence of other adenovirus proteins to protect transfected cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Virol.* **65**, 2629-2639.

Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W., & Ellis, H. M. (1983). Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **48 Pt 2**, 453-463.

Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.

Hu, F. Q., Smith, C. A., & Pickup, D. J. (1994). Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* **204**, 343-356.

Isahara, K., Ohsawa, Y., Kanamori, S., Shibata, M., Waguri, S., Sato, N., Gotow, T., Watanabe, T., Momoi, T., Urase, K., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (1999). Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience* **91**, 233-249.

Jäättelä, M., Cande, C., & Kroemer, G. (2004). Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ.* **11**, 135-136.

Jacobson, M. D., Weil, M., & Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., & Todaro, G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* **4**, 549-553.

Johansson, A. C., Steen, H., Öllinger, K., & Roberg, K. (2003). Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ.* **10**, 1253-1259.

Johnson, D. E. (2000). Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* **14**, 1695-1703.

Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I., & Brunk, U. T. (2001). Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem.J.* **359**, 335-343.

Kagedal, K., Johansson, A. C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N. S., Jurgensmeier, J. M., & Öllinger, K. (2005). Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax? *Int.J.Exp.Pathol.* **86**, 309-321.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* **26**, 239-257.

- Kim, T. H., Zhao, Y., Barber, M. J., Kuharsky, D. K., & Yin, X. M. (2000). Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J.Biol.Chem.* **275**, 39474-39481.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579-5588.
- Kornfeld, S. (1986). Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J.Clin.Invest* **77**, 1-6.
- Krajcsi, P., Dimitrov, T., Hermiston, T. W., Tollefson, A. E., Ranheim, T. S., Vande Pol, S. B., Stephenson, A. H., & Wold, W. S. (1996). The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J.Virol.* **70**, 4904-4913.
- Krammer, PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795
- Kreykenbohm, V., Wenzel, D., Antonin, W., Atlachkine, V., & von Mollard, G. F. (2002). The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur.J.Cell Biol.* **81**, 273-280.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., & Kirchhoff, S. (2003). The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death.Differ.* **10**, 144-145.
- Lawrence, B. P. & Brown, W. J. (1992). Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J.Cell Sci.* **102 (Pt 3)**, 515-526.
- Le Borgne, R. & Hoflack, B. (1998). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta* **1404**, 195-209.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li, W., Yuan, X. M., Olsson, A. G., & Brunk, U. T. (1998). Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **18**, 177-184.

- Li, Y., Kang, J., & Horwitz, M. S. (1997). Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *J. Virol.* **71**, 1576-1582.
- Li, Y., Kang, J., & Horwitz, M. S. (1998). Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1601-1610.
- Li, Y., Kang, J., Friedman, J., Tarassishin, L., Ye, J., Kovalenko, A., Wallach, D., & Horwitz, M. S. (1999). Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 1042-1047.
- Liu, P. & Anderson, R. G. (1995). Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **270**, 27179-27185.
- Ludwig, T., Griffiths, G., & Hoflack, B. (1991). Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. *J. Cell Biol.* **115**, 1561-1572.
- Lukashok, S. A., Tarassishin, L., Li, Y., & Horwitz, M. S. (2000). An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase. *J. Virol.* **74**, 4705-4709.
- Luzio, J. P., Mullock, B. M., Pryor, P. R., Lindsay, M. R., James, D. E., & Piper, R. C. (2001). Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 476-480.
- Marsh, M. & McMahon, H. T. (1999). The structural era of endocytosis. *Science* **285**, 215-220.
- Matteoni, R. & Kreis, T. E. (1987). Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* **105**, 1253-1265.
- Matter, K., Yamamoto, E. M., & Mellman, I. (1994). Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **126**, 991-1004.
- Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121-132.
- McCaffrey, M. W., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., Drummond, F., & Bucci, C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett.* **495**, 21-30.
- McPherson, P. S., Kay, B. K., & Hussain, N. K. (2001). Signaling on the endocytic pathway. *Traffic*. **2**, 375-384.

- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* **16**, 2794-2804.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **12**, 575-625.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., & Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol.Cell Biol.* **21**, 5299-5305.
- Micheau, O. & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181-190.
- Miller, K., Beardmore, J., Kanety, H., Schlessinger, J., & Hopkins, C. R. (1986). Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. *J.Cell Biol.* **102**, 500-509.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D., & . (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**, 171-180.
- Mosselmans, R., Hepburn, A., Dumont, J. E., Fiers, W., & Galand, P. (1988). Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L-929 cells. *J.Immunol.* **141**, 3096-3100.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., & Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J.Biol.Chem.* **273**, 2926-2930.
- Naismith, J. H. & Sprang, S. R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 74-79.
- Nakatsu, F. & Ohno, H. (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct.Funct.* **28**, 419-429.
- Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 299-306.
- Nilsson, E., Ghassemifar, R., & Brunk, U. T. (1997). Lysosomal heterogeneity between and within cells with respect to resistance against oxidative stress. *Histochem.J.* **29**, 857-865.

- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., & Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-1875.
- Oksvold, M. P., Skarpen, E., Wierod, L., Paulsen, R. E., & Huitfeldt, H. S. (2001). Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *Eur.J.Cell Biol.* **80**, 285-294.
- Old, L. J. (1988). Tumor necrosis factor. *Sci.Am.* **258**, 59-75.
- Öllinger, K. & Brunk, U. T. (1995). Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic.Biol.Med.* **19**, 565-574.
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* **14**, 453-501.
- Osmond, D. G. (1993). The turnover of B-cell populations. *Immunol.Today* **14**, 34-37.
- Peter, M. E., Heufelder, A. E., & Hengartner, M. O. (1997). Advances in apoptosis research. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 12736-12737.
- Peter, M. E. & Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr.Opin.Immunol.* **10**, 545-551.
- Peter, M. E. & Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death.Differ.* **10**, 26-35.
- Pfeffer, S. & Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 886-896.
- Piper, R. C. & Luzio, J. P. (2001). Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic.* **2**, 612-621.
- Press, B., Feng, Y., Hoflack, B., & Wandinger-Ness, A. (1998). Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J.Cell Biol.* **140**, 1075-1089.
- Ranheim, T. S., Shisler, J., Horton, T. M., Wold, L. J., Gooding, L. R., & Wold, W. S. (1993). Characterization of mutants within the gene for the adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which prevents cytolysis by tumor necrosis factor. *J.Virol.* **67**, 2159-2167.

Reiners, J. J., Jr., Caruso, J. A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X. M., & Kessel, D. (2002). Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death.Differ.* **9**, 934-944.

Roberg, K. & Öllinger, 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.

Roberg, K., Johansson, U., & Öllinger, K. (1999). Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.* **27**, 1228-1237.

Roberg, K., Kagedal, K., & Öllinger, K. (2002). Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am.J.Pathol.* **161**, 89-96.

Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., & Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., & Becker, J. W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat.Struct.Biol.* **3**, 619-625.

Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D., & Menzel, D. (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol* **135**, 1150-1161.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.

Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J.Exp.Med.* **97**, 695-710.

Schlossman, D. M., Schmid, S. L., Braell, W. A., & Rothman, J. E. (1984). An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J.Cell Biol.* **99**, 723-733.

Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu.Rev.Biochem.* **66**, 511-548.

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., & Schütze, S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*, **21**, 415-428.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur.J.Biochem.* **254**, 439-459.

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

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

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

Shibata, M., Kanamori, S., Isahara, K., Ohsawa, Y., Konishi, A., Kametaka, S., Watanabe, T., Ebisu, S., Ishido, K., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (1998). Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **251**, 199-203.

Shisler, J., Yang, C., Walter, B., Ware, C. F., & Gooding, L. R. (1997). The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J.Virol.* **71**, 8299-8306.

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J., & Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.* **2**, 3-12.

Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., & Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498.

Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., & Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J.Cell Biol.* **144**, 281-292.

Smith, C. A., Hu, F. Q., Smith, T. D., Richards, C. L., Smolak, P., Goodwin, R. G., & Pickup, D. J. (1996). Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* **223**, 132-147.

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418.

Sorkin, A., Krolenko, S., Kudrjavniceva, N., Lazebnik, J., Teslenko, L., Soderquist, A. M., & Nikolsky, N. (1991). Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways. *J.Cell Biol.* **112**, 55-63.

Sorkin, A., Eriksson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., & Claesson-Welsh, L. (1993). Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization. *J.Cell Physiol* **156**, 373-382.

Sorkin, A. (2001). Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling. *Biochem.Soc.Trans.* **29**, 480-484.

Sorkin, A. D., Teslenko, L. V., & Nikolsky, N. N. (1988). The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complex dissociation. *Exp.Cell Res.* **175**, 192-205.

Spiegel, S. & Merrill, A. H., Jr. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* **10**, 1388-1397.

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., & Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* **12**, 599-609.

Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J. C., Yin, X. M., Turk, V., & Salvesen, G. S. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J.Biol.Chem.* **276**, 3149-3157.

Storrie, B. & Desjardins, M. (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* **18**, 895-903.

Sugarman, B. J., Lewis, G. D., Eessalu, T. E., Aggarwal, B. B., & Shepard, H. M. (1987). Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factors. *Cancer Res.* **47**, 780-786.

Sun, X. M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B. B., Green, D. R., & Cohen, G. M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **274**, 5053-5060.

Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208.

- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., & Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., & . (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774.
- Thornberry, N. A. (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br.Med.Bull.* **53**, 478-490.
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Tsuruhara, T., Koenig, J. H., & Ikeda, K. (1990). Synchronized endocytosis studied in the oocyte of a temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **259**, 199-207.
- Vancompernelle, K., Van Herreweghe, F., Pynaert, G., Van de, C. M., De Vos, K., Totty, N., Sterling, A., Fiers, W., Vandenaabeele, P., & Grooten, J. (1998). Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* **438**, 150-158.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklung der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). Solothurn. Jent und Gassmann. 130
- von Figura, K. & Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu.Rev.Biochem.* **55**, 167-193.
- Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J. F., & Hoflack, B. (2003). Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol.Biol.Cell* **14**, 142-155.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* **10**, 45-65.
- Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferez, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., & . (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-352.
- Watanabe, N., Kuriyama, H., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N., Maeda, M., & Niitsu, Y. (1988). Continuous internalization of tumor necrosis factor receptors in a human myosarcoma cell line. *J.Biol.Chem.* **263**, 10262-10266.
- Wiegmann, K., Schütze, S., Machleidt, T., Witte, D., & Krönke, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* **78**, 1005-1015.

- Wiegmann, K., Schwandner, R., Krut, O., Yeh, W. C., Mak, T. W., & Krönke, M. (1999). Requirement of FADD for tumor necrosis factor-induced activation of acid sphingomyelinase. *J.Biol.Chem.* **274**, 5267-5270.
- Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P., & McMahon, H. T. (1997). Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol.Biol.Cell* **8**, 2003-2015.
- Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., & . (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275.
- Wu, G. S., Saftig, P., Peters, C., & El Deiry, W. S. (1998). Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene* **16**, 2177-2183.
- Yamashiro, D. J., Tycko, B., Fluss, S. R., & Maxfield, F. R. (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**, 789-800.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., & Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**, 886-891.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & 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.
- Yuan, X. M., Li, W., Dalen, H., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., & Brunk, U. T. (2002). Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 6286-6291.
- Zapf-Colby, A. & Olefsky, J. M. (1998). Nerve growth factor processing and trafficking events following TrkA-mediated endocytosis. *Endocrinology* **139**, 3232-3240.
- Zerial, M. & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 107-117.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.

Publikationen

Heinrich, M., Neumeyer, J., **Jakob, M.**, Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A. & Schütze, S. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation* **11(5)**, 550-563

Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., **Jakob, M.**, Winoto-Morbach, S., Heldt-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D. & Schütze, S. (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* **21(3)**, 415-428

Abstracts

Jakob, M., Neumeyer, J., Heinrich, M., Wickel, M., Trauzold, A., Hethke, A. & Schütze, S. (2002). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 activation. 6th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS).

Jakob, M., Tchikov, V., Neumeyer, J. & Schütze, S. (2004). Charakterisierung der TNF-Rezeptor-internalisierung und des intrazellulären Traffickings von TNF-Rezeptosomen. 27. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen.

Jakob, M., Tchikov, V., Neumeyer, J., Hallas, C., Schneider-Brachert, W., & Schütze, S. (2005). Characterisation of TNF receptor internalisation and intracellular trafficking of TNF receptors. *European Journal of Cell Biology* **84** Suppl.55, 114

Jakob, M., Tchikov, V., Neumeyer, J., Hallas, C., Schneider-Brachert, W., & Schütze, S. (2005). Characterisation of TNF receptor internalisation and intracellular trafficking of TNF receptors. *Immunobiology* **210**, 452

Danksagung

Mein Dank gilt Prof.Dr. Stefan Schütze, in dessen Arbeitsgruppe ich die Arbeit durchführen konnte. Ich bedanke mich für die Betreuung und Finanzierung der Arbeit sowie für die konstruktive Kritik und Unterstützung im Rahmen unserer Zusammenarbeit!

Mein Dank gilt Prof.Dr. Kabelitz als Leiter des Instituts für Immunologie. Ich bedanke mich für die Bereitstellung und Finanzierung meines Arbeitsplatzes, sowie für das freundliche Forschungsklima!

Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof.Dr.Dr. Silvia Bulfone-Paus für die Betreuung und Übernahme des Referates und dessen Vertretung vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät an der CAU zu Kiel!

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schütze am Institut für Immunologie und besonders Herrn Dr. Jens Neumeyer, dessen langjährige Freundschaft und Kollegialität ich sehr schätze!
Ich danke Frau Dr. Cora Hallas für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft und ihre umfangreiche konstruktive Kritik, nicht nur im Rahmen dieser Arbeit!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und Großeltern, die mir mit ihrer Liebe dies alles erst ermöglicht haben!

Ich danke der gesamten Familie Kelm, die mir mit ihrer Unterstützung und vielen aufmunternden Worten immer wieder den Rücken gestärkt haben!

Der größte Dank von allen gilt meiner Lebensgefährtin Daniela Kelm, die immer in allem zu mir gestanden hat. Kein Wort könnte je meine Freude beschreiben....

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Jakob
Vorname:	Marten
Geburtsdatum:	28.04.1976
Geburtsort:	Hildesheim
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

08/1988 – 05/1995	Gymnasium Himmelsthür, Hildesheim Abschluss: Abitur
08/1986 – 07/1988	Orientierungsstufe Himmelsthür, Hildesheim
08/1982 – 07/1986	Grundschule Moritzberg, Hildesheim

Zivildienst

07/1995 – 07/1996	Zivildienst bei den Diakonischen Werken Hildesheim-Himmelsthür, Hildesheim
-------------------	---

Studium

03/2001 – 03/2002	Diplomarbeit am Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Thema: „Untersuchungen zur Aktivierung von Cathepsin B und D in endolysosomalen Kompartimenten“
10/1996 – 03/2002	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel; Schwerpunktfächer: Zoologie, Biologische Meereskunde, Biochemie Abschluss: Diplom

Promotion

Seit 03/2002	Promotion im Fach Zellbiologie am Institut für Immunologie, UKSH Campus Kiel, Arbeitsgruppe Prof.Dr. Stefan Schütze zum Thema: „Charakterisierung der TNF-Rezeptor- internalisierung und des intrazellulären Transports von TNF- Rezeptosomen“
--------------	--

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.....Datum.....

.....