

Molekularer Mechanismus der Fas Ligand- induzierten Aktivierung der sauren Sphingomyelinase



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Mario Stephan

Kiel

2013

Referent: Prof. Dr. Axel Scheidig

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Schütze

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2013

Zum Druck genehmigt: 17.09.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Todesrezeptoren	1
1.2 Das Fas Ligand/CD95-System	2
1.2.1 Der CD95-Rezeptor	2
1.2.2 Der Fas Ligand	3
1.2.3 Der nicht-apoptotische Signalweg des CD95-Rezeptors	4
1.2.4 Der apoptotische Signalweg des CD95-Rezeptors	5
1.2.5 Die Internalisierung des CD95-Rezeptors	8
1.3 Sphingolipide und Sphingomyelinasen	11
1.4 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.2 Vektoren	20
2.1.3 Kits	20
2.1.4 Antikörper	20
2.1.4.1 Primäre Antikörper	20
2.1.4.2 Sekundäre Antikörper	22
2.1.5 Zelllinien	22
2.1.6 Geräte und sonstige Materialien	22
2.1.7 Software	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Puffer und Lösungen	24
2.2.2 Zellkultivierung	24
2.2.3 Herstellung des Strep-Fc-FLAG-Fas Liganden (SFF-FasL)	25
2.2.3.1 Transformation von <i>E.coli</i> DH10B mit dem pSFFFasL-Plasmid	25

2.2.3.2	Plasmid Maxipräparation.....	26
2.2.3.3	Transfektion von HEK293 Zellen mit dem pSFFFasL-Plasmid.....	26
2.2.3.4	Aufreinigung des SFF-FasL.....	27
2.2.4	BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung.....	28
2.2.5	Dot-Blot Analyse.....	28
2.2.6	Lyse von SKW6.4 Zellen.....	29
2.2.7	Immunpräzipitation.....	30
2.2.7.1	Immunpräzipitation endogener Proteine.....	30
2.2.7.2	Immunpräzipitation des A-SMase-GFP Fusionsproteins.....	31
2.2.8	Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen	32
2.2.8.1	Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen aus SKW6.4 Zellen.....	32
2.2.8.2	Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen aus Inhibitor-behandelten SKW6.4 Zellen.....	34
2.2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.2.10	Western-Blot.....	35
2.2.11	A-SMase Aktivitätsmessung.....	36
2.2.12	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptose.....	37
2.2.13	Durchflusszytometrische Analyse der Internalisierung des CD95-Rezeptors.....	37
2.2.14	Durchflusszytometrische Analyse der A-SMase Translokation.....	38
2.2.15	Immunfluoreszenzanalyse.....	39
2.2.15.1	Aussäen und FasL Stimulation von SKW6.4 Zellen.....	39

2.2.15.2	Fixierung und Permeabilisierung von SKW6.4 Zellen.....	39
2.2.15.3	Antikörperbehandlung.....	40
2.2.15.4	Behandlung der SKW6.4 Zellen mit Dynasore oder IETD.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Nachweis der Anreicherung und der Funktionalität des SFF-FasL.....	41
3.2	SFF-FasL-vermittelte Aktivierung von Caspasen und A-SMase in SKW6.4 Lysaten.....	43
3.3	SFF-FasL-induzierte CD95-Internalisierung	45
3.3.1	Dynasore blockiert die Internalisierung des SFF-FasL-CD95-Komplex	45
3.3.2	Kolokalisation zwischen dem SFF-FasL-CD95-Komplex und intrazellulären Markerproteinen.....	47
3.3.3	Durchflusszytometrische Quantifizierung der SFF-FasL- induzierten Internalisierung des CD95-Rezeptors.....	48
3.4	Charakterisierung von CD95-Rezeptosomen.....	50
3.5	Biphasische Aktivierung der A-SMase in CD95-Rezeptosomen.....	52
3.6	Charakterisierung der biphasischen A-SMase Aktivierung.....	55
3.6.1	IETD blockiert den ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase.....	56
3.6.2	Translokation der A-SMase zur Plasmamembran.....	58
3.6.3	Dynasore blockiert den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase.....	61
3.6.4	Dynasore reduziert die Apoptose in SFF-FasL-stimulierten SKW6.4 Zellen.....	63
3.7	DEVD verhindert den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase.....	64
3.8	Nachweis der aktiven Caspase 3 und 7 in CD95-Rezeptosomen.....	66

3.8.1	Vergleich der Caspase 3 und 7 Aktivierung zwischen CD95- und TNF-R1-Rezeptosomen.....	66
3.8.2	Kolokalisation der Caspase 3 und 7 mit dem internalisierten Ligand-Rezeptorkomplex.....	68
3.9	Interaktion zwischen A-SMase und Caspase 3 und 7.....	68
3.9.1	Ko-Immunpräzipitation.....	68
3.9.2	Reverse Ko-Immunpräzipitation.....	71
3.9.3	Kolokalisation zwischen der A-SMase und Caspase 3 / 7.....	73
3.10	Spaltung und Aktivierung der A-SMase durch Caspase 7 und Caspase 3.....	74
4	Diskussion.....	77
5	Zusammenfassung.....	89
5.1	Summary.....	91
6	Literaturverzeichnis.....	92
7	Danksagung.....	108
8	Wissenschaftlicher Werdegang.....	109
9	Eidesstattliche Erklärung.....	111

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM-10	a disintegrin and metalloprotease-10
AK	Antikörperkontrolle
AP	adaptor protein
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
A-SMase	saure Sphingomyelinase
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
B	Beads
BAK	BCL-2 antagonist killer
BAX	BCL-2 associated x protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BEL	Belgien
BID	BH3-interacting domain death agonist
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CAPP	ceramide-activated protein phosphatase
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
CDase	Ceramidase
CerS	Ceramid-Synthase
cFLIP	cellular FLICE/caspase-8-like inhibitory protein
cFLIP _L	cFLIP long

chc1	clathrin heavy chain 1
CHE	Schweiz
CICD	caspase-independent cell death
CRD	cysteinreiche Domänen
CTSD	Cathepsin D
DD	death domain
DED	death effector domain
DEU	Deutschland
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid
ECL	enhanced chemoluminescence light
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EEA-1	early endosome antigen-1
EED	embryonic ectodermal development
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAN	factor associated with N-SMase activation
FasL	Fas Ligand
Fc	fragment crystallizable region (konstante Region eines Antikörpers)
FERM	For point one-ERM
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GBR	Königreich Großbritannien und Nordirland
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
hiDISC	high DISC
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon- γ
IGF	insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ITA	Italien
JPN	Japan
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LB	lysogeny broth
LBD	ligand binding domain
LSM	laser scanning microscope
L-SMase	lysosomal sphingomyelinase
Ltn A	Latrunculin A
Ly	Lysat
M	Molar
M6P	Mannose-6-Phosphat
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCD	mitotic cell death
MDC	Monodansylcadaverin
mFasL	membranständiger Fas Ligand
μ g	Mikrogramm

µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MMP	matrix-metalloprotease
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
MVK	multivesikuläre Kompartimente
NC	Nitrocellulose
NF-κB	nuclear factor-κB
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSD	neutral sphingomyelinase domain
N-SMase	neutrale Sphingomyelinase
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PI	Propidiumiodid
PFA	Paraformaldehyd
PKC	protein kinase C
PKH	protein kinase H

PLAD	preligand assembly domain
pmol	Picomol
Rab	ras-associated in brain
RACK1	receptor of activated kinase 1
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RIP	receptor-interacting protein
ROS	reactive oxygen species
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAP	Sphingolipid-Aktivatorprotein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sFasL	löslicher Fas Ligand
SFF-FasL	Strep-Fc-FLAG-Fas Ligand
siRNA	small interfering Ribonucleic acid
SK	Sphingosin-Kinase
SMase	Sphingomyelinasen
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SPOTS	signaling protein oligomerization transduction structures
SPT	Serin-Palmitoyltransferase
S-SMase	secretory sphingomyelinase
tBID	truncated BID
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TGV	trans-Golgi Vesikel
THD	TNF-Homologie-Domäne
TNF- α	tumor-necrosis-factor- α
TNF-R1	tumor-necrosis-factor-receptor 1

TRADD	TNF receptor-associated protein with death domain
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
U	units
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
unst.	unstimuliert
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Schwerkraft
YPK	yeast protein kinase

1 Einleitung

1.1 Todesrezeptoren

Die zur Familie der TNF (tumor-necrosis-factor)-Rezeptoren gehörenden Todesrezeptoren (Abb. 1) sind ein wichtiges Element zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose). Zu den wichtigsten Mitgliedern gehören CD95 (cluster of differentiation 95), TNF-R1 (TNF-Rezeptor 1), TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1) und TRAIL-R2, [1]. Als Typ-I Transmembranproteine zeigen sie eine Reihe charakteristischer Strukturmerkmale, die ihre Funktion als Todesrezeptoren kennzeichnen.

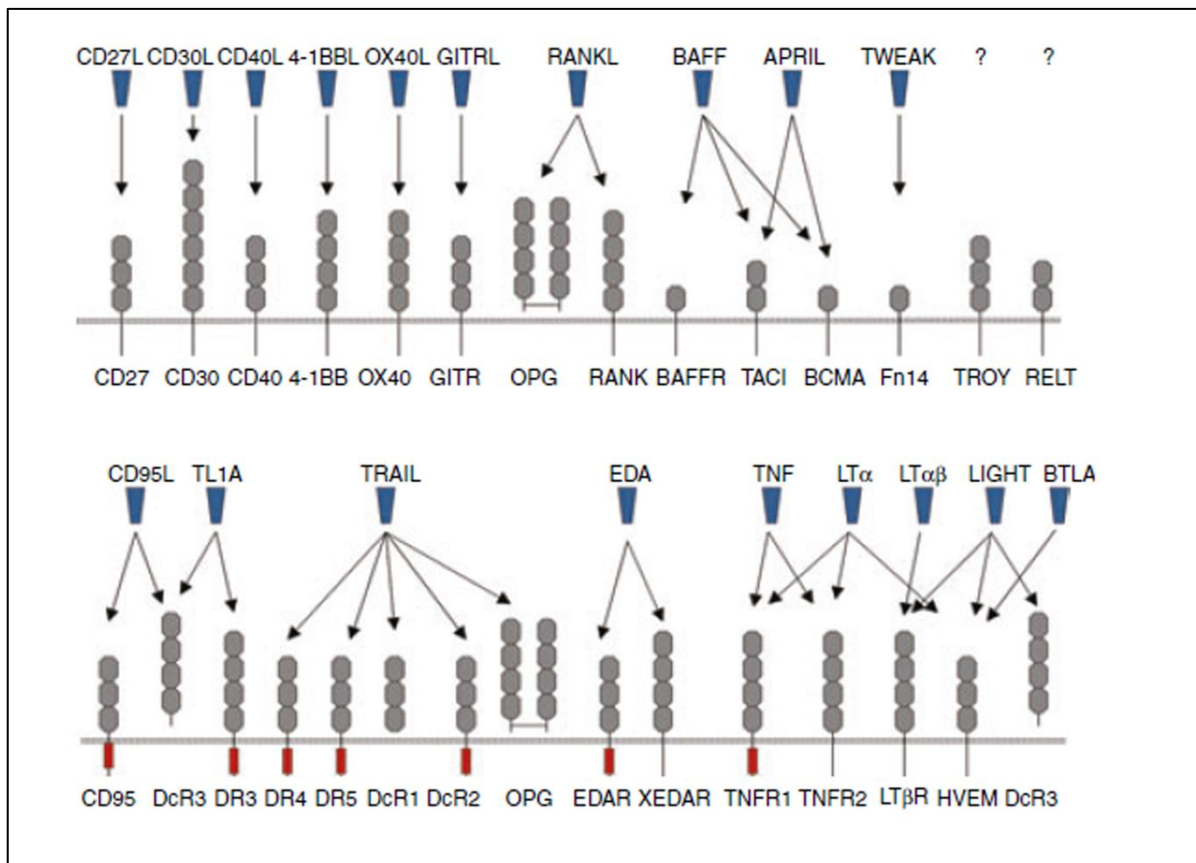


Abbildung 1: Die TNF-Rezeptor Familie und ihre Liganden. Die Liganden der TNF- Familie (blau dargestellt) binden jeweils den entsprechenden Rezeptor. Neben einer charakteristischen Anzahl von cysteinreichen Domänen (CRD, grau) besitzen einige Rezeptoren in ihrem intrazellulären Abschnitt eine Todesdomäne (DD, rot) (übernommen von Hehlhans [1]).

In ihrem N-terminalen, extrazellulären Bereich besitzen sie bis zu sechs cysteinreiche Domänen (CRD), die für die spezifische Bindung des Liganden verantwortlich sind. Zudem ermöglichen die hoch konservierten Cysteine die Bildung von Disulfidbrücken sowie eine Stabilisierung der Proteinstruktur [2]. Als spezielles Merkmal besitzen Todesrezeptoren in ihrem intrazellulären C-terminalen Abschnitt eine ca. 80 Aminosäure große Todesdomäne (DD, death domain) [3]. Nach der Bindung des Rezeptor-spezifischen Liganden wird durch die DD ein zur Apoptose führendes zytotoxisches Signal in die Zelle übertragen. Ermöglicht wird dies durch die spezifische Rekrutierung der DD-enhaltenden Adaptorproteine TRADD (TNF receptor-associated protein with death domain) und FADD (Fas-associated protein with death domain). Je nach Rezeptortyp bewirkt die homotypische Interaktion von TRADD/FADD (bei TNF-R1) bzw. nur FADD (bei CD95, TRAIL-R1 und TRAIL-R2) mit der DD des Todesrezeptors die Rekrutierung der Initiator-Caspase 8 und 10 (Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen). Dies führt zur Ausbildung eines Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (DISC, death-inducing signaling complex) sowie zur Induktion einer proteolytischen Kaskade [4, 5]. Zusätzlich zur Apoptose-Induktion können Todesrezeptoren durch die Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor- κ B) und MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signale vermitteln, die zur Proliferation und Differenzierung einer Zelle beitragen [2, 6-8]. Die Entscheidung zwischen einem pro- oder anti-apoptischen Signalweg ist auf eine Vielzahl unterschiedlicher Regulationsmechanismen zurückzuführen. Neben der intrinsischen Regulation von Adaptorproteinen und der gezielten Inhibition von pro-apoptischen Proteinen, ist auch die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors von großer Bedeutung [9].

1.2 Das Fas Ligand/CD95-System

1.2.1 Der CD95-Rezeptor

Der ubiquitär vorkommende CD95-Rezeptor (Fas, APO-1) gehört neben dem TNF-R1 zu den am besten charakterisierten Todesrezeptoren. Obwohl er in fast allen Geweben des menschlichen Körpers nachweisbar ist, tritt er vor allem in Niere, Herz, Leber, Pankreas, Gehirn, Thymus und aktivierten T-Lymphozyten verstärkt auf [3, 10]. Darüber hinaus kann CD95 durch verschiedene endogene und exogene

Faktoren induzierbar synthetisiert werden. Hierzu zählen TNF- α (tumor-necrosis-factor- α), IFN- γ (Interferon- γ), IL-1 (Interleukin-1), IL-6, IL-7, infektiöse Erreger, Stickstoffmonoxid (NO), Chemotherapie und Bestrahlung [11]. CD95 wird hauptsächlich als Transmembranprotein synthetisiert und umfasst beim Menschen ca. 335 Aminosäuren [12]. Er besitzt im extrazellulären N-terminalen Bereich drei CRDs in denen die Ligandenbindungsdomäne (LBD, ligand binding domain), eine Domäne für die Liganden-unabhängige Selbstaggregation (PLAD, preligand assembly domain) sowie diverse Glykosylierungsstellen lokalisiert sind. Zusätzlich zu einer Transmembranregion enthält der CD95-Rezeptor im intrazellulären C-terminalen Bereich die für Todesrezeptoren charakteristische DD [13, 14]. Neben einer membranständigen Form kann CD95 durch alternatives Splicing oder durch ein Matrix-Metalloproteasen-vermitteltes Shedding als lösliches Protein vorkommen. Durch kompetitive Bindung und Neutralisation des für den Rezeptor spezifischen Liganden besitzt der lösliche CD95-Rezeptor wahrscheinlich eine anti-apoptotische Funktion [15, 16].

1.2.2 Der Fas Ligand

Der physiologische Ligand des CD95-Rezeptors ist der Fas Ligand (FasL, CD95L, CD178, TNFSF6). Als Typ-II-Transmembran-Glykoprotein gehört er zu der TNF-Superfamilie der Zytokine [17]. Der Fas Ligand besitzt wie alle Mitglieder dieser Familie eine charakteristische TNF-Homologie-Domäne (THD), die eine Bindung an die cysteinreichen Domänen (CRD) des CD95-Rezeptors ermöglicht. Des Weiteren enthält er im extrazellulären C-terminalen Bereich eine Domäne die für Selbstaggregation und Trimerisierung notwendig ist [18]. Im Gegensatz zu dem ubiquitär vorkommenden CD95-Rezeptor ist der Fas Ligand hauptsächlich an der Zelloberfläche von aktivierten T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen zu identifizieren, wo er im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor das Absterben von infizierten und transformierten Zellen vermittelt [19, 20]. Darüber hinaus ist der Fas Ligand unter inflammatorischen Bedingungen an der Oberfläche von Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen nachweisbar [21]. Die Synthese des FasL wird auf den unterschiedlichen Ebenen der Transkription und Translation streng reguliert und schützt in Kombination mit dem begrenzten Expressionsmuster vor unkontrollierten Zell- und Gewebeschädigungen. Ein weiterer

Regulationsmechanismus ist das Shedding des membranständigen Fas Liganden (mFasL). Die MMP3 (matrix-metalloprotease-3), MMP7, MMP9 oder ADAM-10 (a disintegrin and metalloprotease-10) vermittelte Spaltung des mFasL führt zur Freisetzung des löslichen Fas Liganden (sFasL) in das umgebende Gewebe und den Blutkreislauf [22-25]. Im Gegensatz zu der pro-apoptotischen Wirkung des mFasL ist die lösliche Form nicht in der Lage die Apoptose zu induzieren. Sie konkurriert vielmehr mit der membranständigen Form um die Bindung an den CD95-Rezeptor und induziert einen Signalweg, der zur Proliferation und Zellmigration führt. Werden jedoch mindestens zwei homotrimere sFasL Moleküle miteinander verknüpft, entsteht eine hexamere Struktur, die genauso wie der mFasL ein apoptotisches Signal vermittelt [26].

1.2.3 Der nicht-apoptotische Signalweg des CD95-Rezeptors

Die Ligation des CD95-Rezeptors vermittelt sowohl apoptotische als auch anti-apoptotische Signalwege. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass CD95 unter bestimmten Bedingungen und in unterschiedlichen Zellsystemen die Proliferation, Migration und Differenzierung induziert. Beispielsweise werden nach einer partiellen Hepatektomie nicht-apoptotische Signalwege aktiviert, die eine Regeneration der Leber einleitet. Die Stimulation mit CD95-spezifischen Antikörpern führt in dieser Situation nicht zum Zelltod der Hepatozyten, sondern fördert deren Regeneration [27]. Auch im zentralen Nervensystem bewirken CD95-spezifische monoklonale Antikörper eine beschleunigte Regeneration beschädigter Nervenzellen. Darüber hinaus induziert CD95 durch die Aktivierung von ERK (extracellular-signal regulated kinase) eine verstärkte Expression des Neuronen-spezifischen Wachstumsfaktors p35. In einer Kultur von primären sensorische Neuronen führt dies zu einem verstärkten Wachstum von Neuriten [28]. Auch bei T-Lymphozyten kann die CD95-Stimulation anti-apoptotische Signale vermitteln. Alderson und Kollegen [29] zeigten bereits 1993, dass die Ligation des CD95-Rezeptors bei Kostimulation mit anti-CD3 Antikörpern zur Aktivierung und Proliferation von frisch isolierten humanen T-Lymphozyten führt. Darüber hinaus zeigten Paulsen und Kollegen eine dosisabhängige Modulation der CD95-induzierten T-Zellaktivierung. Hohe Konzentrationen von CD95-Agonisten blockierten die CD3/CD28-induzierte Aktivierung humaner CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu

fürten geringere Konzentrationen zu einer gesteigerten T-Zellaktivierung und Proliferation [30]. Des Weiteren vermittelt CD95 nicht nur die Reifung von dendritischen Zellen, sondern fördert auch die Proliferation von Fibroblasten die sich in einer Situation des Nährstoffmangels befinden [31, 32]. Die Entscheidung zwischen einem pro- oder anti-apoptotischen Signalweg wird auf verschiedenen Ebenen der Signalübertragung komplex reguliert. Von besonderer Bedeutung ist im Zuge der DISC-Bildung das Verhältnis der Caspase 8 zu seinem Inhibitor cFLIP (cellular FLICE/caspase-8-like inhibitory protein). Innerhalb des CD95-DISC ist cFLIP der wichtigste Regulator der Caspase 8 Aktivität. Von den bisher beschriebenen drei Isoformen sowie zwei Spaltfragmenten können alle die Aktivität der Caspase 8 blockieren. Jedoch kann die längere Isoform cFLIP_L auch als pro-apoptotisches Molekül auftreten, indem es die Aktivierung der Caspase 8 am DISC unterstützt [33, 34]. Neben der Inhibition der Caspase 8 dient cFLIP als Plattform für die Rekrutierung von TRAF1 (TNF receptor associated factor 1), TRAF2 sowie der Kinasen RIP (receptor-interacting protein) und Raf-1 (rapidly accelerated fibrosarcoma). Dies führt zur Aktivierung von ERK und NF- κ B sowie zur Induktion der Proliferation, Migration und Differenzierung [35].

1.2.4 Der apoptotische Signalweg des CD95-Rezeptors

Die Apoptose (altgriechisch apoptosis = das Abfallen, z.B. eines Blattes) repräsentiert eine Form des programmierten Zelltodes und ist ein essentieller Mechanismus für die embryonale Entwicklung sowie der Gewebshomöostase. Defekte in der Signalübertragung haben schwerwiegende Folgen und begünstigen eine unkontrollierte Proliferation und Tumorgenese [36]. Mittlerweile gibt es mindestens acht verschiedene Arten des Zelltodes, die grob in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe ist der apoptotische Zelltod, der neben der klassischen Apoptose auch eine Form enthält, die durch den Verlust des Zell-Matrix Kontakts gekennzeichnet ist (Anoikis). Im Gegensatz dazu umfasst die zweite Gruppe nicht-apoptotische Zelltodwege, die unter anderem die Autophagie, Nekrose, mitotischen Zelltod (MCD, mitotic cell death) und den Caspase-unabhängigen Zelltod (CICD, caspase-independent cell death) beinhaltet [36]. Die Apoptose ist der am besten charakterisierte Zelltod und wurde bereits 1972 von John Kerr und Kollegen beschrieben [37]. Im Zuge der Apoptose kommt es zu

einer Reihe morphologischer Veränderungen. Die Zelle sowie der Zellkern schrumpfen, das Zytoskelett zerfällt und die Kernhülle wird degradiert. Das Chromatin verdichtet sich und die genomische DNA wird durch Endonukleasen fragmentiert. Zusätzlich kommt es zur Ausstülpung der Plasmamembran (Blebbing) und zur Abschnürung sogenannter apoptotischer Körperchen, die schließlich durch Makrophagen phagozytiert werden [38]. Dadurch verhindert die Apoptose, dass intrazelluläres Material, welches Entzündungsreaktionen auslösen könnte, an die Umgebung abgegeben wird. Apoptose kann durch den intrinsischen oder extrinsischen Signalweg aktiviert werden [39]. Der intrinsische Weg wird durch eine Vielzahl verschiedener Stressfaktoren induziert. Neben oxidativen Stress und der Akkumulierung von fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum bewirken auch Schäden an der DNA und am Zytoskelett eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) [36, 40]. Reguliert wird dieser Prozess durch die Mitglieder der BCL-2 (B-cell lymphoma 2)-Familie, für die sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen beschrieben sind. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Rolle der pro-apoptotischen Proteine BAX, BAK und BID. Aufgrund ihrer Poren bildenden Fähigkeiten bewirken sie einen Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und ermöglichen die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol. Zusammen mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) und ATP (Adenosintriphosphat) bildet Cytochrom C das Apoptosom [41, 42]. Dieser Multiproteinkomplex bindet und aktiviert die Initiator-Caspase 9 und induziert eine zur Apoptose führende proteolytische Kaskade. Die anti-apoptotischen Proteine wie zum Beispiel BCL-2 oder BCL-XL wirken dieser intrinsischen Aktivierung von Caspasen entgegen, indem sie die Aktivität von BAX und BAK inhibieren [42]. Caspasen, die zur Familie der Cystein-Proteasen gehören, nehmen eine Schlüsselrolle in der Ausführung der Apoptose ein. Der charakteristische Cystein-Rest im aktiven Zentrum wird als katalytisches Nukleophil verwendet, um eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate (Aktin, β -Catenin, Lamin und Histon H1) nach einem Aspartat-Rest zu spalten [43]. Caspasen führen nicht immer zum proteolytischen Abbau sondern ermöglichen durch die Abtrennung einer regulatorischen Domäne die Aktivierung verschiedener Proteine (Pro-Caspasen, Phospholipase A2 und Protein Kinase C γ) [43]. Anhand ihrer Funktion, Struktur und Substratspezifität werden Caspasen in drei verschiedene Gruppen unterteilt [43].

Neben inflammatorischen Caspasen (Caspase 1, 4, 5 und 12) ist vor allem das Wechselspiel zwischen Initiator- (Caspase 2, 8, 9 und 10) und Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7) entscheidend für die Regulation und Ausführung der Apoptose. Im Vergleich zu den Effektor-Caspasen besitzen die Initiator-Caspasen eine längere Pro-Domäne, in der entweder eine CARD (caspase recruitment domain) oder eine DED (death effector domain) enthalten ist [44]. Die homotypische Interaktion zwischen den CARD-Domänen von Caspase 9 und Apaf-1 führen im intrinsischen Signalweg zur Bildung des Apoptosoms. Im extrinsischen Weg ermöglicht die DED der Caspase 8 oder 10 die Entstehung des DISC sowie die Induktion einer proteolytischen Kaskade [44, 45]. Todesrezeptoren wie TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2 und CD95 sind die am besten beschriebenen Mediatoren der extrinsischen Apoptose. Nach der spezifischen Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne des jeweiligen Rezeptors wird ein zur Apoptose führendes zytotoxisches Signal in die Zelle übertragen [46]. Am Beispiel der CD95-vermittelten Apoptose bewirkt die Ligation des trimerisierten Fas Liganden eine verstärkte Aggregation pre-assoziiierter Rezeptoren [47]. Die dadurch herbeigeführte Konformationsänderung des intrazellulären zytosolischen Abschnittes von CD95 ermöglicht die Rekrutierung des Adaptorproteins FADD an die DD des Rezeptors. Zusätzlich zu der DD besitzt FADD auch eine DED, über die eine weitere homotypische Interaktion mit DED-enhaltenden Adaptorproteinen vermittelt wird. Entscheidend für die Aktivierung der Apoptose ist die DED-vermittelte Interaktion von FADD mit der Pro-Caspase 8. Dies ermöglicht die Bildung des DISC und die autoproteolytische Aktivierung der Caspase 8. Die aktive Caspase 8 spaltet und aktiviert Effektor-Caspasen und führt schließlich zu Induktion der Apoptose [48]. In Abhängigkeit vom Zelltyp existieren zwei verschiedene Signalwege die zur Aktivierung der CD95-vermittelten Apoptose führen. Kennzeichnend für Typ-I Zellen (z.B. SKW6.4, H9, ACHN) ist eine vermehrte DISC-Bildung sowie eine damit einhergehende verstärkte Prozessierung der Caspase 8. Die aktive Caspase 8 führt zu einer schnellen und direkten Aktivierung von Effektor-Caspasen sowie zur Induktion der Apoptose [49-51]. In Typ-II Zellen (z.B. Jurkat, CEM, SR) werden aufgrund einer reduzierten DISC-Bildung weniger aktive Caspase 8 Moleküle gebildet. Um dennoch die Apoptose zu induzieren, benötigen diese Zellen eine Verstärkung durch den intrinsischen mitochondrialen Signalweg. Durch eine Caspase 8-vermittelte Prozessierung von BID wird die gespaltene Form tBID

(truncated BID) gebildet. Zusammen mit BAX und BAK bewirkt tBID die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Dies ermöglicht die Freisetzung von Cytochrom C, die Bildung des Apoptosoms sowie die effiziente Aktivierung von Effektor-Caspasen [49-51]. Nach neueren Befunden wurde außerdem in Typ-I Zellen gezeigt, dass die CD95-Internalisierung eine wichtige Bedeutung in der Aktivierung und Regulation der Apoptose hat [52].

1.2.5 Die Internalisierung des CD95-Rezeptors

Die Rezeptorinternalisierung ist ein oft beobachteter zellulärer Mechanismus von dem lange Zeit vermutet wurde, dass die Hauptaufgabe in dem Abschalten eines Rezeptor-vermittelten Signalweges liegt. Mittlerweile zeigen verschiedene Arbeiten, dass ein stimulierter Rezeptor auch während der Internalisierung aktiv an der Signalübertragung beteiligt ist [53-55]. Die Internalisierung des TNF-R1 oder CD95 nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation und Aktivierung der Apoptose ein [56]. Beispielsweise wird in Typ-I Zellen durch die Inhibition der CD95-Internalisierung nicht nur die Apoptose blockiert, sondern auch die ERK- und NF- κ B-vermittelte Proliferation induziert [52, 57]. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kompartimentierung des CD95-Rezeptors für die Aktivierung der Apoptose von großer Bedeutung ist. Nach Bindung des Liganden werden innerhalb weniger Sekunden zunächst eine geringe Anzahl der Adaptorproteine FADD und Caspase 8 zum Rezeptor rekrutiert (Abb. 2). In dieser frühen Phase lässt sich die Bildung von SDS (sodium dodecyl sulfate)-stabilen CD95-Aggregaten nachweisen, die als CD95^{hi} bezeichnet werden. Diese Aggregate werden durch die Interaktion mit den Aktinfilamenten verstärkt und lassen sich in der Fluoreszenzmikroskopie als SPOTS (signaling protein oligomerization transduction structures) visualisieren. Die CD95^{hi} Aggregate formieren sich zu großen Clustern (clustering, capping) und werden schließlich Clathrin-vermittelt internalisiert [58]. Für die Clathrin-vermittelte Rezeptorinternalisierung werden Clathrin-Triskelions durch Adaptorproteine wie AP2 (adaptor protein 2), AP180 und Epsin an den Rezeptor rekrutiert. Der CD95-Rezeptor besitzt hierfür auf der zytoplasmatischen Seite das Tetrapeptidmotiv YXX Φ . AP2 bindet dieses Erkennungsmotiv und ermöglicht damit die Verknüpfung des Rezeptors mit Clathrin. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein siRNA vermittelter knock-down von AP2 und chc1 (clathrin heavy chain 1) die

CD95-Internalisierung sowie die Apoptose in Typ-I Zellen vollständig blockiert [52]. Die kontinuierliche Anlagerung weiterer Clathrin-Triskelions führt auf der zytosolischen Seite zur Krümmung der Zellmembran und zur Ausbildung einer Clathrin-ummantelten Vertiefung (clathrin coated pit). Dynamin, als GTPase, ermöglicht die Abschnürung des gereiften Clathrin-ummantelten Vesikels (clathrin coated vesicle) von der Zellmembran.

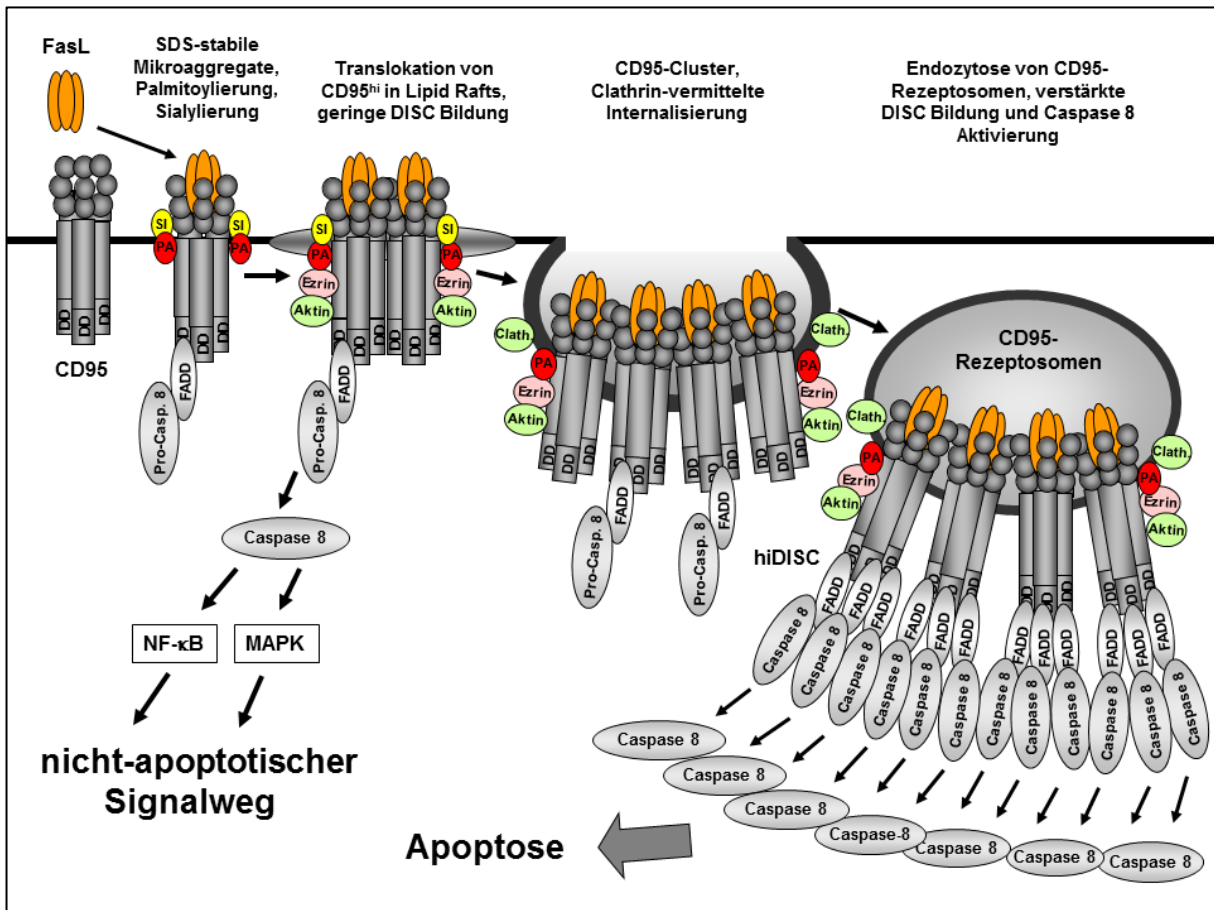


Abbildung 2: CD95-Kompartimentierung. Die CD95 Ligation führt zur Bildung von SDS-stabilen Mikroaggregaten (CD95^{hi}) die in die Lipid Rafts translozieren. Reguliert wird dieser Prozess durch die CD95^{hi}-Palmitoylierung (PA) und die Ezrin-vermittelte Aktin Anlagerung. Geringe Mengen der Adaptorproteine FADD und Caspase 8 werden zum Rezeptor rekrutiert. Der an der Zelloberfläche lokalisierte CD95-Rezeptor aktiviert über NF-κB und MAPK einen nicht-apoptotischen Signalweg. Unterstützt wird die Membranlokalisierung des CD95-Rezeptors durch die Sialylierung (SI). Die Clathrin-vermittelte Internalisierung von CD95-Clustern führt zu einer verstärkten Rekrutierung von DISC-Proteinen (hiDISC) sowie zu einer Caspase 8-abhängigen Aktivierung der Apoptose. (Clath.: Clathrin, DD: death domain, FADD: Fas-associated protein with death domain, hiDISC: high death-inducing signaling complex, MAPK: mitogen-activated protein kinase, NF-κB: nuclear factor-κB, Pro-Casp. 8: Pro-Caspase 8) (verändert nach Schütze [58]).

Das CD95-tragende Vesikel (CD95-Rezeptosom) wird schließlich von der Clathrinhülle befreit und fusioniert mit EEA-1- (early endosome antigen-1) und Rab 4-positiven frühen Endosomen [59, 60]. Während der Endozytose des CD95-Rezeptors werden verstärkt Adaptorproteine wie FADD und Caspase 8 zum Rezeptor rekrutiert. Dies führt zur Bildung einer hoch molekularen Struktur, die auch als hiDISC (high DISC) bezeichnet wird. Innerhalb des hiDISC wird durch eine vermehrte Caspase 8 Aktivierung die Apoptose induziert [58]. Für die CD95-Internalisierung ist die Verknüpfung zum Zytoskelett essentiell und erfordert das zur ERM (Ezrin, Radixin und Moesin)-Familie gehörende Protein Ezrin, welches das Zytoskelett mit der Plasmamembran vernetzt [61]. Hierfür besitzt Ezrin eine C-terminale Domäne, die das F-Aktin bindet sowie eine N-terminale FERM (For point one, ERM)-Domäne, die eine Interaktion mit Membrankomponenten ermöglicht [62]. Im CD95-System verknüpft Ezrin den CD95-Rezeptor mit den Mikrofilamenten des Zytoskeletts und unterstützt damit seine Rekrutierung in die Sphingolipid- und Cholesterol-reichen Domänen der Zellmembran (Lipid Rafts) [63-65]. Auch die Palmitoylierung ist für die Translokation von CD95^{hi} zu den Lipid Rafts entscheidend. Bei dieser post-translationalen Modifizierung wird Palmitinsäure durch eine Thioesterbindung an die Thiolgruppe eines Cysteins kovalent gebunden. Die hierfür erforderlichen Cystein-Reste 194 oder 199 befinden sich in der zytoplasmatischen Domäne des CD95-Rezeptors nahe der Zellmembran. Eine gezielte Punktmutation dieser Cystein-Reste oder die Verwendung des Inhibitors 2-Brom-Palmitinsäure verhindert die Translokation von CD95^{hi} zu den Lipid Rafts, die CD95-Internalisierung sowie die Induktion der Apoptose [65, 66]. Somit stellt die Palmitoylierung eine bedeutende pro-apoptotische Modifizierung des CD95-Rezeptors dar. Im Gegensatz dazu wird durch die Sialylierung des CD95-Rezeptors, die Rezeptorinternalisierung sowie die Apoptose blockiert. In einer Glykosyltransferase (ST6Gal-1)-katalysierten Reaktion werden die N-Glykane des CD95-Rezeptors über eine glykosidische Bindung mit dem Monosaccharid Sialinsäure (α 2-6 Verknüpfung) modifiziert. Die CD95-Sialylierung verhindert die Rekrutierung des Adaptorproteins FADD, die Bildung des DISC sowie die Internalisierung des CD95-Rezeptors [67]. Die Sialylierung ist somit wie die Palmitoylierung eine wichtige regulatorische post-translationalen Modifizierung des CD95-Rezeptors.

1.3 Sphingolipide und Sphingomyelinasen

Todesrezeptoren übertragen Signale, die auch den Sphingolipid-Metabolismus beeinflussen. Von besonderer Bedeutung ist das pro-apoptotische Neutrallipid Ceramid, das durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren (TNF α , Fas Ligand, IFN- γ , IL-1, Wachstumsfaktoren und oxidativer Stress) verstärkt gebildet wird [68].

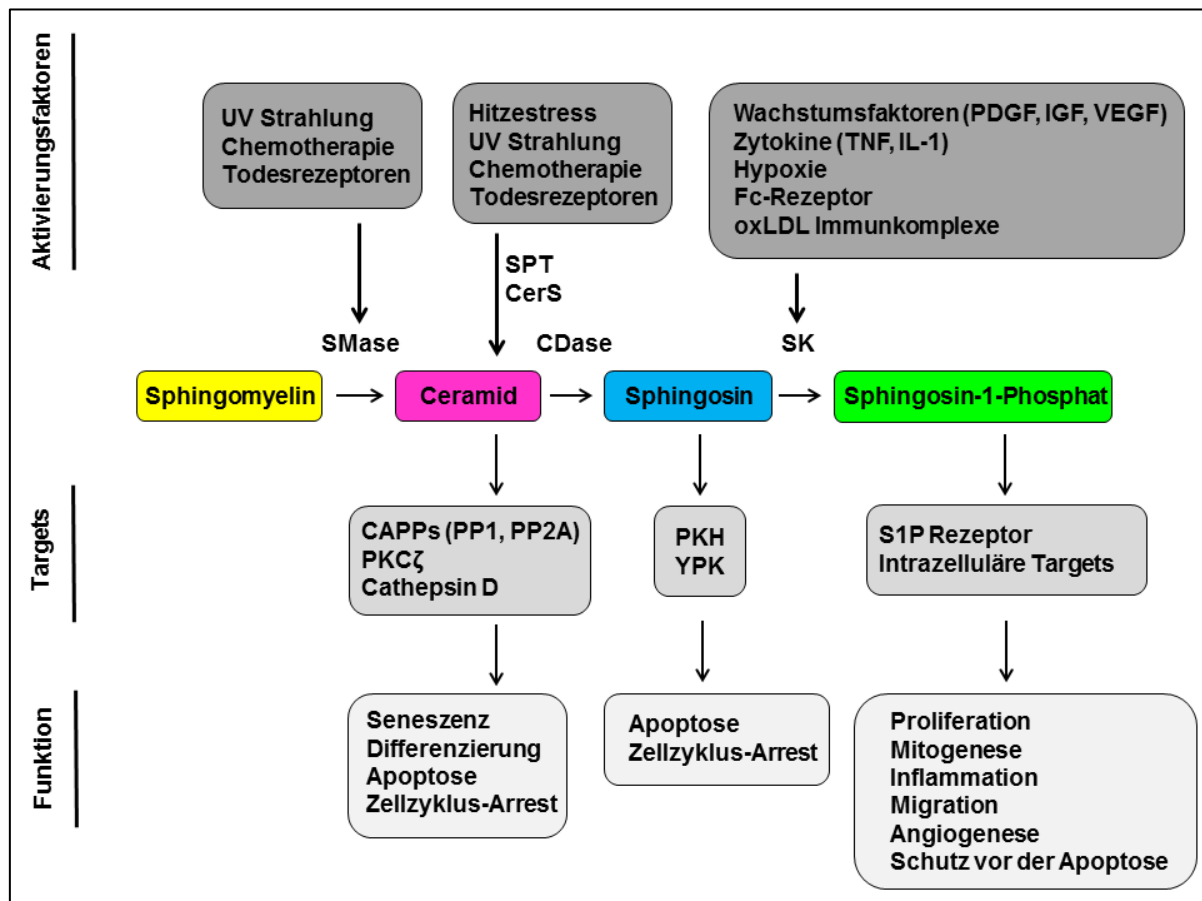


Abbildung 3: Sphingolipide und ihre biologischen Funktionen. Ceramide werden gebildet durch Sphingomyelinasen (SMasen) oder durch die *de-novo* Synthese mit den Enzymen Serin-Palmitoyltransferase (SPT) und Ceramid-Synthase (CerS). Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat werden in einer Ceramidase (CDase)- und Sphingosin-Kinase (SK)-katalysierten Reaktion gebildet. Eine Vielzahl verschiedener Aktivierungsfaktoren (dunkelgraue Boxen) induziert die Synthese unterschiedlicher Sphingolipide. Über intrazelluläre Targets vermitteln Sphingolipide biologische Prozesse wie Apoptose, Seneszenz, Differenzierung, Proliferation, Mitogenese, und Inflammation. (CAPP: ceramide-activated protein phosphatase, IGF: insulin-like growth factor, IL-1: Interleukin-1, oxLDL: oxidiertes Low-Density Lipoprotein, PDGF: platelet-derived growth factor, PKC: protein kinase c; PKH: protein kinase h, S1P: Sphingosin-1-Phosphat, TNF: tumour necrosis factor; VEGF: vascular endothelial growth factor, YPK: yeast protein kinase) (modifiziert nach Hannun [70]).

Ceramid besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, einer gesättigten oder ungesättigten Fettsäure sowie einer polaren Hydroxylgruppe. Die Ceramidstruktur dient als Grundgerüst für weitere Sphingolipide wie Ceramid-Phosphat, Sphingomyelin oder Glykosphingolipide. Darüber hinaus kann in einer Ceramidase (CDase)-katalysierten Reaktion Ceramid auch zu Sphingosin katabolisiert werden [69]. In den letzten Jahrzehnten zeigten diverse Arbeiten, dass Sphingolipide nicht nur Bestandteile von Zellmembranen sind, sondern auch verschiedenste biologische Prozesse regulieren. Beispielsweise induzieren Ceramid und Sphingosin Seneszenz, Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Sphingosin-1-Phosphat vermittelt dagegen die Proliferation, Migration, Inflammation und Angiogenese [70]. Ein Überblick der verschiedenen bioaktiven Sphingolipide und ihrer zellulären Funktionen ist in Abbildung 3 dargestellt.

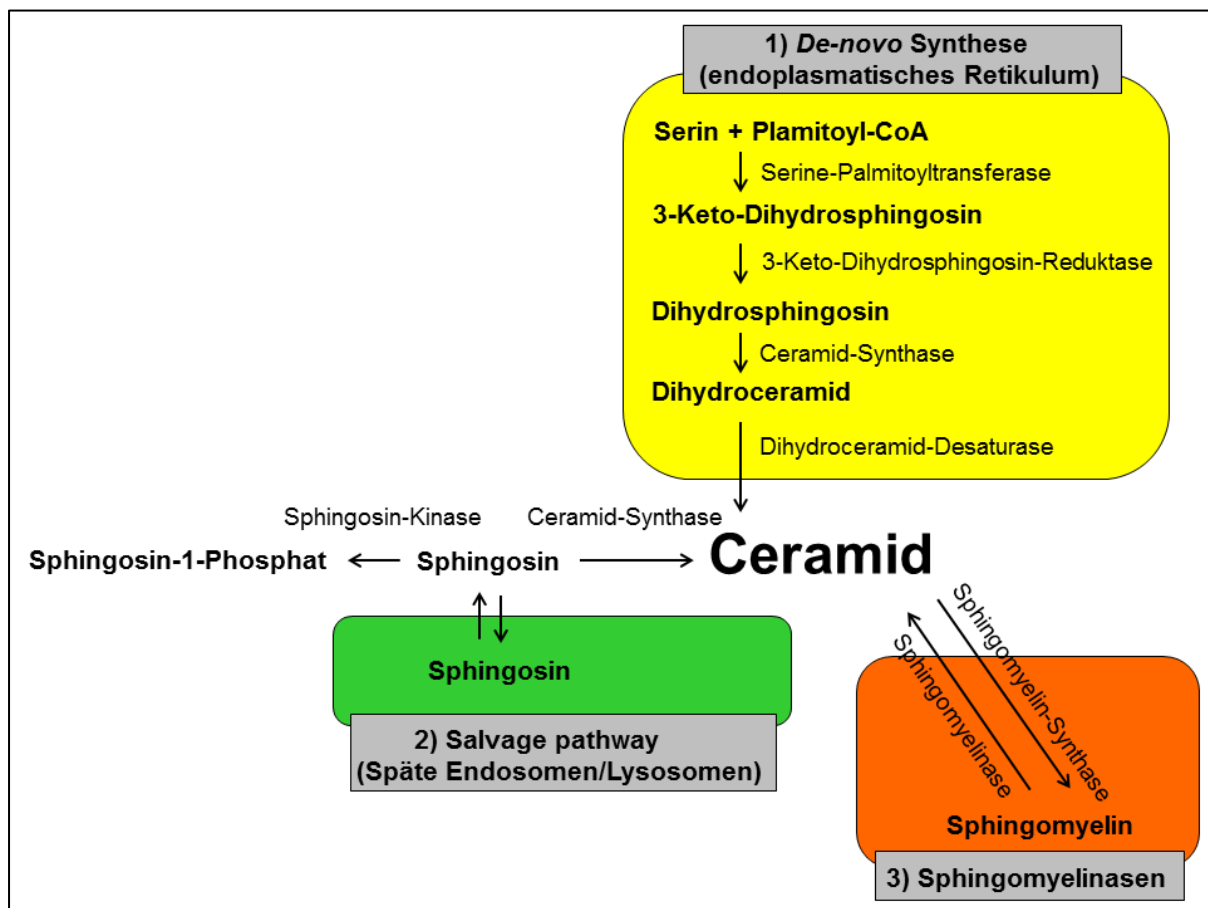


Abbildung 4: Die Ceramid-Synthese. Ceramide werden durch die *de-novo* Synthese im endoplasmatischen Retikulum, durch den Salvage pathway in den späten Endosomen/Lysosomen und durch Sphingomyelinasen gebildet (modifiziert nach Kitatani [72]).

Ceramid kann auf drei verschiedenen Wegen gebildet werden (Abb. 4). 1) Die *de-novo* Synthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum und beginnt mit der Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A. 2) Der Salvage-pathway im endo-lysosomalen Kompartiment recycelt katabolisierendes Sphingosin zu Ceramid. In einer Ceramid-Synthase-katalysierten Reaktion wird eine langkettige Fettsäure durch eine Amidbindung an das Kohlenstoffatom (C2) eines Sphingosinmoleküls gebunden. 3) Der dritte Weg der Ceramid-Bildung wird durch Sphingomyelinasen katalysiert. Durch die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung von Sphingomyelin entsteht Phosphorylcholin und Ceramid [71, 72]. Sphingomyelinasen werden entsprechend des pH-Wertes für ihre optimale enzymatische Aktivität und ihrer Metallionen-Abhängigkeit in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt [73]. Die neutrale (N-SMase) und die saure Sphingomyelinase (A-SMase) sind die am besten charakterisierten Enzyme dieser Familie. Die N-SMase zeigt bei einem pH-Wert von ca. 7 die höchste enzymatische Aktivität und wird in eine Magnesium (Mg^{2+})-abhängige und unabhängige Form unterteilt. In Säugerzellen wurden drei unterschiedliche Mg^{2+} -abhängige N-SMasen (N-SMase1, N-SMase2 und N-SMase3) identifiziert [73, 74]. Die N-SMase2 ist das am besten beschriebene Enzym dieser Gruppe und besitzt neben zwei putativen hydrophoben Membranbindedomänen, eine Kollagen-ähnliche Domäne sowie eine C-terminale katalytische Domäne [75]. Aktiviert durch $TNF\alpha$ induziert die N-SMase2 einen Signalweg der zur Inflammation, Zelladhäsion, Migration und Apoptose führt. Für die Aktivierung der N-SMase2 besitzt der TNF-R1 in seinem zytoplasmatischen Abschnitt eine NSD (neutral sphingomyelinase domain), an die das Protein FAN (factor associated with N-SMase activation) bindet. Durch die Rekrutierung von RACK1 und EED (embryonic ectodermal development) bildet sich der TNF-R1•FAN•RACK1•EED-Komplex, der die Rekrutierung und Aktivierung der N-SMase2 ermöglicht [76].

Im Gegensatz zur N-SMase katalysiert die A-SMase die Hydrolyse von Sphingomyelin bei einem pH-Wert von 5. Die A-SMase war die erste identifizierte Sphingomyelinase und wird als SMPD1 (sphingomyelin phosphodiesterase 1) bezeichnet. Das ca. 6 kb große humane SMPD1-Gen ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert und besteht aus 6 Exons und 5 Introns [77]. Interessanterweise entstehen aus einer einzelnen mRNA sieben unterschiedliche Splice-Varianten, von denen nur das Transkript-1 zu einem katalytisch, aktiven Enzym translatiert wird. Die anderen Splice-Varianten haben vermutlich einen dominant-negativen Effekt auf die zelluläre Ceramidkonzentration

sowie die A-SMase Aktivität [78]. Das Transkript-1 wird in ein 629 Aminosäure großes Polypeptid translatiert, bestehend aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer Saposin-ähnlichen Domäne, einer Prolin-reichen Domäne, einer katalytischen Metallophosphoesterase Domäne sowie einer C-terminalen Domäne (Abb. 5) [79]. Die SAP-Domäne der A-SMase zeigt ähnliche Funktionen wie die Sphingolipid-Aktivatorproteine (SAPs). SAPs sind nicht-enzymatische Glykoproteine, die Sphingolipide aus Zellmembranen solubilisieren und damit deren Interaktion mit einer spezifischen Hydrolase erleichtern. Innerhalb der A-SMase ist die SAP-Domäne eine intramolekulare Aktivierungsregion der Sphingomyelin-Hydrolyse. Damit die SAP-Domäne in der Nähe der katalytischen Domäne wirken kann, wird vermutet, dass die Prolin-reiche Domäne als Gelenkregion zwischen beiden fungiert [79-81].

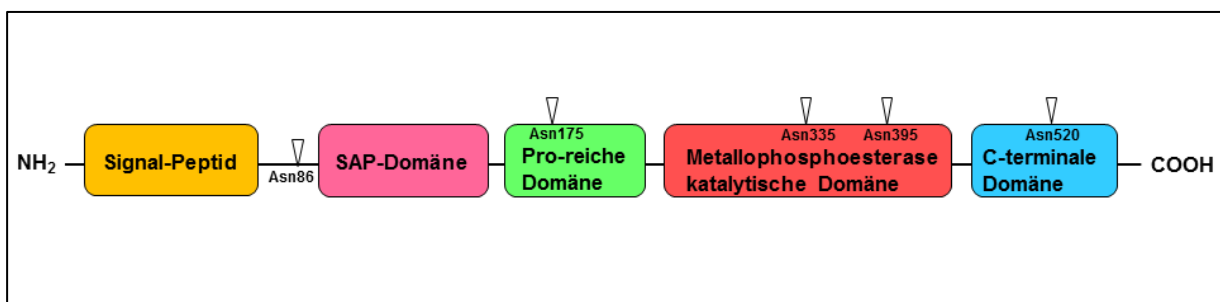


Abbildung 5: Schematische Darstellung der A-SMase. Die Domänenstruktur der A-SMase besteht aus einem Signalpeptid, einer SAP-Domäne, einer Prolin-reichen Domäne, einer katalytischen Domäne und einer C-terminalen Domäne. Darüber hinaus wird die A-SMase an fünf Asparagin (Asn)-Resten (mit Dreiecken gekennzeichnet) N-glykosyliert (modifiziert nach Jenkins [79]).

Die A-SMase kann durch differenzielles Targeting in zwei verschiedenen kompartimentierten Formen auftreten. Neben der L-SMase (lysosomal sphingomyelinase) die im endo-lysosomalen Kompartiment lokalisiert ist, wird die S-SMase (secretory sphingomyelinase) extrazellulär sezerniert [82]. Obwohl beide Formen Zink (Zn^{2+})-Metalloenzyme sind, lassen sie sich dennoch hinsichtlich ihrer Metallionen-Affinität voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu der S-SMase besitzt die L-SMase eine besonders starke Zn^{2+} -Bindung und zeigt selbst in Anwesenheit milder Zn^{2+} -Chelatoren eine enzymatische Aktivität [82]. Darüber hinaus lassen sich beide Formen auch anhand ihres Glykosylierungsmuster unterscheiden. Während die L-SMase eine Mannose-reiche Glykolysierung aufweist, besitzt die S-SMase eine komplexe Glykosylierung. Diese Unterschiede führen zu abweichenden Glykosidase-Spezifitäten sowie zu einem veränderten Laufverhalten

in der SDS-PAGE [82-84]. Die L-SMase wird hauptsächlich durch das Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor-System zu den Lysosomen transportiert. Mutationen der Enzyme des M6P-Systems führen über einen Golgi-vermittelten, sekretorischen Weg zur Sezernierung der A-SMase [85]. Die biologische Relevanz der S-SMase ist bisher nur unzureichend aufgeklärt. Mit Ausnahme ihrer Funktion im Sphingomyelin-Metabolismus von Lipoproteinen ist nur wenig über ihr biologische Bedeutung bekannt [86, 87].

Eine Mutation im A-SMase-kodierenden SMPD1-Gen führt zur lysosomalen Speicherkrankheit Niemann-Pick. Charakterisiert durch die Akkumulierung von Sphingomyelin im endo-lysosomalen Kompartiment werden zwei verschiedene Formen unterschieden, die durch eine A-SMase Defizienz hervorgerufen wurden. Patienten mit der Niemann-Pick Erkrankung Typ A versterben bereits in einem Alter von zwei bis drei Jahren aufgrund einer beschleunigten Neurodegeneration. Typ B ist dagegen die schwächere Verlaufsform, die pathologisch durch eine vergrößerte Leber, eine pulmonalen Insuffizienz sowie kardiovaskuläre Erkrankungen gekennzeichnet ist [88]. Außer bei neurologischen Erkrankungen, Sepsis und Diabetes ist die A-SMase auch in der Krebsentstehung und Therapie von entscheidender Bedeutung [89]. Beispielsweise tritt in A-SMase knock-out Mäusen ein verstärktes Tumorwachstum auf. Darüber hinaus unterstützt die A-SMase die zytotoxischen Effekte von verschiedenen Krebsmedikamenten [90-92].

Die enzymatische Aktivität der A-SMase wird unter anderem durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Stickstoffmonoxid, Lipide, ROS (reactive oxygen species), pH-Wert und Kationen reguliert [79, 93, 94]. Eine wichtige post-translationale Modifizierung stellt die Glykosylierung dar. Von den sechs theoretisch möglichen N-Glykosylierungsstellen wird die A-SMase an fünf Positionen (Asn86, Asn175, Asn335, Asn395, und Asn520) modifiziert (Abb. 5). Eine gezielte Mutation von Asn520 zu Glutamin, führt aufgrund eines defekten Proteintransports, zu einem vollständigen Verlust der L-SMase Aktivität und beeinträchtigt zudem die S-SMase Sekretion [95]. Auch die Phosphorylierung ist für die enzymatische Aktivität der A-SMase essentiell. Zeidan und Kollegen zeigten, dass die Aktivität der A-SMase und deren Translokation zur Zellmembran eine PKC δ (protein kinase C δ)-vermittelte Phosphorylierung von Serin 508 erfordert [96]. Des Weiteren besitzt die A-SMase acht intramolekulare Disulfidbrücken, wodurch sie sehr sensitiv auf Reduktionsmittel reagiert. Interessanterweise sind in der A-SMase 16 von möglichen

17 Cystein-Resten an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt. Die Deletion oder Oxidation des C-terminalen, nicht verbrückten Cystein-Rest 629 steigert die Aktivität der A-SMase um das 4- bis 5-fache [97]. Obwohl dessen funktionelle Bedeutung bisher ungeklärt ist wird jedoch vermutet, dass eine Modifizierung von Cystein 629 für die Reifung und Aktivierung der A-SMase notwendig ist. Zusätzlich wird die A-SMase auch durch Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, Fas Ligand und TRAIL aktiviert. In diesem Zusammenhang konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die A-SMase in internalisierten TNF-R1-tragenden Endosomen (Rezeptosomen) sequenziell durch Caspase 8 und 7 proteolytisch aktiviert wird. Die TNF-R1 Ligation führt zur Clathrin-vermittelten Internalisierung des Ligand-Rezeptorkomplexes. TRADD, FADD und Caspase 8 werden zum Rezeptor rekrutiert und bilden den DISC. Im Zuge der TNF-R1 Kompartimentierung fusionieren TNF-R1 Rezeptosomen mit pro-A-SMase-enthaltenden trans-Golgi Vesikeln. Innerhalb der durch die Fusion gebildeten multivesikulären Strukturen wird die A-SMase sequenziell durch Caspase 8 und 7 aktiviert [98]. Die CD95 Ligation bewirkt dagegen eine Aktivierung und Translokation der A-SMase zur äußeren Zellmembran. Durch eine geringe Rekrutierung der Adaptorproteine FADD und Caspase 8 induzieren nur wenige aktive Caspase 8 Moleküle die Translokation der A-SMase zur Zelloberfläche. In den Lipid Rafts der Zellmembran katalysiert die A-SMase die Hydrolyse von Sphingomyelin. Die Akkumulierung von Ceramid verändert die biophysikalischen Eigenschaften der Sphingolipid-reichen Lipid Rafts und ermöglicht die Bildung von größeren Signalplattformen. Dies begünstigt das Clustern des CD95-Rezeptors und führt zu einer verstärkten Rekrutierung der Adaptorproteine FADD und Caspase 8 sowie zur Induktion der Apoptose [99]. Darüber hinaus konnte vor kurzem gezeigt werden, dass für die Aktivierung und Translokation der A-SMase zur äußeren Plasmamembran auch das SNARE-Protein (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) Syntaxin 4 benötigt wird [100]. Die CD95-vermittelte Translokation der A-SMase sowie die Hydrolyse von Sphingomyelin in der Plasmamembran sind wichtige Voraussetzungen für das Clustern des CD95-Rezeptors und die Induktion der Apoptose. Allerdings ist die Signalkaskade der CD95-induzierten A-SMase Aktivierung nur unzureichend aufgeklärt. Besonders vor dem Hintergrund der CD95-Internalisierung, ist die Funktion und Aktivierung der A-SMase unbekannt.

1.4 Zielsetzung

CD95 ist ein wichtiger Rezeptor zur Induktion der extrinsischen Apoptose. Von besonderer Bedeutung in der Signalübertragung ist das Clustern des Rezeptors. Ermöglicht wird das Rezeptorclustern durch die CD95-vermittelte Translokation der A-SMase zur Plasmamembran verbunden mit der Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid [99]. Die Internalisierung der CD95-Cluster führt zu einer verstärkten DISC-Bildung und zur Induktion einer zur Apoptose führenden proteolytischen Kaskade. Wird jedoch CD95 durch eine Blockierung der Internalisierung an der Zelloberfläche gehalten, aktiviert der Rezeptor über ERK und NF- κ B einen proliferativen Signalweg [52]. Diese Beobachtungen haben gezeigt, dass für die Einleitung eines pro- oder anti-apoptotischen Signalweges die subzelluläre Lokalisation des CD95-Rezeptors wichtig ist. Während der CD95-Internalisierung kann ein zum Zelltod führendes zytotoxisches Signal durch weitere pro-apoptotische Mechanismen verstärkt werden. In einem analogen System konnte vor kurzem gezeigt werden, dass TNF-R1-Rezeptosomen mit A-SMase-enthaltenden Vesikeln fusionieren. Im Zuge der endosomalen Reifung wird die A-SMase sequentiell durch Caspase 8 und Caspase 7 aktiviert. Durch die Hydrolyse von Sphingomyelin entsteht in einer A-SMase-katalysierten Reaktion das pro-apoptotische Molekül Ceramid [98]. Auf Grundlage der Ergebnisse der TNF-R1-Kompartimentierung sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob CD95-Rezeptosomen eine enzymatisch aktive A-SMase enthalten. Mit Hilfe der magnetischen Isolierung von CD95-enthaltenden Membranstrukturen wurden zu unterschiedlich Internalisierungszeiten CD95-Rezeptosomen isoliert und biochemisch charakterisiert. Zusätzlich galt es auch die Frage zu beantworten, über welche Mechanismen die A-SMase in die Rezeptosomen gelangt und dort aktiviert wird. In diesem Zusammenhang sollte vor allem der Einfluss von Initiator- und Effektor-Caspasen auf die A-SMase Aktivität analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Carl Roth, DEU
Acrylamid-bis 37,5:1 (40 % w/v)	Serva, DEU
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich, USA
Adhäsionsobjektträger <i>ImmunoSelect</i>	Squarix, DEU
Albumin Standard (2,0 mg/ml)	Thermo Scientific, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, USA
Ampicillin Natriumsalz	Sigma Aldrich, USA
Aquasafe 300 Plus	Zinsser Analytic, DEU
Bakto-Agar	BD Biosciences, USA
Bakto-Trypton	BD Biosciences, USA
Benzonase	Merck, DEU
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
Bromphenolblau	Merck, DEU
Caspase 3	Biomol, DEU
Caspase 7	Biomol, DEU
Chloroform (CHCl ₃)	Roth, DEU
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck, DEU
Proteaseinhibitoren <i>Complete</i>	Roche, DEU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, DEU
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Scientific, USA
DMEM <i>Dulbecco's modified Egel's medium</i>	Invitrogen, USA
Dynasore	Sigma Aldrich, USA
ECL TM <i>Western blotting detection reagents</i>	GE Healthcare, GBR
Eindeckmedium mit DAPI <i>ProLong Gold</i>	Invitrogen, USA
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Merck, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, USA

FreeStyle Medium	Invitrogen, USA
G418	Biochrom AG, DEU
Glycerol	AppliChem, DEU
Glycin	Serva, DEU
Hefeextrakt	Serva, DEU
HEPES	Biochrom AG, DEU
HiTrap Protein G HP-Säule	GE Healthcare, GBR
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, DEU
Latrunculin A	Biomol, DEU
Leupeptin	Sigma Aldrich, USA
µMACS-Säulen	Miltenyi Biotec, DEU
Magermilchpulver	Frema, DEU
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich, USA
Methanol (CH ₄ O)	Merck, DEU
Monodansylcadaverin (MDC)	Sigma Aldrich, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, DEU
Natriumacetat	Merck, DEU
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, DEU
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, DEU
Natriummolybdat (Na ₂ MoO ₄)	Sigma Aldrich, USA
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma Aldrich, USA
Natriumphosphat (Na ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, USA
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, GBR
N-methyl-[¹⁴ C]-Sphingomyelin	PerkinElmer, USA
NP-40	Fluka, DEU
Page-Ruler™ <i>Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, DEU
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, DEU
PBS	Biochrom AG, DEU
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, DEU
Pepstatin A	Sigma Aldrich, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, USA
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, USA
Protein G MicroBeads	Miltenyi Biotec, DEU
Protein G Sepharose	GE Healthcare, GBR

Röntgenfilme	GE Healthcare, GBR
Saponin	Merck, DEU
StrepTactin-HRP	IBA, DEU
Sucrose	Merck, DEU
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Roth, DEU
Triton X-100	Sigma Aldrich, USA
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, DEU
Tween 20	Sigma Aldrich, USA
Z-DEVD-FMK	Bachem, CHE
Z-IETD-FMK	Bachem, CHE

2.1.2 Vektoren

pSFFFasL-Plasmid	Prof. Janssen, UKSH, Campus Kiel, DEU
------------------	--

2.1.3 Kits

Annexin-V-FLUOS <i>staining Kit</i>	Roche, DEU
BCA-Protein Assay	Pierce, USA
Plasmid Maxipräparation	Qiagen, USA

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

In den Tabellen 1 bis 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper für die Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz, Immunpräzipitation und der Western-Blot Analyse aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung der primären Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Firma	Land	Verdünnung
Kaninchen polyklonal anti-A-SMase	Christiana Perrotta, Eurogentec [92]	ITA	1:50
Maus monoklonal anti-M2-FLAG (F1804)	Sigma Aldrich	USA	1:200

Tabelle 2: Auflistung der primären Antikörper für die Immunfluoreszenzanalyse

Antikörper	Firma	Land	Verdünnung
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 3 (E61)	Abcam	GBR	1:100
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 7 (E22)	Abcam	GBR	1:100
Kaninchen monoklonal anti-FLAG (SIG1-25)	Sigma Aldrich	USA	1:100
Kaninchen polyklonal anti-aktive Caspase 3 (9661)	Cell Signaling	USA	1:300
Kaninchen polyklonal anti-aktive Caspase 7 (9491)	Cell Signaling	GBR	1:100
Kaninchen polyklonal anti-A-SMase	Christiana Perrotta, Eurogentec [92]	ITA	1:50
Kaninchen polyklonal anti-A-SMase (ab83354)	Abcam	GBR	1:300
Kaninchen polyklonal anti-Rab 4A (D20)	Santa Cruz	USA	1:50
Kaninchen polyklonal anti-Vti1b (164002)	Synaptic Systems	DEU	1:200
Maus monoklonal anti-Caspase 3 (E8)	Santa Cruz	USA	1:50
Maus monoklonal anti-Caspase 7 (7CSPO3)	Santa Cruz	USA	1:50
Maus monoklonal anti-Cathepsin D (CTD-19)	Abcam	GBR	1:100
Maus monoklonal anti-M2-FLAG (F1804)	Sigma Aldrich	USA	1:200

Tabelle 3: Auflistung der Antikörper für die Immunpräzipitation

Antikörper	Firma	Land	Verdünnung
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 7 (E22)	Abcam	GBR	1:100
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 3 (8G10)	Cell Signaling	USA	1:100
Kaninchen polyklonal anti-aktive Caspase 7 (9491)	Cell Signaling	USA	1:100
Kaninchen polyklonal anti-GFP (A11122)	Invitrogen	USA	1:100
Maus monoklonal anti-A-SMase (ab74281)	Abcam	GBR	1:100

Tabelle 4: Auflistung der primären Antikörper für die Western-Blot Analyse

Antikörper	Firma	Land	Verdünnung
Kaninchen monoklonal anti-aktive Caspase 8 (18C8)	Cell Signaling	USA	1:1000
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 3 (8G10)	Cell Signaling	USA	1:1000
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 7 (E22)	Abcam	GBR	1:1000
Kaninchen monoklonal anti-Caspase 8 (E7)	Abcam	GBR	1:500
Kaninchen monoklonal anti-Clathrin HC (D3C6)	Cell Signaling	USA	1:1000
Kaninchen polyklonal anti-aktive Caspase 3 (9661)	Cell Signaling	USA	1:1000
Kaninchen polyklonal anti-aktive Caspase 7 (9491)	Cell Signaling	USA	1:1000
Kaninchen polyklonal anti-A-SMase (3687)	Cell Signaling	USA	1:1000
Kaninchen polyklonal anti-FADD (2782)	Cell Signaling	USA	1:500
Kaninchen polyklonal anti-Fas (C20)	Santa Cruz	USA	1:1000
Kaninchen polyklonal anti-Rab 4A (D20)	Santa Cruz	USA	1:1000
HRP-konjugiert Maus monoklonal anti-GFP	Miltenyi Biotec	DEU	1:5000
Maus monoklonal anti-A-SMase (ab74281)	Abcam	GBR	1:1000
Maus monoklonal anti-Cathepsin D (CTD-19)	Abcam	GBR	1:1000
Ziege polyklonal anti-Aktin (C11)	Santa Cruz	USA	1:2000

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

In den Tabellen 5 und 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper für die Western-Blot Analyse, Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie aufgelistet.

Tabelle 5: Auflistung der sekundären Antikörper für die Western-Blot Analyse

Antikörper	Firma	Land	Verdünnung
HRP-konjugiert Esel anti-Ziege (705-035-003)	Dianova	DEU	1:10.000
HRP-konjugiert Kaninchen anti-Maus (315-035-045)	Dianova	DEU	1:10.000
HRP-konjugiert Maus anti-Kaninchen light chain (MAB201P)	Millipore	USA	1:10.000
HRP-konjugiert Ziege anti-Kaninchen (111-035-045)	Dianova	DEU	1:10.000
HRP-konjugiert Ziege anti-Maus light chain (AP200P)	Millipore	USA	1:10.000

Tabelle 6: Auflistung der sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

Antikörper	Firma	Land	Verdünnung
Alexa Fluor 555 Esel anti-Kaninchen IgG (A31572)	Invitrogen	USA	1:200
Alexa Fluor 488 Esel anti-Maus IgG (A21202)	Invitrogen	USA	1:200
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (A1108)	Invitrogen	USA	1:200
Alexa Fluor 555 Ziege anti-Maus IgG (A21422)	Invitrogen	USA	1:200

2.1.5 Zelllinien

Die humanen Suspensionszelllinien SKW6.4 (B-Lymphozyten) und HuT78 (T-Lymphozyten) sowie die humanen adhärenen Zelllinien HeLa (Zervixkarzinom) und HEK293 (embryonale Nierenzellen) wurden über die Zellbank „American Type Culture Collection“ (ATCC) erworben. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete stabile Zelllinie HeLa A-SMase-GFP wurde freundlicherweise von Frau Dr. Edelmann (UKSH, Campus Kiel, DEU) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Geräte und sonstige Materialien

Blotkammer

Bio Rad, USA

Brutschrank

Memmert, DEU

CO₂-Zellinkubator

Thermo Scientific, USA

Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, USA
Elektrophoresekammer	Biometra, DEU
Heizblock	Eppendorf, DEU
Konfokales Laser Scanning Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, DEU
Labormikroskop	Olympus, JPN
LAS 300 Fujifilm Intelligent Dark Box	R&D System, USA
Magnetkammer (HOKI mag)	HOOCK, DEU
Microplate Reader Infinite M200	TECAN Group Ltd., CHE
Netzgeräte	Peqlab, DEU
OctoMACS Seperator	Miltenyi Biotec, DEU
pH-Elektrode	Knick, USA
Pipetten	Eppendorf, DEU
Röntgenfilm Entwicklungsmaschine	AGFA, BEL
Schüttelinkubator	GFL, DEU
Ultraschall-Desintegrator	G. Heinemann, DEU
Spektrometer Nano Drop	Peqlab, DEU
Sterilwerkbank Laminar Air HB 2448	Heraeus, DEU
Szintillationszähler Beta-Counter LS 600 LL	Beckman Coulter, USA
Waage	Sartorius, DEU
Wasserbad	Köttermann, DEU
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, DEU
Zentrifuge Avanti J-25l	Beckman Coulter, USA

2.1.7 Software

Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe, USA
AIDA Image Analyzer v.4.0.4	Raytest, DEU
Cell-Quest 3.3	BD Biosciences, USA
i-Control 3.1	TECAN Group Ltd. CHE
Image Reader LAS 3000	Fujifilm, DEU
LSM Image Browser	Carl Zeiss, DEU
Microsoft Office 2010	Microsoft, USA
ND-1000 v. 3.7.0	Peqlab, DEU
Win MDI 2.8	Freeware (Joe Trotter)

2.2 Methoden

2.2.1 Puffer und Lösungen

Alle im Methodenabschnitt aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders beschrieben, in dH₂O angesetzt und bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Zellkultivierung

<u>RPMI⁺-Medium</u>	RPMI 1640	500 ml
	FKS	10 % (v/v)
	Penicillin/ Streptomycin (10 mg/ml)	1 % (v/v)
<u>DMEM⁺-Medium</u>	DMEM + HEPES	500 ml
	FKS	10 % (v/v)
	Penicillin/ Streptomycin (10mg/ml)	1 % (v/v)
<u>Selektionsmedium</u>	DMEM ⁺ -Medium	
	G418	1 mg/ml

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Zellinkubator bei einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer konstanten Temperatur von 37 °C kultiviert. Die Linien SKW6.4 und HuT78 wurden in RPMI⁺ gehalten und in Abständen von 2 bis 3 Tagen in frisches Medium passagiert. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300 x g sedimentiert und entsprechend des Versuchsablaufs in neuen RPMI⁺ weiter kultiviert. Die adhärenenten Zelllinien HEK293 und HeLa wurden in DMEM⁺ gehalten und ebenfalls in Abständen von 2 bis 3 Tagen in frisches Medium umgesetzt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst und in neuen DMEM⁺ auf verschiedene Kulturgefäße verteilt. Das Umsetzen und die Kultivierung der Zelllinie HeLa A-SMase-GFP erfolgte in Selektionsmedium nach der gleichen Durchführung wie zuvor beschrieben.

2.2.3 Herstellung des Strep-Fc-FLAG-Fas Liganden (SFF-FasL)

Grundlage für die Herstellung des modifizierten Fas Liganden ist die transiente Transfektion des pSFFFasL-Plasmids in HEK293 Zellen. Aufgrund eines Metalloproteasen (MMP3, MMP7, MMP9 oder ADAM-10) vermittelten Sheddings des transmembranständigen Fas Liganden kommt es zur Spaltung und Freisetzung seiner extrazellulären C-terminalen Domäne. Der lösliche Fas Ligand im Zellmedium wurde im weiteren Verlauf über seinen Fc-Abschnitt an eine Protein G Säule gebunden und angereichert. Die detaillierte Herstellung des SFF-FasL ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.3.1 Transformation von *E.coli* DH10B mit dem pSFFFasL-Plasmid

<u>Ampicillin LB-Agar-Platten</u>	Bakto-Agar	0,5 % (w/v)	
	Bakto-Trypton	1 % (w/v)	
	Hefeextrakt	1,5 % (w/v)	
	NaCl	10 mM	
	Ampicillin	50 µg/ml	
<u>SOC-Medium</u>	Bakto-Trypton	2 % (w/v)	
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
	NaCl	10 mM	
	KCl	0,25 mM	pH 7,0

Das freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Janssen zur Verfügung gestellte pFFFasL-Plasmid wurde von Herrn Dr. Bertsch (UKSH Campus Kiel, DEU) zusätzlich mit einem Strep-Tag versehen und anschließend mit Hilfe der Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien übertragen. 100 µl des *E. coli* Stammes DH10B wurden zu diesem Zweck mit 10 ng pSFFFasL-Plasmid versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 Sekunden in einen Heizblock überführt, der eine konstante Temperatur von 42 °C aufwies. Durch diesen kurzen Temperaturschock bildeten sich vorübergehend Poren in der Membran, wodurch die Plasmid-DNA die zusätzlich ein Gen für eine Ampicillin Resistenz enthielt, von den Bakterien aufgenommen wurde.

Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 1 ml SOC-Medium vermischt und bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde im Anschluss in zwei Verdünnungsstufen (1:10 und 9:10) auf Ampicillin LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.2 Plasmid Maxipräparation

<u>LB-Medium</u>	Bakto-Trypton	1 % (w/v)	
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
	NaCl	170 mM	pH 7,2

Am nächsten Tag wurde für eine Plasmid-DNA Maxipräparation eine gut gewachsene, transformierte *E. coli* Kolonie ausgewählt und mit einem sterilen Zahnstocher in 250 ml ampicillinhaltiges (50 µg/ml) LB-Medium überführt. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttelschrank erfolgte die Durchführung der Maxipräparation entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Maxi-Prep-Kit, Qiagen).

2.2.3.3 Transfektion von HEK293 Zellen mit dem pSFFasL-Plasmid

Für die transiente Transfektion wurden HEK293 Zellen, die eine optische Konfluenz von ca. 90 % besaßen, mit Hilfe einer 0,5 mM EDTA/PBS-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Jeweils 1×10^7 Zellen in 100 µl serum- und antibiotikafreiem DMEM wurden für die Elektroporation mit 10 µg pSFFasL-Plasmid vorsichtig in einer Küvette vermischt. Die Zellen wurden unter Verwendung des BioRad Gene Pulser II mit RF Modul bei den in Tabelle 7 aufgeführten Parametern gepulst und anschließend unverzüglich in eine Zellkulturflasche mit 50 ml vorgewärmten, antibiotikafreien FreeStyle-Medium (Invitrogen) überführt. Nach 24 Stunden im Zellinkubator (bei 37 °C und 5 % CO₂) wurde der Überstand mit dem löslichen Fas Liganden abgenommen, mit Proteaseinhibitoren (Complete, Roche) versetzt und sterilfiltriert. Für den Aufbau eines Selektionsdrucks wurde das transfizierte Zellpellet in 50 ml FreeStyle-Medium mit Penicillin/Streptomycin (0,1 mg/ml) sowie Neomycin (G418) (1 mg/ml) aufgenommen und für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden erneut die

Zellüberstände abgenommen, mit Proteaseinhibitoren (Complete, Roche) versetzt, sterilfiltriert und bis zur Anreicherung des Fas Liganden im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 7: Parameter für die Transfektion

Spannung	300 Volt
Modulation	100 %
Radiofrequenz	40 kHz
Pulsanzahl	5
Pulsdauer	5 Millisekunden
Pulsintervall	1 Sekunde

2.2.3.4 Aufreinigung des SFF-FasL

Bindungspuffer Na₂PO₄ 20 mM pH 7,0

Elutionspuffer Glycin-HCl 0,1 M pH 2,7

Die Anreicherung des rekombinanten SFF-FasL erfolgte mit Hilfe einer HiTrap Protein G Säule der Firma GE Healthcare. Grundlage hierfür war der N-terminale humane IgG1 Fc-Abschnitt des Fas Liganden, der mit hoher Affinität an das kovalent gekoppelte Protein G der Sepharose-Matrix bindet. Zu Beginn wurde die Säule an die Schlauchverbindungen einer Peristaltikpumpe angeschlossen und mit 10 ml Bindungspuffer für ca. 10 Minuten gewaschen. Die anschließende Beladung mit den gesammelten Zellüberständen ermöglichte die Bindung und Anreicherung des Fas Liganden an der Säulenmatrix. Verunreinigungen konnten im Anschluss durch einen Waschschrift mit 20 ml Bindungspuffer entfernt werden. Der an das Protein G gebundene Ligand wurde schließlich mit Hilfe eines sauren Elutionspuffers von der Säule gelöst und in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Für die sofortige Neutralisierung wurden vor der Elution jeweils 40 µl einer 1 M Tris-HCl Lösung (pH 9,0) in die entsprechenden Gefäße vorgelegt. Sämtliche Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4 °C im Kühlschrank sowie bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1 ml/min. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit dem eluierten Fas Liganden photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (Nano Drop, Peqlab) sowie durch eine BCA-Proteinbestimmung vermessen. Aussagen über die Anreicherung des Liganden lieferten der Dot-Blot und der Western-Blot. Der

funktionelle und quantitative Nachweis der Fas Ligand-induzierten Apoptose erfolgte durchflusszytometrisch nach einer Annexin V-FITC / Propidium-Iodid Färbung.

2.2.4 BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung

Der quantitative Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA). Dieses schnelle und sensitive Verfahren beruht auf der Protein-vermittelten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . Zusammen mit dem BCA-Reagenz bildet sich ein Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch analysiert werden kann. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 25 μl der zu vermessenden Probe unverdünnt oder in einer entsprechenden Vorverdünnung in eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten überführt. Nach der Zugabe von 200 μl BCA-Lösung (Pierce) wurde die Platte für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend zusammen mit einer BSA Standardreihe im Microplate-Reader (TECAN) vermessen. Anhand der Mittelwerte der gemessenen Extinktion und der sich aus der Standardreihe ergebenden Eichgerade konnten anschließend die Proteinmengen der einzelnen Proben ermittelt werden. Basierend auf der Formel F1 ergaben sich mit Hilfe der berechneten Proteinmengen die Proteinkonzentrationen der jeweils zu vermessenden Proben.

Formel F1:

Konzentration = [Proteinmenge/Probenvolumen] x Verdünnung	F1
---	----

2.2.5 Dot-Blot Analyse

<u>TBS-T Puffer</u>	Tris	10 mM	pH 7,5
	NaCl	100 mM	
	Tween 20	0,1 % (v/v)	

Um die erfolgreiche Aufreinigung des SFF-FasL nachzuweisen wurde eine Dot-Blot Analyse mit einem StrepTactin-HRP gekoppelten Konjugat (IBA) durchgeführt. Hierfür wurden die während der Präparation entnommenen Proben durch Unterdruck auf eine zuvor mit einer Lochplatte fixierten Nitrocellulosemembran transferiert.

Als Referenz diente ein bereits gereinigter Fas Ligand, der in verschiedenen Proteinmengen ebenfalls an die Membran gebunden wurde. Nach dem sechzigminütigen Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen in einer 3 % PBS/BSA-Lösung, wurde die Membran für 1 Stunde mit dem StrepTactin-HRP Konjugat bei Raumtemperatur inkubiert. Der Fas Ligand wurde nach einem dreimaligen jeweils zehnminütigen Waschen mit TBS-T, unter Verwendung einer ECL-Lösung der Firma GE Healthcare, auf einem Röntgenfilm visualisiert.

2.2.6 Lyse von SKW6.4 Zellen

<u>Homogenisationspuffer</u>	HEPES	40 mM	pH 7,4
	KCl	150 mM	
	NP-40	0,2 % (v/v)	

Für jeden Ansatz wurden 1×10^7 SKW6.4 Zellen geerntet und zu Verringerung der metabolischen Aktivität für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach der Behandlung mit 100 ng/ml SFF-FasL in 200 μ l PBS und einer erneuten Inkubation auf Eis für 60 Minuten wurden die einzelnen Ansätze entsprechend ihrer Stimulationszeit in einen Heizblock überführt, der auf 37 °C temperiert war. Durch die anschließende Zugabe von 500 μ l kaltem PBS sowie einer vierminütigen Zentrifugation bei 300 x g wurde die Fas Ligand Stimulation gestoppt. Das Zellpellet wurde in 200 μ l Homogenisationspuffer aufgenommen und mit einer dünnen Kanüle (21G) durch wiederholtes Auf- und Abziehen der Zellsuspension mechanisch aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der klare Überstand abgenommen, eine BCA-Proteinbestimmung durchgeführt und mit Hilfe einer SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht.

2.2.7 Immunpräzipitation

2.2.7.1 Immunpräzipitation endogener Proteine

<u>5x Probenpuffer</u>	Tris	50 mM	pH 8,0
	Bromphenolblau	0,1 g (w/v)	
	DTT (1M)	7 % (v/v)	
	Glycerol	25 % (v/v)	
	SDS	10 % (w/v)	

Für die Immunpräzipitation (IP) der endogenen A-SMase, Caspase 3, Caspase 7 oder aktiven Caspase 7 wurden adhärenzte HeLa Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig von dem Boden der Kulturflasche abgelöst und auf eine Zellzahl von $1,8 \times 10^7$ Zellen pro Präparationspunkt eingestellt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Proben die für eine Stimulation vorgesehen waren, mit 100 ng/ml FasL behandelt und erneut für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für die entsprechenden Zeitpunkte in einen Heizblock überführt, der eine Temperatur von 37 °C aufwies. Durch die Zugabe von 1 ml kaltem PBS sowie der sofortigen fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g wurden die Fas Ligand-vermittelten Signalmechanismen unterbrochen. Das Zellpellet wurde in 700 µl Homogenisationspuffer (siehe 2.2.6) aufgenommen, resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Für die anschließende Lyse wurden die Zellen aufgetaut und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer dünnen Kanüle (21G) mechanisch aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.000 x g ließ sich der post-nukleare Überstand für die Immunpräzipitation vorsichtig mit einer Pipette abnehmen. Um im weiteren Verlauf das gewünschte Antigen aus dem Zelllysat zu isolieren bzw. anzureichern wurde der jeweils benötigte Antikörper (Tabelle 3) über seinen Fc-Abschnitt an 30 µl Protein G MicroBeads gekoppelt und der entsprechenden Probe zugesetzt. Nach einer sechzigminütigen Rotation bei 4 °C, wurde das Gemisch auf eine zuvor mit Homogenisationspuffer (siehe 2.2.6) äquilibrierte µMACS-Säule (Miltenyi Biotec) geladen. Diese befand sich hierfür in einem OctoMACS Separator, einem permanent Magneten, der ein starkes Magnetfeld innerhalb der MACS Säulen induziert. Dieses Magnetfeld ermöglicht die Bindung des magnetisierten Antigens an die Matrix der µMACS-Säule.

Unspezifische, nichtmagnetische Zellkomponenten wurden im anschließenden Waschschrift mit 1 ml Homogenisationspuffer entfernt. Um im letzten Abschnitt das Antigen zu isolieren, wurde zunächst 20 µl heißer Probenpuffer (95 °C) auf die Säule geladen. Nach einer fünfminütigen Inkubation sowie der erneuten Zugabe von 50 µl heißem Probenpuffer, wurde das Eluat aufgefangen und bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Anschließend stand das IP-Material für eine SDS-PAGE und Western-Blot Analyse zur Verfügung. Da bei der Immunpräzipitation nicht nur ein bestimmtes Protein sondern auch seine Interaktionspartner präzipitiert werden, lässt sich diese molekularbiologische Methode zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen einsetzen.

2.2.7.2 Immunpräzipitation des A-SMase-GFP Fusionsproteins

<u>Caspasepuffer</u>	HEPES	20 mM	pH 7,4
	MgCl ₂	10 mM	
	Na ₃ VO ₄	0,1 mM	
	Na ₂ MoO ₄	0,1 mM	
	PMSF	1 mM	
	Leupeptin	0,01 mM	
	Pepstatin A	0,01 mM	
	ATP	0,75 mM	
	NP-40	0,2 % (v/v)	
	DTT	5 mM	

Für die Immunpräzipitation der A-SMase-GFP wurde eine von Frau Dr. Edelmann hergestellte HeLa Zelllinie verwendet, die das Fusionsprotein A-SMase-GFP stabil synthetisiert. 2×10^7 Zellen dieser Linie wurden zunächst mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 700 µl Homogenisationspuffer (siehe 2.2.6) aufgenommen und bei -20 °C eingefroren. Für die anschließende Zellyse wurde die Probe aufgetaut und durch mehrfaches Auf- und Abziehen mit einer Pipette mechanisch aufgeschlossen. Im Anschluss an eine zehnminütige Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer BCA-Proteinbestimmung ermittelt. Um unspezifische Proteinbindungen an die Protein G Sepharose zu

reduzieren wurde ein „Pre-Cleaning“ durchgeführt. Hierfür wurde die Lysatprobe mit 15 µl Protein G Sepharose je Milligramm Protein vermischt. Nach einer fünfundvierzigminütigen Inkubation im Kühlraum bei ständiger Rotation der Probe, wurde die Protein G Sepharose bei 14.000 x g pelletiert. Der gereinigte Überstand wurde mit einem anti-GFP Antikörper (Invitrogen) versetzt und erneut für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 30 µl Protein G Sepharose je Milligramm Protein vermischt und über Nacht bei einer gleichmäßigen Rotation bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Am nächsten Morgen wurde die Sepharose bei 14.000 x g pelletiert und dreimal in Caspasepuffer gewaschen. Das IP-Material wurde in 150 bis 200 µl Caspasepuffer aufgenommen und für die Charakterisierung der Caspasen-katalysierten Spaltung und Aktivierung der A-SMase verwendet. Hierfür wurde das immunpräzipitierte A-SMase-GFP Material mit jeweils 50 Units aktiver Caspase 3 (Biomol) oder aktiver Caspase 7 (Biomol) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 10 µl entnommen und im Vergleich zum unbehandelten IP Material im Westernblot mit einem anti-GFP HRP-konjugierten Antikörper (Miltenyi Biotec) analysiert. Darüber hinaus wurden jeweils 10 µl des IP-Materials für eine A-SMase Aktivitätsmessung verwendet (siehe 2.2.11).

2.2.8 Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen

<u>Sucrosepuffer</u>	HEPES	15 mM	pH 7,4
	MgCl ₂	0,5 mM	
	Sucrose	250 mM	

2.2.8.1 Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen aus SKW6.4 Zellen

Das in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stefan Schütze (UKSH, Campus Kiel, DEU) etablierte System zur Anreicherung subzellulärer Strukturen [101] wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Isolierung CD95-enhaltender Endosomen (Rezeptosomen) verwendet. Als Grundlage hierfür dient die magnetische Markierung des CD95-Rezeptors mit Hilfe von Fas Ligand tragenden paramagnetischen Partikeln. Zu diesem Zweck besitzt der Fas Ligand einen N-terminalen humanen

IgG1 Fc-Abschnitt der den Protein G Teil der MicroBeads spezifisch bindet. Für die Isolierung von CD95-Rezeptosomen wurden für jeden Präparationszeitpunkt durchschnittlich $1,5 \times 10^8$ SKW6.4 Zellen pelletiert und zur Verringerung der Membranfluidität für mindestens 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte, durch die Zugabe von 500 ng FasL in 100 μ l kaltem PBS sowie von 40 μ l Protein G MicroBeads, die extrazelluläre Markierung der membranständigen CD95-Rezeptoren. Nach einer sechzigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 5 ml warmen, serumfreien RPMI Medium zum Zellpellet wurde die Internalisierung der CD95-Rezeptoren gestartet. Die Proben wurden unverzüglich für die entsprechenden Internalisierungszeiten in ein Wasserbad überführt, das eine konstante Temperatur von 37 °C aufwies. Anschließend wurde durch die Zugabe von 45 ml kaltem PBS sowie durch eine sofortige fünfminütige Zentrifugation bei 2 °C und 300 x g die Internalisierung der CD95-Rezeptoren blockiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in kaltem Sucrosepuffer gewaschen, mit Proteaseinhibitoren (Complete, Roche) sowie 12,5 U Benzonase (Merck) versetzt und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Bei konstanter Kühlung wurden die Proben in einem Cup-Resonator (G. Heinemann) für 2 x 20 Sekunden mit Hilfe des Branson Sonifier 450 (Output Control 2,5, Duty Cycle Konstant) aufgeschlossen. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 2 °C und 260 x g wurde der Überstand abgenommen und in einem separaten auf Eis befindlichen 1,5 ml Reagenzgefäß gesammelt. Das Pellet mit den verbleibenden Zellen wurde erneut in Sucrosepuffer aufgenommen und einer weiteren Ultraschallbehandlung wie oben beschreiben unterzogen. Im Anschluss an eine vierminütigen Zentrifugation bei 300 x g wurden 850 μ l des klaren Überstandes über ein Schlauchsystem in die matrixfreie Magnetkammer (Hock, Kiel) gezogen. Hier erfolgte die zweistündige Anreicherung der magnetischen Fraktion an der Innenwand der Säule. Unspezifische, nichtmagnetische Zellkomponenten konnten durch einen dreißigminütigen Waschschrift mit Sucrosepuffer entfernt werden. Die magnetische Fraktion wurde anschließend in 1 ml Sucrosepuffer eluiert und bei 20.000 x g für 60 Minuten zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das hellbraune Pellet in 20 μ l Sucrosepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.8.2 Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen aus Inhibitor-behandelten SKW6.4 Zellen

Für die Isolierung von CD95-Rezeptosomen aus behandelten SKW6.4 Zellen wurde jeder Ansatz vor der Fas Ligand Stimulation mit dem entsprechenden Inhibitor (Dynasore [80 µM], IETD [50 µM] oder DEVD [100 µM]) für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Durchführung wie zuvor beschreiben, jedoch wurde darauf geachtet, dass bei jedem Inkubationsschritt der Inhibitor in der entsprechenden Konzentration mitgeführt wurde.

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

		<u>Endkonzentration</u>	
<u>Sammelgel</u>	40 % (w/v) Acrylamid-bis 37,5:1	12,5 % (v/v)	
	1,5 M Tris pH 8,8	24 % (v/v)	
	dH ₂ O	61,4 % (v/v)	
	10 % (w/v) SDS	1 % (v/v)	
	TEMED	0,1 % (v/v)	
	10 % (w/v) APS	1 % (v/v)	
		<u>Endkonzentration</u>	
<u>Trenngel</u>	40 % (w/v) Acrylamid-bis 37,5:1	12,5 % Gel	15 % Gel
	0,5 M Tris pH 6,8	31 % (v/v)	37,4 % (v/v)
	20 % (v/v) Glycerol	25 % (v/v)	25 % (v/v)
	10 % (w/v) SDS	42,4 % (v/v)	36 % (v/v)
	TEMED	1 % (v/v)	1 % (v/v)
	10 % (w/v) APS	0,15 % (v/v)	0,15 % (v/v)
		0,45 % (v/v)	0,45 % (v/v)
<u>5 x Laemmli-SDS</u>	Tris	50 mM	pH 8,0
<u>-Ladepuffer</u>	Bromphenolblau	0,1 g (w/v)	
	Glycerol	25 % (v/v)	
	SDS	10 % (w/v)	
	2-Mercaptoethanol	10 % (v/v)	

<u>Laufpuffer</u>	Glycin	192 mM
	SDS	1 % (v/v)
	Tris	25 mM

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [102, 103]. Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. Als inerte Matrix, durch die das Gemisch wandert, dient ein stark vernetztes Gel aus Polyacrylamid. Für die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurden durchschnittlich 30 µg Lysat, 5 µg Rezeptosomenmaterial oder 5 µl IP-Material mit 5 µl 5 x Laemmli-SDS-Ladepuffer versetzt und gegebenenfalls mit dH₂O auf ein konstantes Volumen von 25 µl aufgefüllt. Nach dem anschließenden fünfminütigen Aufkochen der Proben bei 95 °C erfolgte die vorsichtige Beladung des Gels. Neben den aufzutrennenden Proben wurde grundsätzlich auch ein Molekulargewichtsstandard (Page-Ruler, Fermentas) mitgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte für jedes Gel für ca. 75 min bei 25 mA.

2.2.10 Western-Blot

<u>Blotpuffer</u>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)

<u>Blockpuffer</u>	TBS-T	
	Magermilchpulver	5 % (w/v)

Die Übertragung von aufgetrennten und denaturierten Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran aus Nitrocellulose (NC) [104] erfolgte mit dem Tankblot-Verfahren (Bio Rad). Hierfür wurde das Gel zwischen Filterpapier und einer NC-Membran in eine Gitterkassette fixiert und anschließend in einen mit Blotpuffer gefüllten Tank geschoben. Durch das nun senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld wurden die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran transferiert. Mit Hilfe eines vertikalen

Kühleinsatzes wurde im Zuge dieses sechzigminütigen Elektrotransfers bei 100 Volt eine effiziente Kühlung gewährleistet. Der selektive Nachweis des gesuchten Proteins erfolgte durch die Immundetektion mit Hilfe spezifischer Antikörper. Nach dem Proteintransfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen der NC-Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Blockpuffer abgesättigt. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C und gleichmäßiger Rotation mit dem primären Antikörper (Tabelle 4) inkubiert. Nach einem jeweils zehn- bis fünfzehnminütigen Waschen in TBS-T (siehe 2.2.5) wurde die NC-Membran für 60 Minuten mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 5) behandelt. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurde sie erneut 3 x für 10 bis 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Die anschließende Visualisierung des gesuchten Proteins erfolgte nach den Angaben der Firma GE Healthcare mit dem ECL *Chemiluminescence Detection System*.

2.2.11 A-SMase Aktivitätsmessung

<u>A-SMase-Puffer</u>	Natriumacetat	250 mM	pH 5,0
	EDTA	1 mM	
	Triton X-100	0,1 % (v/v)	

Für die Aktivitätsbestimmung der A-SMase in Zelllysaten, immunpräzipitierten Material sowie in CD95-Rezeptosomenmaterial wurde ein Assay verwendet, der auf der Spaltung von radioaktiven ^{14}C -markierten Sphingomyelin (N-methyl- ^{14}C -Sphingomyelin, 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) beruht [105]. Hierfür wurden 40 μl des in A-SMase-Puffer gelösten Substrates mit 5 bis 12 μg Protein in einem Volumen von 150 μl vermischt und für 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 750 μl Chloroform/Methanol in einem Verhältnis von 2:1 sowie 250 μl dH_2O wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Nach einem kurzen Vermischen der Proben wurden die Ansätze für die Phasenseparation für 4 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. 350 μl von der oberen wässrigen Phase wurden schließlich für den Nachweis von ^{14}C -Phosphorylcholin vorsichtig entnommen und in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 300 Plus) im Beta-Counter vermessen.

2.2.12 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptose

Die Quantifizierung der Fas Ligand-induzierten Apoptose in SKW6.4 Zellen erfolgte mit einer Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) Färbung. Grundlage hierfür ist die spezifische Bindung zwischen Annexin V und Phosphatidylserin (PS), das während der frühen Phase der Apoptose von der Innenseite zur Außenseite der Zellmembran transloziert [106] und somit die Interaktion mit FITC-konjugierten Annexin V ermöglicht. Im Gegensatz dazu kann PI nur an die DNA binden, wenn die Zellen in einer fortgeschrittenen Phase der Apoptose oder primären Nekrose eine permeabilisierte Membran aufweisen. Eine Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und PI führt somit zu einer genauen Aussage über die zeitliche Veränderung der Apoptose- und Nekroserate in den Fas Ligand-stimulierten Zellen. Zu Beginn der Färbung wurden in jede Kavität einer Zellkulturplatte 4×10^5 SKW6.4 Zellen in 4 ml RPMI Medium ausgesät und mit 100 ng/ml SFF-FasL stimuliert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten im Zellinkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C wurden die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 x g geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet in 0,5 mM EDTA/PBS gewaschen und gemäß den Angaben des Herstellers (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche) mit 50 µl Annexin V-FITC/PI Lösung gefärbt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die durchflusszytometrische Analyse am FACS Calibur (BD Biosciences). Die generierten Daten wurden mit Hilfe der Software WinMDI (<http://facs.scripps.edu/software.html>) ausgewertet. Für eine zusätzliche Behandlung mit einem Dynamin-Inhibitor wurden die Zellen 30 Minuten vor der Stimulation mit dem Fas Ligand mit 80 µM Dynasore behandelt. Die weitere Durchführung erfolgte wie zuvor beschrieben.

2.2.13 Durchflusszytometrische Analyse der Internalisierung des CD95-Rezeptors

Für die Analyse der Fas Ligand-induzierten Internalisierung des CD95-Rezeptors wurde von Herrn Dr. Bertsch sowie von Frau Tatarnikova (UKSH, Campus Kiel, DEU) ein Messsystem etabliert, das darauf beruht, den nach bestimmten Stimulationszeiten auf der Zelloberfläche verbleibenden Ligand-Rezeptorkomplex durchflusszytometrisch nachzuweisen. Zu Beginn wurden für jede Messprobe 1×10^6

HuT78 Zellen geerntet und in serumfreien RPMI Medium für 1 Stunde auf Eis gelagert. Über den FLAG-Tag des rekombinant hergestellten Fas Liganden konnte im Anschluss unter Verwendung eines anti-FLAG Antikörpers sowie dem entsprechenden Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörper der Ligand-Rezeptorkomplex markiert werden. Hierfür wurden die Proben auf Eis für 1 Stunde mit 0,5 µg/ml SFF-FasL sowie mit 10 µg/ml anti-FLAG Antikörper (Maus anti-FLAG M2, Sigma Aldrich) inkubiert. Ungebundener Ligand sowie Antikörper konnten nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C mit dem Überstand abgenommen werden. Das Zellpellet wurde in 200 µl warmen RPMI Medium aufgenommen und für die entsprechenden Internalisierungszeiten in einen Heizblock überführt, der eine Temperatur von 37 °C aufwies. Für die schnelle und sofortige Blockierung der Internalisierung wurde zu jedem Ansatz 500 µl kaltes Medium hinzugegeben und bei 300 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in einem sekundären Alexa-488-konjugierten anti-Maus Antikörper aufgenommen und erneut für 1 Stunde auf Eis platziert. Nach einem letzten Waschschrift mit kaltem PBS wurden die gefärbten Zellen am FACS Calibur (BD Biosciences) durchflusszytometrisch analysiert und die Ergebnisse mit Hilfe der Programme Cell-Quest 3.3 und WinMDI ausgewertet. Für die zusätzlichen Versuche mit den Endozytoseinhibitoren wurden 1×10^6 HuT78 Zellen geerntet und mit 100 mM Monodansylcadaverin (MDC) oder 5 mM Latrunculin A (Ltn A) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie zuvor beschrieben, jedoch wurde bei jedem Zwischenschritt der jeweilige Inhibitor in der entsprechenden Konzentration mitgeführt.

2.2.14 Durchflusszytometrische Analyse der A-SMase Translokation

Für den Nachweis der Fas Ligand-induzierten Translokation der A-SMase zur Außenseite der Plasmamembran wurde neben der Immunfluoreszenzmikroskopie auch eine durchflusszytometrische Analyse mit nicht-permeabilisierten SKW6.4 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die Zellen geerntet, in PBS gewaschen und für jeden Ansatz auf 1×10^6 Zellen in 500 µl serumfreien Medium eingestellt. Für die Verringerung der Membranfluidität wurden die Proben für mindestens 30 Minuten auf Eis platziert. Anschließend erfolgte die Bindung von 100 ng/ml SFF-FasL. Nach

einer sechzigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für die entsprechenden Stimulationszeiten in einen auf 37 °C temperierten Heizblock überführt. Durch die Zugabe von 500 µl kaltem RPMI Medium sowie einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C wurde die Translokation der A-SMase blockiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in dem primären Antikörper (Kaninchen anti-A-SMase, Italien), vorsichtig resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Pellet in dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen Alexa-555) aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen und in einer vierprozentigen PFA-Lösung für 10 Minuten auf Eis fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Proben am FACS Calibur vermessen und die Ergebnisse mit Hilfe der WinMDI Software ausgewertet.

2.2.15 Immunfluoreszenzanalyse

2.2.15.1 Aussäen und FasL Stimulation von SKW6.4 Zellen

Zu Beginn der Immunfluoreszenzanalyse wurden 5×10^5 Zellen der Suspensionszelllinie SKW6.4 auf Adhäsionsobjektträger in einen Fettstift umrandeten Kreis ausgesät und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um im nächsten Schritt die Membranfluidität der Zellen zu verringern wurden die Objektträger für 30 Minuten in eine auf Eis stehenden Metallbox gelegt. Anschließend wurden die adhären Zellen mit 100 ng/ml Fas Ligand stimuliert und erneut für 60 Minuten auf Eis gehalten. Nachdem die Adhäsionsobjektträger entsprechend ihrer Stimulationszeit bei 37 °C inkubiert wurden, erfolgte das schnelle Herunterkühlen der Präparate in einem Glasgefäß mit kaltem PBS.

2.2.15.2 Fixierung und Permeabilisierung von SKW6.4 Zellen

<u>Fixierungspuffer</u>	PFA in dH ₂ O	4 % (v/v)
<u>Permeabilisierungspuffer</u>	BSA	0,2 % (w/v)
	Saponin	0,1 % (w/v)

Für die Zellfixierung wurden die Adhäsionsobjektträger für 30 Minuten auf Eis mit einer PFA-Lösung überschichtet. Nach dem gründlichen Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden erneut in PBS gewaschen und standen im nächsten Schritt für die Antikörperbehandlung bereit.

2.2.15.3 Antikörperbehandlung

Durch die zuvor durchgeführte Permeabilisierung der Zellmembran wurde die spezifische Bindung der Antikörper an ihr entsprechendes Antigen ermöglicht. Hierfür wurden die Präparate in PBS mit dem jeweils benötigten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 2) überschichtet und für eine 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Fluorophor-konjugierten Antikörper (Tabelle 6) behandelt. Nach dem erneuten Waschen der Proben in PBS wurden die Präparate unter Vermeidung von Luftblasen in einem Tropfen ProLong Gold mit DAPI eingebettet. Das Aushärten und Trocknen der Präparate erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 24 Stunden.

2.2.15.4 Behandlung der SKW6.4 Zellen mit Dynasore oder IETD

Im Rahmen der Inhibitionsversuche wurden 5×10^5 SKW6.4 Zellen in Anwesenheit von Dynasore [80 μM] oder IETD [50 μM] auf Adhäsionsobjektträger ausgesät und im Zellinkubator für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 vorinkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie zuvor beschrieben. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass bei jeder Erneuerung des Flüssigkeitsspiegels über den Zellen die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen mitgeführt bzw. erneuert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Anreicherung und der Funktionalität des SFF-FasL

Für die Stimulation des CD95-Rezeptors wurde ein rekombinanter Fas Ligand verwendet, der N-terminal mit einer Fc-Region sowie mit einem FLAG- und Strep-Tag modifiziert war (Abb. 6A). Die humane IgG1 Fc-Region wurde für die Oligomerisierung des FasL-Fusionsproteins benötigt. Durch die Vernetzung mehrerer trimerer Komplexe des CD95-Rezeptors wurde wie bei der membranständigen Form des Fas Liganden die Apoptose induziert [26]. Darüber hinaus sollten durch den FLAG- und Strep-Tag des Fas Liganden eine Reihe verschiedener molekular- und zellbiologischer Fragestellungen mit der Mikroskopie sowie der Durchflusszytometrie beantwortet werden. Um die Anreicherung des FasL-Fusionsproteins über eine Protein G Säule zu verifizieren, wurde von jedem Zwischenschritt ein Aliquot entnommen und mit Hilfe eines Dot-Blots analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 6B zeigen den Fas Liganden im Zellüberstand an Tag 1 und Tag 3 nach der transienten Transfektion von HEK293 Zellen mit dem pSFFFasL-Plasmid. Nach einer Metalloproteasen-vermittelten Spaltung und Freisetzung der extrazellulären Domäne des Fas Liganden wurde dieser auf der Nitrocellulosemembran mit einem StrepTactin-HRP Konjugat nachgewiesen. Des Weiteren ist in dieser Abbildung erkennbar, dass der Fas Ligand mit hoher Affinität über seine Fc-Region an das Protein G der Säulenmatrix gebunden hat. Weder in den entnommenen Aliquots des Durchlaufs noch in der Waschfraktion waren Signale auf dem Röntgenfilm nachweisbar. Für die anschließende Elution des Liganden wurde die Säule mit einem sauren, glycinhaltigen Puffer gewaschen. Verglichen mit einem zuvor hergestellten und gereinigten Fas Liganden war eine analog ansteigende Anreicherung des FasL-Fusionsproteins zu erkennen. Zusätzlich zum Dot-Blot wurde dieses Ergebnis auch durch eine SDS-PAGE und eine Western-Blot Analyse bestätigt. Bei unterschiedlich eingesetzten Proteinmengen war ebenfalls eine Anreicherung des SFF-FasL im Eluat zu beobachten (Abb. 6C).

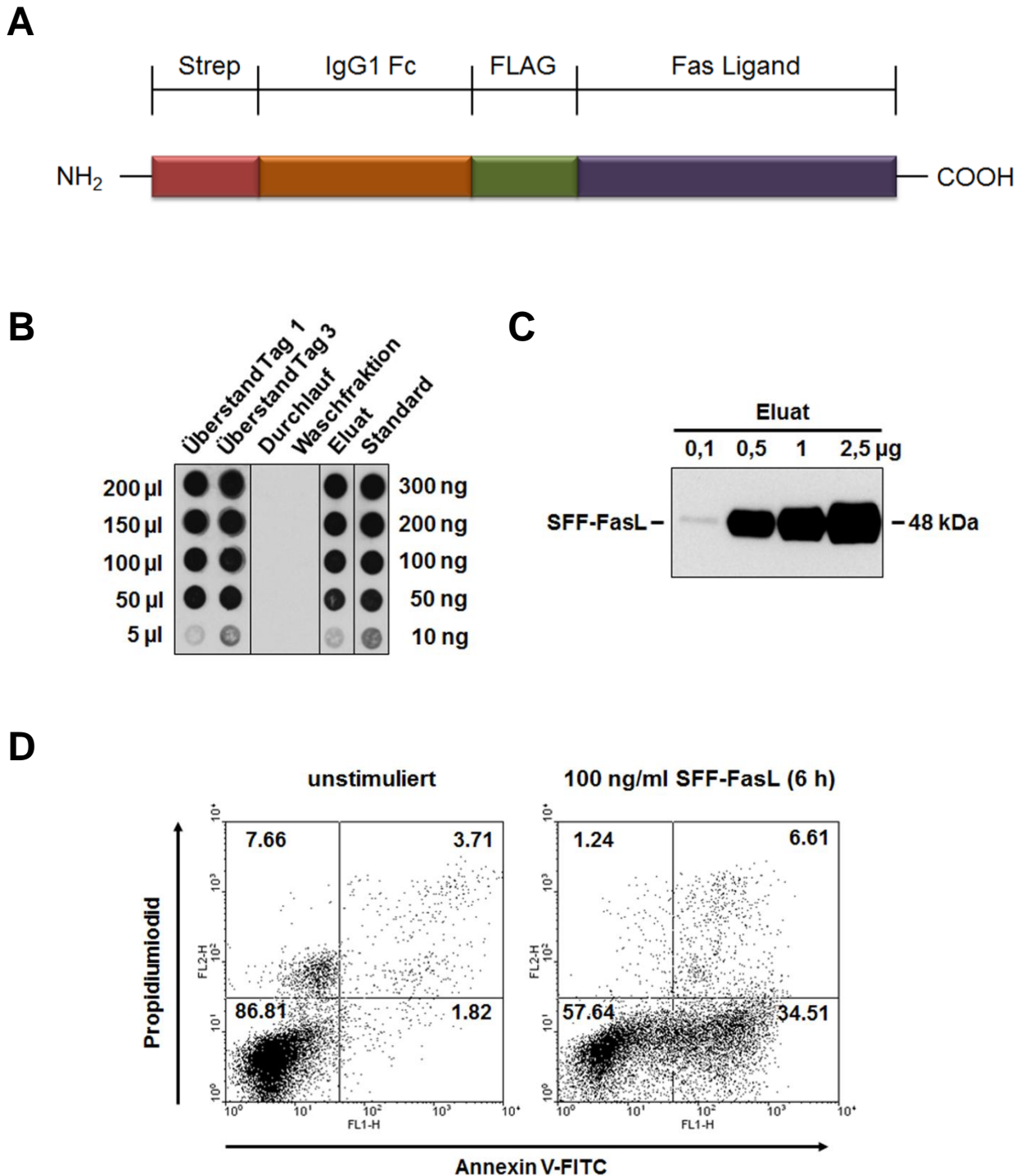


Abbildung 6: Anreicherung und Funktionalität des SFF-FasL. (A) Schematische Darstellung des FasL-Fusionsproteins mit einem N-terminalen Strep-Tag, einer humanen IgG1 Fc-Region und einem FLAG-Tag. (B und C) Dot-Blot und Western-Blot mit einem StrepTactin-HRP Konjugat zum Nachweis der Anreicherung des SFF-FasL im Eluat. (D) Annexin V-FITC/ Propidiumiodid-Färbung von unstimulierten sowie mit 100 ng/ml SFF-FasL-stimulierten SKW6.4 Zellen. Die sechsstündige Behandlung mit dem rekombinanten Fas Liganden führte zu einem Anstieg der Annexin V-positiven Zellen von 1,82 % auf 34,51 %.

Um im nächsten Schritt die Funktionalität des rekombinanten Fas Liganden nachzuweisen, wurde die SFF-FasL-induzierte Apoptose mit Hilfe einer Annexin V/Propidiumiodid (PI)-Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 6D). Im Vergleich zu unstimulierten SKW6.4 Zellen resultierte die sechsstündige Behandlung mit 100 ng/ml SFF-FasL in einem ca. 33-prozentigen Anstieg der Annexin V-positiven Zellen. Die frühe Phase der Apoptose ist durch eine verstärkte Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran gekennzeichnet. Dies ermöglichte die Bindung von FITC-konjugiertem Annexin V und führte zu einer Verschiebung des Signals entlang der Abszisse. Im Gegensatz dazu kommt es während einer fortgeschrittenen Apoptose oder primären Nekrose zu einer Permeabilisierung der Plasmamembran. PI gelangt durch die perforierte Membran in die Zellen und bindet an die DNA. Dies erklärt den leichten Anstieg der Annexin V/PI doppelt positiven Zellen. 6,61 % der SKW6.4 Zellen befanden sich bei einer relativ kurzen Stimulationszeit von 6 Stunden in einer späten Phase der Apoptose. Zusammenfassend ließ sich neben der Synthese und der Anreicherung des SFF-FasL auch die Funktionalität quantitativ nachweisen. Der somit erfolgreich charakterisierte rekombinante Fas Ligand wurde für alle folgenden Experimente eingesetzt.

3.2 SFF-FasL-vermittelte Aktivierung von Caspasen und A-SMase in SKW6.4 Lysaten

Im nächsten Schritt wurde die SFF-FasL-vermittelte Aktivierung von Caspasen untersucht. Als Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen übernehmen sie eine Schlüsselrolle in der Apoptose. Um die Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen zu verifizieren, wurden SKW6.4 Zellen für die in Abbildung 7A angegebenen Zeitintervalle mit 100 ng/ml SFF-FasL stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Western-Blot hinsichtlich des Auftretens eines aktiven Caspasefragments analysiert. Als Bestandteil des CD95-DISC übernimmt Caspase 8 die Funktion einer Initiator-Caspase [43].

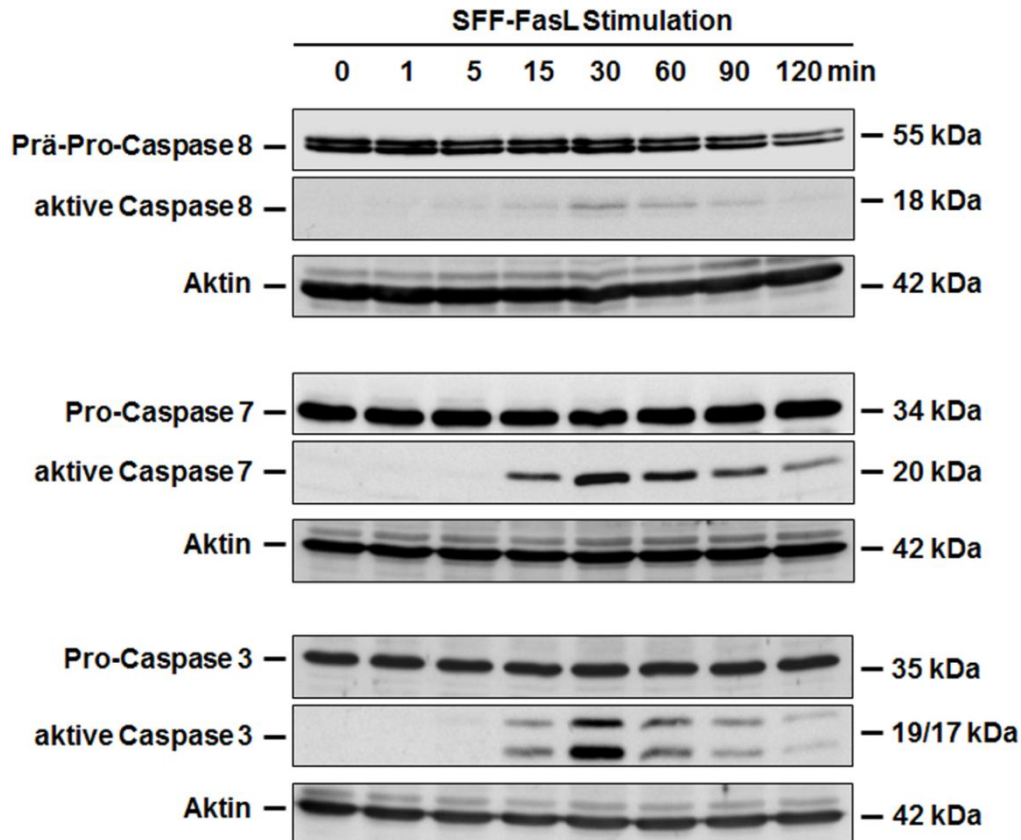
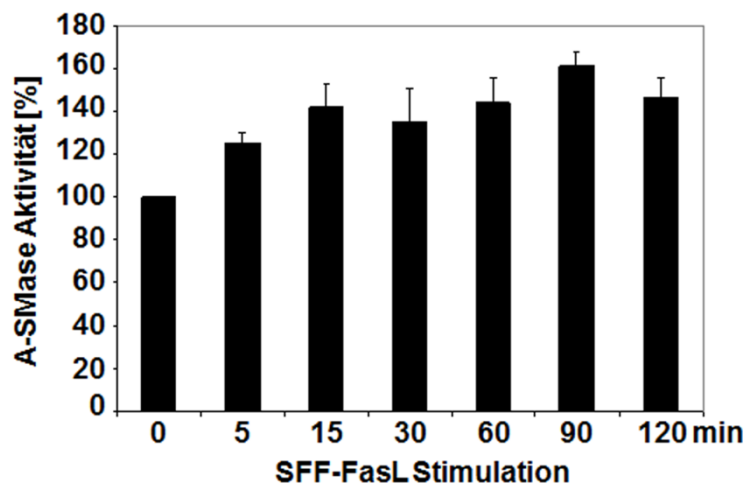
A**B**

Abbildung 7: SFF-FasL aktiviert die Caspasen 8, 3, 7 und die A-SMase. (A) Western-Blot Analyse von SKW6.4 Lysaten mit den in der Abbildung genannten Antikörpern. SKW6.4 Zellen wurden für die entsprechenden Stimulationszeiten mit 100 ng/ml SFF-FasL behandelt. Die Initiator-Caspase 8 sowie die Effektor-Caspasen 3 und 7 zeigten eine für Typ-I Zellen charakteristische Aktivierungskinetik. Aktin diente jeweils als Ladekontrolle. (B) Aktivierung der A-SMase in 100 ng/ml stimulierten SKW6.4 Zellen. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität in den Lysatproben erfolgte über den Nachweis der Hydrolyse von ^{14}C -Sphingomyelin zu ^{14}C -Phosphorylcholin bei einem pH-Wert von 5. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Für jeden Stimulationszeitpunkt wurde der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung angegeben.

Nach der Bindung des Fas Liganden an den CD95-Rezeptor erfolgt die Rekrutierung von DISC-Proteinen sowie die autoproteolytische Aktivierung von Pro-Caspase 8. Dies führte, wie im oberen Teil der Abbildung sichtbar, zu einer Verringerung der Prä-Pro Form der Caspase 8. Im Gegensatz dazu trat bereits nach 5 Minuten die aktive gespaltene Form der Caspase 8 (18 kDa) auf, die nach 30 Minuten ihr Maximum erreichte. Die aktive Caspase 8 kann in Typ-I Zellen ohne den intrinsischen mitochondrialen Signalweg direkt die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktivieren. Dadurch zeigte sich eine analoge Aktivierungskinetik der aktiven Caspase 3 und 7 mit einem Maximum nach 30 Minuten SFF-FasL Stimulation. Aktin diente als Ladekontrolle und zeigte in der Western-Blot Analyse ein gleichmäßig stark gefärbtes Bandenmuster. Neben den Caspasen ist auch die A-SMase an der Apoptose beteiligt. Als ubiquitär vorkommendes Enzym katalysiert es die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und dem pro-apoptotischen Lipid Ceramid. Die Stimulation von SKW6.4 Zellen mit 100 ng/ml SFF-FasL bewirkte bereits nach 5 Minuten einen 25-prozentigen Anstieg der A-SMase Aktivität (Abb. 7B). Das Aktivitätsmaximum mit einem Anstieg von mehr als 60 % erreichte die A-SMase nach 90 Minuten SFF-FasL Stimulation. Basierend auf den in dieser Abbildung dargestellten Ergebnissen zeigte sich, dass die Fas Ligand Stimulation zusätzlich zu der Aktivierung von Caspasen zu einem signifikanten Anstieg der A-SMase Aktivität führte. Für eine weitere detaillierte Charakterisierung der Fas Ligand-induzierten A-SMase Aktivierung wurde in den nächsten Abschnitten die Bedeutung der CD95-Internalisierung näher analysiert.

3.3 SFF-FasL-induzierte CD95-Internalisierung

3.3.1 Dynasore blockiert die Internalisierung des SFF-FasL-CD95-Komplex

Die molekularbiologische Analyse des intrazellulären Transports des CD95-Rezeptors und der Rekrutierung von Adaptorproteinen erforderte zunächst den Nachweis der Fas Ligand-induzierten CD95-Internalisierung. Dazu wurde die SFF-FasL-vermittelte Internalisierung des CD95-Rezeptors in An- und Abwesenheit des Dynamin-Inhibitors Dynasore [107] in der Immunfluoreszenzanalyse verglichen.

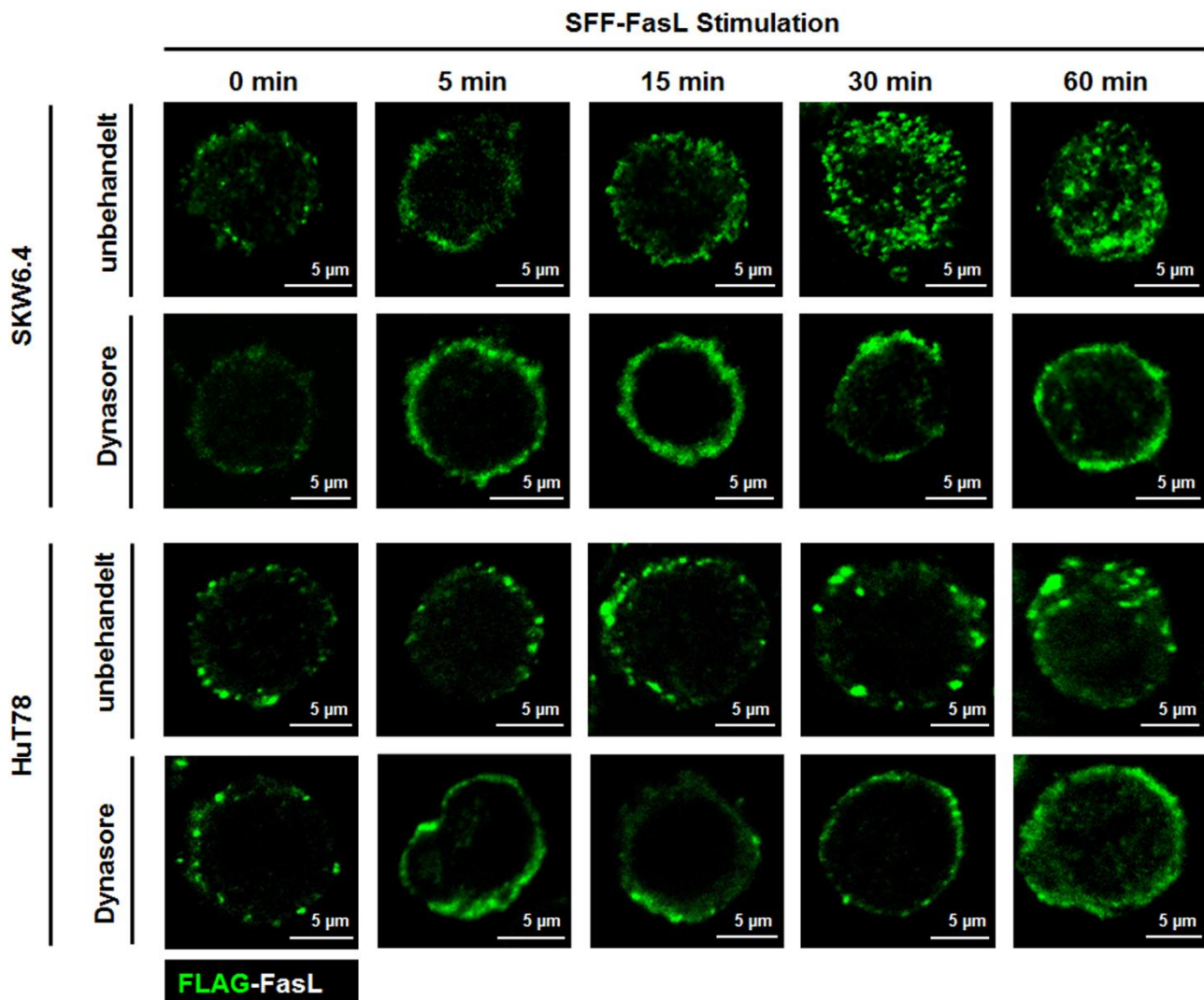


Abbildung 8: Dynasore blockiert die SFF-FasL-induzierte Internalisierung des CD95-Rezeptors. Konfokale LSM-Aufnahme von SFF-FasL-stimulierten (100 ng/ml) SKW6.4 und HuT78 Zellen. Durch den primären Antikörper Maus anti-FLAG sowie den sekundären Antikörper Alexa Fluor-488 anti-Maus, erfolgte die Fluoreszenzmarkierung des stimulierten Ligand-Rezeptorkomplexes. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen inhibierte Dynasore (80 μ M) die SFF-FasL-induzierte Internalisierung des CD95-Rezeptors.

Abbildung 8 zeigt die Verteilung des fluoreszenzmarkierten Ligand-Rezeptorkomplexes in SKW6.4 und HuT78 Zellen. Die Ligation des trimerisierten Fas Liganden führte in unbehandelten Zellen zu einer zeitabhängigen Internalisierung des CD95-Rezeptors. Im Gegensatz dazu wurde durch die Behandlung mit 80 μ M Dynasore der SFF-FasL-stimulierte Rezeptor an der Zelloberfläche zurückgehalten. Dynasore verhindert die Abschnürung von Vesikeln während der Clathrin-vermittelten Endozytose durch die selektive Inhibition der

GTPase Aktivität von Dynamin 1 und Dynamin 2. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wird dies durch eine gleichmäßige, auf die Zelloberfläche beschränkte Färbung der Ligand-Rezeptorkomplexe dokumentiert.

3.3.2 Kolokalisation zwischen dem SFF-FasL-CD95-Komplex und intrazellulären Markerproteinen

Zusätzlich zu den Versuchen mit dem Inhibitor Dynasore wurde die Internalisierung des CD95-Rezeptors durch die räumliche Assoziation (Kolokalisation) mit Kompartiment-spezifischen Markerproteinen nachgewiesen (Abb. 9). Für die Immunfluoreszenzanalyse wurde neben den FLAG-Tag des Fas Liganden, Rab 4A als Markerprotein für frühe Endosomen, Vti1b als Protein das hauptsächlich im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert ist und Cathepsin D (CTSD) als lysosomales Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper fluoreszenzmarkiert. Die fünfzehnminütige SFF-FasL Stimulation von SKW6.4 Zellen führte zu einer Fusion zwischen Rab 4A-positiven frühen Endosomen und den internalisierten CD95-Rezeptosomen. In der konfokalen Mikroskopie wurde diese Kolokalisation der rot und grün markierten Proteine als Gelbfärbung sichtbar. Parallel zu Rab 4A kam es im Zuge der CD95-Internalisierung zu einer Kolokalisation mit Vti1b. Als Mitglied der SNARE-Familie ist Vti1b hauptsächlich in endosomalen Membranen und Vesikeln des TGN lokalisiert. Nach 30 und 60 Minuten SFF-FasL Stimulation wies die partielle Kolokalisation auf eine Fusion zwischen trans-Golgi Vesikeln und den internalisierten CD95-Rezeptosomen hin. Des Weiteren erfolgte über eine Fluoreszenzfärbung mit CTSD die Markierung des lysosomalen Kompartiments. Die SFF-FasL Stimulation führte, wie in den beiden Beispielen zuvor, durch vesikuläre Fusionsprozesse zu einer Kolokalisation zwischen CD95-Rezeptosomen und CTSD-enhaltenden Kompartimenten. Diese lokale Interaktion war vor allem nach 30 und 60 Minuten Fas Ligand Stimulation sichtbar und bestätigt damit die Internalisierung des CD95-Rezeptors.

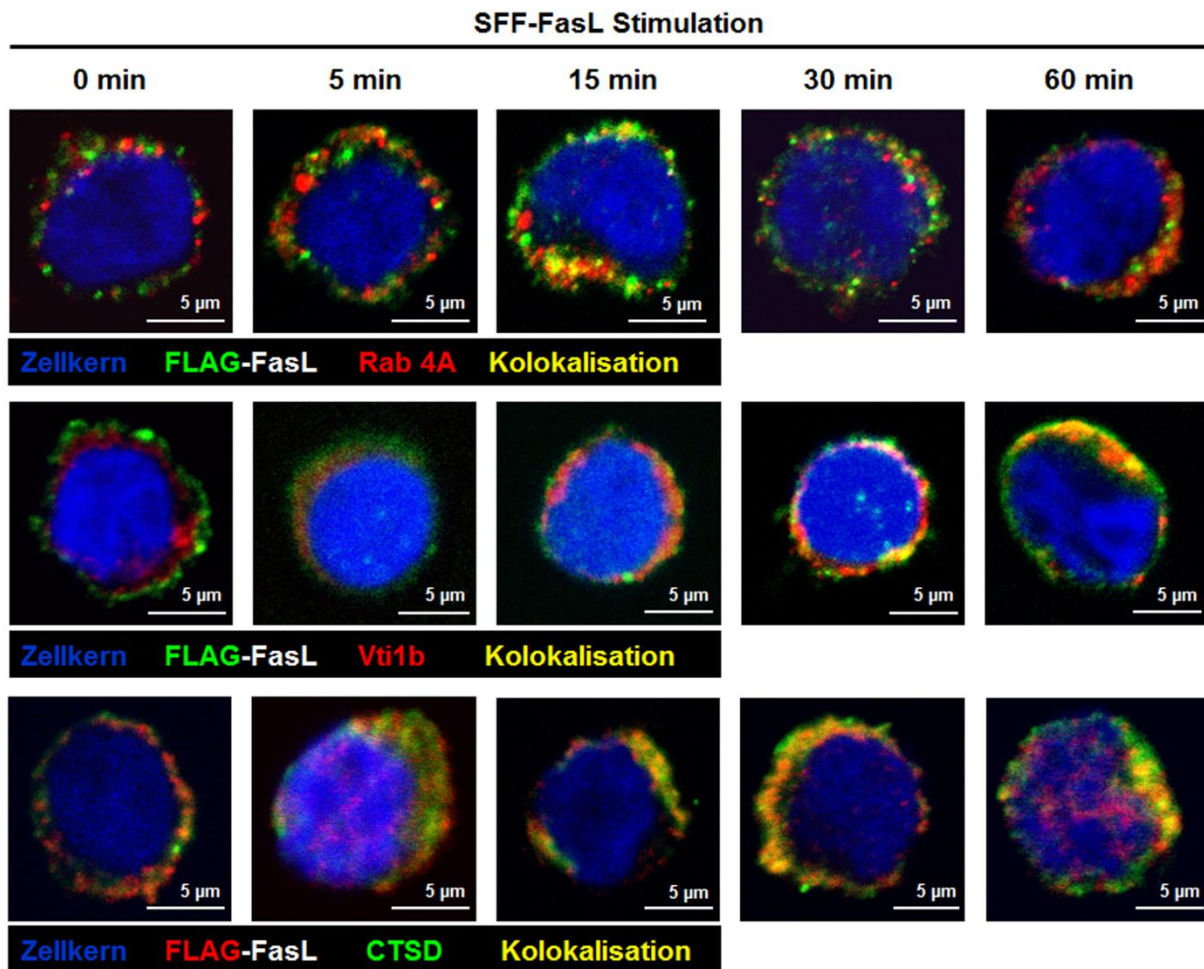


Abbildung 9: Kolokalisation zwischen dem SFF-FasL-CD95-Komplex und Rab 4A, Vti1b oder CTSD. Konfokale LSM-Aufnahme der partiellen Kolokalisation (gelb) zwischen FLAG-FasL (grün) und Rab 4A (rot) oder Vti1b (rot) bzw. FLAG-FasL (rot) und CTSD (grün) in 100 ng/ml SFF-FasL-stimulierten SKW6.4 Zellen.

3.3.3 Durchflusszytometrische Quantifizierung der SFF-FasL-induzierten Internalisierung des CD95-Rezeptors

Neben den Immunfluoreszenzanalysen wurde die Internalisierung des CD95-Rezeptors in den von Herrn Dr. Bertsch und Frau Tatarnikova (UKSH, Campus Kiel) durchgeführten Versuchen durchflusszytometrisch nachgewiesen. Hierfür wurde der Rezeptor von nicht-permeabilisierten, auf Eis synchronisierten HuT78 Zellen über den FLAG-Tag des Fas Liganden fluoreszenzmarkiert. Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, kam es an der Zelloberfläche zu einer kontinuierlichen Verringerung der Rezeptordichte sowie einer damit einhergehenden Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (roter Kurvenverlauf).

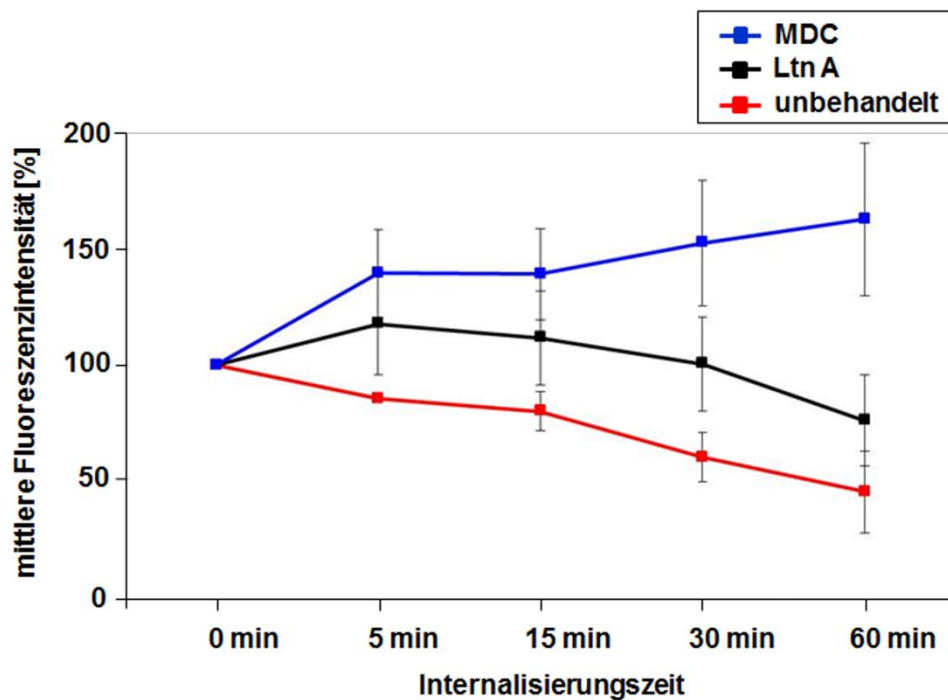


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der CD95-Internalisierung. Die Stimulation von HuT78 Zellen mit 0,5 µg/ml SFF-FasL führte aufgrund der Internalisierung des CD95-Rezeptors zu einer zeitabhängigen Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit 5 mM Latrunculin A (Ltn A) oder 100 mM Monodansylcadaverin (MDC) verringerte bzw. blockierte die Internalisierung des fluoreszenzmarkierten Ligand-Rezeptorkomplexes. Dargestellt ist für jeden Internalisierungszeitpunkt der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung (durchgeführt von A. Tatarnikova und U. Bertsch).

Diese Abnahme der Zelloberflächen-Fluoreszenz weist auf die Internalisierung des CD95-Rezeptors hin. Im Gegensatz dazu blockierte die Vorbehandlung von HuT78 Zellen mit den Endozytoseinhibitoren Monodansylcadaverin (MDC) oder Latrunculin A (Ltn A) die Internalisierung des CD95-Rezeptors. Ltn A inhibiert durch die Bindung von monomerem G-Aktin die Polymerisierung von Aktinfilamenten [108]. Wie anhand der schwarzen Kurve sichtbar ist, reduzierte Ltn A die Endozytose des fluoreszenzmarkierten Ligand-Rezeptorkomplexes. Zusätzlich wurde die Clathrin-abhängige Endozytose durch MDC blockiert. Die MDC-vermittelte selektive Inhibition der membrangebundenen Transglutaminasen verhindert die Bildung von Clathrin-ummantelten Vesikeln [109]. Entsprechend des blauen Kurvenverlaufs resultierte die Behandlung mit MDC in einer vollständigen Inhibition der CD95-Internalisierung. Darüber hinaus war eine deutliche Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität zu beobachten. Eine mögliche Ursache hierfür ist die durch die Bildung von CD95-Clustern herbeigeführte verstärkte Akkumulation von

Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörpern. Zusammenfassend ließ sich anhand dieser Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz von Ltn A oder MDC die CD95-Internalisierung inhibiert bzw. blockiert wurde. In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenzanalysen wurde somit durch drei unterschiedliche Methoden die SFF-FasL-induzierte Internalisierung des CD95-Rezeptors eindeutig nachgewiesen. Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit wurde der rekombinante Fas Ligand für die magnetische Isolierung von CD95-Rezeptosomen verwendet.

3.4 Charakterisierung von CD95-Rezeptosomen

Die zu unterschiedlichen Internalisierungszeiten isolierten CD95-enthaltenden Endosomen (CD95-Rezeptosomen) erlauben eine zeitabhängige Analyse der Rekrutierung von Adaptorproteinen. Mit Hilfe einer matrixfreien Magnetkammer der Firma Hock (Kiel), wurde die spezifische Anreicherung von morphologisch und funktionell intakten CD95-Rezeptosomen ermöglicht. Grundlage hierfür war die extrazelluläre Markierung des membranständigen CD95-Rezeptors durch Fas Ligand gebundene Protein G MicroBeads (Miltenyi Biotec). Der auf diese Weise magnetisch markierte Ligand-Rezeptorkomplex wurde in seiner nativen Membrenumgebung zu unterschiedlichen Internalisierungszeiten isoliert. Anhand der Western-Blot Analyse der magnetischen (CD95-Rezeptosomen) und nicht-magnetischen Fraktionen wurde die Rekrutierung des DISC nachgewiesen (Abb. 11). Der CD95-Rezeptor war in allen magnetischen Fraktionen gleichmäßig angereichert. Im Vergleich zu der mitgeführten Lysatprobe und den nicht-magnetischen Fraktionen spricht die verstärkte Bandenintensität für eine erfolgreiche Isolierung der CD95-Rezeptosomen. Zusätzlich zum Rezeptor wurde auch die Rekrutierung der Adaptorproteine FADD und Caspase 8 analysiert. Die Ligand-induzierte Multimerisierung des CD95-Rezeptors ermöglicht die Rekrutierung und Bindung des zytosolischen Adaptorproteins FADD durch eine Konformationsänderung seiner intrazellulären Todesdomänen [110]. Nach einer Internalisierungszeit von 5 Minuten war der zu beobachtende Anstieg in der Bandenintensität auf eine verstärkte Rekrutierung von FADD zurückzuführen. Darüber hinaus war in dem Zeitraum zwischen 15 und 60 Minuten eine deutliche Doppelbande zuerkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert der von Wang und Kollegen beschriebene Mechanismus der Granzym M-vermittelten Spaltung von FADD nach Methionin 178. Die gespaltene

Form des Adaptorproteins FADD führt zu einer verstärkten Oligomerisierung und erleichtert damit die Todeseffektordomän-vermittelte Rekrutierung und Bindung von Pro-Caspase 8 Molekülen [111]. Im Vergleich zur nicht-magnetischen Fraktion kam es während der Internalisierung und DISC-Bildung zu einer frühen Rekrutierung der Pro-Caspase 8 (41/43 kDa). Durch die autoproteolytische Spaltung und Aktivierung der Caspase 8 war bereits nach einer Internalisierungszeit von einer Minute das p18-Fragment der Caspase 8 in der magnetischen Fraktion nachweisbar.

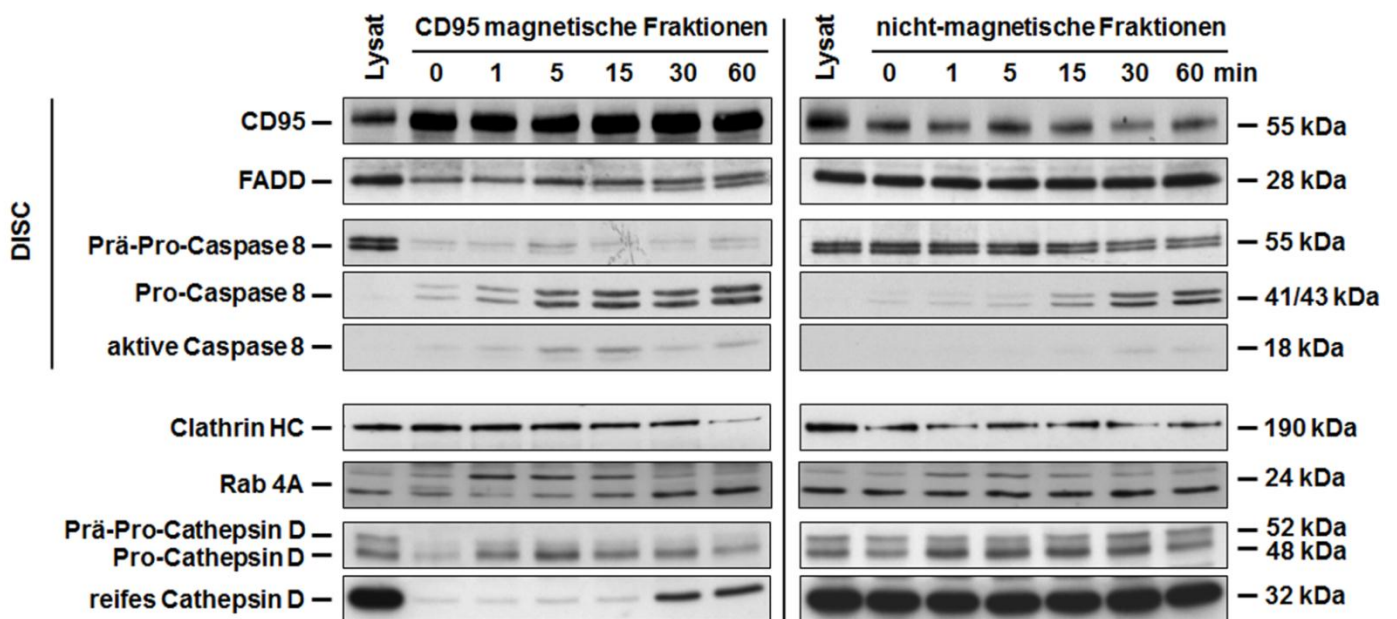


Abbildung 11: Western-Blot Analyse der magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen. Magnetische Isolierung von CD95-enhaltenden Membranstrukturen aus SKW6.4 Zellen nach verschiedenen Internalisierungszeiten. Durch die anschließende Western-Blot Analyse mit den in der Abbildung genannten Antikörpern, wurden parallel zur DISC-Bildung auch Markerproteine der Internalisierung (Clathrin HC) sowie spezifischer Kompartimente (Rab 4A, Cathepsin D) in den CD95-Rezeptosomen nachgewiesen.

Für eine weitere detaillierte Charakterisierung von CD95-Rezeptosomen wurden neben der DISC-Rekrutierung auch Markerproteine der Internalisierung bzw. spezifischer Kompartimente nachgewiesen. Die Ergebnisse der Western-Blot Analyse zeigten eine zeitabhängige Abnahme der Clathrin HC (clathrin heavy chain) in den magnetischen Fraktionen (Abb. 11). Damit unterstreicht dieses Ergebnis die Clathrin-vermittelte Internalisierung des CD95-Rezeptors. Die Endozytose des Ligand-Rezeptorkomplexes führt zu einer vesikulären Fusion mit Rab 4A-positiven, frühen Endosomen. Die Western-Blot Analyse mit einem polyklonalen anti-Rab 4A

Antikörper zeigte eine deutliche Doppelbande. Das frühe Auftreten der oberen Rab 4A-Signale in den magnetischen Fraktionen könnte auf eine Prenylierung hindeuten [112]. Diese post-translationale Modifikation ermöglicht eine Membranassoziation des Proteins, wodurch es vor allem in den frühen Isolierungszeitpunkten sichtbar war. Im Gegensatz dazu könnten die nach 30 und 60 Minuten auftretenden unteren Signale durch nicht-prenylierte Rab 4A Moleküle hervorgerufen worden sein. Zu diesen späten Internalisierungszeiten haben sich durch Fusionsprozesse multivesikuläre Kompartimente gebildet [101]. Innerhalb dieser multivesikulären Strukturen werden Rab 4A Moleküle deprenyliert, wodurch sie sich von den frühen endosomalen Membranen ablösen. Durch die Isolierung von CD95-enthaltenden Membranstrukturen ließ sich zu diesen späten Internalisierungszeiten Rab 4A in den multivesikulären Strukturen identifizieren. Der Nachweis lysosomaler Kompartimente erfolgte in der Western-Blot Analyse durch Cathepsin D. Die Abnahme der Prä-Pro- und Pro-Form von Cathepsin D in den magnetischen Fraktionen korrelierte mit einem nach 30 und 60 Minuten auftretenden signifikanten Anstieg der reifen Form. Parallel zu der Immunfluoreszenzanalyse in Abbildung 9 deutet dieses Ergebnis auf eine vesikuläre Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen und Cathepsin D-enthaltenden Kompartimenten hin. Diese Fusionsprozesse sind ein weiterer Beweis für die Internalisierung und den intrazellulären Transport des CD95-Rezeptors.

3.5 Biphasische Aktivierung der A-SMase in CD95-Rezeptosomen

Der Nachweis einer enzymatisch aktiven A-SMase in CD95-Rezeptosomen erfolgte über die zuvor beschriebene magnetische Isolierung von CD95-enthaltenden Membranstrukturen. Hierfür wurden CD95-Rezeptosomen zu unterschiedlichen Internalisierungszeiten aus SKW6.4 Zellen isoliert und durch eine A-SMase Aktivitätsmessung und Western-Blot Analyse charakterisiert. Über den Nachweis der Hydrolyse von ^{14}C -Sphingomyelin zu ^{14}C -Phosphorylcholin und Ceramid (bei einem pH-Wert von 5,0) wurde die enzymatische Aktivität der A-SMase bestimmt. Abbildung 12A zeigt repräsentativ in einem von sechs unabhängig durchgeführten Versuchen, die prozentuale Aktivierung der A-SMase in den magnetischen und

nicht-magnetischen Fraktionen. Für jeden Internalisierungszeitpunkt wurden drei Rezeptosomenpräparationen gepoolt und mittels Dreifachbestimmung im Aktivitätsassay analysiert. Die im Säulendiagramm angegebenen Standardabweichungen veranschaulichen damit die Variationsbreite der Dreifachbestimmung. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse ein signifikantes, biphasisches Aktivierungsprofil der A-SMase in den magnetischen Fraktionen. Bereits nach einer Internalisierungszeit von einer Minute kam es zu einem 53-prozentigen Anstieg der A-SMase-Aktivität. Nach 30 und 60 Minuten war sogar eine 90-prozentige Aktivitätssteigerung der A-SMase zu beobachten. Die biphasische Aktivierung der A-SMase ließ sich zudem in jedem der sechs durchgeführten Versuche eindeutig nachweisen. Das erste Aktivitätsmaximum lag jedoch nicht immer bei einer Minute, sondern vielmehr in einem Bereich zwischen 1 und 5 Minuten. Auch das zweite Aktivitätsmaximum wies Variationen auf und wurde in einem Bereich zwischen 15 und 60 Minuten in den magnetischen Fraktionen nachgewiesen. Im Vergleich zur der in Abbildung 7B dargestellten Aktivierungskinetik in SKW6.4 Lysaten war zudem ein deutlicher Unterschied in den spezifischen Aktivitäten der A-SMase zu erkennen. So lag zum Beispiel nach einer Internalisierungszeit von 60 Minuten das Aktivitätsmaximum bei 5475 pmol/mg/h. Dieser Wert war damit vier- bis fünfmal so hoch wie das Aktivitätsmaximum in stimulierten SKW6.4 Lysaten. Nach einer neunzigminütigen SSF-FasL-Stimulation lag hier die spezifische Aktivität bei 1120 pmol/mg/h. Dieser Vergleich zeigt eine wesentlich höhere Aktivität der A-SMase in den magnetischen Fraktionen als in den Lysaten und kennzeichnet damit die Funktionalität der Isolierungsmethode. Neben der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der A-SMase wurden die magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen zusätzlich durch eine Western-Blot Analyse (Abb. 12B) charakterisiert. Mit Hilfe von zwei verschiedenen anti-A-SMase Antikörpern wurde die Pro- und die aktive Form in den CD95-Rezeptosomen nachgewiesen. Mit einem Molekulargewicht von 65 kDa lag die Pro-Form etwas unter den zu erwartenden 70 kDa. Das biphasische Auftreten der Pro-Form in den magnetischen Fraktionen korrelierte mit dem A-SMase Aktivitätsprofil. Der Western-Blot mit einem polyklonalen anti-CD95 Antikörper bestätigte aufgrund seiner gleichmäßigen Bandenintensität in den magnetischen Fraktionen die einheitliche Beladung des Gels.

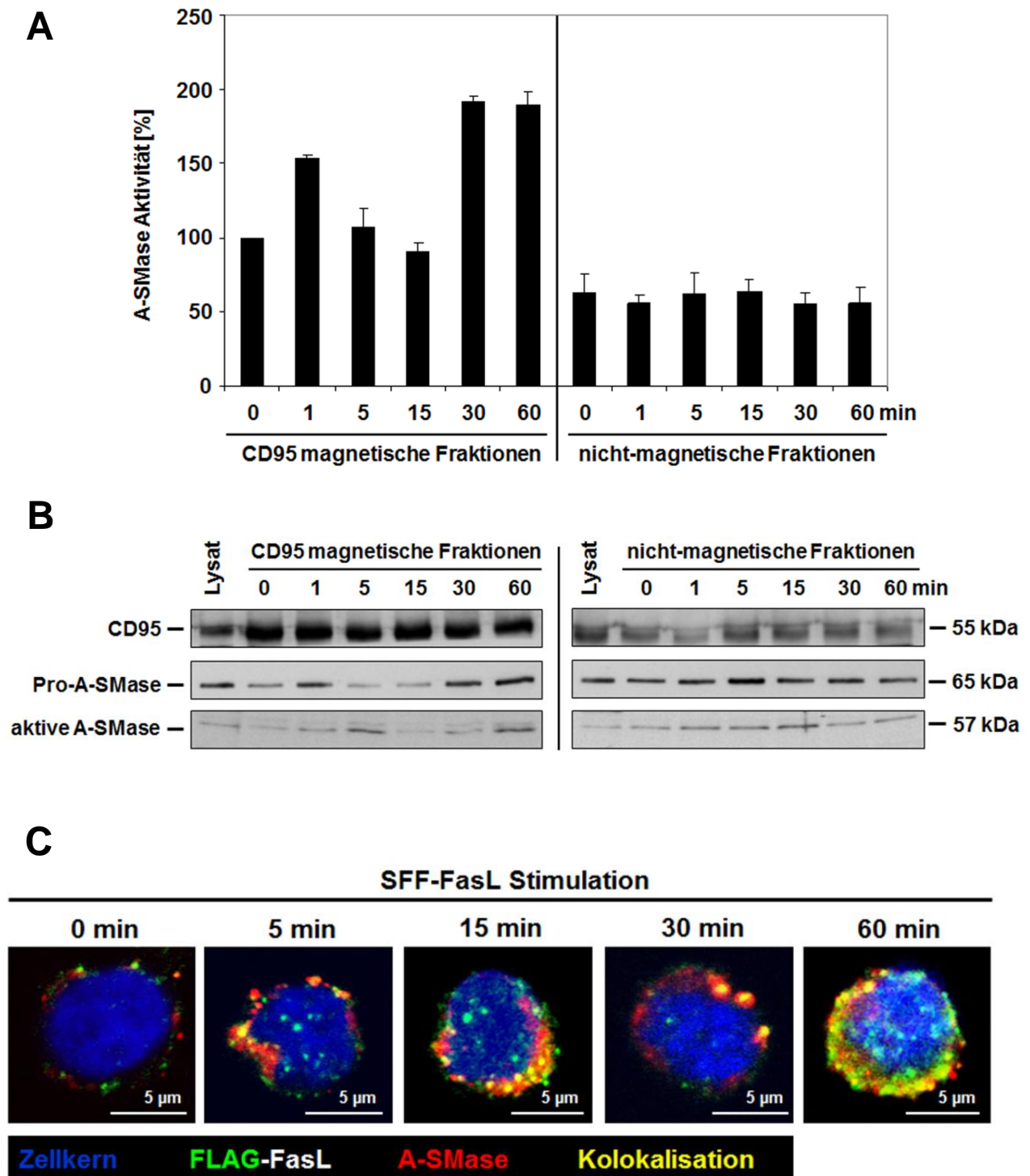


Abbildung 12: Nachweis der aktiven A-SMase in CD95-Rezeptosomen. (A) Biphasische Aktivierung der A-SMase in den magnetischen Fraktionen von SKW6.4 Zellen. Der Nachweis der A-SMase Aktivität erfolgte über die Hydrolyse von ^{14}C -Sphingomyelin zu ^{14}C -Phosphorylcholin bei einem pH-Wert von 5,0. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von sechs unabhängig durchgeführten Versuchen. Für jeden Präparationszeitpunkt wurde der Mittelwert einer Dreifachbestimmung angegeben. (B) Die Western-Blot Analysen mit einem anti-CD95 und zwei anti-A-SMase Antikörpern zeigten, dass die Pro- und aktive Form der A-SMase in den magnetischen Fraktionen vorhanden ist. (C) Konfokale LSM-Aufnahme der partiellen Kolokalisation (gelb) zwischen FLAG-FasL (grün) und A-SMase (rot) in 100 ng/ml FasL-stimulierten SKW6.4 Zellen.

Zusätzlich konnte auch das enzymatisch aktivere Spaltprodukt der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen detektiert werden. Ähnlich wie die Pro-Form besaß auch die aktive A-SMase einen biphasischen Verlauf. Das jeweils nach einer Internalisierungszeit von 5 und 60 Minuten zu beobachtende Intensitätsmaximum war im Vergleich zu dem in Abbildung 12A dargestellten Aktivitätsassay zeitlich leicht verschoben. Eine Erklärung für diese Diskrepanz der Kinetik liegt vermutlich darin, dass aufgrund der Begrenzung des Probenmaterials für die Aktivitätsbestimmung und für den in Abbildung 12B dargestellten Western-Blot kein identisches Material aus gleich synchronisierten Zellen verwendet wurde. Dennoch bestätigen diese Ergebnisse den Aktivitätsassay in Abbildung 12A. Durch das zeitlich parallele Auftreten der Pro-Form sowie durch die Detektion des proteolytischen Spaltfragments bewies auch die Western-Blot Analyse, dass eine aktive A-SMase in den Rezeptosomen enthalten ist. Zum weiteren Nachweis der Rekrutierung der A-SMase zu den CD95-Rezeptosomen wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Für die Kolokalisationsstudie in permeabilisierten SKW6.4 Zellen wurde der FLAG-Tag des Fas Liganden (grün) und die A-SMase (rot) fluoreszenzmarkiert. Die konfokale LSM-Aufnahme in Abbildung 12C zeigt zahlreiche distinkte Kolokalisationen zwischen dem internalisierten Ligand-Rezeptorkomplex und der A-SMase. In dem Zeitraum zwischen 5 und 60 Minuten weisen die gelben, punktuellen Färbungen auf eine Fusion mit A-SMase-enthaltenden Kompartimenten hin. Zusammenfassend konnte mit den Ergebnissen dieser Abbildung der Nachweis erbracht werden, dass eine enzymatisch aktive A-SMase in den CD95-Rezeptosomen angereichert ist.

3.6 Charakterisierung der biphasischen A-SMase Aktivierung

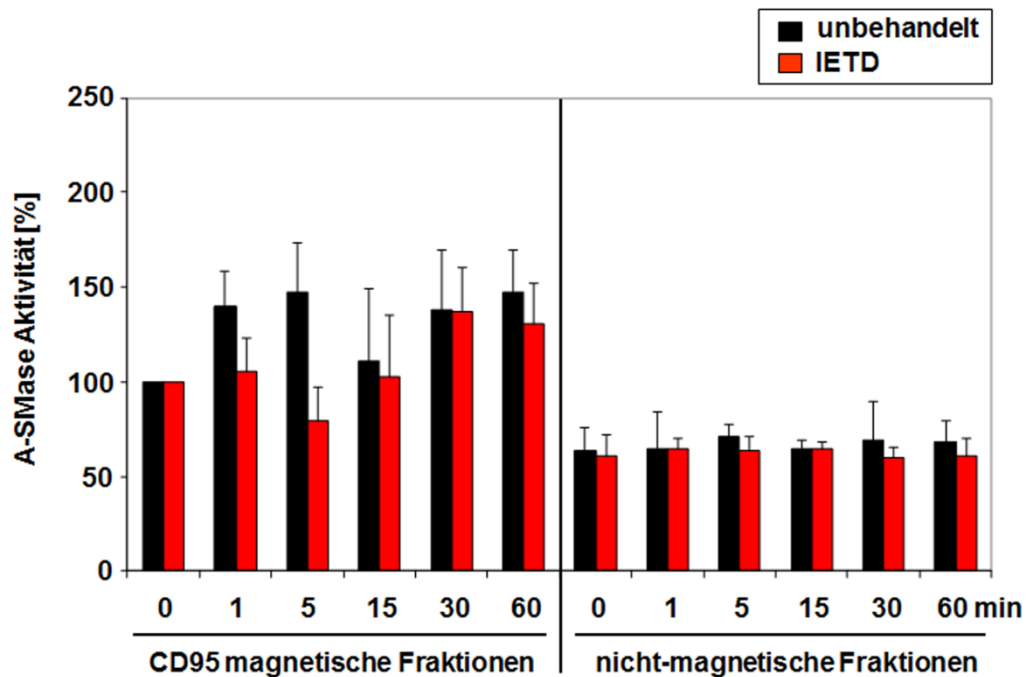
Durch drei verschiedene Methoden wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen, dass die A-SMase nicht nur in CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist, sondern auch mit einer biphasischen Kinetik aktiviert wird. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden in den nächsten Abschnitten die zwei Phasen der A-SMase Aktivierung näher charakterisiert. Entsprechend der Publikation von Grassme und Kollegen [99] lag die Vermutung nahe, dass der erste Aktivitätsanstieg mit der

Translokation der A-SMase zur äußeren Plasmamembran in Verbindung zu setzen ist. Nach der Stimulation des CD95-Rezeptors kommt es durch die Bildung des DISC zur autoproteolytischen Spaltung und Aktivierung der Caspase 8. Die aktive Form dieser Initiator-Caspase induziert über unbekannte Mediatoren die Translokation der A-SMase zur Zellmembran. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss des Caspase 8 spezifischen Inhibitors IETD auf den ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den magnetischen Fraktionen analysiert. Das zweite Aktivitätsmaximum könnte durch eine Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen und A-SMase-enthaltenden Vesikeln hervorgerufen worden sein [98]. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Internalisierung des CD95-Rezeptors durch den Dynamin-Inhibitor Dynasore blockiert.

3.6.1 IETD blockiert den ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase

Für die Charakterisierung der biphasischen A-SMase Aktivierung wurden CD95-Rezeptosomen aus IETD-behandelten SKW6.4 Zellen isoliert und mit einem A-SMase Aktivitätsassay analysiert. Das in Abbildung 13A dargestellte Aktivitätsprofil der A-SMase in unbehandelten Kontrollzellen basiert auf dem Mittelwert von vier verschiedenen Präparationen die an unterschiedlichen Tagen isoliert und vermessen wurden. Die Standardabweichungen repräsentieren die Variationsbreite der A-SMase Aktivität beim Vergleich der vier verschiedenen Präparationen untereinander. Analog zur Abbildung 12A ließ sich auch hier eine biphasische Aktivierung der A-SMase in den magnetischen Fraktionen nachweisen. Da jedoch beim Vergleich der vier verschiedenen Versuchsreihen das immer auftretende biphasische Aktivitätsprofil der A-SMase zeitlich leicht variierte, ergaben sich etwas höhere Standardabweichungen. Auch für die IETD-Behandlung der SKW6.4 Zellen wurde der Mittelwert der A-SMase Aktivität aus drei verschiedenen Experimenten aufgetragen. Im Vergleich zu der biphasischen Aktivierung der unbehandelten Kontrollzellen blockierte der Caspase 8-Inhibitor IETD den frühen Anstieg der A-SMase Aktivität in den magnetischen Fraktionen. Demgegenüber stand aufgrund der ungehinderten Internalisierung des CD95-Rezeptors ein erneuter Anstieg der A-SMase Aktivität zu den späten Internalisierungszeiten.

A



B

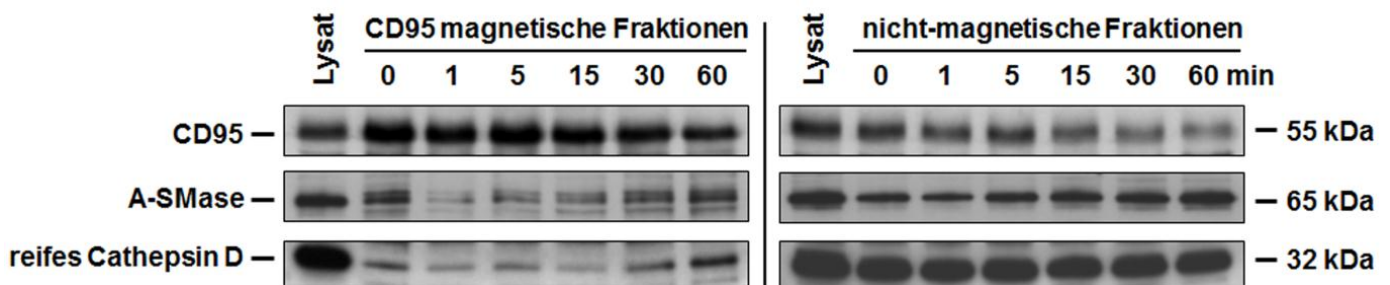


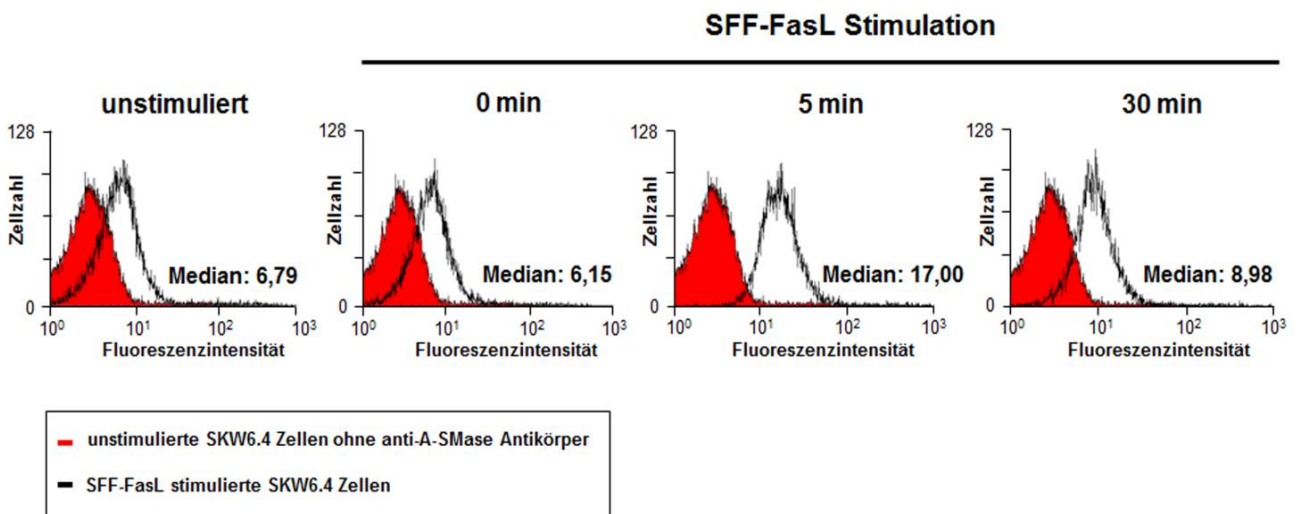
Abbildung 13: Caspase 8 Inhibition durch IETD blockiert den ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase. (A) Enzymatische Aktivität der A-SMase in den magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen aus IETD-behandelten (50 μ M) und unbehandelten SKW6.4 Zellen. Dargestellt wurde für die unbehandelte Kontrolle der Mittelwert aus vier verschiedenen Experimenten bzw. für die IETD-Behandlung der Mittelwert aus drei verschiedenen Experimenten. Die Inhibition von Caspase 8 durch IETD verhinderte den ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase. (B) Western-Blot Analyse (mit den in der Abbildung genannten Antikörpern) der magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen isoliert aus IETD-behandelten SKW6.4 Zellen. Das nach einer Internalisierungszeit von 30 und 60 Minuten erhaltene A-SMase-Signal korrelierte mit dem zweiten Aktivitätsanstieg in CD95-Rezeptosomen.

Zusätzlich zu der Aktivitätsbestimmung wurde auch hier eine Western-Blot Analyse zum Nachweis der A-SMase in den magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen aus IETD-behandelten Zellen durchgeführt (Abb. 13B). Die gleichmäßige und verstärkte Bandenintensität des CD95-Rezeptors weist neben der erfolgreichen Isolierung von CD95-Rezeptosomen auch auf eine einheitliche Beladung hin. Des Weiteren war in den späten Internalisierungszeiten der magnetischen Fraktionen ein verstärktes Signal für die A-SMase und das reife Cathepsin D zu erkennen. Dabei korrelierte die nach 30 und 60 Minuten im Western-Blot auftretende A-SMase mit einem Anstieg der enzymatischen Aktivität. Eine Diskrepanz ergab sich jedoch bei dem Vergleich zwischen dem Western-Blot und dem Aktivitätsassay für die A-SMase. Der Null-Minuten Wert in der magnetischen Fraktion wies ein deutliches Western-Blot Signal für die A-SMase auf und steht damit im Widerspruch zu der enzymatischen Aktivität. Eine mögliche Ursache liegt in der magnetischen Isolierung von CD95-Rezeptosomen. Der Null-Minuten Wert repräsentiert aktivierte, plasmamembranständige Rezeptoren die nicht internalisiert sind. Dies führt dazu, dass bei der Homogenisation Plasmamembranfragmente undefinierte Größe isoliert wurden, die sich sofort zu geschlossenen Membranvesikeln umlagern. Dabei könnten Cathepsin D und A-SMase inkorporiert worden sein und somit das deutliche Signal im Western-Blot herbeigeführt haben. Mit Ausnahme des Null-Minuten Werts korrelierte jedoch die enzymatische Aktivität der A-SMase mit dem Bandenmuster im Western-Blot und bestätigt die IETD-vermittelte Inhibition des ersten Aktivitätsanstiegs.

3.6.2 Translokation der A-SMase zur Plasmamembran

Die frühe Aktivierung der A-SMase in den CD95-enthaltenden magnetischen Fraktionen sowie deren Inhibition durch IETD sind charakteristische Anzeichen für die Translokation der A-SMase zur Plasmamembran. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der A-SMase tatsächlich mit einer Translokation einhergeht, wurde zunächst eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. In nicht-permeabilisierten SKW6.4 Zellen wurde die A-SMase an der Zelloberfläche mit einem anti-A-SMase Antikörper [92] sowie mit dem entsprechenden Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert.

A



B

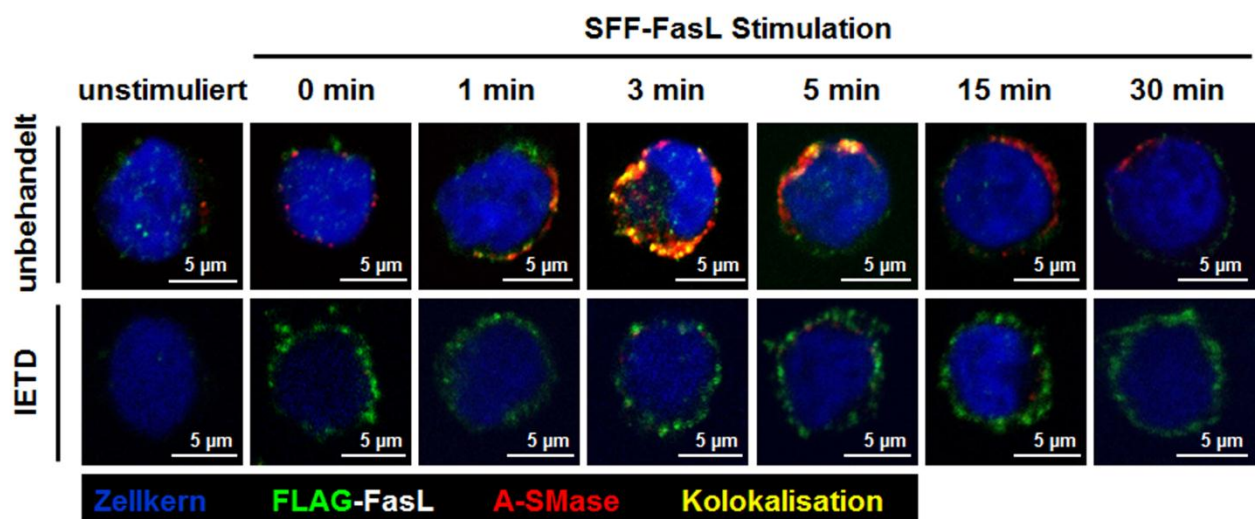


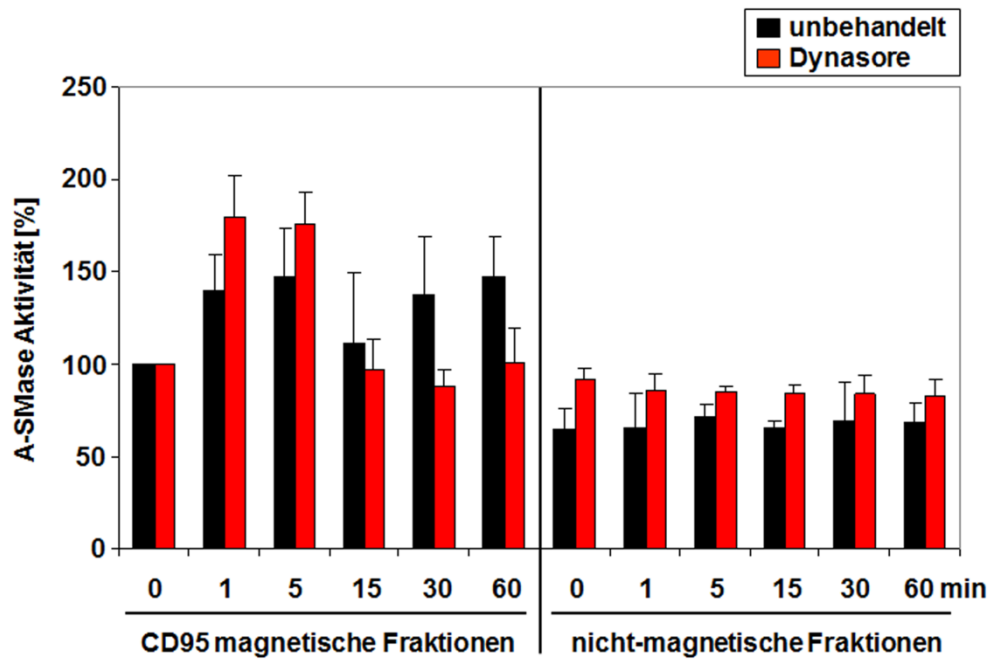
Abbildung 14: Translokation der A-SMase zur Plasmamembran. (A) Durchflusszytometrische Analyse der SFF-FasL-induzierten (100 ng/ml) A-SMase Translokation in nicht-permeabilisierten SKW6.4 Zellen. Das Histogramm zeigt die höchste mittlere Fluoreszenzintensität nach einer fünfminütigen SFF-FasL Stimulation. (B) Konfokale LSM-Aufnahme der Kolokalisation (gelb) zwischen FLAG-FasL (grün) und der A-SMase (rot) in nicht-permeabilisierten SKW6.4 Zellen. Die ein- bis fünfminütige Stimulation mit 100 ng/ml SFF-FasL führte zu einer partiellen Kolokalisation zwischen der A-SMase und dem Ligand-Rezeptorkomplex. Die Behandlung der Zellen mit 50 μ M IETD verhinderte die räumliche Assoziation beider Proteine an der Zellmembran.

Abbildung 14A zeigt repräsentativ in einem von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen, das Fluoreszenz-Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse der A-SMase Translokation. Als Kontrolle (rote Population) dienten unstimulierte Zellen, die für die Fluoreszenzfärbung nicht mit dem anti-A-SMase Antikörper inkubiert wurden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte die fünfminütige SFF-FasL Stimulation zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität sowie zu einer damit einhergehenden Verschiebung der Population (schwarz dargestellt) entlang der Abszisse. Auch der Median der Fluoreszenzverteilung war nach einer fünfminütigen SFF-FasL Stimulation am höchsten. Dieses Ergebnis lässt somit auf eine Fas Ligand-induzierte A-SMase Translokation zur äußeren Plasmamembran schließen. Neben der Durchflusszytometrie wurde die Translokation der A-SMase auch mit einer Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen. Für die Kolokalisationsstudie in nicht-permeabilisierten SKW6.4 Zellen wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper der FLAG-Tag des SFF-FasL (grün) sowie die A-SMase (rot) fluoreszenzmarkiert. Abbildung 14B zeigt in nicht mit IETD-behandelten Zellen eine Fas Ligand-induzierte Kolokalisation zwischen der A-SMase und dem Ligand-Rezeptorkomplex. Grundlage hierfür war die räumliche Assoziation zwischen dem plasmamembranständigen CD95-Rezeptor und der zur Zelloberfläche translozierten A-SMase. Darüber hinaus war in den späten Stimulationszeitpunkten eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der A-SMase zu beobachten. Zurückzuführen ist dies auf eine mögliche Sekretion der A-SMase oder einen endozytotischen Recyclingprozess. Um den Einfluss der Caspase 8 auf die Translokation der A-SMase zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Caspase 8-Inhibitor IETD vorbehandelt. Die konfokalen LSM-Aufnahmen in Abbildung 14B zeigen, dass durch die Caspase 8 Inhibition die A-SMase Translokation sowie die Kolokalisation mit dem Ligand-Rezeptorkomplex verhindert wurde. Dies hatte zur Folge, dass in nicht-permeabilisierten Zellen nur der membranständige CD95-Rezeptor fluoreszenzmarkiert war. Dieses Ergebnis zeigt, dass die SFF-FasL Stimulation eine Caspase 8-abhängige Translokation der A-SMase zur äußeren Plasmamembran induzierte. Zusammen mit der Durchflusszytometrie beweisen diese Ergebnisse eine Fas Ligand-vermittelte Translokation der A-SMase zur Plasmamembran. Zudem korrelierte die Translokation des Enzyms mit dem ersten Anstieg der A-SMase Aktivität in den CD95-entaltenden magnetischen Fraktionen.

3.6.3 Dynasore blockiert den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase

Um als nächstes den Einfluss der Inhibition der CD95-Internalisierung auf die Aktivität der A-SMase zu beurteilen, wurden SKW6.4 Zellen mit 80 μ M Dynasore behandelt. Anschließend wurden CD95-Rezeptosomen zu unterschiedlichen Internalisierungszeiten isoliert und mittels der A-SMase Aktivitätsmessung analysiert. Abbildung 15A zeigt die prozentuale Aktivität der A-SMase in den magnetischen und den nicht-magnetischen Fraktionen. Analog zur Abbildung 13A wurde als unbehandelte Kontrolle der Mittelwert aus vier verschiedenen Experimenten dargestellt. Für Dynasore wurde der Mittelwert der A-SMase Aktivität aus zwei verschiedenen Experimenten aufgetragen. Im Vergleich zu der biphasischen Aktivierung in unbehandelten SKW6.4 Zellen blockierte Dynasore den zweiten Anstieg der A-SMase Aktivität in den magnetischen Fraktionen. Die selektive Inhibition der GTPase Aktivität von Dynamin 1 und Dynamin 2 durch Dynasore verhindert die Abschnürung von endozytotischen Vesikeln von der Plasmamembran. Dies hat zur Folge, dass die Internalisierung des CD95-Rezeptors blockiert wird und er an der Zelloberfläche verbleibt. Des Weiteren war der Mittelwert des ersten Aktivitätsmaximums in Dynasore-behandelten Zellen höher als in unbehandelten Zellen. Da Dynasore sämtliche endozytotische Prozesse blockiert, kam es vermutlich zu einer Akkumulation der A-SMase an der Plasmamembran. Die Ergebnisse des Aktivitätsassays wurden anschließend durch eine Western-Blot Analyse bestätigt (Abb. 15B). Die A-SMase wie auch das reife Cathepsin D zeigten in den magnetischen Fraktionen die stärkste Bandenintensität nach 5 Minuten. Das jeweils nach einer Internalisierungszeit von 30 und 60 Minuten zu erwartende Intensitätsmaximum war durch die Behandlung der Zellen mit Dynasore nur noch schwach zu detektieren. Damit unterstreichen die Ergebnisse, dass die Internalisierung des CD95-Rezeptors für den zweiten Anstieg der A-SMase Aktivität in den CD95-Rezeptosomen notwendig ist.

A



B

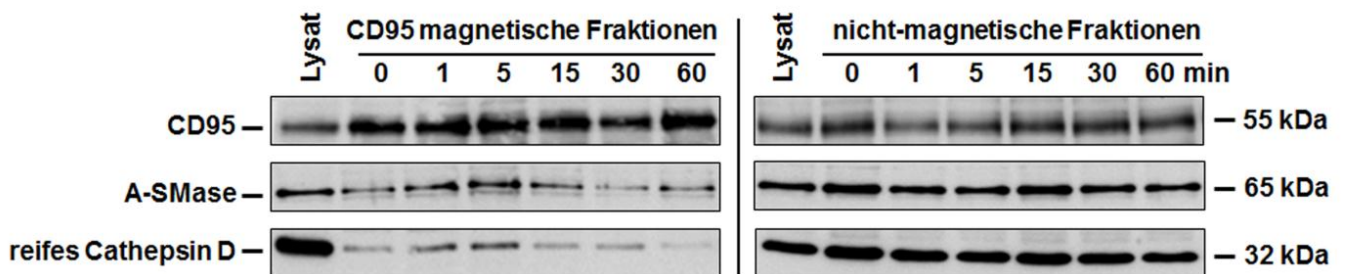


Abbildung 15: Dynasore verhindert den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase. (A) Vergleich der A-SMase Aktivität in den magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen von 80 μ M Dynasore-behandelten und unbehandelten SKW6.4 Zellen. Aufgetragen wurde für die unbehandelte Kontrolle der Mittelwert aus vier verschiedenen Experimenten bzw. für Dynasore der Mittelwert aus zwei verschiedenen Experimenten. Dynasore blockierte den zweiten Anstieg der A-SMase Aktivität in den CD95-Rezeptosomen. (B) Western-Blot Analyse der magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen isoliert aus Dynasore-behandelten SKW6.4 Zellen. Die Western-Blot Analyse mit einem anti-CD95, anti-A-SMase und einem anti-Cathepsin D Antikörper zeigte, dass bei einer gleichmäßigen Bandenintensität des CD95-Rezeptors, die A-SMase wie auch das reife Cathepsin D nur schwach zu den späten Internalisierungszeiten zu detektieren war.

3.6.4 Dynasore reduziert die Apoptose in SFF-FasL-stimulierten SKW6.4 Zellen

Die subzelluläre Lokalisation des CD95-Rezeptors spielt eine wichtige Rolle bei der Entscheidung einer Zelle entweder einen pro-apoptotischen oder einen proliferativen Signalweg einzuleiten. Die Induktion der Apoptose erfordert die Internalisierung des CD95-Rezeptors in Typ-I Zellen [52]. Im Gegensatz dazu wird eine MAPK- und NF- κ B-vermittelte Proliferation nur durch einen plasmamembranständigen Rezeptor ermöglicht [56]. Durch den Einsatz von Dynasore wurde dieser zentrale Regulationsmechanismus des CD95-Rezeptors auch in Fas Ligand-stimulierten SKW6.4 Zellen bestätigt. Hierfür wurde die SFF-FasL-induzierte frühe Apoptose durch eine Annexin V-FITC-Färbung zwischen unbehandelten Kontrollzellen und Dynasore-behandelten Zellen durchflusszytometrisch verglichen. Für das in Abbildung 16 abgebildete Säulendiagramm wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von unstimulierten Kontrollzellen die nicht mit Dynasore behandelt waren auf 1 gesetzt. Bezogen auf diese Kontrollzellen wurde der SFF-FasL-induzierte Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität in Dynasore-behandelten und unbehandelten Zellen berechnet und dargestellt. Im Vergleich zu den auf 1 gesetzten unstimulierten Kontrollzellen bewirkte die sechsstündige SFF-FasL Stimulation in Dynasore-unbehandelten Zellen einen starken Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität. Ohne die Behandlung mit Dynasore führt die Bindung des trimerisierten Fas Liganden zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose des Rezeptors. Über eine verstärkte DISC-Rekrutierung kommt es zu einer Amplifizierung des extrinsischen Todessignals sowie zur Induktion der Apoptose. Eine durch Dynasore-vermittelte Internalisierungsblockade des CD95-Rezeptors reduzierte dagegen die Anzahl der Annexin V-positiven Zellen und verringerte damit die mittlere Fluoreszenzintensität. Dies bestätigt, dass die Internalisierung des CD95-Rezeptors eine wichtige Komponente für die Induktion der Fas Ligand-vermittelten Apoptose darstellt.

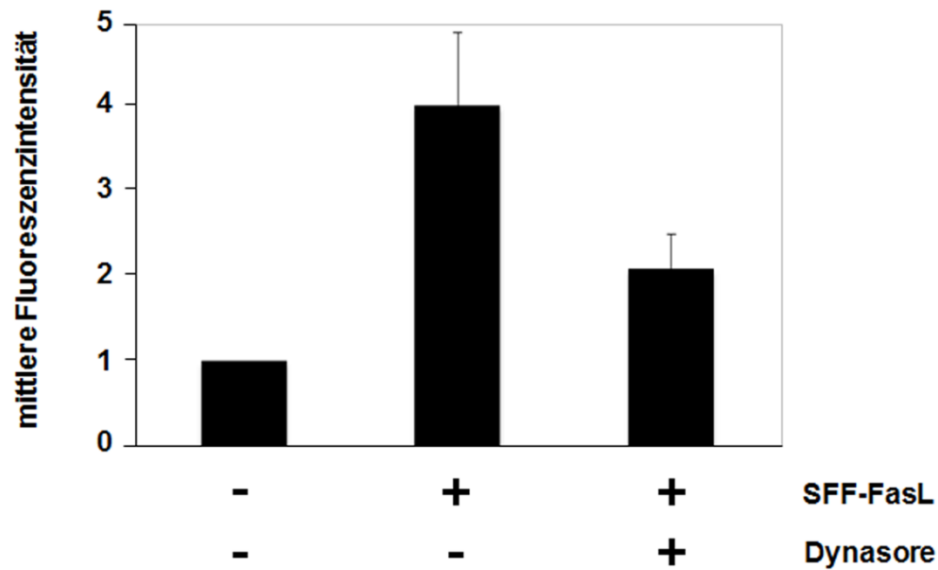


Abbildung 16: Dynasore reduziert den SFF-FasL-vermittelten Anstieg der Annexin V-positiven Zellen. Durchflusszytometrische Analyse Annexin V-FITC gefärbter SKW6.4 Zellen. Entsprechend der Abbildung wurden die Proben die mit einem Plus (+) gekennzeichnet sind für sechs Stunden mit 100 ng/ml SFF-FasL stimuliert bzw. mit 80 μ M Dynasore behandelt. Die Proben die mit einem Minus (-) markiert sind blieben unstimuliert bzw. wurden nicht mit Dynasore behandelt. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen (unstimuliert und nicht mit Dynasore behandelt) wurde auf 1 gesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde der SFF-FasL-induzierte Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität in Dynasore-behandelten und nicht-behandelten Zellen berechnet und als Säulendiagramm dargestellt. Im Vergleich zu SFF-FasL-stimulierten Zellen die nicht mit Dynasore behandelt wurden reduzierte die zusätzliche Behandlung mit Dynasore (80 μ M) die mittlere Fluoreszenzintensität der Annexin V-FITC gefärbten Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei verschiedenen Experimenten.

3.7 DEVD verhindert den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase

Der Einsatz spezifischer Inhibitoren ermöglichte die Charakterisierung der biphasischen Aktivierung der A-SMase in CD95-Rezeptosomen. Wie in den vorhergehenden Kapiteln dargestellt wurde, blockierte die Dynasore-vermittelte Inhibition der CD95-Internalisierung den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase. Der Caspase 8-Inhibitor IETD verhinderte dagegen die frühe Aktivierung und Translokation der A-SMase zur Zelloberfläche. Ausgehend von den Vorbefunden zur Funktion der Effektor-Caspase 7 bei der Aktivierung der A-SMase in TNF-R1-Rezeptosomen [98], sollte im nächsten Abschnitt eine mögliche Rolle von

Caspase 3 oder Caspase 7 in der CD95-induzierten A-SMase Aktivierung mittels des Inhibitors DEVD untersucht werden. Ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen wurden aus DEVD-behandelten SKW6.4 Zellen CD95-Rezeptosomen isoliert und in einem A-SMase Aktivitätsassay analysiert (Abb. 17). Als unbehandelte Kontrolle wurde wie in den Abbildungen 13A und 15A der Mittelwert aus vier verschiedenen Experimenten aufgetragen. Auch für DEVD wurde der Mittelwert der A-SMase Aktivität von vier verschiedenen Experimenten berechnet und im Säulendiagramm mit Standardabweichungen dargestellt. Im Vergleich zu Zellen die nicht mit DEVD behandelt wurden, bewirkte die Inhibition der Caspase 3 und 7 Aktivität einen deutlichen Rückgang des zweiten Aktivitätsanstiegs der A-SMase in den magnetischen Fraktionen. Nach einer Internalisierungszeit von 30 bis 60 Minuten lag der Mittelwert der enzymatischen Aktivität der A-SMase auf einem ähnlichen Niveau wie in den nicht-magnetischen Fraktionen. Dieses Ergebnis lässt somit vermuten, dass in CD95-Rezeptosomen die Caspase 3 oder 7 eine entscheidende Funktion in der Aktivierung der A-SMase einnimmt.

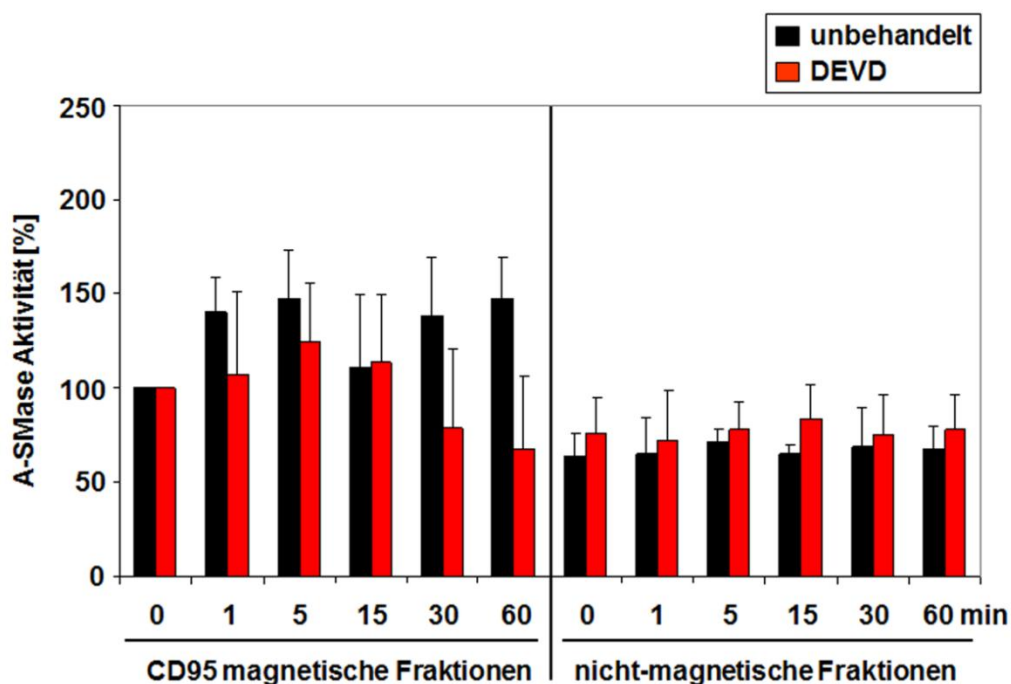


Abbildung 17: Caspase 3 und 7 Inhibition durch DEVD verhindert den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase. Vergleich der A-SMase Aktivitäten in den magnetischen und nicht-magnetischen Fraktionen von DEVD-behandelten (100 μ M) und unbehandelten SKW6.4 Zellen. Aufgetragen wurde für die unbehandelte Kontrolle sowie für DEVD der Mittelwert aus jeweils vier verschiedenen Experimenten. Die DEVD-vermittelte Inhibition der Caspase 3 und 7 verhinderte den zweiten Anstieg der A-SMase Aktivität in den CD95-Rezeptosomen.

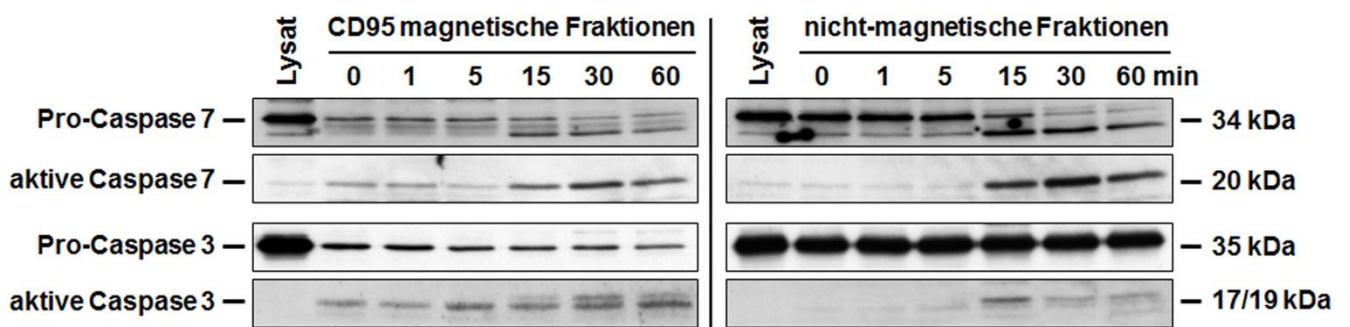
3.8 Nachweis der aktiven Caspase 3 und 7 in CD95-Rezeptosomen

3.8.1 Vergleich der Caspase 3 und 7 Aktivierung zwischen CD95- und TNF-R1-Rezeptosomen

Die DEVD-vermittelte Inhibition des zweiten Aktivitätsanstiegs wurde als Anlass genommen, die Bedeutung der Caspase 3 und 7 in der A-SMase Aktivierung näher zu charakterisieren. Da DEVD sowohl Caspase 3 als auch Caspase 7 inhibiert konnte keine Aussage getroffen werden, welches der beiden Enzyme für die A-SMase Aktivierung verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde in einer Western-Blot Analyse das zeitliche Auftreten der aktiven Caspase 3 und 7 analysiert. In den magnetischen wie auch in den nicht-magnetischen Fraktionen zeigte sich, dass die Abnahme der Pro-Caspase 7 mit einer Zunahme der aktiven Caspase 7 einhergeht (Abb. 18A). Zudem korrelierte das Intensitätsmaximum der aktiven Caspase 7 mit dem zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase nach einer Internalisierungszeit von 30 Minuten. Dem gegenüber steht Caspase 3, die in der Pro- und aktiven Form in allen magnetischen Fraktionen identifiziert werden konnte. Damit unterscheidet sich dieses Ergebnis von dem aus HeLa Zellen isolierten TNF-R1-Rezeptosomen (Abb. 18B) [98]. Weder die Pro-Form noch die aktive Form der Caspase 3 konnte in den TNF-R1 magnetischen Fraktionen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Caspase 7 in den TNF-R1-Rezeptosomen ein ähnliches Verhalten wie in den CD95-Rezeptosomen. Die mit zunehmender Stimulationszeit zu beobachtende Abnahme der Pro-Form korrelierte mit einem Anstieg der aktiven Form. Die aktive Caspase 7 trat jedoch im Vergleich zu den CD95-Rezeptosomen erst nach einer Internalisierungszeit von 60 Minuten in den TNF-R1-Rezeptosomen auf. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf die unterschiedlichen Zellmodelle die für die Isolierung verwendet wurden. Typ-II Zellen (HeLa) zeigen durch den intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Signalweg eine verspätete Aktivierung der Effektor-Caspase 7. Zusammenfassend zeigte sich, dass mit Hilfe der Western-Blot Analyse die Rekrutierung der Caspase 3 und 7 zu den CD95-Rezeptosomen nachgewiesen werden konnte. Neben der Pro-Form ließ sich auch die enzymatisch aktive Form beider Caspasen in den Rezeptosomen

identifizieren. Dabei korrelierte das Auftreten der aktiven Caspase 7 mit dem zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen. Die aktive Caspase 3 war dagegen in allen magnetischen Fraktionen nachweisbar.

A



B

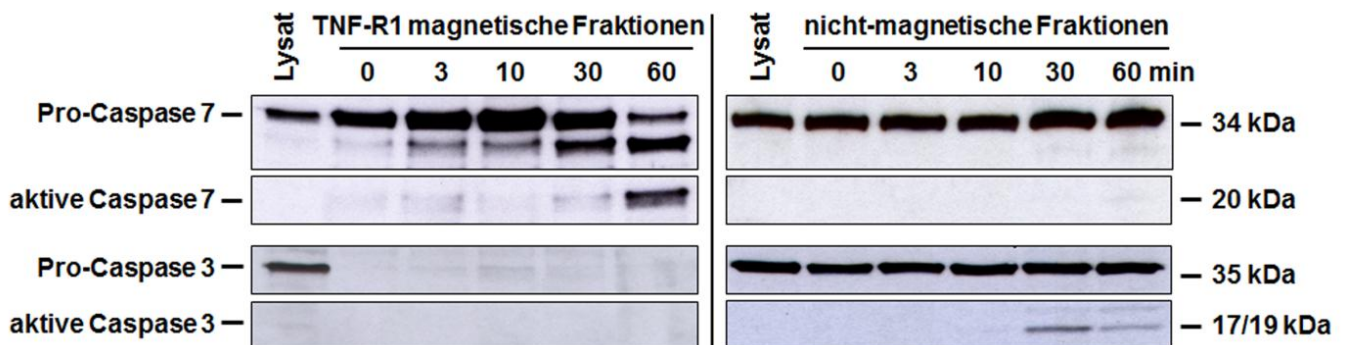


Abbildung 18: Caspase 3 und 7 Aktivierung in CD95- und TNF-R1-Rezeptosomen. (A) Western-Blot Analyse der CD95-Rezeptosomen mit den in der Abbildung genannten Antikörpern. Magnetische und nicht-magnetische Fraktionen wurden aus SKW6.4 Zellen isoliert. Verglichen mit der aktiven Caspase 3, die in allen magnetischen Fraktionen nachweisbar war, trat die aktive Caspase 7 nach einer Internalisierungszeit von 15 bis 30 Minuten auf. (B) Western-Blot Analyse der TNF-R1-Rezeptosomen isoliert aus HeLa Zellen. Im Vergleich zu der nach 60 Minuten auftretenden aktiven Caspase 7, war die aktive Caspase 3 nicht in den magnetischen Fraktionen zu detektieren. Die Daten der TNF-R1-Rezeptosomen entstammen der Publikation von Edelmann und Kollegen [98].

3.8.2 Kolokalisation der Caspasen 3 und 7 mit dem internalisierten Ligand-Rezeptorkomplex

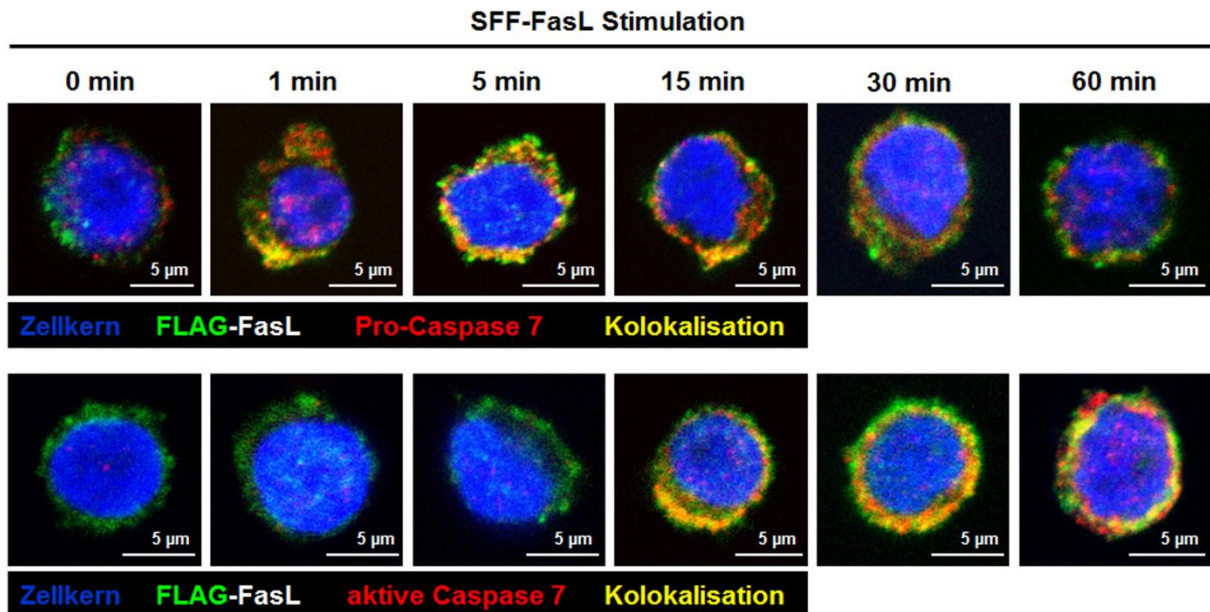
Um eine Kolokalisation zwischen dem Ligand-Rezeptorkomplex und Caspase 3 oder 7 in permeabilisierten Zellen nachzuweisen wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Auf Eis synchronisierte SKW6.4 Zellen wurden für die in der Abbildung 19 angegebenen Zeitpunkte mit 100 ng/ml SFF-FasL stimuliert. Nach der Permeabilisierung der Zellen wurde der FLAG-Tag des Fas Liganden (grün) sowie die jeweilige Caspase (rot) mit Hilfe spezifischer Antikörper fluoreszenzmarkiert. Die konfokalen LSM-Aufnahmen zeigten nach einer ein- bis fünfzehnminütigen SFF-FasL Stimulation eine partielle Kolokalisation zwischen der Pro-Caspase 7 und dem internalisierten Ligand-Rezeptorkomplex (Abb. 19A). Nach einer Stimulationszeit von 15 bis 30 Minuten war zudem eine Kolokalisation mit der aktiven Form der Caspase 7 zu beobachten. Damit stehen diese LSM-Aufnahmen in Übereinstimmung mit der Western-Blot Analyse in Abbildung 18A und bestätigen das Auftreten einer aktiven Caspase 7 in den CD95-Rezeptosomen. Des Weiteren war zu allen Stimulationszeiten zahlreiche Kolokalisationen zwischen dem internalisierten Ligand-Rezeptorkomplex und der Pro- und aktiven Form der Caspase 3 zu erkennen (Abb. 19B). Wie bei der Western-Blot Analyse beweisen diese Ergebnisse, dass auch eine aktive Caspase 3 in den CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist.

3.9 Interaktion zwischen A-SMase und Caspase 3 und 7

3.9.1 Ko-Immunpräzipitation

Die Ergebnisse der bisherigen Experimente zeigten, dass parallel zu der biphasisch aktivierten A-SMase auch eine aktive Caspase 3 und 7 in den CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist. Um im nächsten Abschnitt eine direkte Interaktion beider Proteine nachzuweisen wurde eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt (Abb. 20). Hierfür wurde die endogene A-SMase aus HeLa Zellen immunpräzipitiert und anschließend deren möglichen Interaktionspartner in der Western-Blot Analyse identifiziert.

A



B

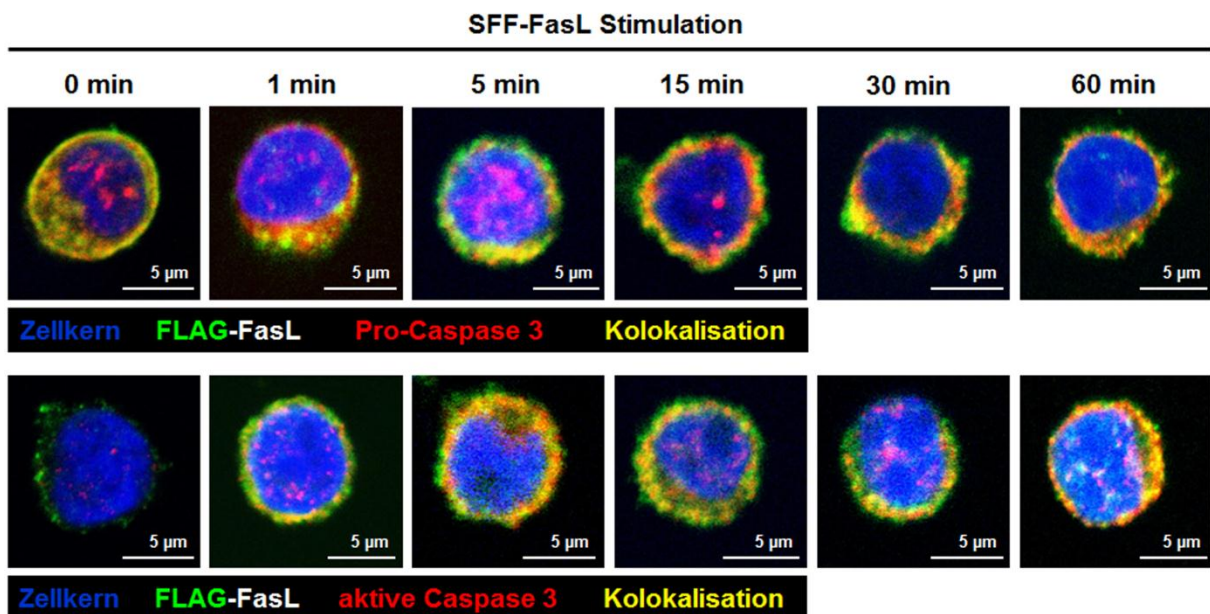


Abbildung 19: Auftreten einer aktiven Caspase 3 und 7 in den CD95-Rezeptosomen: (A) Konfokale LSM-Aufnahme der partiellen Kolokalisation (gelb) zwischen dem FLAG-FasL (grün) und der Pro- und aktiven Caspase 7 (rot) in 100 ng/ml stimulierten SKW6.4 Zellen. (B) Immunfluoreszenzanalyse zwischen dem FLAG-FasL (grün) und der Pro- und aktiven Caspase 3 (rot). Die Stimulation mit 100 ng/ml SFF-FasL führte zu einer partiellen Kolokalisation (gelb) in SKW6.4 Zellen.

Aus unstimulierten sowie aus Fas Ligand-stimulierten HeLa Zellen konnten konstante Mengen an A-SMase immunpräzipitiert werden. Mit einem Molekulargewicht von 65 kDa lag die immunpräzipitierte A-SMase auf der gleichen Höhe wie im Lysat. Darüber hinaus wurden als Kontrolle Protein G MicroBeads mitgeführt, die nicht mit dem anti-A-SMase Antikörper (Abcam) gekoppelt waren. Das Fehlen einer entsprechenden Bande in den Beadkontrollen in unstimulierten sowie in stimulierten HeLa Zellen wies auf ein spezifisches Signal für die immunpräzipitierte A-SMase hin. Da mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) auch die Bindungspartner der A-SMase präzipitiert werden können, lässt sich diese Methode als Nachweis für eine mögliche Caspaseinteraktion verwenden. In der Western-Blot Analyse in Abbildung 20 war für die Prä-Pro-Form der Caspase 8 mit einem Molekulargewicht von 55 kDa kein Signal zu identifizieren. Die beiden sichtbaren, mit einem Sternchen gekennzeichneten Banden waren unspezifische Signale, die nicht das gleiche Laufverhalten zeigten wie die Prä-Pro-Caspase 8 im Lysat. Zudem lag die untere unspezifische Bande auf der gleichen Höhe wie die Antikörperkontrolle und kennzeichnete damit die schwere Kette des zur IP verwendeten anti-A-SMase Antikörpers. Neben der Prä-Pro- war auch die Pro-Form der Caspase 8 nicht im Western-Blot zu detektieren. Vor diesem Hintergrund belegen beide Ergebnisse, dass weder zu den frühen noch zu den späten Stimulationszeiten mit dem Fas Ligand eine direkte Interaktion zwischen der Caspase 8 und der A-SMase auftrat. Dem gegenüber steht ein deutliches Signal für die Pro- und aktive Caspase 7 in dem IP-Material der A-SMase. Neben einer zeitabhängigen Abnahme der Pro-Form war auch eine Zunahme der aktiven Caspase 7 zu beobachten. Der nach einer dreißig- und sechzigminütigen SFF-FasL Stimulation zu beobachtende Anstieg korrelierte mit dem zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen. Im Gegensatz zur Caspase 7 war für die Caspase 3 nur eine zeitabhängige Abnahme der Pro-Form zu detektieren. Das fehlende Auftreten der aktiven Caspase 3 lässt somit vermuten, dass nur zwischen der Pro-Form und der A-SMase eine Interaktion besteht. Basierend auf den Ergebnissen der Ko-Immunpräzipitation ließ sich somit eine direkte Interaktion zwischen der A-SMase und der Pro-Form der Caspase 3 und 7 sowie der aktiven Caspase 7 nachweisen.

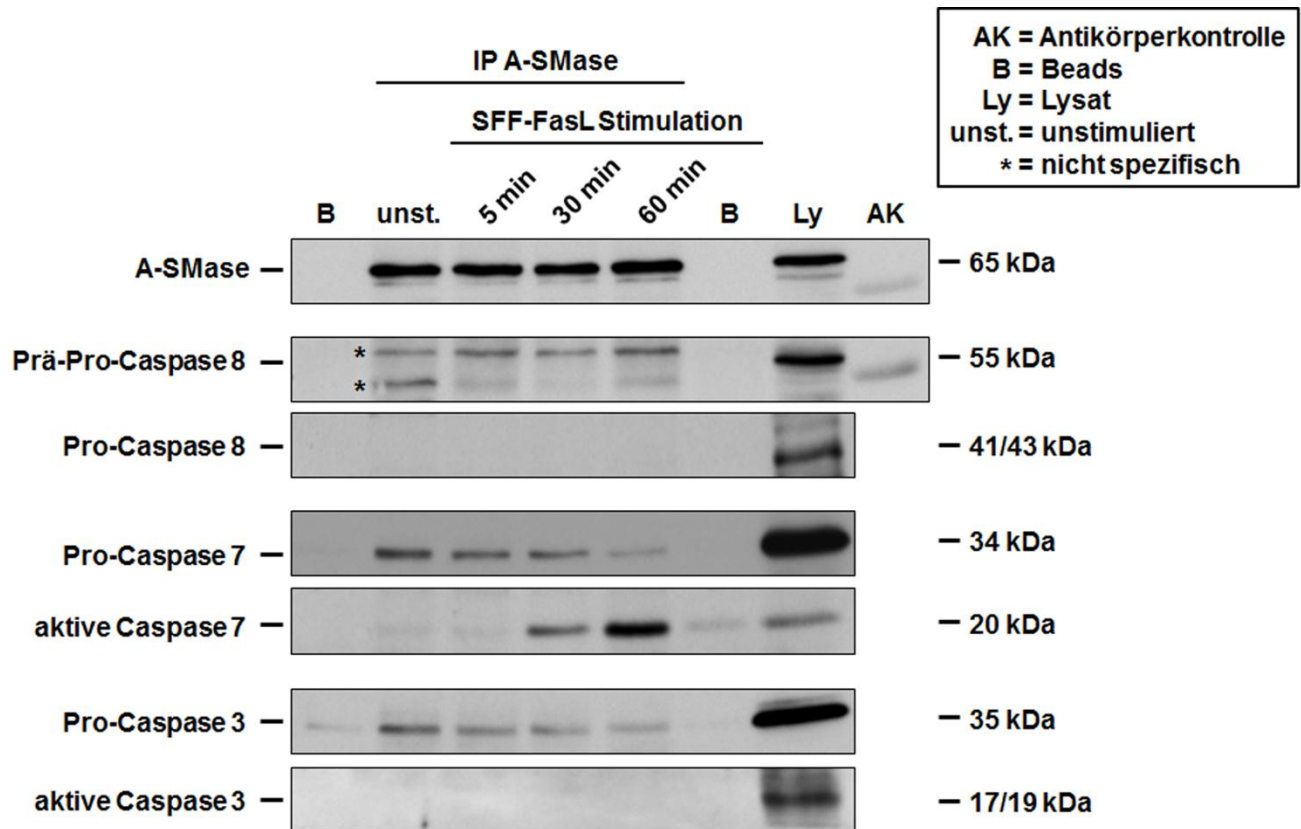


Abbildung 20: Ko-Immünpräzipitation zwischen der A-SMase und der Caspase 3 und 7. Immunpräzipitation der endogenen A-SMase aus nicht stimulierten sowie mit 100 ng/ml stimulierten HeLa Zellen. Die Western-Blot Analyse mit den in der Abbildung genannten Antikörpern zeigte eine gleichmäßige Immunpräzipitation der A-SMase sowie die Ko-Immünpräzipitation der Caspase 3, 7 und der aktiven Caspase 7.

3.9.2 Reverse Ko-Immünpräzipitation

Um die zuvor erzielten Ergebnisse der Ko-Immünpräzipitation zu bestätigen wurde im nächsten Schritt eine reverse Ko-Immünpräzipitation durchgeführt. Durch die IP der Pro-Caspase 3/7 und der aktiven Caspase 7 wurde versucht den Bindungspartner A-SMase nachzuweisen. Abbildung 21A zeigt die erfolgreiche IP der Pro-Caspase 7 in unstimulierten sowie in SFF-FasL-stimulierten HeLa Zellen. Mit einem Molekulargewicht von 34 kDa lag die immunpräzipitierte Pro-Caspase 7 auf der gleichen Höhe wie im Lysat. Dagegen war in der Western-Blot Analyse für den Interaktionspartner nur ein Signal im Zelllysat zu identifizieren. Damit zeigt dieses Ergebnis, dass mit der reversen Ko-Immünpräzipitation keine Interaktion zwischen der Pro-Caspase 7 und der A-SMase nachgewiesen werden konnte.

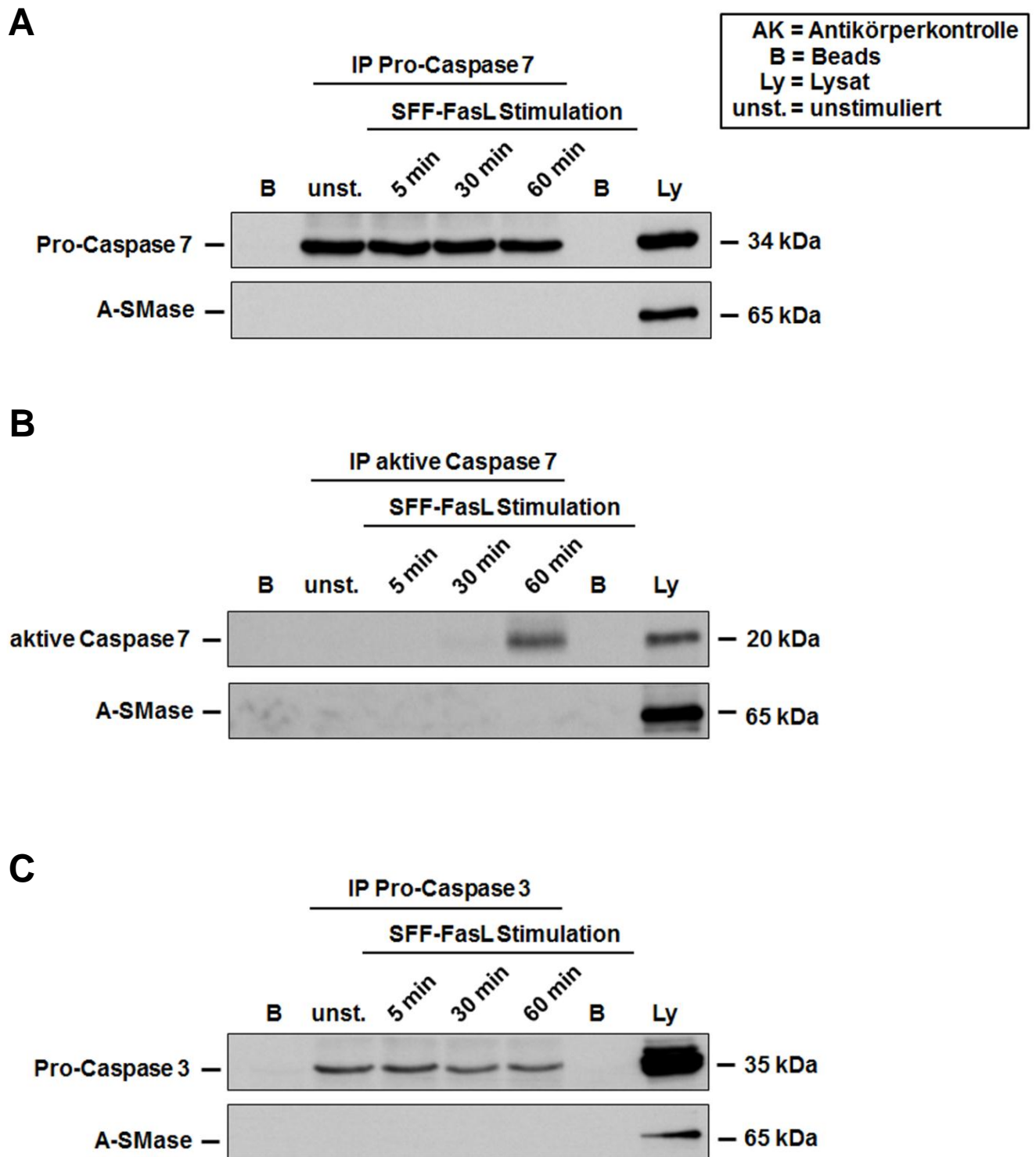


Abbildung 21: Reverse Ko-Immünpräzipitation. Immunpräzipitation der endogenen Pro-Caspase 7 (A), aktive Caspase 7 (B) und Pro-Caspase 3 (C) aus unstimulierten sowie 100 ng/ml SFF-FasL-stimulierten HeLa Zellen. Die Western-Blot Analyse mit den in der Abbildung dargestellten Antikörpern zeigte eine erfolgreiche Immunpräzipitation der jeweiligen Caspase, jedoch keine Ko-Immünpräzipitation der A-SMase.

Auch die Western-Blot Analyse mit der immunpräzipitierten aktiven Caspase 7 (Abb. 21B) und der Pro-Caspase 3 (Abb. 21C) führte zu einem ähnlichen Resultat. In beiden Fällen ließ sich jeweils die erfolgreiche Immunpräzipitation der Caspasen nachweisen, jedoch nicht die A-SMase als Interaktionspartner. Somit konnte nur durch die Immunpräzipitation der A-SMase die Interaktion mit Caspase 3/7 nachgewiesen werden.

3.9.3 Kolokalisation zwischen A-SMase und Caspase 3 / 7

Zusätzlich zu der Ko-Immunpräzipitation wurde die Interaktion zwischen der A-SMase und der Caspase 3 oder 7 in einer Kolokalisationsstudie in permeabilisierten Zellen analysiert. In unstimulierten SKW6.4 Zellen wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper die A-SMase (rot) und die Pro-Caspase 3 oder Pro-Caspase 7 (grün) fluoreszenzmarkiert.

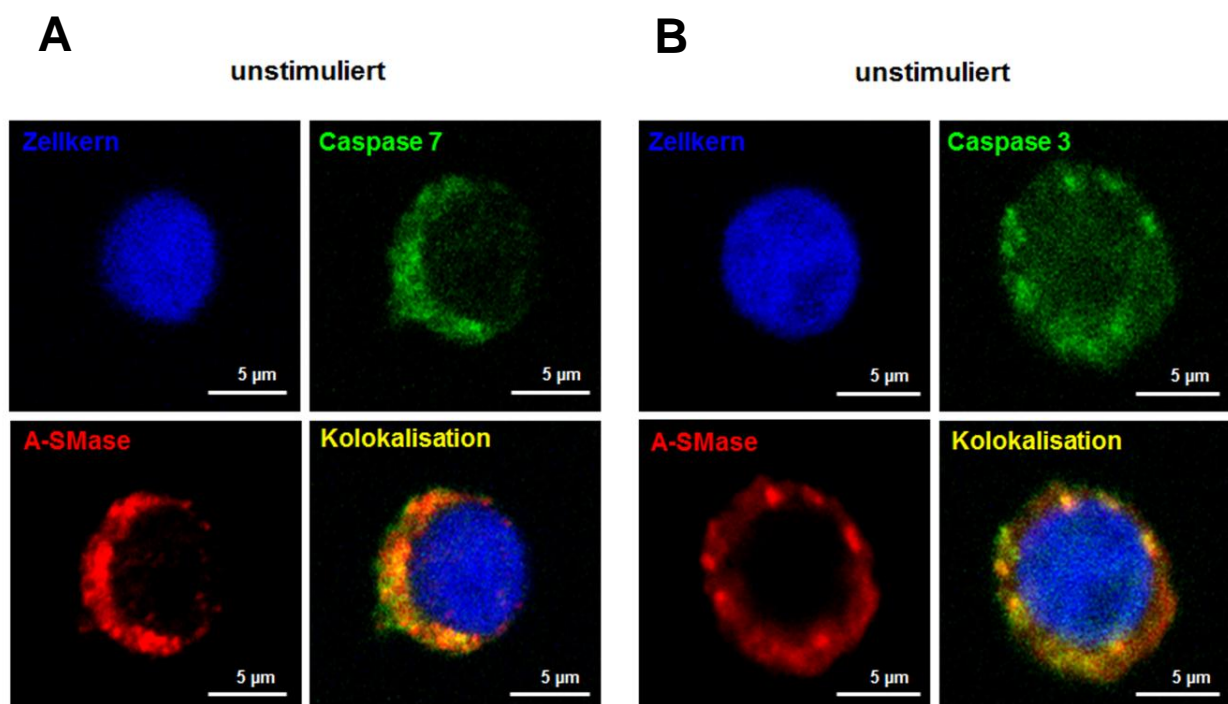


Abbildung 22: Kolokalisation zwischen der A-SMase und Caspase 3/7. Konfokale LSM-Aufnahme der partiellen Kolokalisation (gelb) zwischen der A-SMase (rot) und der Pro-Caspase 3 oder 7 (grün) in unstimulierten SKW6.4 Zellen.

Die konfokale LSM-Aufnahme zeigte eine partielle Kolokalisation zwischen der Caspase 7 und der A-SMase (Abb. 22A). In Übereinstimmung mit der Ko-Immunpräzipitation in Abbildung 20 bestätigte dieses Ergebnis eine Interaktion zwischen der A-SMase und der Caspase 7. Analog zu diesem Versuch war auch eine Kolokalisation zwischen der A-SMase und der Caspase 3 zu erkennen (Abb. 22B). Auch hier korrelierte das Ergebnis der LSM-Aufnahme mit der Ko-Immunpräzipitation und veranschaulichte eine direkte Interaktion zwischen A-SMase und der Caspase 3 in unstimulierten Zellen.

3.10 Spaltung und Aktivierung der A-SMase durch Caspase 7 und Caspase 3

Durch die Ko-Immunpräzipitation und die Kolokalisationsstudien wurde in den Abschnitten zuvor eine Interaktion zwischen der A-SMase und der Caspase 3 und 7 nachgewiesen. Um zu bestätigen, dass diese Interaktion auch mit einer Aktivitätssteigerung der A-SMase einhergeht, wurde immunpräzipitierte A-SMase-GFP mit einer rekombinanten aktiven Caspase 3 oder Caspase 7 für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben durch eine A-SMase Aktivitätsmessung und durch einen Western-Blot mit einem anti-GFP Antikörper analysiert (Abb. 23). Die Behandlung des IP-Materials mit Caspase 7 führte zu einer Aktivitätssteigerung der A-SMase um mehr als 50 %. Dieser Anstieg korrelierte mit dem verstärkten Auftreten eines 82 kDa großen A-SMase-GFP Spaltfragments. Auch die Inkubation des IP-Materials mit Caspase 3 führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der A-SMase Aktivität. Die Steigerung der enzymatischen Aktivität stand auch hier in Übereinstimmung mit einem Anstieg des aktiven A-SMase-GFP Spaltfragments in der Western-Blot Analyse. Damit bestätigen diese Ergebnisse eine Caspase 3- und 7-induzierte Aktivitätssteigerung der A-SMase, die mit einem verstärkten Auftreten eines 82 kDa großen A-SMase-GFP Spaltfragment korreliert.

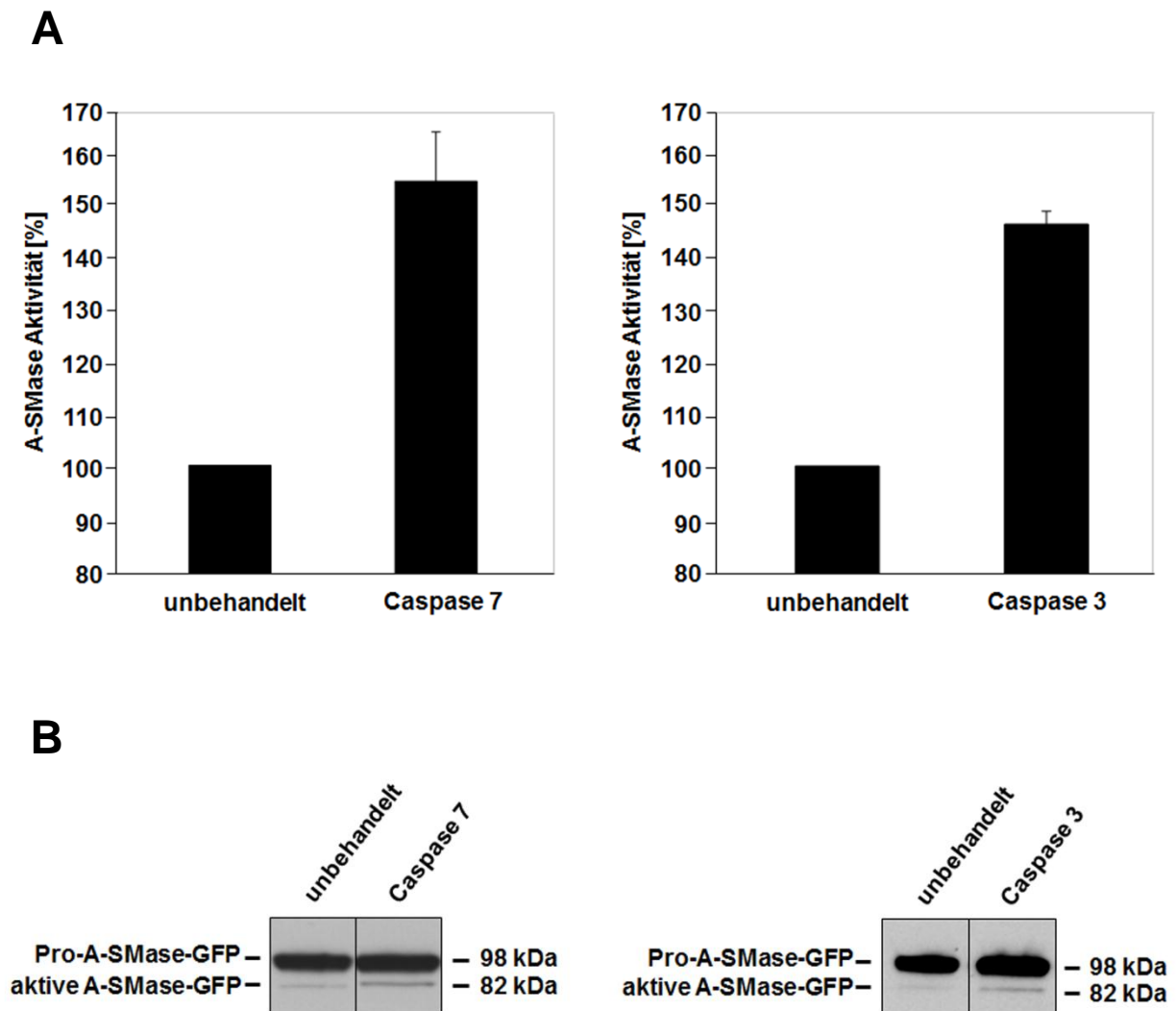


Abbildung 23: Caspase 7- und 3-vermittelte Spaltung und Aktivierung der A-SMase. Immunpräzipitierte A-SMase-GFP wurde für 15 Minuten mit aktiver Caspase 7 oder 3 behandelt. (A) Im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte die Inkubation mit Caspase 7 oder 3 zu einem Anstieg der A-SMase Aktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Für jede Probe wurde der Mittelwert einer Dreifachbestimmung angegeben. (B) Western-Blot Analyse des gleichen Materials wie aus (A) mit einem anti-GFP Antikörper. Der Anstieg der enzymatischen Aktivität der A-SMase korrelierte in den Caspase 7 oder 3 behandelten Proben mit dem Auftreten eines 82 kDa großen A-SMase-GFP Spaltfragments.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, welche der beiden Effektor-Caspasen für die Aktivierung der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen verantwortlich ist. Obwohl das Auftreten der aktiven Caspase 7 in der Western-Blot Analyse mit dem zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase korrelierte, ließ sich auch die aktive Caspase 3 in allen magnetischen Fraktionen nachweisen. Die Ko-Immunpräzipitation sowie die

Immunfluoreszenzanalyse zeigten zudem eine direkte Interaktion zwischen der A-SMase und der Pro-Formen der Caspase 3 und 7. Allerdings ließ sich nur für die aktive Form der Caspase 7 eine Interaktion mit der A-SMase in der Ko-Immunpräzipitation nachweisen. Da Caspase 7 sowie auch Caspase 3 immunpräzipitierte A-SMase-GFP proteolytisch aktivierten, kommen beide Caspasen für den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den CD95-enthaltenden magnetischen Fraktionen in Frage.

4 Diskussion

Die A-SMase ist ein bedeutendes Enzym des Sphingolipid-Katabolismus und nimmt eine wichtige Funktion in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ein. Beispielsweise zeigten Edelman und Kollegen, dass TNF-R1-Rezeptosomen mit pro-A-SMase-enthaltenden trans-Golgi Vesikeln fusionieren. Innerhalb der sich bildenden multivesikulären Strukturen wird die A-SMase sequentiell durch Caspase 8 und 7 aktiviert. Durch die Hydrolyse von Sphingomyelin wird in einer A-SMase-katalysierten Reaktion das bioaktive Lipid Ceramid gebildet. Ceramid bindet und aktiviert die Aspartat-Protease Cathepsin D und vermittelt dessen Translokation ins Zytosol. Die Cathepsin D-vermittelte Spaltung des pro-apoptotischen Proteins BID führt schließlich zu Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C und zur Aktivierung einer proteolytischen Kaskade [98]. Auch bei CD95, TRAIL-Rezeptor 1 und TRAIL-Rezeptor 2 ist die A-SMase für die Induktion der Apoptose von besonderer Bedeutung. In den Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Abschnitten der Plasmamembran (Lipid Rafts) werden durch die A-SMase-vermittelte Hydrolyse von Sphingomyelin, Ceramid-angereicherte Membrandomänen gebildet. Diese Domänen dienen als Signalplattformen und induzieren die Bildung von Rezeptorkomplexen sowie die Rekrutierung und Aggregation von intrazellulären Signalmolekülen (z.B. NADPH-Oxidase Untereinheiten, kleine G Proteine) [99, 113-115]. Das Clustern von Rezeptoren ist eine wichtige Voraussetzung für die CD95-vermittelte Apoptose. Das durch die A-SMase Translokation zur Plasmamembran ermöglichte CD95-Clustern führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Adaptorproteinen (FADD, Caspase 8) sowie zur Induktion der Apoptose [99]. Jedoch ist bisher unbekannt, ob der A-SMase parallel zur Bildung von Signalplattformen eine weitere Funktion in der CD95-induzierten Apoptose zukommt. Vor allem vor dem Hintergrund der Kompartimentierung der CD95-Signaltransduktion ist die Rolle der A-SMase in der Apoptose nur unzureichend aufgeklärt. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit nachzuweisen, ob eine enzymatisch aktive A-SMase in den CD95-Rezeptosomen angereichert ist. Des Weiteren sollte auch der molekulare Aktivierungsmechanismus der A-SMase näher charakterisiert werden.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden zu unterschiedlichen Internalisierungszeiten CD95-enhaltende Membranstrukturen magnetisch isoliert. Die Stimulation und extrazelluläre Markierung des membranständigen CD95-Rezeptors erfolgte mit einem zuvor selbst hergestellten rekombinanten Fas Liganden (SFF-FasL). Dieser besaß neben einem N-terminalen Strep- und FLAG-Tag auch eine humane IgG1 Fc-Region, die für die Bindung der Protein G MicroBeads und die magnetische Markierung des Rezeptors notwendig war. Nach einem etablierten Protokoll der Arbeitsgruppe Schütze (UKSH, Kiel) wurde mit Hilfe einer matrixfreien Magnetkammer (Hooek, Kiel), CD95-enhaltende Membranstrukturen isoliert. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für die Isolierung von TNF-R1- und CD95-Rezeptsomen angewandt [56, 98, 101]. Zudem wurden mit der Immunfluoreszenzanalyse und der Elektronenmikroskopie die TNF-R1-Internalisierung sowie die Isolierung von intakten TNF-R1-enhaltenden vesikulären Strukturen nachgewiesen [101].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen Methoden die SFF-FasL-induzierte CD95-Internalisierung in den Typ-I Zellen SKW6.4 und HuT78 analysiert. Die Immunfluoreszenzanalyse in Abbildung 8 zeigte eine zeitabhängige Internalisierung des fluoreszenzmarkierten Ligand-Rezeptorkomplexes. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore [107] blockierte dagegen die Endozytose des CD95-Rezeptors. Darüber hinaus wurde die CD95-Internalisierung durch die räumliche Assoziation (Kokalisation) mit Kompartiment-spezifischen Markerproteinen nachgewiesen (Abb. 9). Anhand der Kokalisation mit Rab 4A (frühes Endosom), Vti1b (trans-Golgi-Netzwerk) und Cathepsin D (Lysosom) ließ sich der intrazelluläre Transport des CD95-Rezeptors zeitlich verfolgen. Zusätzlich zu den Immunfluoreszenzanalysen wurde die CD95-Internalisierung auch durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 10). In nicht-permeabilisierten HuT78 Zellen wurde die Endozytose des Fluorophor-markierten Ligand-Rezeptorkomplexes durch die zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Im Gegensatz dazu inhibierte die zusätzliche Behandlung mit Monodansylcadaverin (MDC) oder Latrunculin A (Ltn A) die Internalisierung des CD95-Rezeptors. MDC, ein spezifischer Inhibitor der membrangebundenen Transglutaminasen, verhindert die Bildung von Clathrin-ummantelten Vesikeln [109]. Zusammen mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore, der die Abschnürung von Clathrin-ummantelten Vesikeln blockiert,

bestätigen diese Inhibitionsversuche die Clathrin-vermittelte Endozytose des CD95-Rezeptors [52]. Auch die Behandlung der Zellen mit Ltn A, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation, reduzierte die CD95-Internalisierung. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Algeciras-Schimmich und Kollegen, die eine Aktin-abhängige Internalisierung des CD95-Rezeptors beschrieben haben [57]. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeitsgruppe auch gezeigt werden, dass die Ltn A Behandlung von Typ-I Zellen (SKW6.4, H9), die DISC-vermittelte Caspase 8 Aktivierung sowie die Apoptose signifikant verringert. Die Aktin-abhängige CD95-Internalisierung ließ sich zudem nur in Typ-I Zellen nachweisen. Nach einer zweistündigen Stimulation mit dem agonistischen Antikörper anti-APO-1, war in Typ-II Zellen (Jurkat, CEM) keine CD95-Internalisierung zu detektieren [57]. Andere Arbeiten zeigten dagegen, dass in Typ-II Zellen die Internalisierung des CD95-Rezeptors erst nach einer dreistündigen Stimulation mit dem agonistischen Antikörper CH11 auftrat [116]. Parallel zu den Ergebnissen von Algeciras-Schimmich und Kollegen ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit die CD95-Internalisierung in den Typ-I Zellen SKW6.4 und HuT78 nachweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der selbst hergestellte rekombinante SFF-FasL die Internalisierung des CD95-Rezeptors induziert. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Daten von Chaigne-Delalande und Kollegen, die nur nach der Stimulation mit dem agonistischen Antikörper APO1-3 eine CD95-Internalisierung nachweisen konnten. Dagegen war die lösliche Form des Fas Liganden modifiziert mit einem FLAG-Tag (FLAG-CD95L), nicht in der Lage die Endozytose des CD95-Rezeptors zu induzieren [117]. Obwohl diese Befunde den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen widersprechen, konnte mit Hilfe der Publikationen von Kyeong-Hee Lee sowie Adriana Eramo auch eine Fas Ligand-induzierte CD95-Internalisierung nachgewiesen werden [52, 116]. Beide Autoren zeigten, dass die FLAG-CD95L Stimulation zur Internalisierung des CD95-Rezeptors führt. Darüber hinaus lieferten Kyeong-Hee Lee und Kollegen Beweise für eine membranständige Fas Ligand (mCD95L)-induzierte CD95-Internalisierung. In Kokultur-Experimenten mit Zellen die einen nicht-spaltbaren mCD95L synthetisierten, ließ sich die Endozytose des CD95-Rezeptors induzieren [52]. Angesichts dieser Befunde wurde die in dieser Arbeit beschriebene Fas Ligand-induzierte CD95-Internalisierung auch durch verschiedene Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Der somit

charakterisierte rekombinante Fas Ligand wurde anschließend für die Isolierung von CD95-Rezeptosomen verwendet.

Die zu verschiedenen Internalisierungszeiten isolierten CD95-enthaltenden Membranstrukturen ermöglichten eine zeitabhängige Analyse der Rekrutierung von Adaptorproteinen. Die Western-Blot Analyse zeigte in den magnetischen Fraktionen eine schnelle Rekrutierung von FADD und Caspase 8 sowie die Bildung des DISC (Abb. 11). Darüber hinaus ließ sich bereits nach 5 Minuten das p18-Fragment der aktiven Caspase 8 identifizieren. Die schnelle Rekrutierung von Caspase 8 sowie das nach 5 Minuten auftretende p18-Fragment kennzeichnen die frühe Phase der CD95 Aktivierung und gehen der Rezeptorinternalisierung voran [56]. Zusätzlich wurde in den magnetischen Fraktionen auch die Rekrutierung der Endozytosemarker Rab 4A (frühe Endosomen) und Cathepsin D (Lysosom) nachgewiesen. Parallel zu der Kollokalisationsstudie in Abbildung 9 bestätigen diese Ergebnisse die Internalisierung des CD95-Rezeptors sowie die Fusion zwischen Rezeptosomen und frühen Endosomen bzw. Lysosomen. Mit Hilfe der magnetischen Isolierung von CD95-enthaltenden Membranstrukturen wurde in dieser vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht, dass eine enzymatisch aktive A-SMase in den CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist (Abb.12). Die A-SMase zeigte in den magnetischen Fraktionen eine biphasische Aktivierung, die nach einer Internalisierungszeit von einer Minute sowie 30 und 60 Minuten ihr Aktivitätsmaximum erreichte (Abb. 12A). Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung korrelierten mit dem biphasischen Auftreten der Pro- und aktiven Form der A-SMase in der Western-Blot Analyse (Abb.12B). Bereits Ferlinz und Kollegen zeigten, dass zwei verschiedene Formen der A-SMase existieren. Neben der Pro-Form mit einem Molekulargewicht von 72/70 kDa identifizierten die Autoren auch ein proteolytisches Spaltprodukt mit 57 kDa [118]. Darüber hinaus wurde durch Edelmann und Kollegen der Nachweis erbracht, dass eine Zunahme des proteolytischen Spaltfragments (57 kDa) mit einer Aktivitätssteigerung der A-SMase verbunden ist. Durch Fraktionierungsexperimente mit einem OptiPrep-Gradienten zeigten die Autoren, dass die 57 kDa Form der A-SMase mit lysosomalen Markerproteinen (LAMP-1, Cathepsin D) ko-sedimentiert. Zusätzlich besaß diese lysosomale Fraktion die höchste A-SMase Aktivität. Nicht-lysosomale Fraktionen in denen die Pre-Pro- (75 kDa) und Pro-A-SMase (72 kDa) detektiert wurden, besaßen dagegen deutlich verringerte Aktivitäten. Anhand dieser Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass

die 57 kDa Form eine lysosomale aktive A-SMase darstellt [98]. Auch in dieser Arbeit korrelierte das Auftreten des 57 kDa Spaltfragments mit einer Aktivitätssteigerung der A-SMase (Abb. 12, 23). Die biphasische Aktivierung der A-SMase in den magnetischen Fraktionen wurde somit nicht nur durch den Aktivitätsassay sondern auch durch die Western-Blot Analyse bestätigt.

Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren gegen Caspase 8 (IETD), Caspase 3 und 7 (DEVD) sowie Dynamin (Dynasore) wurde die biphasische Aktivierung der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen näher charakterisiert. Dabei ließ sich der erste Aktivitätsanstieg mit der Translokation der A-SMase zur äußeren Zellmembran in Verbindung setzen. Verschiedene Autoren zeigten, dass durch die CD95 Stimulation A-SMase-positive Lysosomen mit der Plasmamembran fusionieren [100, 119]. In einer A-SMase-katalysierten Reaktion wird durch die Hydrolyse von Sphingomyelin, Ceramid-angereicherte Membrandomänen gebildet. Diese Domänen fungieren als Signalplattformen und ermöglichen das Clustern des CD95-Rezeptors [99]. Perrotta und Kollegen lieferten zudem den Beweis für eine Syntaxin 4-abhängige Fusion zwischen A-SMase-positiven Lysosomen und der Plasmamembran [100]. Jedoch ist bisher unbekannt wie die A-SMase an dem lysosomalen Fusionsprozess beteiligt ist. Xiang Li und Kollegen postulierten, dass durch den TRAIL-Rezeptor 1 eine konstitutiv in der Plasmamembran lokalisierte A-SMase aktiviert wird und nur geringe Mengen von Sphingomyelin zu Ceramid katabolisiert. Diese winzigen Mengen an Ceramid (kindling ceramide) induzieren den lysosomalen Transport sowie die Fusion mit den Lipid Rafts der Plasmamembran. Eine verstärkte Translokation der A-SMase zur Zellmembran führt schließlich zu einer verstärkten Ceramid-Bildung (bonfire ceramide). Dies ermöglicht das Clustern der Lipid Rafts, die Bildung von Signalplattformen und verstärkt den Transport weiterer Lysosomen zur Plasmamembran [113]. Ein analoger Mechanismus könnte auch bei dem CD95-Rezeptor auftreten und damit die Funktion der A-SMase an den lysosomalen Fusionsprozessen erklären. Eine Schlüsselrolle in der CD95-vermittelten Translokation der A-SMase nimmt die Caspase 8 ein. Grassme und Kollegen zeigten, dass durch den Einsatz von IETD oder anderen Caspase 8 Inhibitoren die CD95-induzierte Translokation der A-SMase zur Plasmamembran, die Bildung von Ceramid sowie das CD95-Clustern blockiert wurden [99]. Die Fas Ligand-vermittelte A-SMase Translokation sowie die Inhibition durch IETD ließ sich auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigen (Abb. 14). In

nicht-permeabilisierten SKW6.4 Zellen bewies die Immunfluoreszenzmikroskopie den Caspase 8-abhängigen Transport der A-SMase zur äußeren Zellmembran. Dabei korrelierte die Translokation mit dem frühen Auftreten des p18-Fragments der Caspase 8 sowie dem ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den magnetischen Fraktionen (Abb. 11 und 12A). Im Gegensatz dazu war in den magnetischen Fraktionen aus IETD-behandelten SKW6.4 Zellen der frühe Aktivierungsspeak der A-SMase nicht nachweisbar. In Übereinstimmung mit der Western-Blot Analyse ließ sich mit diesen Daten der Nachweis erbringen, dass der frühe Aktivitätsanstieg Caspase 8 abhängig ist (Abb. 13). Zusammenfassend ließ sich anhand dieser Ergebnisse zeigen, dass der erste Aktivierungsspeak mit der Translokation der A-SMase zur Plasmamembran in Verbindung zu setzen ist. Für den zweiten Aktivitätsanstieg lag dagegen die Vermutung nahe, dass er durch eine Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen sowie Pro-A-SMase-enthaltenden trans-Golgi Vesikeln hervorgerufen wurde. Bereits Schneider-Brachert und Kollegen zeigten, dass TNF-R1-Rezeptosomen mit Vti1b-positiven trans-Golgi Vesikeln fusionieren [101]. Diese Fusionsprozesse ließen sich mit den Ergebnissen der Abbildung 9 auch für CD95-Rezeptosomen nachweisen. Nach einer Internalisierungszeit von 30 und 60 Minuten trat eine partielle Kollokalisierung zwischen Vti1b und dem internalisierten Ligand-Rezeptorkomplex auf. Zusätzlich bewiesen die Versuche mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore, dass die Endozytose des CD95-Rezeptors für den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase notwendig ist (Abb. 15). Die Dynasore-vermittelte Inhibition der CD95-Internalisierung blockierte den zweiten Aktivierungsspeak. Dieses Ergebnis stand in Übereinstimmung mit der Western-Blot Analyse. Nach einer Internalisierungszeit von 30 oder 60 Minuten war weder für Cathepsin D noch für die A-SMase ein deutliches Signal in den magnetischen Fraktionen zu identifizieren. Die Internalisierung des CD95-Rezeptors ist nicht nur für den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase, sondern auch für die Apoptose entscheidend. Die durchflusszytometrische Analyse Annexin V-gefärbter SKW6.4 Zellen veranschaulichte, dass Dynasore die Fas Ligand-induzierte Apoptose reduziert (Abb. 16). Auch Lee und Kollegen zeigten, dass für die Induktion der Apoptose die CD95-Internalisierung benötigt wird. Im Gegensatz dazu war in Zellen mit einer Internalisierungsblockade die Fas Ligand-induzierte Apoptose signifikant verringert. Nur die CD95-Internalisierung führte zu einer verstärkten Rekrutierung von DISC-Komponenten, Aktivierung von Caspasen sowie zur Induktion der Apoptose.

Darüber hinaus beobachten die Autoren, dass ein an der Zelloberfläche gehaltener Rezeptor einen proliferativen Signalweg (ERK und NF- κ B) einleitet [52]. Damit stehen die Ergebnisse von Lee und Kollegen in Übereinstimmung mit der hier gezeigten verringerten Fas Ligand-induzierten Apoptose in Dynasore-behandelten SKW6.4 Zellen. Anhand der Ergebnisse in den Abbildungen 13, 14, 15 und 16 ließ sich durch den gezielten Einsatz des Dynamin-Inhibitors Dynasore sowie des Caspase 8-Inhibitors IETD, die biphasische Aktivierung der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen charakterisieren. Während der erste Aktivitätsanstieg mit der Translokation der A-SMase in Verbindung gesetzt werden konnte, war der zweite Anstieg von der Internalisierung des CD95-Rezeptors abhängig. Darüber hinaus unterstützen die Ergebnisse der Abbildung 13 die Vermutung, dass der zweite Aktivitätsanstieg nicht durch eine Ko-Internalisierung der A-SMase mit dem CD95-Rezeptor sondern durch eine Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen und A-SMase-enthaltenden Vesikeln hervorgerufen wurde. Die durch den Einsatz von IETD erzielten Ergebnisse veranschaulichten, dass nur eine Inhibition des ersten Aktivitätsanstiegs der A-SMase in den magnetischen Fraktionen auftrat. IETD, ein spezifischer Inhibitor der Caspase 8, blockierte die Translokation der A-SMase zur Plasmamembran (Abb. 14). Dies hatte zur Folge, dass keine zusätzliche A-SMase an die Zelloberfläche transportiert wurde, die zusammen mit dem CD95-Rezeptor hätte internalisiert werden können. Da nach 30 und 60 Minuten ein deutlicher Anstieg der enzymatischen Aktivität bzw. ein starkes Signal für die A-SMase in der Western-Blot Analyse nachgewiesen wurde, lässt sich dies nur mit einer intrazellulären Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen und A-SMase-enthaltenden Vesikeln erklären (Abb. 13). Eine mögliche Ko-Internalisierung der A-SMase scheint demnach nicht die Ursache des zweiten Aktivitätsanstiegs zu sein.

Der nach 30 und 60 Minuten in den magnetischen Fraktionen zu beobachtende Aktivitätsanstieg der A-SMase ließ sich auch durch den Caspase 3/7-Inhibitor DEVD blockieren (Abb. 17). Dieses Ergebnis lässt somit vermuten, dass die Effektor-Caspase 3 oder 7 eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen einnimmt. Zusätzlich zeigen die Daten der Abbildung 18 und 19, dass eine aktive Caspase 3 und aktive Caspase 7 in den CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist. Dabei korrelierte das Auftreten der aktiven Caspase 7 mit dem zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase. Im Gegensatz dazu war die aktive Caspase 3 in allen magnetischen Fraktionen nachweisbar. Auch Edelmann und Kollegen zeigten, dass

die Effektor-Caspase 7 die direkte Aktivierung der A-SMase ermöglicht. Die Autoren beschrieben eine sequentielle Caspase 8 und Caspase 7-vermittelte, proteolytische Aktivierung der A-SMase in TNF-R1-Rezeptosomen [98]. Aufgrund der Ergebnisse der Abbildung 13 ließ sich diese sequentielle Aktivierung der A-SMase in CD95-Rezeptosomen nicht nachweisen. In den magnetischen Fraktionen aus IETD-behandelten SKW6.4 Zellen war lediglich der erste Aktivierungsspeak der A-SMase blockiert. Dieses Ergebnis lässt somit vermuten, dass der zweite Aktivitätsanstieg der A-SMase durch einen Caspase 8 unterstützenden Aktivierungsmechanismus ermöglicht wird oder sogar Caspase 8 unabhängig ist. Eine Schlüsselrolle könnte dabei die Aspartat-Protease Cathepsin D einnehmen. Sebastien Conus und Kollegen zeigten, dass bei einem sauren pH-Wert Cathepsin D spezifisch die Caspase 8 spaltet. Durch die anschließende Homodimerisierung und autoproteolytische Aktivierung der Initiator-Caspase 8 wird eine proteolytische Kaskade induziert [120]. Ein analoger Mechanismus könnte auch in den CD95-Rezeptosomen vorliegen, in dem zunächst eine inaktive Caspase 8 durch Cathepsin D aktiviert wird. Durch die Caspase 8-vermittelte proteolytische Spaltung der Effektor-Caspasen 3 und 7 wird schließlich der zweite Aktivitätsanstieg der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen ermöglicht. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie und Western-Blot Analyse (Abb. 9 und 11). Mit zwei verschiedenen methodischen Ansätzen wurde in der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht, dass die reife Form des Cathepsin D in den CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist. Neben der durch Cathepsin D-vermittelten Proteolyse und Homodimerisierung von Caspase 8 lieferten Antonio Ruiz-Vela und Kollegen Beweise für eine Calpain-abhängige Aktivierung der Caspase 7 [121]. Calpain ist eine intrazelluläre, Ca^{2+} -abhängige Cystein-Protease die an der Organisation des Zytoskeletts, Migration, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist [122]. Die Autoren zeigten, dass Calpain unabhängig von Caspase 8, Cytochrom C und der mitochondrialen Depolarisierung direkt die Effektor-Caspase 7 aktiviert [121]. Calpain könnte somit in den CD95-Rezeptosomen die Initiator-Caspase 8 ersetzen und durch die Aktivierung der Effektor-Caspase 7 den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase induzieren.

Jedoch stellt sich angesichts dieser Befunde die Frage, auf welchen Wegen Caspase 3 oder Caspase 7 in die CD95-Rezeptosomen gelangen. Ein möglicher Mechanismus wäre die Ko-Internalisierung von Caspase 3 mit dem CD95-Rezeptor.

Salah M. Aouad und Kollegen zeigten, dass Caspase 3 in den Lipid Rafts der Plasmamembran lokalisiert ist. Des Weiteren bewiesen die Autoren, dass Caspase 3 nicht nur ein Bestandteil des CD95-DISC ist, sondern auch für die vollständige Aktivierung der Caspase 8 benötigt wird [123]. Vor diesem Hintergrund liegt die Vermutung nahe, dass Caspase 3 zusammen mit dem CD95-Rezeptor ko-internalisiert. Gestützt wird diese Annahme mit den Ergebnissen der Western-Blot Analyse der Abbildung 18. In allen magnetischen Fraktionen ließ sich ein deutliches Signal für die Pro- und aktive Form der Caspase 3 nachweisen. Dagegen war in den magnetischen Fraktionen die aktive Form der Caspase 7 erst nach einer Internalisierungszeit von 15 bis 60 Minuten sichtbar. Das im Vergleich zu Caspase 3 verspätete Auftreten könnte auf einen anderen Weg hindeuten, auf dem die Caspase 7 in die CD95-Rezeptosomen gelangt. Mögliche Beweise hierfür lieferten Chandler und Zhivotovsky, die beide nach CD95 Stimulation die aktive Caspase 7 in der mikrosomalen Fraktion nachweisen konnten [124, 125]. Definiert als Fraktion, die hauptsächlich aus Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums (Mikrosomen), Zellmembranen, Lysosomen oder Golgimembranen besteht, bestätigen diese Fraktionierungsexperimente die Assoziation der aktiven Caspase 7 mit Membranen oder Vesikeln. Diese Ergebnisse führten somit zur Annahme, dass die aktive Caspase 7 durch einen Fusionsprozess in die CD95-Rezeptosomen gelangt. Jedoch ist bisher unbekannt wie die A-SMase im endo-lysosomalen Kompartiment direkt mit einer zytosolischen, membranassoziierten Caspase 7 interagieren kann. Beide sind durch eine Membran getrennt, wodurch eine direkte Interaktion blockiert wird. Dies lässt somit vermuten, dass nach einer Fusion die intraluminale Membran abgebaut wird oder die Caspase 7 innerhalb der multivesikulären Strukturen durch die Lipiddoppelschicht transloziert. Um letztendlich die Lokalisation der Caspase 7 in den CD95-Rezeptosomen aufzuklären, müsste eine elektronenmikroskopische Analyse mit Fas Ligand-stimulierten Zellen durchgeführt werden.

Die endosomale Reifung und die Bildung von multivesikulären Strukturen gehen mit einer kontinuierlichen Azidifizierung einher. Angesichts der stetigen Verringerung des pH-Wertes stellt sich vor diesem Hintergrund die Frage, wie sich die enzymatische Aktivität der Caspasen verändert. Edelman und Kollegen zeigten, dass Caspase 7 bei einem pH-Wert von 6.5 lediglich die Hälfte seiner enzymatischen Aktivität einbüßt [98]. Auch Stennicke und Salvesen demonstrierten, dass der optimale pH-Wert für Caspase 7 in einem Bereich von 6,5 bis 7,7 liegt. Für Caspase 3 beschrieben die

Autoren einen Bereich von 6,4 bis 8,6 und für Caspase 8 sogar von 6,0 bis 7,7 [126]. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die betreffenden Caspasen in einem leicht sauren Bereich enzymatisch aktiv sind. Dies würde Caspase 3 bzw. Caspase 7 gestatten, die A-SMase in den frühen Endosomen proteolytisch zu aktivieren.

Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen der A-SMase und Caspase 7 bzw. Caspase 3 erfolgte anhand der Ko-Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 20 und 22). Beide Methoden zeigten, dass in unstimulierten Zellen eine konstitutive Interaktion zwischen der A-SMase und der Caspase 7 bzw. Caspase 3 besteht. Bereits Matsumoto und Kollegen beschrieben mit Hilfe eines modifizierten Yeast Two-Hybrid Screen eine Stickstoffmonoxid (NO)-abhängige Interaktion von Pro-Caspase 3 und A-SMase. Sie zeigten, dass durch die Interaktion mit der A-SMase die Effektor-Caspase 3 in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Darüber hinaus vermuteten die Autoren, dass auf diese Weise Pro-Caspase 3 vor einer direkten Aktivierung durch Initiator-Caspasen geschützt ist [127]. Dieses Verhalten könnte somit erklären warum in der Ko-Immunpräzipitation kein Signal für die aktive Caspase 3 detektiert wurde (Abb. 20). Des Weiteren zeigten Edelmann und Kollegen, dass eine direkte Interaktion zwischen der A-SMase und der Caspase 7 besteht [98]. Diese Interaktion ließ sich in der vorliegenden Arbeit auch mit der Ko-Immunpräzipitation in Abbildung 20 nachweisen. Zusätzlich wurde in Fas Ligand stimulierten Zellen die aktive Form der Caspase 7 mit der A-SMase ko-präzipitiert. Dabei korrelierte das Auftreten der aktiven Caspase 7 mit dem zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen. Allerdings ließ sich mit der reversen Ko-Immunpräzipitation nicht der Nachweis erbringen, dass Caspase 3 oder Caspase 7 mit der A-SMase interagiert (Abb. 21). Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine sterische Behinderung sein. Durch die Interaktion zwischen A-SMase und Caspase 7 oder Caspase 3 könnte das Epitop für den entsprechenden zur Immunpräzipitation eingesetzten anti-Caspase 7 oder anti-Caspase 3 Antikörper blockiert worden sein. Wie anhand der Abbildung 21 sichtbar ist, würde dies nur zur Immunpräzipitation der ungebundenen Caspase 7 und Caspase 3 führen. Dass die Interaktion auch durch eine reverse Ko-Immunpräzipitation nachweisbar ist, zeigten Edelmann und Kollegen. Mit einem aus der Arbeitsgruppe Perrotta selbst hergestellten Antikörper, bewiesen die Autoren die Interaktion zwischen der A-SMase und Caspase 7 [92, 98]. Da dieser Antikörper nicht mehr zur Verfügung steht, wurde

für diese Arbeit ein Antikörper der Firma Abcam verwendet. Dieser weist andere Spezifitäten auf und könnte somit auch zum Misslingen der reversen Ko-Immünpräzipitation beigetragen haben. Die Interaktion zwischen der A-SMase und Caspase 3 bzw. 7 ließ sich auch mit den in der Abbildung 23 gezeigten Ergebnissen nachweisen. In einem *in vitro* Experiment wurde immunpräzipitierte A-SMase-GFP durch exogene Caspase 7 oder Caspase 3 gespalten und aktiviert. Dabei korrelierte das Auftreten des proteolytischen Spaltfragments mit einer Zunahme der enzymatischen Aktivität der A-SMase. Da das A-SMase-Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von 82 kDa noch seinen C-terminalen GFP-Tag besaß, lassen diese Ergebnisse auf eine N-terminale Spaltung schließen. Zusätzlich identifizierten Edlmann und Kollegen durch Punktmutationen die mögliche Caspase 7-Spaltstelle in der A-SMase. Eine Mutation von Aspartat 253 zu Alanin (D253A) verhinderte die TNF α -induzierte proteolytische Aktivierung der A-SMase [98]. Angesichts dieser Daten liegt die Vermutung nahe, dass auch im CD95-System die A-SMase am Aspartat-Rest 253 durch Caspase 7 oder 3 gespalten wird. Da mit den Ergebnissen dieser vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, welche Effektor-Caspase für den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase verantwortlich ist, müsste eine stabile Caspase 3 und Caspase 7-defiziente Zelllinie generiert werden. Die Isolierung von CD95-Rezeptosomen sowie die anschließende Bestimmung der A-SMase Aktivität würde dann eine genaue Aussage liefern, welche Effektor-Caspase an der proteolytischen Aktivierung der A-SMase beteiligt ist.

Die CD95-induzierte biphasische A-SMase Aktivierung ist schematisch in Abbildung 24 dargestellt. Mit Hilfe der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse ließ sich der Nachweis erbringen, dass eine enzymatisch aktive A-SMase in den CD95-Rezeptosomen lokalisiert ist. Das erste Aktivitätsmaximum der A-SMase war vom Caspase 8-Inhibitor IETD abhängig. Zusammen mit dem zeitlich parallelen Auftreten des p18-Fragments der Caspase 8 in den magnetischen Fraktionen sowie der verstärkten Exposition der A-SMase an der Zelloberfläche, ließ sich der erste Aktivitätsanstieg mit der Translokation der A-SMase zur äußeren Plasmamembran in Verbindung setzen. Das zweite Aktivitätsmaximum war dagegen von der Internalisierung des CD95-Rezeptors sowie von den Effektor-Caspasen 3/7 abhängig. Diese Ergebnisse lassen somit vermuten, dass der zweite Aktivitätsanstieg durch die Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen und A-SMase-enthaltenden trans-Golgi Vesikeln hervorgerufen wurde. Innerhalb der sich bildenden

multivesikulären Kompartimente wird die A-SMase proteolytisch durch Caspase 3 oder 7 aktiviert. Durch die Hydrolyse von Sphingomyelin und der Bildung von Ceramid, unterstützt schließlich die A-SMase die CD95-induzierte Apoptose.

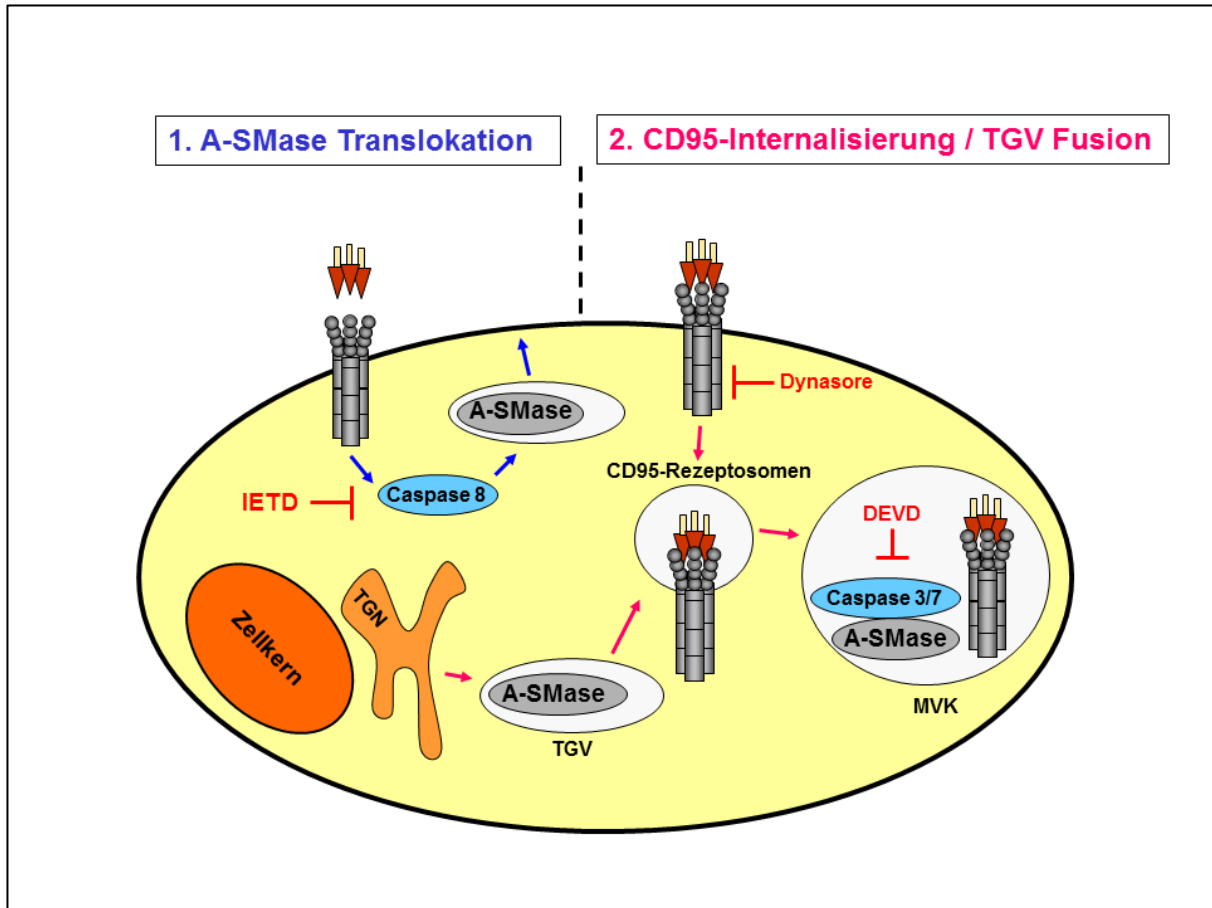


Abbildung 24: Schematische Darstellung der CD95-induzierten biphasischen A-SMase Aktivierung. Der erste Aktivitätsanstieg ließ sich mit der Caspase 8-abhängigen Translokation der A-SMase zur äußeren Zellmembran in Verbindung setzen. Der Caspase 8-Inhibitor IETD blockierte die Translokation sowie den ersten Aktivitätsanstieg der A-SMase. Für das zweite Aktivitätsmaximum liegt dagegen die Vermutung nahe, dass er durch die Fusion zwischen A-SMase-enthaltenden trans-Golgi Vesikeln (TGV) und internalisierten CD95-Rezeptosomen hervorgerufen wurde. Innerhalb der sich bildenden multivesikulären Kompartimente (MVK) wird die A-SMase durch Caspase 3 oder 7 proteolytisch aktiviert. Der Dynamin-Inhibitor Dynasore sowie der Caspase 3/7-Inhibitor DEVD blockierten den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase. (TGN: trans-Golgi-Netzwerk)

5 Zusammenfassung

Das endo-lysosomale Enzym saure Sphingomyelinase (A-SMase) ist ein wichtiges Element der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Im CD95-Signalweg ist die Translokation der A-SMase zur äußeren Zellmembran von besonderer Bedeutung. An der Zelloberfläche katalysiert die A-SMase die Hydrolyse von Sphingomyelin und ermöglicht die Bildung von Ceramid-angereicherten Membrandomänen. Dies bewirkt das Clustern des CD95-Rezeptors, eine verstärkte Rekrutierung der Adaptorproteine FADD und Caspase 8 sowie die Induktion einer apoptotischen, proteolytischen Kaskade. Jedoch ist bisher unbekannt, ob der A-SMase während der Rezeptor-Internalisierung eine weitere Funktion in der CD95-Signaltransduktion zukommt. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die Internalisierung des CD95-Rezeptors zu analysieren und eine enzymatisch aktive A-SMase in den CD95-enthaltenden Endosomen (Rezeptosomen) nachzuweisen. Die magnetische Isolierung des zu unterschiedlichen Zeitpunkten internalisierten CD95-Rezeptors ermöglichte eine zeitabhängige Analyse der Rekrutierung von Adaptorproteinen. In der Western-Blot Analyse ließ sich mit dem verstärkten Auftreten von FADD und Caspase 8 die Bildung des DISC (death-inducing signaling complex) nachweisen. Die Detektion Kompartiment-spezifischer Markerproteine veranschaulichte zudem die Fusion zwischen CD95-Rezeptosomen und Rab 4A- oder Cathepsin D-positiven Vesikeln. Darüber hinaus ließ sich mit verschiedenen methodischen Ansätzen eine biphasisch aktivierte A-SMase in den magnetischen Fraktionen identifizieren. Der erste Aktivitätsanstieg korrelierte mit einer verstärkten Translokation der A-SMase an die Zelloberfläche und konnte durch den Caspase 8-Inhibitor IETD blockiert werden. Die Inhibition der CD95-Internalisierung durch den Dynamin-Inhibitor Dynasore reduzierte dagegen den zweiten Aktivitätsanstieg der A-SMase in den CD95-Rezeptosomen. Auf Grundlage dieser Inhibitionsversuche ließ sich das biphasische Aktivitätsprofil mit der Caspase 8-abhängigen Translokation der A-SMase zur Plasmamembran sowie mit der anschließenden CD95-Internalisierung in Verbindung setzen. Interessanterweise führte auch die Behandlung mit dem Caspase 3/7-Inhibitor DEVD zu einer Inhibition des zweiten Aktivitätsanstiegs der A-SMase. Weitere Analysen zeigten, dass Caspase 3 und 7 in den CD95-Rezeptosomen angereichert sind und direkt mit der A-SMase interagieren.

In vitro ließ sich zudem die Caspase 3- und 7-vermittelte proteolytische Aktivierung der A-SMase nachweisen. Diese Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass der zweite Aktivitätsanstieg der A-SMase auf einem Caspase 3- oder 7-abhängigen Aktivierungsmechanismus in internalisierten CD95-Rezeptosomen beruht.

5.1 Summary

The death receptor-mediated activation of acid sphingomyelinase (A-SMase) plays an important role in the induction of apoptosis. In the case of CD95-signaling the translocation of A-SMase to the outer leaflet of the plasma membrane is of particular importance. At the cell surface the A-SMase catalyze the breakdown of sphingomyelin which leads to the formation of ceramide-enriched membrane domains. This results in the clustering of the CD95-receptor, enhanced recruitment of FADD and caspase 8 as well as the induction of a proteolytic cascade. However, it is still unknown if there is another function of A-SMase in CD95-signaling.

Aim of the project was to analyze the CD95-internalization and the recruitment of A-SMase to CD95-containing endosomes (receptosomes). The magnetic isolation of internalized CD95-receptors allowed the time-dependent analysis of the recruitment of adaptor proteins. Immunoblot analysis showed the formation of the DISC (death-inducing signaling complex) by the recruitment of FADD and caspase 8 to the CD95-receptor. The detection of compartment-specific marker proteins demonstrated a fusion between CD95-receptosomes and Rab 4A- or cathepsin D-positive vesicles. Using different experimental approaches, it could be shown for the first time that A-SMase is located in CD95-receptosomes and is activated in a biphasic manner. The first activation peak correlates with the translocation of the A-SMase to the plasma membrane and could be blocked by the caspase 8-inhibitor IETD. The inhibition of the CD95-internalization by the dynamin-inhibitor dynasore reduced the second activation peak of the A-SMase in CD95-receptosomes. Based on the experiments using the inhibitors IETD or dynasore, the biphasic activation of A-SMase is associated with the caspase 8-mediated translocation to the cell surface and with subsequent CD95-internalization. Interestingly, the caspase 3/7-inhibitor DEVD blocked the second activation peak of the A-SMase, too. Further studies showed that caspase 3 and caspase 7 are located in CD95-receptosomes leading to the interaction and proteolytic activation of the A-SMase. These results suggest that the second activation peak of the A-SMase is caused by a caspase 3- or 7-dependent activation mechanism within internalized CD95-receptosomes.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1-20 (2005)
- [2] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-50 (2001)
- [3] Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* **23**, 1625-1637 (2009)
- [4] Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* **10**, 348-355 (2009)
- [5] Kavurma MM, Tan NY, Bennett MR. Death receptors and their ligands in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1694-1702 (2008)
- [6] Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 271-285 (2009)
- [7] Röder C, Trauzold A, Kalthoff H. Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 450-455 (2010)
- [8] Thangaraju S, Subramani E, Chakravarty B, Chaudhury K. Therapeutic targeting of the TNF superfamily: a promising treatment for advanced endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* **127**, 426-432 (2012)
- [9] Tchikov V, Bertsch U, Fritsch J, Edelmann E, Schütze S. Subcellular compartmentalization of TNF receptor 1 and CD95 signaling pathways. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 467-475 (2011)

- [10] Yurchenko M, Shlapatska LM, Sidorenko SP. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome. *Exp. Oncol.* **34**, 153-159 (2012)
- [11] Peshes-Yaloz N, Rosen D, Sondel PM, Krammer PH, Berke G. Up-regulation of Fas (CD95) expression in tumour cells in vivo. *Immunology* **120**, 502-511 (2007)
- [12] Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 10709-10715 (1992)
- [13] Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur. J. Immunol.* **24**, 3057-3062 (1994)
- [14] Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354-2357 (2000)
- [15] Strand S, Vollmer P, van den Abeelen L, Gottfried D, Alla V, Heid H, Kuball J, Theobald M, Galle PR, Strand D. Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene* **23**, 3732-3736 (2004)
- [16] Midis GP, Shen Y, Owen-Schaub LB. Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer Res.* **56**, 3870-3874 (1996)
- [17] Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, Janssen O. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 456-466 (2011)
- [18] Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D. CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ.* **10**, 1215-1225 (2003)

- [19] Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* **81**, 9-12 (1995)
- [20] Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH, Brahmi Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell. Immunol.* **166**, 236-246 (1995)
- [21] Penna A, Khadra N, Tauzin S, Vacher P, Legembre P. The CD95 signaling pathway: To not die and fly. *Commun. Integr. Biol.* **5**, 190-192 (2012)
- [22] Matsuno H, Yudoh K, Watanabe Y, Nakazawa F, Aono H, Kimura T. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J. Rheumatol.* **28**, 22-28 (2001)
- [23] Vargo-Gogola T, Crawford HC, Fingleton B, Matrisian LM. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch. Biochem. Biophys.* **408**, 155-161 (2002)
- [24] Kiaei M, Kipiani K, Calingasan NY, Wille E, Chen J, Heissig B, Rafii S, Lorenzl S, Beal MF. Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **205**, 74-81 (2007)
- [25] Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de Strooper B, Janssen O, Saftig P. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ.* **14**, 1040-1049 (2007)
- [26] Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp J. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1428-1440 (2003)

- [27] Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat. Med.* **6**, 920-923 (2000)
- [28] Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 118-125 (2003)
- [29] Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 2231-2235 (1993)
- [30] Paulsen M, Valentin S, Mathew B, Adam-Klages S, Bertsch U, Lavrik I, Krammer PH, Kabelitz D, Janssen O. Modulation of CD4+ T-cell activation by CD95 co-stimulation. *Cell Death Differ.* **18**, 619-631 (2011)
- [31] Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, Kindler V, Tschopp J, Ricciardi-Castagnoli P. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J. Exp. Med.* **192**, 1661-1668 (2000)
- [32] Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, Lee TH. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 47100-47106 (2001)
- [33] Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* **19**, 36-41 (2011)
- [34] Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 196-204 (2006)

- [35] Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.* **10**, 640-648 (2000)
- [36] Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* **6**, 686-695 (2007)
- [37] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972)
- [38] Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1570-1583 (2009)
- [39] Peter ME. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. *Nature* **471**, 310-312 (2011)
- [40] Galluzzi L et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107-120 (2012)
- [41] Reubold TF, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell. Signal.* **24**, 1420-1425 (2012)
- [42] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47-59 (2008)
- [43] Alenzi FQ, Lotfy M, Wyse R. Swords of cell death: Caspase activation and regulation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **11**, 271-280 (2010)
- [44] Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell* **138**, 838-854 (2009)

- [45] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-290 (1999)
- [46] Gonzalez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **29**, 4752-4765 (2010)
- [47] Chan FK. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* **37**, 101-107 (2007)
- [48] Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* **30**, 180-92 (2009)
- [49] Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687 (1998)
- [50] Algeciras-Schimmich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL, Peter ME. Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11445-11450 (2003)
- [51] Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin. Immunol.* **15**, 185-193 (2003)
- [52] Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* **25**, 1009-1023 (2006)
- [53] McPherson PS, Kay BK, Hussain NK. Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* **2**, 375-384 (2001)
- [54] Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 600-614 (2002)

- [55] Teis D, Huber LA. The odd couple: signal transduction and endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2020-2033 (2003)
- [56] Schütze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 655-662 (2008)
- [57] Algeciras-Schimnich A, Peter ME. Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett.* **546**, 185-188 (2003)
- [58] Schütze S, Schneider-Brachert W. Impact of TNF-R1 and CD95 Internalization on Apoptotic and Antiapoptotic Signaling. *Results Probl. Cell Differ.* **49**, 63-85 (2009)
- [59] McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517-533 (2011)
- [60] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117 (2001)
- [61] Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* **120**, 129-139 (1993)
- [62] Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh. Migr.* **5**, 199-206 (2011)
- [63] Parlato S, Giammarioli AM, Logozzi M, Lozupone F, Matarrese P, Luciani F, Falchi M, Malorni W, Fais S. CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J.* **19**, 5123-5134 (2000)

- [64] Giammarioli AM, Garofalo T, Sorice M, Misasi R, Gambardella L, Gradini R, Fais S, Pavan A, Malorni W. GD3 glycosphingolipid contributes to Fas-mediated apoptosis via association with ezrin cytoskeletal protein. *FEBS Lett.* **506**, 45-50 (2001)
- [65] Chakrabandhu K, Hérincs Z, Huault S, Dost B, Peng L, Conchonaud F, Marguet D, He HT, Hueber AO. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J.* **26**, 209-220 (2006)
- [66] Feig C, Tchikov V, Schütze S, Peter ME. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.* **26**, 221-231 (2006)
- [67] Swindall AF, Bellis SL. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 22982-22990 (2011)
- [68] Bartke N, Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, 91-96 (2009)
- [69] Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J. Biol. Chem.* **286**, 27855-27862 (2011)
- [70] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139-150 (2008)
- [71] Perry DK. Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 146-152 (2002)
- [72] Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal.* **20**, 1010-1018 (2008)

- [73] Goñi FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* **53**, 38-46 (2002)
- [74] Clarke CJ, Snook CF, Tani M, Matmati N, Marchesini N, Hannun YA. The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* **45**, 11247-11256 (2006)
- [75] Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA. The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Adv. Enzyme Regul.* **51**, 51-58 (2011)
- [76] Philipp S, Puchert M, Adam-Klages S, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Mathieu S, Deerberg A, Kolker L, Marchesini N, Kabelitz D, Hannun YA, Schütze S, Adam D. The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 1112-1117 (2010)
- [77] Schuchman EH, Levran O, Pereira LV, Desnick RJ. Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics* **12**, 197-205 (1992)
- [78] Rhein C, Tripal P, Seebahn A, Konrad A, Kramer M, Nagel C, Kemper J, Bode J, Mühle C, Gulbins E, Reichel M, Becker CM, Kornhuber J. Functional implications of novel human acid sphingomyelinase splice variants. *PLoS One* **7**, e35467 (2012)
- [79] Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell. Signal.* **21**, 836-846 (2009)
- [80] Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 81-103 (2005)
- [81] Ferlinz K, Linke T, Bartelsen O, Weiler M, Sandhoff K. Stimulation of lysosomal sphingomyelin degradation by sphingolipid activator proteins. *Chem. Phys. Lipids* **102**, 35-43 (1999)

- [82] Jenkins RW, Canals D, Idkowiak-Baldys J, Simbari F, Roddy P, Perry DM, Kitatani K, Luberto C, Hannun YA. Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 35706-35718 (2010)
- [83] Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 18250-18259 (1998)
- [84] Hurwitz R, Ferlinz K, Vielhaber G, Moczall H, Sandhoff K. Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 5440-5445 (1994)
- [85] Takahashi I, Takahashi T, Mikami T, Komatsu M, Ohura T, Schuchman EH, Takada G. Acid sphingomyelinase: relation of 93lysine residue on the ratio of intracellular to secreted enzyme activity. *Tohoku J. Exp. Med.* **206**, 333-340, (2005)
- [86] Marathe S, Choi Y, Leventhal AR, Tabas I. Sphingomyelinase converts lipoproteins from apolipoprotein E knockout mice into potent inducers of macrophage foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2607-2613 (2000)
- [87] Devlin CM, Leventhal AR, Kuriakose G, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. Acid sphingomyelinase promotes lipoprotein retention within early atheromata and accelerates lesion progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1723-1730 (2008)

- [88] Hollak CE, de Sonnaville ES, Cassiman D, Linthorst GE, Groener JE, Morava E, Wevers RA, Mannens M, Aerts JM, Meersseman W, Akkerman E, Niezen-Koning KE, Mulder MF, Visser G, Wijburg FA, Lefeber D, Poorthuis BJ. Acid sphingomyelinase (Asm) deficiency patients in The Netherlands and Belgium: disease spectrum and natural course in attenuated patients. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 526-533 (2012)
- [89] Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J.* **22**, 3419-3431 (2008)
- [90] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* **300**, 1155-1159 (2003)
- [91] Lacour S, Hammann A, Grazide S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergent O, Laurent G, Gambert P, Solary E, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 3593-3598 (2004)
- [92] Perrotta C, Bizzozero L, Falcone S, Rovere-Querini P, Prinetti A, Schuchman EH, Sonnino S, Manfredi AA, Clementi E. Nitric oxide boosts chemoimmunotherapy via inhibition of acid sphingomyelinase in a mouse model of melanoma. *Cancer Res.* **67**, 7559-7564 (2007)
- [93] Falcone S, Perrotta C, De Palma C, Pisconti A, Sciorati C, Capobianco A, Rovere-Querini P, Manfredi AA, Clementi E. Activation of acid sphingomyelinase and its inhibition by the nitric oxide/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway: key events in Escherichia coli-elicited apoptosis of dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 4452-4463 (2004)
- [94] Won JS, Singh I. Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1875-1888 (2006)

- [95] Ferlinz K, Hurwitz R, Moczall H, Lansmann S, Schuchman EH, Sandhoff K. Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **243**, 511-517 (1997)
- [96] Zeidan YH, Hannun YA. Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 11549-11561 (2007)
- [97] Qiu H, Edmunds T, Baker-Malcolm J, Karey KP, Estes S, Schwarz C, Hughes H, Van Patten SM. Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J. Biol. Chem.* **278**, 32744-32752 (2003)
- [98] Edelmann B, Bertsch U, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Perrotta C, Jakob M, Adam-Klages S, Kabelitz D, Schütze S. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *EMBO J.* **30**, 379-394 (2011)
- [99] Grassmé H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* **22**, 5457-5470 (2003)
- [100] Perrotta C, Bizzozero L, Cazzato D, Morlacchi S, Assi E, Simbari F, Zhang Y, Gulbins E, Bassi MT, Rosa P, Clementi E. Syntaxin 4 is required for acid sphingomyelinase activity and apoptotic function. *J. Biol. Chem.* **285**, 40240-40251 (2010)
- [101] 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. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* **21**, 415-428 (2004)

- [102] Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969)
- [103] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970)
- [104] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354 (1979)
- [105] Weigmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* **78**, 1005-1015 (1994)
- [106] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39-51 (1995)
- [107] Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* **10**, 839-850 (2006)
- [108] Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**, 493-495 (1983)
- [109] Schütze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, Heinrich M, Wickel M, Krönke M. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 10203-10212 (1999)

- [110] Schleich K, Warnken U, Fricker N, Öztürk S, Richter P, Krammerer K, Schnölzer M, Krammer PH, Lavrik IN. Stoichiometry of the CD95 Death-Inducing Signaling Complex: Experimental and Modeling Evidence for a Death Effector Domain Chain Model. *Mol. Cell* **47**, 1-14 (2012)
- [111] Wang S, Xia P, Shi L, Fan Z. FADD cleavage by NK cell granzyme M enhances its self-association to facilitate procaspase-8 recruitment for auto-processing leading to caspase cascade. *Cell Death Differ.* **19**, 605-615, (2012)
- [112] Pereira-Leal JB, Hume AN, Seabra MC. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Lett.* **498**, 197-200 (2001)
- [113] Li X, Han WQ, Boini KM, Xia M, Zhang Y, Li PL. TRAIL death receptor 4 signaling via lysosome fusion and membrane raft clustering in coronary arterial endothelial cells: evidence from ASM knockout mice. *J. Mol. Med.* **91**, 25-36, (2013)
- [114] Dumitru CA, Gulbins E. TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* **25** 5612-5625 (2006)
- [115] Min Y, Shi J, Zhang Y, Liu S, Liu Y, Zheng D. Death receptor 5-recruited raft components contributes to the sensitivity of Jurkat leukemia cell lines to TRAIL-induced cell death. *IUBMB Life* **61**, 261-267 (2009)
- [116] Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CG, Parolini I, Lotti F, Sette G, Peschle C, De Maria R. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1930-1940 (2004)

- [117] Chaigne-Delalande B, Mahfouf W, Daburon S, Moreau JF, Legembre P. CD95 engagement mediates actin-independent and -dependent apoptotic signals. *Cell Death Differ.* **16**, 1654-1664 (2009)
- [118] Ferlinz K, Hurwitz R, Vielhaber G, Suzuki K, Sandhoff K. Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *Biochem. J.* **301**, 855-862, (1994)
- [119] Jin S, Yi F, Zhang F, Poklis JL, Li PL. Lysosomal targeting and trafficking of acid sphingomyelinase to lipid raft platforms in coronary endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 2056-2062 (2008)
- [120] Conus S, Pop C, Snipas SJ, Salvesen GS, Simon HU. Cathepsin D primes caspase-8 activation by multiple intra-chain proteolysis. *J. Biol. Chem.* **287**, 21142-21151 (2012)
- [121] Ruiz-Vela A, González de Buitrago G, Martínez-A C. Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion. *EMBO J.* **18**, 4988-4998 (1999)
- [122] Khorchid A, Ikura M. How calpain is activated by calcium. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 239-241 (2002)
- [123] Aouad SM, Cohen LY, Sharif-Askari E, Haddad EK, Alam A, Sekaly RP. Caspase-3 is a component of Fas death-inducing signaling complex in lipid rafts and its activity is required for complete caspase-8 activation during Fas-mediated cell death. *J. Immunol.* **172**, 2316-2323 (2004)
- [124] Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **273**, 10815-10818 (1998)

- [125] Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 644-51, (1999)
- [126] Stennicke HR, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* **272**, 25719-25723 (1997)
- [127] Matsumoto A, Comatas KE, Liu L, Stamler JS. Screening for nitric oxide-dependent protein-protein interactions. *Science* **301**, 657-661 (2003)

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Stefan Schütze für die Bereitstellung des interessanten und spannenden Arbeitsthemas sowie seiner vielseitigen Unterstützung. Seine ständige Ansprechbarkeit, Diskussionsbereitschaft und vielen guten Ratschläge haben maßgeblich zum erfolgreichen Voranschreiten meines Projekts beigetragen.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig für die Übernahme der Betreuung seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz für die Möglichkeit am Institut für Immunologie zu promovieren und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Frau Dr. Bärbel Edelmann, Herrn Dr. Jürgen Fritsch, Herrn Dr. Uwe Bertsch, Frau Anastasia Tatarnikova und Frau Susann Voigt danke ich herzlich für die experimentelle Mithilfe, das Einarbeiten in die neuen Methoden sowie das Korrekturlesen. Auch Dr. Supandi Winoto-Morbach, Dr. Vladimir Tchikov, Andrea Hethke und Casimir Malanda danke ich herzlich für ihre Unterstützungen im Laboralltag. Der Arbeitsgruppe Schütze sowie dem gesamten Institut für Immunologie verdanke ich eine großartige Zusammenarbeit und eine angenehme Arbeitsatmosphäre

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern Armin und Gabriele Stephan, meiner Schwester Janin sowie der gesamten Familie. Ihr immerwährender Beistand, aufbauenden Worte und Motivation ist ein fester Rückhalt meines Lebens.

Meiner Freundin Bärbel danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe, Geduld und ihre unglaubliche Unterstützung in allen Lebenssituationen. Ihr Engagement und Zuspruch hat mir in schwierigen Situationen Kraft gegeben durchzuhalten und an mich zu glauben.

8 Wissenschaftlicher Werdegang

persönliche Daten:

Name: Mario Stephan

Wohnort: Uhlenkrog 22
24113 Kiel

Geburtsdatum: 1. Juni 1980

Geburtsort: Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion:

seit Nov. 2008 Wissenschaftlicher Angestellter (Doktorand) am
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
Institut für Immunologie, AG Prof. Schütze

Hochschulstudium:

2007–2008 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Molekulare
Pharmakologie in Berlin, AG Prof. Hermosilla

2002–2008 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin

Grundwehrdienst:

2000–2001 Grundwehrdienst beim 2/Panzergrenadierbataillon 421
in Brandenburg an der Havel

Schulbildung und Schulabschluss:

1997–2000	Oberstufenzentrum Oberhavel II–Technik Hennigsdorf, Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
1993–1997	Erich-Weinert Gesamtschule Falkensee
1987–1993	Lessing-Grundschule Falkensee

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die eingereichte wissenschaftliche Abhandlung mit dem Titel:

“Molekularer Mechanismus der Fas Ligand-induzierten Aktivierung der sauren Sphingomyelinase“

abgesehen von der Beratung durch akademische Lehrer, nach Inhalt und Form von mir eigenständig verfasst wurde.

Die hier vorliegende Dissertation ist unter Einhaltung der Regel guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Kiel, den 17.09.2013,

Mario Stephan