

Die Rolle des Proteins DEDD in Apoptose

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität,
Heidelberg

vorgelegt von
Olaf Schickling
Diplom-Biologe

November 2001

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1998 bis Juli 1999 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und von August 1999 bis September 2001 am Ben May Institute for Cancer Research der University of Chicago.

Gutachter: Prof. Dr. Christine Clayton
(Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg)

Prof. Dr. Marcus E. Peter
(Ben May Institute for Cancer Research, University of Chicago)

Danksagungen

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marcus Peter, der mir durch seine intensive und kompetente Betreuung half, den Überblick über meine Ergebnisse zu behalten, und der niemals den Glauben an mich oder mein Projekt verlor. Er hat mir gezeigt, was es heißt ein Wissenschaftler zu sein und wie viel man mit Engagement und Motivation erreichen kann.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Prof. Dr. Christine Clayton, die sich stets Zeit für mich genommen und mir und meiner Arbeit großes Vertrauen entgegengebracht hat. Durch ihre freundliche, hilfsbereite und unkomplizierte Betreuung wurde die Durchführung dieser Arbeit erst möglich.

Dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Peter Krammer, der es mir durch seine Unterstützung ermöglicht hat, meine wissenschaftliche Karriere in einem großartigen Umfeld zu beginnen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Alexander Stegh, Jörg Volkland und meiner Frau Sandra Schickling bedanken. Ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und unserer Freundschaft haben zu einem sehr großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen und mir viel Freude bereitet.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die zum Teil sehr enge Zusammenarbeit mit:

Dr. Lixin Zheng & Prof. Dr. Michael Lenardo im Rahmen des DEDAF-Projektes.

Johnnie Byrd, der half, die DNA-Bindung zu charakterisieren.

Andrea Murmann und Ihre Hilfe bei den Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop.

Justine Lee, aka. „El Spawn“, deren Energie und Enthusiasmus ansteckend wirkten, und der ich für die Weiterführung des DEDD-Projektes alles Gute wünsche.

Dr. David Dinsdale & Prof. Dr. Gerald Cohen, die uns halfen, DEDD auch mit dem Elektronen-Mikroskop nachzuweisen.

Den Mitarbeitern des Krammer- und des Peter-Labors, die durch Ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Danke.

Verwendete Abkürzungen

µg	Mikrogramm	IF	Intermediärfilament
µl	Mikroliter	IgG	Immunglobulin Typ G
µM	Mikromolar	IP	Immunpräzipitation
°C	Grad Celsius	kb	Kilobasen
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom	kDa	Kilodalton
AIF	Apoptose-induzierender Faktor	M	molar
APS	Ammoniumperoxidisulfat	mA	Milliampere
AS	Aminosäure	max.	maximal
ATP	Adenosintriphosphat	mg	Milligramm
BSA	Rinderserumalbumin	min	Minuten
c-FLIP	„ <u>c</u> ellular <u>FL</u> ICE-inhibitory <u>P</u> rotein“	mind.	mindestens
CD	„ <u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation“	mRNA	„ <u>m</u> essenger <u>R</u> NA“
CED	„ <u>e</u> legans <u>D</u> eath Gene“	p	Protein
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DD	Todesdomäne	SDS	Natriumdodecylsulfat
DED	Todeseffektordomäne	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex	STS	Staurosporin
DMSO	Dimethylsulfoxid	TNF	Tumornekrosefaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol	TRITC	Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat
ECL	„ <u>E</u> nhanced <u>C</u> hemo <u>l</u> uminescence“	UpM	Umdrehungen pro Minute
EM	Elektronen-Mikroskop	v-FLIP	„ <u>v</u> iral <u>FL</u> ICE-inhibitory <u>P</u> rotein“
FADD	„ <u>F</u> as- <u>A</u> ssociated <u>D</u> eath <u>D</u> omain Protein“	v/v	Volumen zu Volumen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	WB	Western Blot
FKS	fötales Kälberserum	w/v	Gewicht zu Volumen
FACS	„ <u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter“	z.B.	zum Beispiel
GFP	grün fluoreszierendes Protein		

Für die Bezeichnung von Aminosäuren wurden der übliche Ein- bzw. Drei-Buchstabencode verwendet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	8
1.01 Die Mechanismen des Zelltodes	8
1.02 <i>C. elegans</i> als Modellsystem der Apoptose	9
1.03 Die Todesrezeptoren	9
1.04 Die Bcl-2 Familie und die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose	11
1.05 Aktivierung und Lokalisation von Caspasen	13
1.06 Virale, zelluläre und synthetische Inhibitoren von Caspasen	16
1.07 Caspasensubstrate und die apoptotische Morphologie	17
1.08 Nukleare und nukleolare Ereignisse der Apoptose	21
1.09 Die Todeseffektordomäne und ihre Verwandten	23
1.10 DEDD	24
1.11 Aufgabenstellung	26
 2. Material und Methoden	 28
2.01 Chemikalien	28
2.02 Häufig verwendete Puffer	28
2.03 Geräte	30
2.04 Bakterienstämme	31
2.05 Eukaryontische Zellen	31
2.06 Antikörper	32
2.07 Caspaseninhibitoren	33
2.08 Caspasenpeptidsubstrate	34
2.09 Vektoren	34
2.10 Oligonukleotide (PCR-Primer)	34
2.11 Enzyme und Kits	36
2.12 Medien für Bakterien	37

2.13	Anzucht von Bakterien	37
2.14	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
2.15	Auftrennung und Elution von DNA-Fragmenten	38
2.17	Modifizierung von DNA	40
2.18	Polymerase-Kettenreaktion	41
2.19	Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen	43
2.20	Herstellung und Transformation chemo-kompetenter Bakterien	43
2.21	Herstellung rekombinanter His-Fusionsproteine	44
2.22	Bindung von His-Fusionsproteinen an λ -DNA	45
2.23	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.24	Western Blot-Analyse	46
2.25	Medien für die Zellkultur	46
2.26	Kultivierung eukaryontischer Zellen	46
2.27	Trypanblau-Ausschlußtest	47
2.28	Immunpräzipitation	47
2.29	Subzelluläre Fraktionierung	48
2.30	Präparation von Intermediärfilamenten und unlöslichem DEDD	48
2.31	Caspasenaktivitätstest	49
2.32	Transfektion von Zellen	49
2.33	Proteinfärbung zur FACS-Analyse	50
2.34	Messung apoptotischer Zellen nach Nicoletti	50
2.35	Immunfluoreszenzmikroskopie	51
2.36	<i>in vivo</i> -Transkriptionsanalyse in permeabilisierten Zellen	52
2.37	Detektion von aktiver Caspase-6 in einzelnen Zellen	52
2.38	Apoptose-Induktion durch Kotransfektion des CD8:Casp-8-Konstruktes	52

3. Ergebnisse 53

3.01	Die Exon / Intron Struktur von DEDD	53
------	-------------------------------------	----

3.02	Identifizierung eines dritten NLS	55
3.03	DEDD benötigt die Kernlokalisierung, um proapoptotisch zu wirken	57
3.04	Die Apoptose-Induktion von DEDD basiert auf einer funktionellen DED	59
3.05	DEDD aktiviert mit Hilfe seiner DED Caspase-6 im Nukleus	61
3.06	DEDD interagiert über seine DED mit DEDAF	63
3.07	Endogenes DEDD befindet sich im Cytoplasma und im Nukleus	65
3.08	Nukleares DEDD befindet sich in Nukleoli	67
3.09	DEDD inhibiert spezifisch Polymerase I-abhängige Transkription	69
3.10	DEDD bildet filamentförmige Aggregate im Cytoplasma apoptotischer Zellen	71
3.11	Die Entstehung der DEDD-Filamente ist Caspase-3 abhängig	74
3.12	DEDD-Filamente treten nach verschiedenen Apoptose-Stimuli auf	76
3.13	DEDD-Filamente kolokalisieren mit Cytokeratin 8/18 und Vimentin	77
3.14	Die Bildung von DEDD-Filamenten geht der Spaltung von Cytokeratin 18 durch Caspase-3 voraus	79
3.15	Die Aggregation von DEDD in apoptotischen Zellen ist nicht von Keratinen abhängig	80
3.16	DEDD, K18, gespaltenes K18 und Vimentin lokalisieren in intrazellulären Granuli	82
3.17	Die DEDD-positiven intrazellulären Granuli sind Vorläufer der apoptotischen Körperchen	84
3.18	DEDD bildet SDS-stabile Aggregate, die im Verlauf der Apoptose unlöslich werden	84
3.19	DEDD ^{ag} assoziiert mit Keratin 18	85
3.20	DEDD und K18 kolokalisieren zusammen mit aktiver Caspase-3 in Filamenten und Granuli	87
3.21	Transiente Transfektion von DEDD-NLS1-3 k.o. inhibiert die Spaltung von K18	91
4.	Diskussion	93
4.01	Das dedd-Gen	94
4.02	Die Rolle der DED im Nukleus	95
4.03	DEDD als nukleolares Protein	97

4.04	DEDD und DEDAF interagieren im Nukleus	99
4.05	DEDD bildet Aggregate	100
4.06	DEDD und seine Rolle bei der Spaltung von Keratin 18	102
4.07	Die Auswirkungen der Keratin-Spaltung	106
4.08	Ein Modell zur Aktivierung von DEDD	107
5.	Zusammenfassung	112
6.	Literaturverzeichnis	114

1. Einleitung

1.01 Die Mechanismen des Zelltodes

Nach morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten unterscheidet man zwei Formen von Zelltod: Apoptose und Nekrose. Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein notwendiger Prozeß, der im Rahmen von Zellwachstum und -entwicklung eine wichtige Rolle spielt und für die Regulation des Immunsystems und für Gewebshomöostase verantwortlich ist (Thompson 1995). Der Begriff "Apoptose" wurde von Kerr, Wyllie und Currie geprägt, die damit eine Reihe morphologischer Veränderungen definierten, die in Lebergewebe nach Entzug von Wachstumsfaktoren zu beobachten waren (Kerr et al., 1972). Leberzellen fragmentierten in kleine Vesikel variabler Größe und wurden durch Nachbarzellen oder Phagozyten aufgenommen und damit aus dem Zellverband entfernt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß apoptotische Zellen eine charakteristische Abfolge cytologischer Veränderungen aufweisen, die durch die Aktivierung katabolischer Enzyme, wie Nukleasen und Proteasen, hervorgerufen werden. Das Chromatin kondensiert und chromosomale DNA wird endonukleolytisch gespalten. Zunächst entstehen 50, 150 und 300 kb große DNA-Fragmente (Watanabe et al., 1995; Oberhammer et al., 1993). In einer zweiten Phase der DNA-Spaltung entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von 180 bp und ganzzahligen Vielfachen davon. Zudem bilden Membranen bläschenförmige Ausstülpungen (Zeiose, Vorstufe der später auftretenden apoptotischen Körper), die biochemisch mit dem Verlust der Membranasymmetrie einhergehen. Phosphatidylserine werden an der Zelloberfläche exponiert und spezifisch durch beispielsweise Makrophagen erkannt, was zur Phagocytose und Elimination dieser apoptotischen Körperchen führt. Dadurch wird sicher gestellt, daß alternde oder geschädigte Zellen in einer kontrollierten Weise eliminiert werden, ohne daß inflammatorische Reaktionen auftreten, die benachbarte intakte Zellen oder die extrazelluläre Matrix schädigen könnten.

Der Apoptose als physiologischer Form des Zelltodes ist die Nekrose gegenüberzustellen, die vielfach mit Entzündungserscheinungen verbunden ist (Trump et al., 1981). Die Nekrose bedient sich keiner geregelten Mechanismen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren. Sie ist Folge irreversibler Schädigungen, die durch Einwirkung verschiedener Noxen entstehen. Es kommt zur Erhöhung der Membranpermeabilität und als unmittelbare Folge zum Anschwellen der Zelle und deren Organellen (Oncoze). Gekoppelt an den Verlust der Membranintegrität ist die Freisetzung lysosomaler Enzyme, die den zellulären Desintegrationsprozeß weiter fördern.

Obwohl Apoptose und Nekrose grundsätzlich verschiedene Charakteristika aufweisen, und daher voneinander unabhängig scheinen, zeigen einige Studien, daß beide Prozesse unter bestimmten Bedingungen miteinander gekoppelt sind: Verschiedene Toxine lösen in geringer

Konzentration Apoptose, in größeren Mengen Nekrose aus (Kroemer, 1995). Der zelluläre ATP-Status scheint ebenfalls einen Einfluß darauf zu haben, ob eine Zelle einen nekrotischen oder einen apoptotischen Zelltod stirbt: Höhere ATP-Konzentrationen begünstigen Apoptose, niedrige ATP-Konzentrationen führen zu Nekrose (Leist et al., 1997; Egushi et al., 1997). Apoptose wird durch eine Vielzahl exogener und endogener Stimuli, wie z.B. Hypoxia, Hitze, Kälte, ionisierende Strahlung, Glukokortikoide, Cytokine (z.B. Tumornekrosefaktor, TNF) oder Pharmaka (z.B. Cytostatika), induziert. Ist der apoptotische Signalweg jedoch blockiert, kann ein proapoptotischer Stimulus auch Nekrose auslösen (Vercammen et al., 1998).

1.02 *C. elegans* als Modellsystem der Apoptose

Die Apoptose ist ein evolutionär stark konservierter Prozeß. Erste Erkenntnisse über die genetische Grundlage der Apoptose wurden in der Entwicklungsbiologie in Studien des Nematoden *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Während der Entwicklung von *C. elegans* sterben 131 der 1090 somatischen Zellen (Sulston et al., 1992). Dabei spielen drei Genprodukte eine essentielle Rolle: CED-3 und CED-4 sind proapoptotische Moleküle, während CED-9 anti-apoptotisch wirkt (Lin und Hengartner, 1999). CED-3 ist eine Cysteinprotease, die ihre Substrate nach einem Aspartatrest spaltet. CED-3 liegt als Zymogen vor, das sich autoproteolytisch aktiviert (Thornberry und Lazebnik, 1998). Das Adapter-Molekül CED-4 bindet an CED-3 und fördert so die Aktivierung dieser Protease. CED-9 inhibiert die Aktivierung von CED-3 durch direkte Bindung an CED-4 (Chinnaiyan et al., 1997). In einer lebendigen Zelle liegen CED-3, CED-4 und CED-9 als ternärer Komplex vor. Induktion von Apoptose führt zur Dissoziation von CED-9 und damit zur CED-4-vermittelten Aktivierung von CED-3. Ein weiteres proapoptotisches Gen, EGL-1, interagiert mit CED-9 und inhibiert dessen anti-apoptotische Aktivität, was zur Aktivierung des CED-4/CED-3-Komplexes führt (Conradt und Horvitz, 1998). Vertebraten haben ganze Genfamilien entwickelt, die diesen prototypischen *C. elegans*-Proteinen ähneln: Caspasen (kurz für Cysteiny-Aspartasen) sind homolog zu CED-3 (Thornberry und Lazebnik, 1998), Apaf-1 ist ein CED-4-Homolog (Zou et al., 1997), und die *Bcl-2*-Genfamilie (siehe Abschnitt 1.04) steht in enger Beziehung zu CED-9 (Yang und Korsmeyer, 1996) und EGL-1 (Conradt und Horvitz, 1998).

1.03 Die Todesrezeptoren

Verliert eine Zelle den Kontakt zu ihrer Umgebung, d.h. zu benachbarten Zellen oder zur extrazellulären Matrix, oder wird sie irreparabel geschädigt, so wird das apoptotische Selbstmordprogramm initiiert (Evan und Littlewood, 1998). Säugetiere haben darüber hinaus einen weiteren, bei niederen Organismen wie *C. elegans* nicht zu beobachtenden Mechanismus

entwickelt, der als "instruktive Apoptose" bezeichnet werden kann (Ashkenazi und Dixit, 1998). Eine Schlüsselfunktion übernehmen bestimmte Oberflächenrezeptoren, die nach Bindung ihrer spezifischen Liganden Apoptose induzieren. Diese, als Todesrezeptoren bezeichneten Proteine, sind differentiell glykosylierte Oberflächenmoleküle mit charakteristischen Cystein-reichen Domänen und gehören zur TNF/NGF-Rezeptorsuperfamilie. Todesrezeptoren können ein cytotoxisches Signal ins Cytoplasma übertragen. Neben der Induktion von Apoptose können sie darüber hinaus noch andere Funktionen im Rahmen von Zell-Aktivierung, Differenzierung und Proliferation übernehmen. Mit der Entdeckung des Typ I-Transmembranproteins CD95 (APO-1/Fas; Molekulargewicht: 42-52 kDa) (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992) wurde erstmals ein Rezeptor beschrieben, dessen Hauptaufgabe die Induktion von Apoptose zu sein scheint. Durch Vergleich mit TNF-R1 wurde eine intrazelluläre Domäne identifiziert, die für die Transduktion des Todessignals in das Innere der Zelle verantwortlich ist (Tartaglia et al., 1993; Itoh und Nagata, 1993), und die als Todesdomäne („death domain", DD) bezeichnet wurde. Diese Todesdomäne weist eine charakteristische Proteinfaltung auf, die aus sechs antiparallelen amphipatischen α -Helices besteht (Huang et al., 1996). Sie ist eine von mehreren verwandten Interaktionsdomänen, die wichtige Rollen in den Signalwegen der Todesrezeptoren spielen (siehe auch Abschnitt 1.09).

Die Initiationsphase der Apoptose ist für CD95 detailliert analysiert worden. Wie andere Mitglieder der TNF-Familie, so ist auch der Ligand (CD95L) des CD95-Rezeptors ein homotrimeres Molekül. In Analogie zur Kristallstruktur von Lymphotoxin α mit TNF-R1 und

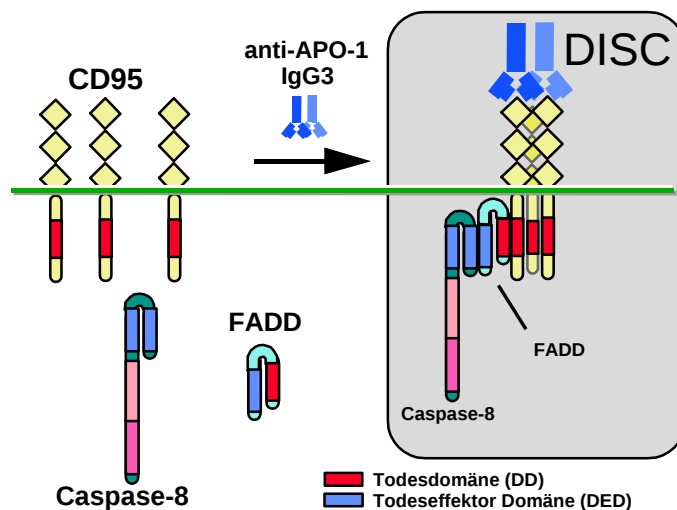


Abbildung 1.03b: Schematische Darstellung der CD95 DISC Bildung. Der agonistische anti-APO-1 Antikörper (IgG3) ist in der Lage, den CD95 Rezeptor zu oligomerisieren. Dies führt zu der Anlagerung von FADD und Caspase-8 an die intrazelluläre Todesdomäne von CD95. Der so entstandene Proteinkomplex wird als DISC („Death Inducing Signalling Complex“) bezeichnet.

basierend auf Computermodellen, wird davon ausgegangen, daß CD95L drei CD95-Moleküle bindet (Smith et al., 1994). Da die DD in der intrazellulären Region die Eigenschaft zur Oligomerisierung besitzt, führt die Trimerisierung von CD95 zu einer Komplexbildung der DD. Die Trimerisierung des Rezeptors kann auch durch die Bindung eines agonistischen Antikörpers, wie zum Beispiel anti-APO-1 (Trauth et al., 1989), ausgelöst werden. Nach Trimerisierung des Rezeptors lagert sich das Adaptermolekül FADD (für „Fas

associated death domain", auch als Mort1 bezeichnet) an den Rezeptorkomplex an. FADD verfügt wie CD95 über eine DD und bindet über eine homophile DD-Wechselwirkung an den Rezeptor (Chinnaiyan et al., 1995). Neben einer DD besitzt FADD ein zweites Protein-Protein-Interaktionsmodul, das als Todeseffektordomäne (DED für „Death Effector Domain“) bezeichnet wird. Mit Hilfe seiner DED rekrutiert FADD über eine DED-DED-Interaktion die Cysteinprotease Caspase-8 (auch als FLICE, MACH oder Mch5 bezeichnet) an den Rezeptor (Muzio et al., 1995; Boldin et al., 1996; Fernandez-Alnemri et al., 1996). Der Komplex aus trimerisiertem CD95, FADD und Caspase-8 wird als DISC (für „Death Inducing Signalling Complex“) bezeichnet (Kischkel et al., 1995) (Abb.1.03b). Caspase-8 besitzt zwei N-terminale DED. Die Interaktion mit FADD erfolgt mit Hilfe der ersten DED. Der C-Terminus, der Caspase-8 als Mitglied der Caspasenfamilie identifiziert, ist durch zwei charakteristische Untereinheiten gekennzeichnet, die die Proteaseaktivität besitzen und die bei allen Mitgliedern dieser Familie zu finden sind. (Wilson et al., 1994, Walker et al., 1995). Das sogenannte „Induced Proximity Model“ schlägt vor, daß ein Caspase-8-Molekül durch ein zweites Zymogenmolekül in unmittelbarer Nähe proteolytisch prozessiert wird, woraufhin das aktive Enzym vom DISC freigesetzt wird (Muzio et al., 1998).

1.04 Die Bcl-2 Familie und die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose

Neuere Studien haben Mitochondrien zu einem zentralen Bestandteil der Apoptose gemacht (Kroemer et al., 1998). So kann während der Apoptose ein Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) noch vor der DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Petit et al., 1995; Zamzami et al., 1995). Dieser Verlust von $\Delta\Psi_m$ ist nach nahezu allen Apoptosestimuli zu beobachten und stellt daher ein universelles Ereignis dar (Kroemer et al., 1997). Verursacht wird dieser Abfall des Transmembranpotentials durch einen Vorgang, den man Permeabilitäts-Transition (PT) nennt und der durch das Öffnen von Poren der Mitochondrienmembran gekennzeichnet ist (Bernardi et al., 1994).

Eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose spielen die Proteine der Bcl-2-Familie, deren Namensgeber, das Onkogen *bcl-2*, als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist (Tsujimoto et al., 1985). Im Gegensatz zu anderen Onkogenen besteht die Funktion von Bcl-2 nicht darin Proliferation zu stimulieren, sondern Zellen vor Apoptose zu schützen (Vaux et al., 1988; Hockenbery et al., 1990). Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine umfaßt anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-x_L und proapoptotische Moleküle wie z. B. Bax und Bak (Wei et al., 2001). Die evolutionäre Konservierung von Bcl-2 wird dadurch unterstrichen, daß CED-9 aus *C. elegans* und Bcl-2 sowohl homologe Proteine, als auch funktionell austauschbar sind (Hengartner et al., 1994). Bcl-2 besitzt eine Transmembrandomäne am C-Terminus, die zu einer Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, die Kernmembran

und das Endoplasmatische Retikulum führt (Monaghan et al., 1992; Jacobson et al., 1993; Krajewski et al., 1993). Durch Deletion dieser Domäne verliert Bcl-2 weitgehend seine anti-apoptotische Wirkung (Tanaka et al., 1993).

Während CED-9 homolog zu einem anti-apoptischen Protein der Bcl-2-Familie ist, weist das *C.elegans* Protein EGL-1 Homologien mit dem proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglied Bid auf (Conradt et al., 1998). Mitochondrien können als Signal-Verstärker das Apoptose Signal amplifizieren. Aktive Caspase-8 spaltet das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid, wodurch ein 15 kDa großes Spaltprodukt (tBid, p15Bid) entsteht, das zu den Mitochondrien transloziert und die Freisetzung von Cytochrom c über einen bislang wenig charakterisierten Mechanismus auslöst (Gross et al., 1999; Luo et al., 1998; Li et al., 1998; Han et al., 1999). Dies führt zur Aktivierung des mitochondrienabhängigen Signalweges der Apoptose, der durch Bcl-2 oder Bcl-x_L inhibiert werden kann. Untersuchungen von Bid-defizienten Mäusen haben gezeigt, daß Bid für die Aktivierung des Todesrezeptor-vermittelten mitochondrialen Apoptose-Signalweges essentiell ist (Yin et al., 1999). Vor kurzem zeigten Untersuchungen an Bax -/- und Bak -/- doppelt-negativen Mäusen, daß diese resistent gegenüber sämtlicher Mitochondrien-vermittelter Apoptose, und Bax und Bak somit essentiell für diese Form des Zelltods sind (Cheng et al., 2001).

Cytochrom c ist ein Faktor, der von apoptotischen Mitochondrien freigesetzt wird, (Liu et al., 1996). In nicht-apoptotischen Zellen ist er ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, der Elektronen von der Cytochrom c-Reduktase auf die Cytochrom c-Oxidase überträgt. Cytochrom c ist mit der inneren Mitochondrienmembran auf der Seite des Intermembranspalts assoziiert. Das Cytochrom c-Apoprotein, das nicht proapoptotisch wirkt, wird im Cytoplasma synthetisiert und gelangt über einen speziellen Mechanismus in die Mitochondrien, wo es seine Hämgruppe erhält und zum komplett gefalteten Holocytochrom c wird. Dieses Holoprotein kann unter normalen Umständen den Intermembranspalt nicht mehr verlassen. Ins Cytoplasma freigesetzt, trägt Cytochrom c zur Caspasenaktivierung bei.

Der Mechanismus der Cytochrom c-induzierten Caspasenaktivierung wurde mittels zellfreier Systeme aufgeklärt und führte zu der Identifizierung des menschlichen CED-4-Homologs Apaf-1 (Zou et al., 1997). Cytochrom c bindet zuerst an die Caspasen-Rekrutierungsdomänen (CARD) von Apaf-1 und assoziiert anschließend unter Verbrauch von ATP mit der CARD von Caspase-9 (Li et al., 1997; Qin et al., 1999). Die CARD besitzt eine ähnliche Struktur wie die DD und der DED (siehe Abschnitt 1.09) und gehört somit zu dieser evolutionär verwandten Gruppe von Interaktionsdomänen (Chou et al. 1998, Qin et al. 1999, Day et al. 1999). Die Assoziation von Caspase-9 und Apaf-1 führt zu der autoproteolytischen Aktivierung von Caspase-9 (Srinivasula et al., 1998), was die Aktivierung weiterer Caspasen, wie

z.B. Caspase-3, zur Folge hat und letztlich über die Spaltung von DFF45/ICAD zur DNA-Fragmentierung führt.

1.05 Aktivierung und Lokalisation von Caspasen

Die Caspasen sind die Schlüsselmoleküle, die für die Weiterleitung des apoptotischen Signals von der Zelloberfläche ins Zellinnere maßgeblich verantwortlich sind. Es handelt sich dabei um eine Familie von Proteasen, die einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum besitzen und ihre Substrate nach einem Aspartat spalten, d.h. sie benötigen einen Aspartatrest in der P1-Position ihres korrespondierenden Substrates. Die Caspasenfamilie umfaßt 14 Mitglieder, die in Säugetieren identifiziert und von denen 12 Enzyme im Menschen gefunden wurden. Caspasen lassen sich aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Gruppen einteilen (Thornberry et al., 1997): Gruppe I-Caspasen (Caspasen 1, 4, 5, 13), deren Hauptfunktion in der Prozessierung von Cytokinen besteht, bevorzugen das Spaltungsmotiv (W/L)EHD. Caspasen der Gruppen II und III sind Effektorproteasen verschiedener Apoptosesignalwege. Gruppe II-Caspasen (Caspasen 2, 3, 7) spalten ihre Substrate an einem DExD-Motiv, das in den meisten Todessubstraten vorkommt. Gruppe III-Caspasen (6, 8, 9, 10) bevorzugen eine (L/V)E(T/H)D-Spaltsequenz. Die Substratspezifität humaner Caspase-14 ist noch nicht bestimmt. Der Aktivierungsmechanismus ist in Abbildung 3 illustriert: Caspasen werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert. Nach der ersten Spaltung zwischen kleiner (p10) und großer Untereinheit (p20) wird ein Intermediat gebildet, das proteolytische Aktivität besitzt und die große Untereinheit von der Prodomäne abspaltet. Wie Kristallstrukturanalysen der Caspasen 1, 3 und 8 zeigten (Blanchard

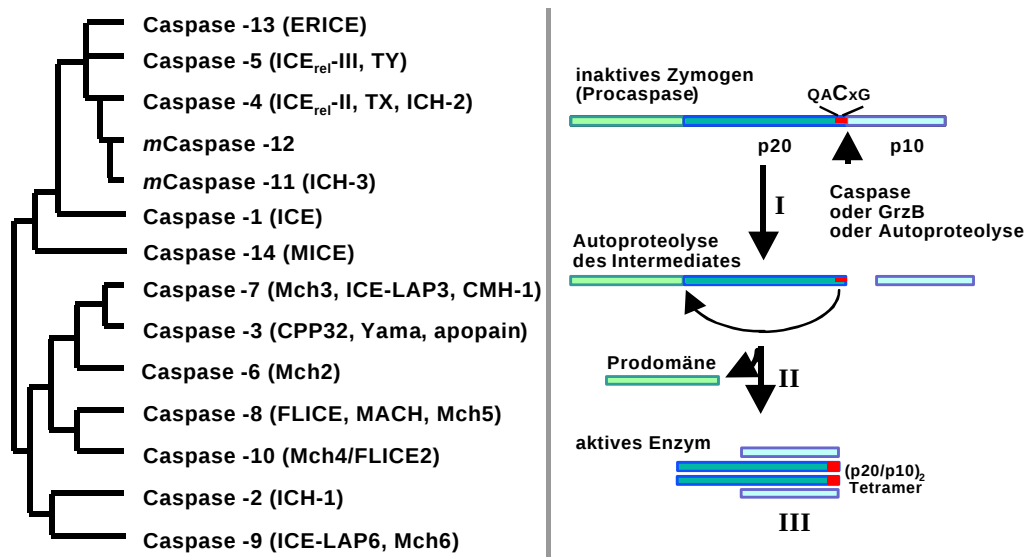


Abbildung 1.05: Die Familie der Caspasen. Links: Die Caspasen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit in verschiedenen Untergruppen zusammengefaßt sind (für Erläuterungen siehe Text). Rechts: Der Aktivierungsmechanismus von Caspasen besteht aus zwei proteolytischen Schritten: Zunächst erfolgt die Spaltung zwischen der kleinen und der großen Untereinheit (I), woraufhin ein aktives Intermediat gebildet wird, welches die Abspaltung der Prodomäne bewirkt (II). Das aktive Enzym liegt als Heterotetramer vor (III). GrzB, Granzym B.

et al., 1999; Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994; Watt et al., 1999; Wilson et al., 1994), bilden die aktiven Untereinheiten daraufhin ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer.

Caspasen sind keine rein cytoplasmatisch lokalisierten Enzyme, sondern zeigen vielmehr ein komplexes Verteilungsmuster. In einer Vielzahl humaner Zelllinien und Geweben ist beispielsweise Caspase-3, eine zentrale Effektorcaspase, sowohl diffus cytoplasmatisch als auch mitochondrial lokalisiert (Mancini et al., 1998). Elektronenmikroskopie zeigte, daß sich in bestimmten Zellen das Proenzym zum Teil im mitochondrialen Intermembranraum befindet, während die aktive Caspase von den Mitochondrien ins Cytoplasma freigesetzt wird. Eine weitere Studie identifizierte eine zweite mitochondriale Form von Caspase-3, die über eine Transmembranregion verfügt (Krebs et al., 1999). Ähnlich wie CED-9 die Prozessierung von CED-3 durch direkte Protein-Protein-Interaktion inhibieren kann, so scheint die membranständige Procaspase-3 durch mitochondrial-lokalisiertes Bcl-2 reguliert zu werden (Krebs et al., 1999). Neben Caspase-3 wurden auch die Caspasen 2 und 7 im mitochondrialen Intermembranraum gefunden (Susin et al., 1999). Nach Desintegration der äußeren Mitochondrienmembran während der Apoptose werden sie freigesetzt und aktiviert. Sowohl die Translokation ins Cytoplasma als auch die nachfolgende Aktivierung sind durch Bcl-2 inhibierbar (Susin et al., 1999; Adachi et al., 1997). Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem, daß in einigen Zell-Linien Caspase-8 ebenfalls mitochondrial lokalisiert ist (Stegh et al., 2000).

Eine weitere Studie analysierte die Lokalisation aktiver Caspase-3 und Caspase-7 in der Leber von anti-CD95-behandelten Mäusen. Diese Caspasen wurden in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten gefunden: Aktive Caspase-3 lag cytoplasmatisch vor, während aktive Caspase-7 in der mikrosomalen Fraktion gefunden wurde, wo sie eines ihrer potentiellen Substrate SREBP-1 (für "Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1") spaltet (Chandler et al., 1998). Obwohl beide Caspasen eine identische Substratspezifität besitzen (Thornberry et al., 1997), wird durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation gewährleistet, daß sie unterschiedliche, Kompartiment-spezifische Substrate spalten.

Aktive Caspase-9 ist sowohl cytoplasmatisch (Susin et al., 1999) als auch aufgrund putativer Kernlokalisierungssignale (NLS) nuklear lokalisiert (Krajewski et al., 1999). Eine detaillierte Analyse der Lokalisation von Caspase-9 in Ischemie-sensitiven Hirnregionen zeigte, daß Caspase-9 in nicht-geschädigten (d.h. nicht-apoptotischen) Neuronen mitochondrial lokalisiert ist und nach Ischemie-Induktion ins Cytoplasma und in den Kern transloziert – ein Prozeß, der mit DNA-Fragmentierung einhergeht (Krajewski et al., 1999). Diese Daten deuten auf eine zentrale Rolle von Caspase-9 in bestimmten neuronalen Apoptoseformen hin. In Analogie zu Caspase-9 verfügt Caspase-2 über basische Tetrapeptidsequenzen, die als Kernlokalisierungssignale dienen könnten (Colussi et al., 1998). Procaspase-2 und aktive Caspase-2 wurden im Nukleus von Jurkat Zellen gefunden (Zhivotovsky et al., 1999), bisher ist jedoch kein Substrat für diese Caspase bekannt. Auch für das murine Homolog von Caspase-2 (Nedd2) wurde eine Kernlokalisierung beobachtet (Colussi et al., 1998). Caspase-1 befindet sich

nach TNF α -Stimulation ebenfalls im Kern (Mao et al., 1998). Dabei transloziert zunächst das Proenzym mit Hilfe einer N-terminalen NLS in der Prodomäne in den Kern, um dort zum aktiven Enzym prozessiert zu werden (Mao et al., 1998). Es scheinen demnach Mechanismen im Kern zu existieren, die die Aktivierung von Caspasen bewirken.

Wie Caspase-1 und -2 wurde auch Caspase-6 im Nukleus gefunden. Sowohl überexprimierte als auch endogene Caspase-6 ist jedoch vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert (Orth et al., 1996; Shikama et al., 2001). Es ist nicht bekannt, ob Caspase-6 im Cytosol aktiviert wird und anschließend in den Nukleus transloziert oder ob sie direkt im Kern aktiviert wird. Biochemische *in vitro* Analysen deuteten daraufhin, daß Caspase-6 erst nach der Aktivierung von Caspase-9 aktiviert wird (Slee et al., 1999). Eine Spaltung und Aktivierung von Caspase-6 durch Caspase-3 wurde vorgeschlagen (Takahashi et al., 1996). Eine Analyse von intakten Zellen mit Hilfe membrangängiger, Caspase-spezifischer Substrate zeigte hingegen, daß Caspase-6 in Dexamethason-behandelten Thymozyten vor Caspase-3 aktiviert wird (Komoriya et al., 2000). Neuere Daten zeigten auch, daß zumindest in Zellen des zentralen Nervensystems die vorgeschlagene Reihenfolge umgedreht ist und Caspase-6 Caspase-3 spaltet (Allsop et al., 2000). Caspase-6 wurde zudem mit der C-terminalen proteolytischen Spaltung des Alzheimer β -Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in Verbindung gebracht (Pellegrini et al., 1999) und es wurde gezeigt, daß in Neuronen, die niedrigen Konzentrationen von Serum ausgesetzt sind, spezifisch Caspase-6 aktiviert wird (LeBlanc et al., 1999). Zu den bekannten Apoptose-Stimuli, die zu einer Aktivierung von Caspase-6 führen, zählt außerdem noch der Kinase-Inhibitor Staurosporin (STS) (Orth et al., 1996). Vor kurzem wurde das neue Todesdomänen (DD)-Protein p84N5 identifiziert, das mit Hilfe einer funktionellen DD im Kern Apoptose induziert und spezifisch nukleare Caspase-6 aktiviert (Doostzadeh-Cizeron et al., 2000). Der genaue Mechanismus der Caspasen-Aktivierung ist jedoch noch unklar.

Mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde ein weiteres intrazelluläres "Caspasen-Kompartiment" identifiziert (Nakagawa et al., 2000). Caspase-12 wurde ausschließlich im ER gefunden und nur durch solche Apoptosestimuli aktiviert, die direkt auf das ER wirkten. So wurde Caspase-12 nach Tunikamycin-Behandlung, nicht aber durch Todesliganden oder durch die auf Mitochondrien wirkenden Substanzen Staurosporin oder Dexamethason aktiviert (Nakagawa et al., 2000). Das Amyloid- β (A β)-Protein induziert neuronale Apoptose und ist damit möglicherweise für die neuronale Degeneration bei Alzheimer mitverantwortlich (Yankner et al., 1990). Es wirkt dabei auf das ER durch Bindung seines ER-lokalisierten Rezeptors ERAB (Yan et al., 1997) und bewirkt letztlich die Aktivierung ER-lokalisierter Caspase-12 (Nakagawa et al., 2000). Somit scheint Caspase-12 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Alzheimer zu spielen.

1.06 Virale, zelluläre und synthetische Inhibitoren von Caspasen

Viren nutzen die Biosynthesemaschinerie ihrer Wirtszelle, um sich selbst zu reproduzieren. Der einfachste und zugleich effektivste Mechanismus, die virale Replikation zu verhindern, besteht darin, eine Virus-infizierte Zelle durch Apoptose zu eliminieren. Viren haben jedoch Proteine, sogenannte Caspaseninhibitoren, entwickelt, um die Apoptose der Wirtszelle zu inhibieren. Der erste Caspaseninhibitor, der identifiziert wurde, war CrmA (für „Cowpox Virus Product Cytokine response modifier A“). CrmA gehört zur Klasse der Serinproteaseinhibitoren (Serpine), zeigt aber im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie eine Spezifität für Cysteinproteasen (Ray et al., 1992; Komiyama et al., 1994). Das baculovirale Protein p35 inhibiert neben CED-3 und Caspasen in Insektenzellen die Säugetier-Caspasen 1, 3, 6, 7, 8 und 10 (Ekert et al., 1999). Im Gegensatz zu CrmA wird p35 gespalten und das Spaltprodukt bildet daraufhin einen inhibitorischen Komplex mit der Caspase (Hay et al., 1994).

Die sogenannten IAPs (für „Inhibitor of Apoptosis Protein“) wurden wie p35 als baculovirale Proteine identifiziert (Crook et al., 1993), deren entsprechenden zellulären Analoge in Hefe, *C.elegans*, *Drosophila* und Vertebraten durch Homologievergleiche gefunden wurden (Uren et al., 1998; LaCasse et al., 1998). Neben einer Zinkfinger-Domäne (die sogenannte RING-Domäne) zeichnen sie sich durch bis zu drei sogenannte BIR (für „Baculoviral IAP Repeats“-) Domänen aus, die für die Interaktion mit anderen Proteinen notwendig sind (Ekert et al., 1999). Eine Vielzahl von IAPs spielt jedoch in der Apoptosesignaltransduktion keine Rolle und ist eher anderen Prozessen, wie z.B. der Cytokinese, zuzuordnen (Fraser et al., 1999; Uren et al., 1999).

Mit v-FLIP (für „viral FLICE-Inhibitory Protein“) wurde ein weiterer viraler Caspaseninhibitor gefunden, der von einer Vielzahl verschiedener Viren produziert wird (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997; Bertin et al., 1997). v-FLIP verfügt wie Caspase-8 über zwei N-terminale Todeseffektordomänen (DED), mit deren Hilfe es an den CD95-DISC attrahiert wird und die Prozessierung von Caspase-8 inhibiert. Das zelluläre Homolog c-FLIP wurde von verschiedenen Gruppen identifiziert (Irmeler et al., 1997; Shu et al., 1997; Hu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997; Goltsev et al., 1997; Inohara et al., 1997; Han et al., 1997; Rasper et al., 1998; Scaffidi et al., 1999). c-FLIP besitzt wie Caspase-8 eine Tandem-DED am N-Terminus und eine ICE-ähnliche Domäne am C-Terminus, jedoch verfügt c-FLIP nicht über jene konservierten Motive (insbesondere den Cysteinrest im aktiven Zentrum), die für die katalytische Aktivität von Caspase-8 verantwortlich sind. Anstelle eines QACQG-Motivs im aktiven Zentrum von Caspase-8 besitzt c-FLIP die Sequenz QNYVV und ist daher katalytisch inaktiv. c-FLIP kann, wenn überexprimiert, die Caspase-8-Prozessierung inhibieren, indem es eine weitere Rekrutierung von Caspase-8 an den aktivierten CD95-Rezeptor blockiert (Scaffidi et al., 1999).

Eine Deregulation von Apoptose ist bei einer Vielzahl von Krankheiten beschrieben worden. Es wurden daher große Anstrengungen unternommen, um mit Hilfe von synthetischen Caspaseninhibitoren regulativ in die Apoptosesignalmaschinerie einzugreifen. Caspasen stellen eine von etwa 20 verschiedenen Cysteinproteasefamilien dar. Inhibitoren (wie z.B. Iodacetamid), die mit dem Cystein im aktiven Zentrum reagieren, sind nicht spezifisch für Caspasen, sondern inhibieren sämtliche Cysteinproteasen. Um selektiv Caspasen inhibieren zu können wurden eine Vielzahl Caspase-spezifischer Inhibitoren entwickelt, die auf der Substratspaltstelle der jeweiligen Caspase basieren (Ekert et al., 1999). Es handelt sich dabei um Peptide, die als Pseudosubstrate für aktive Caspasen und damit als kompetitive Inhibitoren fungieren. Es werden vor allem Peptide mit drei bis fünf Aminosäuren eingesetzt. Der Inhibitionsmechanismus der synthetischen Inhibitoren wird durch die reaktive Gruppe bestimmt, die an das entsprechende Peptid gekoppelt ist. Eine Fluoro- oder Chloromethylketongruppe (-FMK oder -CMK) bildet ein Thiomethylketon II mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum der Caspase, woraufhin die Caspase irreversibel blockiert wird (Thornberry et al., 1994). Ein Peptid mit einer Aldehydgruppe (-CHO) wirkt als reversibler Inhibitor (Ekert et al., 1999).

1.07 Caspasensubstrate und die apoptotische Morphologie

Caspasen spielen nicht nur in der Initiationsphase der Apoptosesignaltransduktion eine wichtige Rolle, sondern repräsentieren auch die enzymatische Aktivität, die für die Degradation zellulärer Proteine verantwortlich ist und somit den Phänotyp der Apoptose bestimmt. Während der Apoptose wird nur eine begrenzte Anzahl von zellulären Proteinen gespalten. Zweidimensionale SDS-PAGE-Analysen von nicht-apoptotischen und apoptotischen Zellextrakten zeigten, daß etwa 200 Polypeptide im Verlauf der Apoptose proteolytisch degradiert werden (Martin und Green, 1995, Brockstedt et al., 1999).

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten der bisher identifizierten Todessubstrate. Sie lassen sich in Proteine unterteilen, die im Cytoskelett, im DNA-RNA-Metabolismus, in der Signaltransduktion oder in anderen zellulären Prozessen wichtige Rollen spielen. Die physiologische Bedeutung der Spaltung der meisten dieser Proteine, läßt sich in drei Bereichen zusammenfassen:

- a) Strukturproteine, die Schlüsselfunktionen im zellulären Cytoskelett besitzen, werden proteolytisch degradiert. Dies führt letztlich zur Kondensation von Kern und Cytoplasma und zur Ausbildung apoptotischer Körperchen.
- b) Prozesse, wie DNA-Replikation, -transkription oder -reparatur, Splicing, Translation und Zellzyklusprogression/Proliferation werden durch Spaltung involvierter Proteine abgebrochen, da es sich um energieverbrauchende und dem Zelltod entgegengesetzte Ereignisse handelt.

- c) Prozesse, die für die Phagocytose und damit für die Eliminierung einer Zelle aus einem Zellverband notwendig sind, werden durch proteolytische Aktivierung bestimmter Proteine induziert.

Cytoskelett	Signaltransduktion		DNA-/RNA-Metabolismus	Sonstige Prozesse
FAK	Rb	SBMA-AR	PARP	ATM
α -II-Fodrin	HDM2/MDM2	STAT-1	DNA-PKcs	Nup153
PAK2	p21 ^{CIP1/WAF1}	SRP p72	Rad51	APC
Gelsolin	SREBP	PISTLRE Kinase	Acinus	Hsp90
Cytokeratin 18	I- κ B α	PAK2	DFF45 / I-CAD	UbqCE NEDD4
LAP2	cPLA-2	p59 ^{fyn}	DNA-RFC140	Persenilin-2
Rababtin	PKC	CaMk-IV	U1-70 kDa	Huntingtin
Aktin	MEKK-1	p28BAP31	hnRNP-C1/C2	Atrophin
Gas2	Mst1	proIL16	Sp1	β -APP
Lamine	PRK2	Procaspasen	MCM3	Catenin
NuMA	PP2A	p27 ^{KIP1}	CDC27	Kinektin
D4-GDI	Bcl-2	Wee1	SAF	Calpastatin
Plectin	Bcl-x _L	RasGAP	hnRNP-U	Ataxin-3
Vimentin	Bid	RAF1	hnRNP-A1	AMPA-Rezeptoren
ROCK I	Akt1	PKN	UBF	

Tabelle 1. Die wichtigsten Caspasensubstrate. Proteine, die während Apoptose durch Caspasen gespalten werden, lassen sich in vier Gruppen einteilen: Cytoskelettale Proteine, Signalmoleküle und Proteine, die im Rahmen des DNA/RNA-Metabolismus sowie anderer zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle spielen. FAK, "focal adhesion kinase"; LAP2, "lamin associated protein 2"; Gas2, "growth arrest-specific gene product 2"; NuMA, "nuclear-mitotic apparatus protein"; D4-GDI, Rho GDP-Dissoziationsinhibitor D4; PAK2, p21-aktivierte Protein-Kinase; ROCK I, Rho-assozierte Kinase I; Rb Retinoblastoma-Genprodukt; PARP, Poly(ADP-Ribose) Polymerase; DNA-PKcs, katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase; Rad51, Säugetierhomolog von RecA; Acinus, "apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus"; DFF45 / I-CAD, 45 kDa-Komponente des DNA-Fragmentierungsfaktors ("inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease"); DNA-RFC140, 140 kDa-Untereinheit des DNA Replikationsfaktors C; MDM2, "murine double-minute chromosome mdm2"-Onkogen; p21^{CIP1/WAF1}, 21 kDa-Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen; ATM, "ataxia telangiectasia mutated gene product"; U1-70 kDa, 70 kDa Komponente des U1 "small nuclear" Ribonucleoproteins; hnRNP-C1/C2, "heteronukleare Ribonukleoproteine C1 and C2"; SREBP, "sterol responsive element binding protein"; I- κ B α , α -Isoform des Rel/NF- κ B Inhibitors; cPLA2, Cytosolische Phospholipase A2; PKC, Proteinkinase C; MEKK-1, MEK-Kinase-1; Mst1 (auch als Krs2 bezeichnet), Säugetierhomolog des Ste20-Kinase in Hefe; PRK2, "protein kinase C-related kinase 2"; PP2A, Proteinphosphatase 2A; Nup153, 153 kDa- Nukleoporin; Rabaplin-5, Rab5 GTPase-Effektorprotein; APC, "adenomatous polyposis coli oncosuppressor protein"; Hsp90, "90 kDa heat shock protein"; UbqCE NEDD4, "ubiquitin conjugating enzyme neural-expressed developmentally downregulated gene 4 protein"; Bcl-2, "B-cell lymphoma gene 2 product"; SBMA-AR, Androgenrezeptor, der in spinaler Muskeldystrophie (Kennedy's disease) defekt ist; STAT1, "signal transducer and activator of transcription factor 1"; SRPp72, 72 kDa-Protein des "signal recognition particle"; NF- κ B, "nuclear factor- κ B Transkriptionsfaktor; PITSLRE kinase, p34^{CDC2}-ähnliche Proteinkinase; PAK2 (auch als PAK65, γ -PAK, PAK1 bezeichnet), p21-aktivierte Proteinkinase; p59^{FYN}, Src-ähnliche Tyrosinkinase p59 FYN; CaMK-IV, Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV; p28BAP31, 28 kDa großes Bcl-2-interagierende Protein; Bcl-x_L, lange Form des Bcl-2-ähnlichen Genprodukts X; BID, "BH3 interacting domain death agonist"; β -APP, "amyloid- β precursor protein"; proIL-16, pro-Interleukin-16; MCM3, "minichromosome maintenance protein 3"; p27^{KIP1}, 27 kDa Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor; Wee1, Wee1 Kinase, Inhibitor von Cdc2 and Cdk2; SAF-A/hnRNP-U, "scaffold attachment factor A/heteronukleares Ribonukleoprotein U"; hnRNP-A1, "heteronukleares Ribonukleoprotein A1"; UBF, "Upstream Binding Factor" RasGAP, "Ras GTPase-aktivierendes Protein"; Raf1, "Ras aktivierter/assoziierter Factor 1"; PKB, Proteinkinase B; PKN, Proteinkinase N. Verändert nach Nicholson, 2000.

Insbesondere die molekularen Grundlagen der morphologischen Veränderungen, denen eine Zelle während Apoptose unterworfen ist, sind bisher nur ansatzweise verstanden. Die Identifizierung einiger cytoskelettaler Proteine als Caspasensubstrate zeigte jedoch potentielle Mechanismen auf. Frühzeitig nach Induktion von Apoptose wird beispielsweise der „Cytolinker“ Plektin, der als eine Art intrazellulärer Kleber verschiedene Filamentsysteme verbindet, durch Caspase-8 gespalten (Stegh et al., 2000). Aktin depolymerisiert während der Apoptose zunächst und wird später Caspasen-vermittelt gespalten (Brown et al., 1997; Chen et al., 1996; Kayalar et al. 1996; Mashima et al., 1997, 1999). Ektope Expression der Aktinspaltfragmente führt zu morphologischen Veränderungen in der transfizierten Zelle, die jenen ähneln, die in einer apoptotischen Zelle beobachtet werden können (Mashima et al., 1999). Es wurde auch beobachtet, daß während p53-induzierter Apoptose das Aktin-Filamentsystem ein sphärisches Netzwerk bildet, das die apoptotischen Membranausstülpungen von den Organellen trennt (Pitzer et al., 1999). Aktinspaltung kann somit zur Morphologie der Apoptose beitragen. Gas2 ist eine weitere Komponente des Mikrofilamentsystems, die ein Caspasensubstrat darstellt. Gas2 wird durch Caspase-3 und Caspase-7 *in vitro* gespalten (Sgorbissa et al., 1999; Brancolini et al., 1995), woraufhin ein Spaltfragment gebildet wird, das dramatische Reorganisationsprozesse im Aktin-Mikrofilamentsystem auslöst und damit die Zellmorphologie maßgeblich beeinflusst (Sgorbissa et al., 1999).

Gelsolin, ein Mikrofilament-assoziiertes Protein, wird ebenfalls durch Caspasen gespalten. Dabei entsteht ein N-terminales Spaltfragment, das nach Überexpression Aktindepolymerisation auslöst und cytoplasmatische und nukleare Kondensation induziert (Geng et al., 1997; Kothakota et al., 1997). Darüber hinaus zeigen neutrophile Zellen Gelsolin-defizienter Mäuse nach TNF α -Stimulation eine verzögerte DNA-Fragmentierung, und die von Natur aus Gelsolin-negativen HeLa-Zellen wurden nach Rekonstitution mit Gelsolin sensitiv gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose (Kothakota et al., 1997). Im Gegensatz zu dieser proapoptotischen Funktion von Gelsolin zeigten andere Studien, daß Apoptose nach Überexpression von Gelsolin blockiert ist, da Caspase-3 nicht aktiviert wird (Ohtsu et al., 1997). Ein potentieller Mechanismus für diese Inhibition könnte darin bestehen, daß Gelsolin zusammen mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat und den Caspasen 3 und 9 einen Komplex bildet, der die Aktivierung jener Caspasen unterbindet (Azuma et al., 2000). Darüber hinaus ist ein gewisser Anteil zellulären Gelsolins mit Mitochondrien assoziiert, wo er die Freisetzung von Cytochrom c und die Verminderung des mitochondrialen Transmembranpotentials verhindern kann (Koya et al., 2000).

Da das Cytoskelett wichtig für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität einer Zelle ist, sind größere Veränderungen des Cytoskeletts Voraussetzung für die Bildung bläschenförmiger Membranausstülpungen und das Abschnüren von apoptotischen Körperchen. Es wurde gezeigt, daß diese Veränderungen Caspasen-abhängig sind (Zhang et al., 1999; Zheng

et al., 1998) und sie werden mit der Spaltung einer Reihe spezifischer Caspasen-Substrate in Verbindung gebracht: Gelsolin (Kothakota et al., 1997), Aktin (Kayalar et al., 1996; Maruyama et al., 2000), das Aktin-interagierende Protein α -Fodrin (Jänicke et al., 1998b), die Kinasen PAK2 (Rudel und Bokoch., 1997), FAK (Wen et al., 1997), ROCK I (Coleman et al., 2001) und das mit der Ras-Familie interagierende und für die frühe endosomale Fusion verantwortliche Protein Rabaptin-5 (Cosulich et al., 1997). Mit Hilfe der humanen Brustkarzinom Zelllinie MCF7, die keine Caspase-3 exprimiert, und Caspase-3 defizienten Mäusen wurde gezeigt, daß diese neben der DNA-Fragmentierung auch für die Entstehung der Membranbläschen essentiell ist (Jänicke et al., 1998a; Zheng et al., 1998). Letzteres ist auch von der Phosphorylierung der leichten Kette des Myosin-Motorproteins abhängig und kann durch die Behandlung der Zellen mit einem Kinase-Inhibitor, wie Staurosporin (STS), inhibiert werden (Mills et al., 1998). Es wurde daher ein Modell vorgeschlagen, indem Interaktionen von Aktin-Filamenten und Myosin-Motorproteinen die Zellkontraktionen und die Ausbildung der bläschenförmigen Membranausstülpungen in apoptotischen Zellen verursachen (Mills et al., 1998).

Auch Intermediärfilament (IF)-Proteine werden im Verlauf der Apoptose durch Caspasen gespalten. Viele IF-Proteine besitzen konservierte Spaltstellen für die Caspasen-3 und -7 (in der Nähe des C-Terminus) und Caspase-6 (in der Mitte des Proteins). Man unterscheidet fünf Typen von IF-Proteinen: Typ I, saure Keratine (K9 - K20), Typ II, basische Keratine (K1 - K8), Typ III, Vimentin-ähnliche Proteine (Vimentin, Desmin, GFAP und Peripherin), Typ IV, Neurofilamente, Nestin und Internexin, sowie Typ V, Lamine. In höheren Eukaryonten ist das Expressionsmuster der IF-Proteine von dem Gewebe und dem Entwicklungsstadium einer Zelle abhängig (Steinert und Roop, 1988). Keratine spielen eine wichtige Rolle in epithelialen Geweben inklusive der Leber, da sie dort den Großteil der Intermediärfilamente bilden. Keratin-Filamente sind Heteropolymere, die aus mindestens einem Typ I und einem Typ II Keratin bestehen (Steinert et al., 1976; Hatzfeld und Franke, 1985). In einfachen oder Ein-Zell-Schicht Epithelien, sowie den Karzinomen, die aus diesen Zellen hervorgehen, sind die Hauptkomponenten der IF Heteropolymere der Keratine 8 und 18 (K8 und K18) (Schaafsma et al., 1990; Trask et al., 1990; Schussler et al., 1992; Oshima et al., 1996).

Keratine zeigen eine dramatische Reorganisation während der Apoptose. K18, das in nicht-apoptotischen Epithelzellen zusammen mit K8 Netzwerk-artig verteilt ist, befindet sich in apoptotischen Zellen zusammen mit K8 und gespaltenem K19 in intrazellulären granulären Aggregaten, die im gesamten Cytoplasma verteilt sind (Caulin et al., 1997). Diese Granuli enthalten kein K13/15/16, Vimentin, β -Aktin oder Tubulin. Interessanterweise wurde jedoch in verschiedenen Zelllinien nach TRAIL-induzierter Apoptose in diesen Granuli der größte Teil, wenn nicht sogar die gesamte Menge der cytosolischen, aktiven Caspase-3 gefunden (MacFarlane et al., 2000). Die Reorganisation des K8/K18 Netzwerkes geht mit zwei Veränderungen des

Proteins K18 einher: Der Aminosäurerest Serin 53 wird phosphoryliert, und K18 wird durch Caspase-3, 6 und 7 (VEVD²³⁸ Casp-3, 6 und 7 bzw. DALD³⁹⁷ Casp-3 und 7) gespalten (Caulin et al., 1997). Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß IF-Proteine nicht nur an den morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen beteiligt sind, sondern auch direkt an der Regulation der Apoptose: K8- oder K18-defiziente Hepatozyten sind 100fach sensitiver gegenüber TNF-induzierter Apoptose als Wildtyp-Zellen (Caulin et al., 2000). Hepatozyten, die keine Cytokeratine enthalten, sind zudem gegenüber CD95-vermittelter Apoptose stark sensitiviert, da CD95 in diesen Zellen effizienter zur Zelloberfläche transportiert wird (Gilbert et al., 2001). Neben K18 wird auch Vimentin, ein IF-Protein des Typs III, durch die Caspasen-3 bzw. -7 und -6 gespalten, wobei durch die Caspase-3 bzw. -7 vermittelte Spaltung ein Fragment generiert wird, das über einen bisher nicht geklärten Mechanismus proapoptotisch wirkt (Byun et al., 2001).

1.08 Nukleare und nukleolare Ereignisse der Apoptose

Apoptose ist nicht nur mit der Desintegration des Cytoplasmas, sondern darüber hinaus auch mit dem Kollaps nuklearer Strukturen verbunden (Prasad et al., 1999). Dabei spielen das Intermediärfilament-Protein Lamin, das ein Netzwerk zwischen Chromatin und der inneren Kernmembran ausbildet, sowie das Protein NuMa („nuclear-mitotic apparatus protein“), das als Mikrotubuli-bindendes Protein essentiell für die Organisation und Stabilisierung des Spindelapparates während der Mitose ist, wichtige Rollen in der Aufrechterhaltung einer funktionellen Kernarchitektur (Nigg, 1989; Hirata et al., 1998). Verschiedene Studien zeigten, daß Lamine durch Caspase-6 (Orth et al., 1996; Rao et al., 1996; Takahasi et al., 1996) und durch eine nukleare, Calcium-abhängige Serin-Protease, die nicht zur Familie der Caspasen gehört, gespalten wird (Zhivotovsky et al., 1997). Die Überexpression von nicht-spaltbaren Formen der Lamine A und B führte dazu, daß Chromatinkondensation und die Zerstörung der Kernmembran inhibiert wurden (Rao et al., 1996). Dies deutet darauf hin, daß die Laminspaltung ein wichtiger Schritt zur Desintegration nuklearer Strukturen ist. NuMa wird ebenfalls durch Caspase-6 (und Caspase-3) gespalten (Hirata et al., 1998). Die Spaltung von sowohl Lamin, NuMa und Keratin 18, als auch von Vimentin, durch Caspase-6 deutet darauf hin, daß diese Caspase möglicherweise ein genereller Regulator der Desintegration der Zellarchitektur in apoptotischen Zellen ist (Caulin et al., 1997).

Neben der Desintegration cytoskelettaler Strukturen in Kern und Cytoplasma sind Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung weitere wichtige Ereignisse während der Apoptose. Proteine, die Schlüsselfunktionen im Rahmen dieser Prozesse übernehmen, sind Acinus (für „Appototic Chromatin Condensation Inducer in the Nucleus“) und die Endonuklease CAD / DFF-40 (für „Caspase-Activated Deoxyribonuclease“ bzw. „DNA fragmentation factor-40“).

Acinus wird durch Caspase-3 proteolytisch aktiviert und induziert dann Chromatinkondensation *in vivo* und *in vitro*, ohne dabei DNA-Fragmentierung auszulösen (Sahara et al., 1999). CAD liegt in nicht-apoptotischen Zellen mit dem Inhibitor I-CAD / DFF-45 komplexiert vor. Nach Apoptoseinduktion wird I-CAD durch Caspase-3 gespalten und dissoziiert von CAD, die daraufhin in den Kern transloziert und dort DNA fragmentiert (Enari et al., 1998; ; Halenbeck et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Untersuchungen an ICAD-defizienten Mäusen haben gezeigt, daß das CAD/ICAD-System in den meisten Geweben essentiell für die Degradation der DNA ist (Zhang et al., 1998).

Im Verlauf der Apoptose können eine Reihe von morphologischen und nuklearen Veränderungen nachgewiesen werden, die jeweils von der Form der Apoptose und dem Zelltyp abhängig sind. In Jurkat T Zellen geht die Bildung von Membranbläschen und andere cytoskeletale Veränderungen der nuklearen DNA-Degradation und der Aktivierung von Caspase-3 voraus (Maruyama et al., 2000). Das finale Ereignis der Apoptose ist die Chromatinkondensation und die Spaltung der DNA im Nukleus. Die Rolle, die nukleare Ereignisse im Verlauf der Apoptose spielen, sind unklar. Es wurde gezeigt, daß bestimmte charakteristische Erscheinungen der Apoptose, wie z. B. die Ausbildung von Membranbläschen, auch in enukleierten Zellen stattfand. Daraus wurde geschlossen, daß Nukleus und DNA-Fragmentierung für die Ausführung des apoptotischen Programmes nicht notwendig sind (Schulze-Osthoff et al., 1994; Nakajima et al., 1995). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß Thymozyten von ICAD-defizienten Mäusen Apoptose-resistenter sind als Wildtyp-Zellen (Zhang et al., 1998). Dies ist ein Hinweis darauf, daß es einen Austausch von Signalen zwischen den nuklearen Ereignissen der Apoptose und dem Cytoplasma gibt, der möglicherweise für einige der apoptotischen Ereignisse im Cytoplasma notwendig ist.

Der Nukleolus ist eine hoch organisierte Unterabteilung des Zellkerns. In Elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann man drei, teilweise voneinander abgetrennte Regionen unterscheiden: Ein blaß anfärbbares fibrilläres Zentrum, das nicht aktiv transkribierte DNA enthält. Eine dichte fibrilläre Komponente, die RNA-Moleküle, die gerade synthetisiert werden, darstellt. Und eine granuläre Komponente, welche reifende ribosomale Vorläufer-Partikel enthält. Nukleoli sind schon seit einiger Zeit als Ort der rDNA Transkription durch die DNA-Polymerase I (Pol I) und die Zusammensetzung der Ribosomen bekannt. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, daß sie außerdem eine aktive Rolle während der Apoptose spielen. Der für die rDNA-Transkription essentielle nukleolare Faktor UBF („upstream binding factor“) wird schon früh im Verlauf der Apoptose durch Caspasen gespalten (Casiano et al., 1996). Außerdem wurde gezeigt, daß UBF während der Apoptose die Nukleoli verläßt, während andere nukleolare Proteine wie z.B. B23 in diesen Strukturen verbleiben (Torres-Montaner et al., 2000). Es wird angenommen, daß dies die Spaltung von UBF durch Caspasen widerspiegelt. Eine kürzlich

veröffentlichte Untersuchung zeigte zudem, daß eine signifikante Menge von nicht-aktiviertem p53 in Nukleoli lokalisiert ist. Es wird vermutet, daß es dort die Aktivität der Transkription ribosomaler DNA überwacht, um so schnell auf rDNA-Schädigungen reagieren zu können (Rubbi und Milner, 2000). Diese Untersuchungen zeigen, daß es zunehmend Hinweise auf eine im Verlauf der Apoptose aktive Kommunikation zwischen nuklearem und cytosolischem Kompartiment gibt.

1.09 Die Todeseffektordomäne und ihre Verwandten

Die Todeseffektordomäne (DED) besitzt eine charakteristische Struktur mit sechs hochkonservierten α -Helices. Diese Tertiärstruktur hat sie mit drei anderen homophilen Interaktionsdomänen, die in der Apoptose eine Rolle spielen, gemein: Mit der Caspasen-Rekrutierungsdomäne (CARD), die sich in einigen Caspasen und in Adapterproteinen des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose befindet, mit der Todesdomäne (DD), die sich im cytoplasmatischen Bereich von Todesrezeptoren und deren Adaptermolekülen, wie FADD, TRADD oder RIP, befindet (Hofmann et al., 1997; Eberstadt et al., 1998, Fesik 2000), sowie der kürzlich identifizierten Pyrin-Domäne, die in Proteinen gefunden wurde, die eine Rolle beim familiären mediterranen Fieber (FMF) spielen (Martinon et al., 2001). Alle vier Domänen liegen in der Regel N-terminal vor und werden von einem einzigen Exon kodiert. Daher nimmt man an, daß sie von einem gemeinsamen Prototyp abstammen, der sich im Verlaufe der Evolution auf verschiedene zelluläre Funktionen spezialisiert hat (Locksley et al., 2001, Martinon et al., 2001).

Proteine, die eine DED besitzen, spielen fundamentale Rollen in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Das Adaptermolekül FADD beispielsweise, das sowohl eine DD als auch eine DED besitzt, assoziiert mit der DD an den trimerisierten CD95-Rezeptor und rekrutiert mit seiner DED Pro-Caspase-8 über deren N-terminale DED in den DISC (Kischkel et al., 1995; siehe Abschnitt 1.03). Das Caspase-8-ähnliche Molekül c-FLIP, das ebenfalls zwei DED besitzt, dem aber die katalytische Aktivität zur Spaltung von Proteinen nach Aspartat-Resten fehlt (siehe Abschnitt 1.06), kann ebenfalls an FADD binden und so eine weitere Rekrutierung von Caspase-8 verhindern. c-FLIP trägt dadurch zur Regulierung der Apoptose bei (Scaffidi et al., 1999). Einige Viren haben c-FLIP-ähnliche DED-Proteine entwickelt (v-FLIPs), um durch den selben Mechanismus die Apoptose der infizierten Zellen zu blockieren (Thome et al., 1997; Hu et al., 1997; Bertin et al., 1997). Auch für die anderen DED-Proteine Caspase-10, PEA-15/PED oder NDED, wurde gezeigt, daß sie an der Regulierung des Apoptosesignalweges von Todesrezeptoren beteiligt sind. Caspase-10 spielt im CD95-Signalweg und in der TNF-Rezeptor 2 (p55)-vermittelten Apoptose eine Rolle, seine genaue Funktion ist jedoch bisher unklar (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Vincenz and Dixit, 1997). Für PEA-15 wurde gezeigt, daß die

Expression des Proteins in Astrozyten diese vor TNF α -induzierter Apoptose schützt (Kitsberg et al., 1999). Die Expression von NDED wird durch TNF α induziert und inhibiert die Aktivität von Caspase-8 (You et al., 2001). Vor kurzem wurde das Multidomänen-Protein BAR (für „bifunctional apoptosis regulator“) beschrieben, das eine DED-ähnliche Domäne besitzt. Außerdem wurden in der AS-Sequenz von BAR noch eine Zink-bindende RING(-Finger)-Domäne, eine Transmembran-Domäne, die BAR in der mitochondrialen Membran verankert und eine Domäne, die Interaktionen mit Familienmitgliedern der Bcl-2 Familie ermöglicht und Bax-induzierte Apoptose unterdrückt (SAM-Domäne), gefunden. Es wurde gezeigt, daß BAR mit Hilfe seiner Domänen als Bindeglied zwischen Caspasen und Mitochondrien fungiert indem es einen Proteinkomplex mit Procaspase-8 und Bcl-2 bildet (Zhang et al., 2000). Abbildung 1.09 zeigt eine Übersicht über alle bisher beschriebenen DED-Proteine.

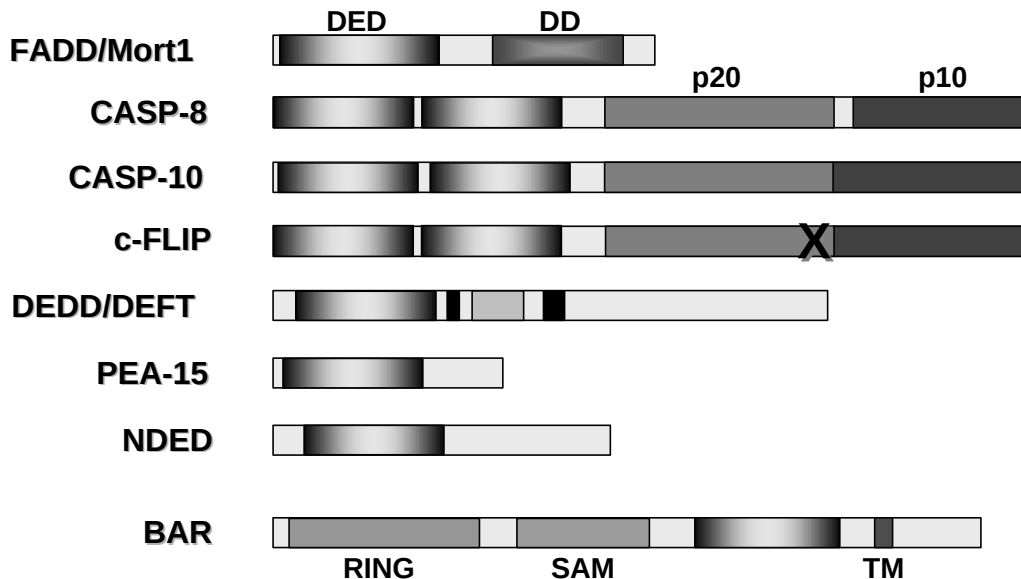


Abbildung 1.09: Schematische Darstellung der DED-Proteinfamilie. DED, Todeseffektordomäne. DD, Todesdomäne. p20 / p10, aktive Caspase-Untereinheiten. X, inaktives katalytisches Zentrum. RING, RING-Domäne. SAM, SAM-Domäne. TM, Transmembran-Domäne.

DED-Proteine können auch unabhängig von Todesrezeptoren Apoptose auslösen (Kawahara et al., 1998; Bantel et al., 1999; Ding et al., 2000). Es wurde gezeigt, daß DED-Proteine in Überexpressions-Experimenten durch Interaktionen der DED sogenannte DED-Filamente bilden, die cytoplasmatische Caspase-8 aktivieren und dadurch Apoptose induzieren (Siegel et al., 1998). Selbst in Bakterien, die keine Caspasen besitzen, kann FADD mit Hilfe seiner DED Zelltod induzieren (Lee et al., 2000). Dies deutet darauf hin, daß DED-Proteine mehr bewirken können, als nur die Caspase-8 abhängige Apoptose-Maschinerie zu aktivieren.

1.10 DEDD

Vor kurzem konnten wir ein neuartiges Molekül der DED-Proteinfamilie identifizieren (Stegh et al., 1998): DEDD („DED-containing DNA-binding protein“) ist ein hochkonserviertes Multi-Domänen-Protein mit einer N-terminalen DED, einer Prolin-reichen Region in der Mitte des Proteins und einem C-terminalen Bereich mit Homologien zu Histonen und anderen DNA-bindenden Proteinen. Die DED von DEDD ist in Maus, Ratte, Rind und Mensch 100% identisch und die Identität des vollständigen Proteins zwischen Maus und Mensch beträgt 98.7%. DEDD ist zudem ein ubiquitäres Protein, da sich seine mRNA in bisher allen getesteten Geweben und Zelllinien nachweisen ließ. Trotz einer Homologie seiner DED zu den DED von Caspase-8 und FADD assoziiert DEDD nicht mit dem DISC und nur spät nach der Induktion von Apoptose konnte eine schwache Assoziation mit FADD beobachtet werden. Für DEDD konnte jedoch, wie für andere Mitglieder der DED-Proteinfamilie auch, in Überexpressions-Experimenten eine cytotoxische Aktivität nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Funktionalität seiner DED. Der Prolin-reichen Region konnte keine Funktion zugeordnet werden, es wird aber angenommen, daß sie als eine Art „Scharnier“-Region die Beweglichkeit des Proteins erhöht. Endogenes DEDD befand sich im Cytoplasma, obwohl in seiner Aminosäuresequenz zwei Kern-lokalisierungssignale („nuclear localisation signals“, NLS) identifiziert wurden. In transienten Expressionsexperimenten lokalisierte das Protein jedoch entsprechend seiner NLS im Nukleus. Dort kolokalisierte es mit dem für die RNA Polymerase I (Pol I)-abhängige Transkription essentiellen Faktor UBF in Nukleoli-artigen Strukturen. Nach Induktion von Apoptose wurde endogenes DEDD in einer unlöslichen Fraktion, in der sich auch nukleare Proteine befanden, nachgewiesen. Daraus wurde geschlossen, daß DEDD nach Induktion von Apoptose in den Nukleus transloziert. Rekombinantes DEDD band sowohl nackte DNA als auch rekonstituierte Mononukleosomen und inhibierte *in vitro* die Transkription eines rDNA-Minigens durch Pol I.

Caspasen-abhängige proapoptotische Wirkung &

DNA/Chromatin-Bindung → Inhibition der rDNA-Transkription

Assoziation mit FADD Scharnier-Region?

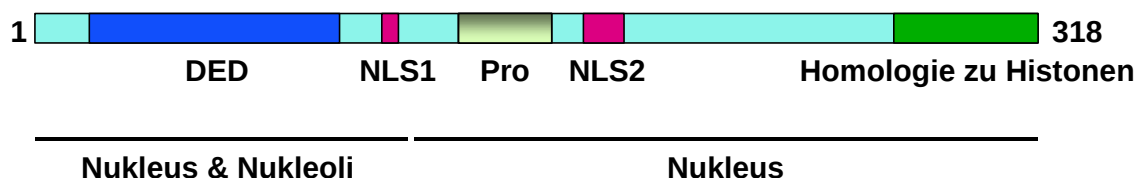


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des Proteins DEDD und Zusammenfassung der veröffentlichten Erkenntnisse. Oberhalb: Zusammenfassung der funktionellen Daten. Unterhalb: Lokalisation von Deletionsmutanten. DED, Todeseffektordomäne. NLS, Kernlokalisierungssignal. Pro, Prolinreiche Domäne.

Aufgrund der Ergebnisse vermuteten wir, daß DEDD eine neues Bindeglied zwischen den cytoplasmatischen und nuklearen Ereignissen der Apoptose darstellt und den zellulären Prozeß der Transkription von rDNA, der der Apoptose entgegenläuft, ausschaltet. Abbildung 1.13 zeigt eine schematische Darstellung des Proteins und faßt die Erkenntnisse zu Beginn dieser Arbeit zusammen.

1.11 Aufgabenstellung

Die Apoptose spielt eine bedeutende Rolle bei der Ontogenese und Homöostase von mehrzelligen Organismen. Dysregulation dieses zellulären Prozesses kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Fehlregulationen des Apoptose-Signalwegs tragen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Krebs oder AIDS bei. Um therapeutisch in solche Fehlregulationen eingreifen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die Signalwege der Apoptose zu entschlüsseln. Signalmoleküle, die das apoptotische Signal weiterleiten, besitzen häufig spezialisierte Protein/Protein-Interaktionsdomänen, wie die Todeseffektordomäne (DED). Vor kurzem identifizierten wir ein Protein, das wir DEDD für „DED-containing DNA-binding protein“ nannten (Stegh et al., 1998). Innerhalb der Apoptose-Signalmoleküle ist DEDD sowohl in seiner Häufigkeit, als auch in seiner Konservierung zwischen verschiedenen Spezies einzigartig. Dies deutet an, daß DEDD eine fundamentale Rolle im Apoptose-Signalweg unterhalb der Todesrezeptoren spielen könnte.

DEDD besitzt mehrere Kernlokalisierungssignale (NLS). Transient transfiziertes Protein lokalisierte im Kern in Nukleoli-artigen Strukturen, während sich endogenes Protein hauptsächlich im Cytoplasma befindet. Das Protein könnte demnach als Kommunikator zwischen Cytoplasma und Nukleus dienen. Über die Mechanismen, mit denen diese beiden Kompartimente während der Apoptose miteinander kommunizieren, ist zur Zeit noch wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte daher nicht nur untersucht werden, welche Rolle DEDD im Nukleus und im Cytoplasma spielt, sondern auch, ob es eine Vermittler-Rolle zwischen beiden Kompartimenten einnimmt.

Als Ausgangspunkt sollte eine Untersuchung der funktionellen Domänen von DEDD dienen. Überexpressionsexperimente und *in vitro* Untersuchungen zeigten, daß DEDD ein nukleolares und proapoptotisches Molekül ist. Es stellte sich die Frage, welchen Einfluß DED und NLS auf die Lokalisation und die cytotoxische Aktivität des Proteins haben. Da bekannt war, daß die proapoptotische Wirkung von DEDD Caspasen-abhängig ist, sollte weiterhin untersucht werden, welche Caspasen durch die transiente Transfektion von DEDD aktiviert werden und in welchen Kompartimenten eine Aktivierung erfolgt.

Da wir DEDD *in vitro* als Inhibitor der DNA-Polymerase I-abhängigen rDNA-Transkription identifiziert hatten, war es ein weiteres Ziel, auch in intakten Zellen eine Inhibition nachzuweisen und die Spezifität dieser Inhibition zu bestimmen. Zudem sollte endogenes DEDD in Nukleus und Nukleoli nachgewiesen werden und nukleare Interaktionspartner von DEDD identifiziert werden.

Der größte Teil des endogenen DEDD befindet sich im Cytosol. Nach Induktion von Apoptose wurde endogenes DEDD aber auch in einer unlöslichen Fraktion, die unter anderem nukleare Proteine enthielt, nachgewiesen. Daher sollte untersucht werden, welche Veränderungen endogenes DEDD während der Apoptose in Bezug auf Löslichkeit und Lokalisation unterläuft, und welche Vorgänge dazu führen. Dabei stellte die Identifikation von Interaktionspartnern von DEDD und die Regulationsmechanismen ihrer Interaktionen ein grundlegendes Ziel dar.

2. Material und Methoden

2.01 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg) Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München, St. Louis), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Fisher Scientific (Chicago), radioaktive Reagenzien von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig, Piscataway) bezogen.

2.02 Häufig verwendete Puffer

Coomassie-Färbelösung:	10% (v/v) Essigsäure 45% (v/v) ml Methanol 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue
DNA-Probenpuffer (Agarosegel):	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylenzanol 30% (v/v) Glyzerin in ddH ₂ O
Elektrophoresepuffer (10x):	0,1% (w/v) SDS 25 mM Tris-HCl 192 mM Glyzin
Fixierlösung	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Laufpuffer (SDS-PAGE):	25 mM Tris-Base 1,9 M Glyzin 0,1% SDS (w/v)
Lysepuffer (TX-100):	150 mM NaCl 30 mM Tris-HCl, pH = 7,5 1 mM PMSF 10% Glyzerin (w/v) 1% Triton X-100 (w/v) 0,5 µg/ml Antipain 0,5 µg/ml Chymostatin A 0,5 µg/ml Leupeptin

	0,5 µg/ml Pepstatin
Nikolettipuffer:	0,1% Natriumcitrat (w/v) 0,1% Triton X-100 (w/v) 50 µg/ml Propidiumiodid
PBS (1x):	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 2,7 mM KCl 137 mM NaCl
Puffer für DEDD/I-DNA-Bindung (10x):	500 mM Tris/HCl (pH 7,4) 20 mM MgCl ₂ 1 M NaCl
Red. Probenpuffer für SDS-PAGE (5x RSB):	10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glyzerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau 250 mM Tris/HCl (pH6,8) 7,7% (v/v) β-Mercaptoethanol
TBE (10x):	0,45 M Tris-Base 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA
TE (1x):	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
Transferpuffer Western Blot:	25 mM Tris-Base 0,19 M Glycin 20% MeOH (v/v) 0,037% SDS (w/v)
Trenngel:	37,5 mM Tris-HCl, pH = 8,8 7,5-15% Acrylamid (w/v) 0,1% SDS (w/v) 0,03% APS (w/v) 0,1% TEMED (w/v)

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

2.03 Geräte

Gerät		Hersteller
Autoradiographiekassetten		Fisher Scientific
Blotting-Apparatur Trans-Blot Semi-Dry		Owl
Brutschränke Steri-Cult Incubator		Fisher Scientific
Durchflußcytometer FACScan		Becton Dickinson
ELISA-Reader		SLT Labinstruments
Gefrierschränke:	-20°C	GE
	-80°C	Legacy Ref. Systems
Geiger-Müller-Zählrohr 900		Series
Gelelektrophoresekammern		Owl, CTI
Heizbad		Köttermann
Heizblock Thermostat 5320		Eppendorf
Mikroskope:	Lichtmikroskop ID 02	Zeiss
	Immunfluoreszenz-Mikroskop Axiovert S100	Zeiss
	Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss
Mikroplatten-Fluoreszenz-Reader	FLx800	BIO-TEK Instruments
Mikrowellengerät HMG730B		GE
Minigelelektrophoresekammer		Owl
Netzgerät Electrophoresis Power Supply PS 500		EC Apparatus Corp.
PCR-Maschine	Robocycler	Stratagene
pH-Meter Calimatic		Fisher Scientific
Photoeinheit:	UV-Flächenstrahler	Konrad Benda
	Kamera RA1	Fisher Scientific
	Video Graphic Printer UP-860 CE	Sony
Photometer U-1100		Hitachi
Quarzküvetten Suprasil		Hellma
Röntgenfilmentwicklungsgerät	Kodak X-Omat 2000	Kodak
Schüttelinkubator Certomat HK		Fisher Scientific

Sterilarbeitsplatz SG600		Baker Company
UV Crosslinker		Stratagene
Waagen:	Analysenwaage AE 240	Fisher Scientific
	Präzisionswaage PE 3600	Fisher Scientific
Zählkammer Neubauer		Sigma
Zentrifugen:	Allegra 6R	Beckmann
	Centrifuge 5402	Eppendorf
	Sorvall RC 3B PLUS	DuPont

2.04 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Verwendung	Bezugsquelle
XL1 blue	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen
BL21	Produktion von Fusionsproteinen	Novagen

2.05 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Herkunft
293T	humane embryonale Nierenzelllinie
A549	humane epitheliale Lungenkarzinomzelllinie
BJAB	EBV-negative humane Burkitt-ähnliche lymphoblastoide B-Zelllinie
CEM	humane lymphoblastoide T-Zelllinie
EL4	murine lymphoblastoide T-Zelllinie
HeLa	humane Adenokarzinomzelllinie
H9	humane lymphoblastoide T-Zelllinie
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie-Linie
MCF7(Vek) MCF7(Casp-3)	humane Mammakarzinomzelllinie mit Vektor oder Pro-Caspase-3 stabil transfiziert (Jänicke et al., 1998a)
NTera-2	humane pluripotente embryonale Karzinomzelllinie
SW13	humane Nebennierenkarzinomzelllinie, K8/K18-negativ

SW13 2C4 K- SW13 2C6 K+	SW13 Zellen transfiziert mit Vektor (K-) oder cDNA für Keratin 8 und K18 (K+) (Caulin et al., 1997)
----------------------------	---

2.06 Antikörper

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-FLAG M2 (IgG1) (Maus, monoklonal)	FLAG Epitop	Sigma, St. Louis
anti-FADD (IgG1) (Maus, monoklonal)	FADD	Transduction Laboratories
C15 (IgG2b) (Maus, monoklonal)	Caspase-8 p18 Untereinheit (aktive Caspase-8)	Scaffidi et al., 1997
anti-aktive Casp-3 (Kaninchen, polyklonal)	aktive Caspase-3	Cell Signaling Technologies
anti-DEDD1 (Kaninchen, polyklonal)	DEDD (AS 139 – 158: (C)RAFSDPEPRPPQPSKTGPPH	Stegh et al., 1998
anti-DEDD2 (Kaninchen, polyklonal)	DEDD (AS 51 – 66): (C)DVIDDHERGLIRNGRD	Schickling et al., 2001
anti-Nukleolus (IgG1) (Maus, monoklonal)	humane Nukleoli	Chemicon
anti-BrdU (Maus, monoklonal)	Bromdesoxyuridin, kreuzreaktiv mit Bromuridin	Roche Diagnostics
anti-Lamin B (M-20) (Ziege, polyklonal)	Lamin B	Santa Cruz Biotechnology
anti-C23/Nukleolin (Maus, monoklonal)	C23 / Nukleolin	Santa Cruz Biotechnology
anti-K8 (Maus, monoklonal)	Cytokeratin 8	Sigma, St. Louis
anti-K18 DC-10 (IgG1) (Maus, monoklonal)	Cytokeratin 18	Santa Cruz Biotechnology
M30 (IgG2b) (Maus, monoklonal)	Keratin 18 (DALD ³⁹⁷ -Neoepitope nach Spaltung durch Caspase-3 oder 7)	Roche Diagnostics (Leers et al., 1999)
anti-Vimentin (IgG1) (Maus, monoklonal)	Vimentin	Sigma, St. Louis
anti- α -Tubulin (IgG1) (Maus, monoklonal)	α -Tubulin	Sigma, St. Louis
anti-CD8 HIT8a (IgG1) (Maus, monoklonal)	CD8 α -Untereinheit	Pharmingen, San Diego

anti-IgG1, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2a, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2a	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2b, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-Kaninchen, HRPO (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG, HRPO (Ziege, polyklonal)	Maus IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology
anti-Ziegen IgG, HRPO (Kaninchen, polyklonal)	Ziegen IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG, FITC (Ziege, polyklonal)	Maus IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG, TRITC (Ziege, polyklonal)	Maus IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG1, TRITC (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus IgG2b, FITC (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Santa Cruz Biotechnology
anti-Kaninchen IgG, FITC (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology
anti-Kaninchen IgG, TRITC (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology
anti-Ziegen IgG, TRITC (Kaninchen, polyklonal)	Ziegen IgG, Fc-spezifisch	Santa Cruz Biotechnology

2.07 Caspaseninhibitoren

Name	Verbindung	Bezugsquelle
zVAD-FMK	Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Enzyme System Products (Dublin, Ca, USA)
zDEVD-FMK	Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Enzyme System Products (Dublin, Ca, USA)
zIETD-FMK	Benzoxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Enzyme System Products (Dublin, Ca, USA)
CaspaTag 6 (FAM-VEID-FMK)	Carboxyfluorescein-Val-Glu-Ile-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon	Intergen

Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst und bei -70°C gelagert.

2.08 Caspasenpeptidsubstrate

Name	Verbindung	Bezugsquelle
zVDVAF-AFC	Benzoxycarbonyl-Val-Asp-Val-Asp-Phe-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
zDEVd-AFC	Benzoxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
zVEID-AFC	Benzoxycarbonyl-Val-Glu-Ile-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
zIETD-AFC	Benzoxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Ac-LEHD-AFC	Benzoxycarbonyl-Leu-Glu-His-Asp-(O-Methyl)-Aminofluoromethylcoumarin	Bachem, Bubendorf, Schweiz

Die Peptidsubstrate wurden in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst und bei -70°C gelagert.

2.09 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pcDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3.FLAG A, B, C	pcDNA3 Vektor, der ein FLAG-Peptid in der <i>Kpn</i> I Schnittstelle besitzt. A, B, C = verschiedene "open reading frames"	Eigenbau
pBSK ^{-/+}	Klonierungsvektor	Stratagene
pGEX 4T-1, 2, 3	prokaryotischer GST Fusionsprotein-Expressionsvektor	Pharmacia Biotech
pRSET A, B, C	prokaryotischer 6His Fusionsprotein-Expressionsvektor	Invitrogen
pEGFP-N1, -C1	eukaryotischer GFP Fusionsprotein-Expressionsvektor	Clontech

2.10 Oligonukleotide (PCR-Primer)

Name & Orientierung	Sequenz
Primer 1 (sense)	5'-CGCGGATCCGGGGAAAGCATTGCGTACCTGAGCC-3'

Primer 2 (<i>antisense</i>)	5'-CCGGAATTCCGGACAGTCCCCAAAGTGAGAAAGAGGG-3'
3'FLAG-DEDD (<i>antisense</i>)	5'-CCGGAATTCCGGTCACTTGTATCGTCGTCCTTGTAAATCGGGCAAAGCTTGACGATC-3'
Muta NLS1 Schritt 1 (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-CGTCACCCTCAAGCTGAGACTGGCTGTGTGCCC-3' 5'-GGGCACACAGCCAGTCTCAGCTTGAGGGTGACG-3'
Muta NLS1 Schritt 2 (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-CGTCACCCTCGCGCTGGCACTGGCTGTGTGCCC-3' 5'-GGGCACACTGCCAGTGCCAGCGCGAGGGTGAC-3'
Muta NLS2 Schritt 1 (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-CAGATGTGTAGCCTGCTGCCAGCCCGAG-3' 5'-CTCGGGCTGGCAGCAGGCTACACATCTG-3'
Muta NLS2 Schritt 2 (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-AGAGCCACACTTGGGAGCCAGCGAATACTCCGGATCTCAGTGACACC-3' 5'-GGTGTCACTGAGATCCGGAGTATTCGCTGGCTCCCAAGTGTGGCTCT-3'
Muta NLS2 Schritt 3 (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-GCCACACTTGGGAGCCAGGCAATACTCGCGATCTCAGTGACACC-3' 5'-GGTGTCACTGAGATCGCGAGTATTGCCCTGGCTCCCAAGTGTGGC-3'
Muta NLS3 (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-ATGGCGGGCCTAGCGGCGGCGGCAAGCCAGGTG-3' 5'-CACCTGGCTTGCCGCCGCCGCTAGGCCCGCCAT-3'
Muta (F47Y) (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-GCGCGTGCTTTCTTACCTCTTTGTTGATGTC-3' 5'-GACATCAACAAAGAGGTAAGAAAGCACGCGC-3'
Muta (F47G) (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-GCGCGTGCTTTCTTGGCCTCTTTGTTGATGTC-3' 5'-GACATCAACAAAGAGGCCAGAAAGCACGCGC-3'
Muta (L97/98G) (<i>sense</i>) + (<i>antisense</i>)	5'-CATCACTCGCCACGACGGGGGGCCCTACGTCACC-3' 5'-GGTGACGTAGGGCCCCCGTCGTGGCGAGTGATG-3'
5'FLAG-C-DEDD (<i>sense</i>)	5'-CGCGGATCCGCGATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGCGGGCTGTGTGCCCTGATC-3'
C-DEDD-ΔC (<i>antisense</i>)	5'-CCGGAATTCCGGTCAGTCACGCCAGAATGCATCGAG-3'
C'-DEDD (<i>sense</i>)	5'-CGCGGATCCGCGTGTAGCAAGCGGCCAGCC-3'
Exon 2/3 (<i>sense</i>)	5'-CGCGGATCCGCGGTGTGCCCTGATCTTGTAG-3'
Exon 2/3 (<i>antisense</i>)	5'-CCGGAATTCCGGACATGTCTGCTTCTCCTT-3'
Exon 4 (<i>sense</i>)	5'-CGCGGATCCGCGGACATCAGACTGCGGGTTCG-3'
3'FLAG-N-DEDD (<i>antisense</i>)	5'-CCGGAATTCCGGTCACTTGTATCGTCGTCCTTGTAAATCTACAAGATCAGGGCACACAGC-3'

3'FLAG-N'-DEDD (<i>antisense</i>)	5'-CCGGAATTCCGGTCACTTGTATCGTCGTCCTTGTAGGTGTCGTAGGGCAGCAG-3'
GFP-N'-DEDD (<i>sense</i>)	5'-CCGGAATTCATGGCGGGCCTAAAGCGG-3'
GFP-N'-DEDD (<i>antisense</i>)	5'-CGCGGATCCGCGTCAGGTGTCGTAGGGCAGCAG-3'

Einfach unterstrichen: BamH I-Schnittstelle

Gestrichelt: EcoR I-Schnittstelle

Schlangenlinie: Flag-Sequenz

Hervorgehoben: Punktmutationen

2.11 Enzyme und Kits

Enzym / Kit	Bezugsquelle
RNAse (DNAse frei)	Roche Diagnostics, Mannheim
Deep Vent TM DNA Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
Murine LV Reverse Transkriptase	Perkin Elmer, New Jersey, USA
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Qiagen Maxiprep Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

Die verschiedenen Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas und New England Biolabs bezogen.

2.12 Medien für Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Caseinhydrolysat
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 pH 7,2 mit 1N NaOH eingestellt.

Für die Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (Amp; 100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) zugegeben.

2.13 Anzucht von Bakterien

E. coli-Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten bei 37°C angezogen. Für die Anzucht von Plasmid-tragenden Stämmen wurde Selektionsmedium verwendet, dem Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) hinzugefügt worden war. Für die Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit Zellen einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (200 UpM; 37°C) inkubiert. Einzelkulturen der Bakterienstämme wurden auf LB-Agar-Platten bei 4°C aufbewahrt und Glycerinkulturen der Bakterien angelegt, indem zu einer frischen Übernachtskultur Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50% gegeben wurde. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei –80°C.

2.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

a) in kleinem Maßstab mit Hilfe der alkalischen Lyse

Die verwendete DNA-Minipräparationsmethode ist angelehnt an die „alkalische Lyse-Methode“ nach Birnboim und Doly (1979). Die so gewonnene Plasmid-DNA ist für Restriktionsanalysen und direkte Sequenzierungen hinreichend rein. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Tischzentrifuge. 1 ml einer 5 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde pelletiert (1 min; 12000 UpM; RT) und in 200 µl GTE-Puffer (5 mM Glucose; 0,5 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Lyse-Puffer (0,2 N NaOH; 1% SDS), 5 min Inkubation auf Eis, Zugabe von 300 µl einer eiskalten 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,8) und einer weiteren fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden Zellfragmente und chromosomale DNA abzentrifugiert (10 min; 14000 UpM; 4°C). Zur Fällung der Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde dieser mit 1 bis 1,5 Vol. absolutem Ethanol (-20°C) versetzt und sofort zentrifugiert (10 min; 14000 UpM; 4°C). Das Pellet wurde einmal mit 70%igem EtOH gewaschen (5 min; 14000 UpM; 4°C) und in 40 µl TE-Puffer (plus 1 µl RNase) aufgenommen.

b) in großem Maßstab mit dem Qiagen Maxiprep Kit

Um große Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das Maxi Plasmid Reinigungsprotokoll von Qiagen verwendet. 400 ml einer über Nacht Bakterien-Kultur wurden abzentrifugiert (10 min; 3000 UpM; 4°C; Sorvall-Zentrifuge; GSA-Rotor), in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und 5 min, RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eiskalter Puffer P3 hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14000 UpM; 30 min; 4°C; Sorvall-Zentrifuge; SS34-Rotor) wurde der Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 500 Säule gegeben und die Säule anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml des Puffers QF von der Säule eluiert. Das Eluat wurde zur DNA Fällung mit 10,5 ml Isopropanol vermischt, die DNA abzentrifugiert (6000 UpM; 30 min; 4°C), mit 70%igem Alkohol gewaschen und in 200 - 300 µl TE-Puffer gelöst.

2.15 Auftrennung und Elution von DNA-Fragmenten**a) Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Agarose in einer Konzentration von 0,7% bis 2,0% eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer im Mikrowellenherd kurz aufgeköcht. Nach abkühlen auf ca. 55°C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in einen waagrechten Gelschlitten gegossen. Ein Kamm diente zur Ausbildung der Taschen während der Polymerisation. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer (5x) gemischt und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Laufpuffer bei 90 V (ca. 6 V pro cm) für 1 bis 3 h. Da Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren interkaliert und durch UV-Licht (315 nm) zur Fluoreszenz angeregt wird, konnte das Ergebnis der Elektrophorese photographisch dokumentiert werden. Die Länge unbekannter DNA-Fragmente konnte durch den Vergleich mit einem DNA-Marker (siehe Abschnitt 3.3.3), der mit auf das Gel aufgetragen worden waren, ermittelt werden.

b) Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Um ein DNA-Fragment von anderen Fragmenten zu trennen, beispielsweise nach einem Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.17), wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (gemäß dem Protokoll des Herstellers) verwendet: Die DNA wurde in einem 0,7% bis 2,0%igen "low-melting-point"-Agarosegel in TE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Auf dem UV-Leuchttisch (315 nm) wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten, gewogen und mit dem dreifachen Gewicht der Agarose ($1\text{ }\mu\text{g} \cong 1\text{ }\mu\text{l}$) an Puffer QX1 versetzt. Um die Agarose zu

schmelzen und die DNA in Lösung zu bringen, wurde der Ansatz für ca. 10 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit einem Drittel des Volumens an QX1 mit Isopropanol vermischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Durch Zentrifugation (13000 UpM; RT; Tischzentrifuge) wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden, die Säule anschließend einmal mit Puffer PE gewaschen (Zentrifugation: siehe oben) und zur Entfernung von Ethanol-Resten noch einmal trocken zentrifugiert. Schließlich wurde die DNA mit 50 µl H₂O eluiert.

2.16 Reinigung, Konzentration und Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

a) Deproteinierung von DNA durch Phenolisierung (Phenol/Chloroform-Extraktion)

Um eine mit Protein verunreinigte DNA-Präparationen zu reinigen, wurde eine Phenolextraktion durchgeführt: Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 v/v) versetzt, gut gemischt und anschließend abzentrifugiert (5 min; 13000 UpM; RT). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Durch anschließende zweimalige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) konnten Phenolreste entfernt werden. Die wässrige Phase wurde zur Fällung der DNA mit 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) versetzt und 15 min bei -80°C inkubiert und die DNA abzentrifugiert (5 min; 13000 UpM; RT), mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

b) Reinigen von DNA durch Ethanolfällung

Um eine mit Salzen verunreinigte DNA-Präparationen zu reinigen, wurde eine Ethanolfällung wie folgt durchgeführt: Die DNA-Lösung wurde mit dem 0,1fachen Volumen einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) und dem 2,5fachen Volumen Ethanol (-20°C) versetzt, gut gemischt und für 10 min bei -70°C inkubiert. Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min; 14000 UpM; 4°C), anschließend mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen und in einem geeigneten Volumen H₂O oder TE-Puffer resuspendiert.

c) Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀). Für die Berechnungen wurden folgende Formeln verwendet:

Konzentration einer Lösung mit doppelsträngiger DNA:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g DNA/ml}]$$

Konzentration einer Lösung mit einzelsträngiger DNA:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g DNA/ml}]$$

Konzentration einer Lösung mit RNA:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33 = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g RNA/ml}]$$

Molarität einer Lösung mit DNA-Oligonukleotiden:

$$OD_{260} / (\text{Anz. d. Nukl. des Oligos} \times 10) = \text{Oligonukleotidkonz. } [\mu\text{mol/ml}]$$

Ein Maß für die Reinheit einer DNA-Präparation ist das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} . Dieser Wert sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

Alternativ dazu kann die Konzentration von DNA-Fragmenten durch Vergleich mit Lösungen definierter Konzentration in einem Agarosegel bestimmt werden. Hierfür wurde ein Aliquot der zu untersuchenden DNA-Lösung im Agarosegel parallel zu Proben mit definierter DNA-Menge analysiert. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität konnte die Konzentration abgeschätzt werden.

2.17 Modifizierung von DNA

a) Restriktionsspaltung von DNA

Je nach Restriktionsenzym wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durch 10fache Verdünnung der entsprechenden Reaktionspuffer eingestellt. Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab erfolgte in 10 bis 20 μl , wobei 1 μg DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym 1-2 h bei 37°C inkubiert wurde. Das Ansatzvolumen für Spaltungen im präparativen Maßstab richtete sich nach der Menge der eingesetzten DNA (Endkonzentration: 0,1 bis 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Vor der Gelelektrophorese wurde dem Restriktionsansatz 1/5 Volumen des Probenpuffers hinzugefügt.

b) Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden

Die Entfernung von Phosphatgruppen an den 5'-Enden linearisierter Vektor-DNA verhindert die Religation des Vektors ohne das zu klonierende Insert (Ligation siehe Abschnitt 4.3.3) und erhöht damit die Klonierungseffizienz. 1 bis 2 μg linearisierte Vektor-DNA wurden mit 10x Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) in einem 50 μl -Ansatz vorgelegt. 75 U des Enzyms CIAP (alkalische Phosphatase) wurden hinzugegeben und 40 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Vektor-DNA durch Gelelektrophorese und Gel-Extraktion (siehe Abschnitt 2.15) gereinigt.

c) Ligation von DNA-Fragmenten

Die Bakteriophagen-T4-Ligase katalysiert in Gegenwart von ATP die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Vektor-DNA (0,05 bis 0,1 pM) wurde mit dem zweifachen molaren Überschuß der zu klonierenden DNA gemischt. Nach Zugabe von 10x Ligationspuffer (10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 5% Polyethylenglykol 8000; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6) und 1 U T4-DNA-Ligase (Volumen des Reaktionsgemisches: 15 - 20 µl) wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 14°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde schließlich in kompetente Bakterien transformiert (siehe Abschnitt 2.20).

2.18 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich durch Wahl entsprechender Oligonukleotid-"Primer" gezielt DNA-Abschnitte amplifizieren. Die Oligonukleotide, die eine Länge von 20 - 50 bp besitzen sollten, sind dabei komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA (*sense*- bzw. *antisense*-Primer). Grundlage der PCR sind zyklische Temperaturänderungen, die optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen darstellen. Im ersten Schritt hybridisieren die Primer an durch Hitze denaturierte einzelsträngige DNA („Annealing“) und bilden so einen doppelsträngigen Startpunkt für die DNA-Polymerasen, die dann im zweiten Schritt doppelsträngige DNA aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisieren. Durch Hitzeeinwirkung trennen sich die komplementären Einzelstränge im dritten Schritt und können schließlich erneut mit den Primern hybridisieren, so daß sich bei jedem Zyklus die Zahl der zur Verfügung stehenden Vorlagen verdoppelt. Auf diese Weise wurden Deletionsmutanten oder Konstrukte mit alternativen Restriktionsstellen hergestellt.

In einem 50 µl PCR-Ansatz wurden jeweils 1 µM Sense- und Antisense-Primers, 150 ng Ausgangs-Plasmid (Template), 1 mM dNTPs und 0,5 U Deep-Vent DNA-Polymerase in 5 µl Deep-Vent-PCR-Puffer (10x) mit 2 µl MgSO₄ (25 mM) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und im „Thermocycler“ (Stratagene) in folgenden Zyklen inkubiert:

1. Zyklus:	3 min;	95°C (Denaturierung der DNA)
2. bis 35. Zyklus:	1 min;	95°C (Denaturierung der DNA)
	1,5 min;	59°C (Primer-Annealing)
	1,5 min;	72°C (Polymerisations-Reaktion)
36. Zyklus:	10 min;	72°C (Polymerisations-Reaktion)

Die Annealing-Temperatur kann abhängig von den eingesetzten Primern variieren. Die für das jeweils verwendete Primer-Paar angewandte Annealing-Temperatur wurde durch

Vorversuche ermittelt. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Reaktionsansatz nach der PCR mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Abbildung 2.18 zeigt eine schematische Aufstellung aller erzeugten DEDD-Mutanten.

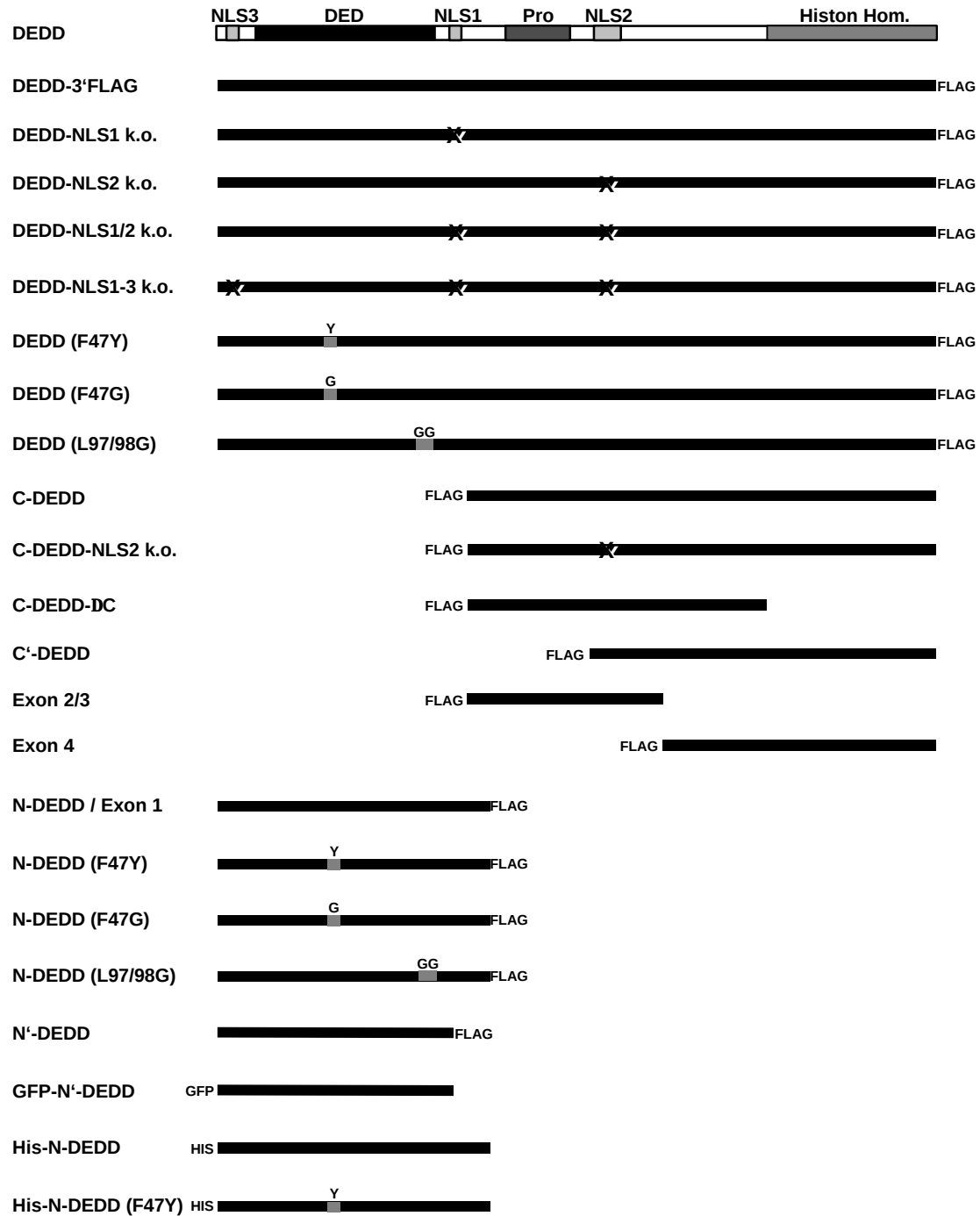


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung aller erzeugten DEDD-Konstrukte. NLS, Kernlokalisierungssignal. DED, Todeseffektordomäne. Pro, Prolinreiche Domäne. FLAG, FLAG-Markerpeptid. X, mutiertes NLS. Y, G und GG, mutierte Aminosäuren in der DED. GFP, grün fluoreszierendes Protein. HIS, 6Histidin-Markerpeptid.

2.19 Generierung von Plasmiden mit Punktmutationen

Um Punktmutationen in ein Gen einzuführen, wurde das *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene benutzt. Die Durchführung folgte den Angaben des Herstellers. Das Kit basiert auf der Tatsache, daß parentale wt-Plasmid-DNA aus Bakterien stammt, die die Sequenz 5'-GATC-3' durch Methylierung zu 5'-G^{M6}ATC-3' modifiziert haben, während neusynthetisierte und mutierte Plasmide diese Modifikation nicht tragen. 5'-G^{M6}ATC-3' ist die Erkennungssequenz der Endonuklease *Dpn* I. Zur Mutagenese werden zwei zueinander komplementäre Primer (*sense* und *antisense*) benötigt, die die gewünschte Mutation eingebettet in die wt-Sequenz enthalten. Ähnlich einer PCR werden diese Mutations-Primer an ein hitzedenaturiertes wt-Plasmid angelagert und dienen so als Ausgangspunkt für die Synthese mutierter Plasmide durch die Polymerase *Pfu*. Anschließend wird das parentale wt-Plasmid mit der methylierten DNA 5'-G^{M6}ATC-3' durch die Endonuklease *Dpn* I verdaut. Die übrigbleibenden neusynthetisierten mutierten Plasmide werden in Bakterien transformiert.

Ein 50 µl-Ansatz enthielt neben 5 - 50 ng wt-Plasmid 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, 125 ng *sense*-Primer, 125 ng *antisense*-Primer, und 2,5 U *Pfu*-Polymerase. Der Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und im Thermocycler in folgenden Zyklen inkubiert:

1. Zyklus:	30 sec;	95°C	(Denaturierung der DNA)
2. bis 17. Zyklus:	30 sec;	95°C	(Denaturierung der DNA)
	1 min;	55°C	(Primer-Annealing)
	12 min;	68°C	(Polymerisations-Reaktion)
18. Zyklus:	2 min;	4°C	(Abkühlung)

Anschließend wurden pro Ansatz 10 U *Dpn* I hinzugegeben und die parentalen Plasmide für 2 h bei 37°C verdaut, und schließlich 5 bis 15 µl des Ansatzes in kompetente Bakterien transformiert (siehe Abschnitt 2.20).

2.20 Herstellung und Transformation chemo-kompetenter Bakterien

a) Herstellung

200 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₂₆₀ von 0,6 im Schüttler inkubiert (37°C; 200 UpM). Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min; 3000 UpM; 4°C; Heraeus Zentrifuge) und in 60 ml eiskalter TFB1-Lösung (100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl₂; 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach 90 min Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min; 3000 UpM; 4°C; Heraeus Zentrifuge) und anschließend wurde das Bakterienpellet in 8 ml

eiskalter TFB2-Lösung (10 mM RbCl_2 ; 75 mM CaCl_2 ; 15% Glycerin; 10 mM MOPS; pH 7,0) aufgenommen. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die nach dieser Methode hergestellten kompetenten Bakterien wiesen eine Transformationseffizienz von 1 bis 5×10^7 Transformanten pro μg zirkulärer Plasmid-DNA auf.

b) Transformation

Zur Transformation wurden die tiefgefrorenen chemo-kompetenten Bakterien (100 μl) auf Eis aufgetaut, 0,02 bis 0,05 pM Plasmid-DNA (in weniger als 5 μl) bzw. 15 bis 20 μl Ligationsansatz (siehe 2.19) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 90 sec auf 42°C erwärmt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 μl LB-Medium und einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden entweder direkt 200 μl der Bakterien-Suspension ausplattiert (Transformation von Plasmiden) oder die Bakterien abzentrifugiert (2 min; 6000 UpM; RT; Heraeus Zentrifuge) in 200 μl resuspendiert und diese dann auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert (Transformation von Ligationen). Die Agarplatten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

2.21 Herstellung rekombinanter His-Fusionsproteine

a) Induktion und Expression der His-Fusionsproteine

His-N-DEDD, His-N(F47Y)-DEDD und His-FADD, deren cDNAs in pRSET A kloniert waren, wurden bakteriell exprimiert. 100 ml einer Bakterien-Übernachtskultur, die mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert war, wurden mit der zehnfachen Menge an LB/Amp-Medium verdünnt und im Schüttler 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 mM IPTG zugefügt und die Kultur für 2 bis 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Zur Überprüfung der Induktion wurden 200 μl der nicht-induzierten und induzierten Bakterien abzentrifugiert, in 20 μl 1x RSB aufgenommen, 3 min bei 95°C gekocht und jeweils 5 μl auf einem 12%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau-Färbung analysiert.

b) Lyse der Bakterien und Extraktion von His-Fusionsproteinen

His-Fusionsproteine können unter denaturierenden Bedingungen über eine Affinitätssäule aufgereinigt werden, da die Interaktion zwischen den Histidinen und dem Nickel nicht von der dreidimensionalen Proteinstruktur abhängt. Dazu wurden die induzierten Bakterien abzentrifugiert (6000 g, 10 min) und in einem kleinen Volumen 6 M GuanidinHCl, 0,1 M NaPhosphat, pH 8,0 lysiert. Anschließend wurde das Lysat auf 50 ml pro 500 ml induzierter Kultur mit 6 M GuanidinHCl, 0,1 M NaPhosphat, pH 8,0 aufgefüllt und um die Lyse zu vervollständigen, für 60

Minuten bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert (6000 g, 15 min) und der Überstand für mehrere Stunden mit in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPhosphat, pH 8,0 gewaschenen Ni^{2+} -Beads bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Beads mehrfach in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPhosphat, pH 8,0 gewaschen und die gebundenen Proteine mit 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaPhosphat, pH 4,0 eluiert. Das Eluat wurde gegen PBS dialysiert, wobei die Proteine ausfielen. Durch die Zugabe von 0,1 % SDS und leichtes Erhitzen wurden die Proteine wieder in Lösung gebracht und die Konzentration und Reinheit mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.23) und Coomassie Brilliant Blau-Färbung zusammen mit einem Proteinstandard bestimmt.

2.22 Bindung von His-Fusionsproteinen an λ -DNA

Um die DNA-bindenden Eigenschaften von His-N-DEDD, His-N(F47Y)-DEDD und His-FADD zu testen, wurden 2, 4 und 8 μg der His-Fusionsproteine oder die selbe Menge BSA jeweils 10 min, RT mit 100 ng verdauter Phage λ DNA (1:1 Mischung der λ DNA Marker 13 und 19 von MBI Fermentas) in 20 μl (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 5 μl 5x DNA-Probenpuffer (siehe 2.02) vermischt und auf einem 1%-Agarosegel analysiert.

2.23 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine oder Lysate wurden in diskontinuierlichen SDS-PAGE-Gelen (Laemmli, 1970) mit einem 7,5-15%igen (w/v) Acrylamid-Trenngel und einem 5%igen (w/v) Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. Die Gelzusammensetzung ist unter Abschnitt 2.02 aufgeführt. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, der Alkohol nach erfolgter vollständiger Polymerisation mit Wasser entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und zur Ausbildung der Probentaschen ein Kamm in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragspuffer bei 95°C für 3 min gekocht, um sämtliche Proteine zu denaturieren. Es wurde ein elektrisches Feld von bis zu 30 mA/Gel angelegt. Die Proteine im Gel können durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung sichtbar gemacht werden.

2.24 Western Blot-Analyse

Der Semidry-Blotter und verschiedenen Lagen von Filterpapier (4 Stück unterhalb von Membran/Gel und 4 Stück oberhalb), Nitrozellulosemembran und SDS-Gel wurden mit Transferpuffer angefeuchtet, um eine optimale Stromleitung zu gewährleisten. Bei einer

Stromstärke von 0,8 A pro cm^2 Gel wurde 2 h die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in einer 5%igen Magermilch / PBS (0,05% Tween)-Lösung für mindestens 1h Stunde abgesättigt. Der Blot wurde mehrmals mit einer PBS (0,05% Tween)-Lösung gewaschen. Primärantikörper wurden in PBS/Tween verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS/Tween wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper (1:15000 in PBS/Tween verdünnt) unter Schütteln inkubiert. Der Blot wurde anschließend dreimal je 10 min mit TPBS gewaschen. Gleiche Teile der Detektionsreagenzien A und B (ECL-Kit, Amersham-Buchler, Braunschweig oder Piscataway) wurden gemischt, der Blot darin eine Minute inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

2.25 Medien für die Zellkultur

Die Zellkulturmedien RPMI 1640 und DMEM wurden von den Firmen Gibco BRL (Grand Island, NY), bzw. Cellgro (Boston) bezogen. Vor der Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen komplementiert:

10% (v/v) Fötale Kälber Serum	Gibco BRL (Grand Island, NY)
10 mM HEPES	Gibco BRL (Grand Island, NY)
50 µg/ml Gentamicin	Gibco BRL (Grand Island, NY)

Zur Selektion von eukaryontischen Zellen wurden Geneticin (Sigma, St. Louis, MO) und Hygromycin B (Sigma, St. Louis, MO) eingesetzt.

2.26 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt. Eukaryontische Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um optimales Zellwachstum und -vitalität zu gewährleisten, wurden die Zellen bei einer Dichte von 8×10^5 bis zu 1×10^6 (nach ca. 2 bis 3 Tagen) mit frischem Kulturmedium auf eine Zelldichte von ca. 2×10^5 bis 3×10^5 Zellen pro ml verdünnt. Die verwendeten Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

RPMI 1640 Medium: BJAB, CEM, H9, HeLa, Jurkat, MCF7
DMEM Medium: 293T, NTera-2, SW13

Transfizierte Zellen wurden mit folgenden Zusätzen kultiviert:

MCF7 und SW13-Transfektanten: 1 mg/ml G418

2.27 Trypanblau-Ausschlußtest

Die Zellzahl und Vitalität der eukaryontischen Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlußtests bestimmt. Der Farbstoff Trypanblau lagert sich an cytoplasmatische Proteinstrukturen an und kann nur bei defekter Plasmamembran ins Cytoplasma gelangen. Daher markiert er nicht mehr lebensfähige Zellen, die bei der Zählung nicht berücksichtigt werden.

Aus einer gut suspendierten Zellkultur wurde ein Aliquot steril entnommen, 1:1 mit Farbpuffer (0,16% Trypanblau; 150 mM NaCl) gemischt und in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop betrachtet. Jeweils zwei der Großquadrate wurden ausgezählt und die Zelldichte wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Anzahl der Trypanblau-negativen Zellen}) \times 10^4.$$

2.28 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von nuklearen Proteinen aus transfizierten 293T Zellen wurden die Zellen in eiskaltem „total“-Lysepuffer (250 mM NaCl; 50 mM HEPES, pH 7.0; 5 mM EDTA; 1% Nonidet P-40, *Complete*[®] Protease-Inhibitoren (Roche Molecular Biochemicals)) resuspendiert und für 15 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz sonifiziert (30 sec, 20% Intensität) und Kerne und unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 14000 UpM; 4° C; Heraeus Zentrifuge).

Zur Immunpräzipitation von Cytokeratinen wurden HeLa oder MCF7 Zellen in PBS, das 2% Empigen BB (Calbiochem) enthielt (2% Empigen; 4 mM EDTA; 0,1 mM PMSF; *Complete*[®] Protease-Inhibitoren), für 45 min auf Eis lysiert (Zhou et al., 1999) und ebenfalls Pellet und Überstand durch Zentrifugation voneinander getrennt (15 min, 14000 UpM; 4° C). Im Gegensatz zu NP-40 wurde für Empigen BB gezeigt, daß es bis zu 40% der Keratine solubilisieren kann (Zhou et al., 1999).

Um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an Protein A-Sepharose bzw. anti-IgG1-Agarose binden, wurde das Lysat zunächst mit Protein A-Sepharose und 10 µg Maus IgG bei RT für 60 bis 90 min inkubiert. Die eigentliche Immunpräzipitation, d.h. die Inkubation des Lysats mit Protein A-Sepharose bzw. anti-IgG1-Agarose und 10 µg Antikörpern, erfolgt bei 4°C für 2 bis 3 Stunden, bzw. über Nacht. Nach mehrmaligem Waschen mit Lysepuffer wurden die Protein A-Sepharose- bzw. anti-IgG1-Agarose-Beads mit 50 µl 1x RSB (siehe 2.02) versetzt, 3 min bei 95°C gekocht, auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

2.29 Subzelluläre Fraktionierung

1×10^8 Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Jeweils die Hälfte der Zellen wurde für die Präparation von Kernen bzw. Cytoplasma eingesetzt. Zur Präparation cytoplasmatischer Extrakte wurden die Zellen in Cyt-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM EDTA; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM Dithiothreitol (DDT); 10 μ M Cytochalasin B; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), *Complete*[®] Protease-Inhibitoren (Roche Molecular Biochemicals)) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Ein Aliquot des Lysats wurde mit Trypanblau gefärbt, um den prozentualen Anteil der bereits aufgebrochenen Zellen zu bestimmen. Nachdem etwa >95% der Zellen aufgeschlossen waren, wurde das Lysat bei 14000 g zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen und mit 5x RSB versetzt. Zur Isolierung von Kernen wurden die gewaschenen Zellen für 20 min auf Eis in Nuk-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM DDT, 10 μ M Cytochalasin B, 1 mM PMSF) inkubiert und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Wiederum wurde die Anzahl lysierter Zellen durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Nachdem ein Lysegrad von mehr als 95% erreicht wurde, wurde die Suspension auf eine 30%ige Saccharose-Lösung (in Nuk-Puffer) vorsichtig aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 800g wurde das Kernpellet einmal in Nuk-Puffer gewaschen, erneut resuspendiert und mit 5x RSB versetzt. Anschließend wurden die Proben 3 min bei 95°C gekocht, auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

Zur Anreicherung von Nukleoli aus der Kernfraktion wurde das Kernpellet in Nukleoli-Puffer (10 mM Hepes, pH 7,6; 0,05 mM $MgCl_2$; 880 mM Sucrose; 0,05 mM Spermidin; 0,015 mM Spermin; 0,5 mM PMSF; *Complete*[®] Protease-Inhibitoren (Roche Molecular Biochemicals)) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Kerne durch vorsichtige Sonifizierung (15 sec, 10% Intensität) aufgebrochen, die Nukleoli mit 1000g für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und einmal mit Nukleoli-Puffer gewaschen, erneut resuspendiert und mit 5x RSB versetzt. Die verschiedenen Fraktionen wurden durch 12%ige SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.30 Präparation von Intermediärfilamenten und unlöslichem DEDD

Für die Trennung von unlöslichen und löslichen Proteinen wurden zwei Methoden verwendet:

a) Bei dieser klassischen Methode wurden $1-5 \times 10^7$ Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Extraktionspuffer (25 mM MOPS; pH 7,0; 10 mM $MgCl_2$; 60 mM NaCl; 4 mM Na_2HPO_4 ; 1,3 mM KCl; 0,75 mM KH_2PO_4 ; 1 mM PMSF; 1% NP-40) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation (14000 UpM; 4° C; Heraeus Zentrifuge). wurden

Überstand und Pellet voneinander getrennt. Der Überstand wurde mit 5x RSB versetzt, während das Pellet in 1xRSB aufgenommen wurde, der mit 5M Harnstoff versetzt war. Diese Methode wurde für Abbildung 3.18b verwendet.

b) Eine andere Methode wurde für Abbildung 3.19b verwendet. Die Zellen wurden in eiskaltem „total“-Lysepuffer (250 mM NaCl; 50 mM HEPES, pH 7.0; 5 mM EDTA; 1% Nonidet P-40, *Complete*[®] Protease-Inhibitoren (Roche Molecular Biochemicals)) resuspendiert (0,1 Mio. Zellen pro μ l) und für 15 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz sonifiziert (30 sec, 20% Intensität) und Kerne und unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 14000 UpM; 4° C; Heraeus Zentrifuge). Der Überstand wurde mit 5x RSB versetzt, während das Pellet in 1xRSB aufgenommen wurde, der mit 5M Harnstoff versetzt war.

Anschließend wurden die Proben jeweils 3 min bei 95°C gekocht, auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

2.31 Caspasenaktivitätstest

Verschiedene Zellfraktionen wurden mit jeweils 40 μ M Aminotrifluoromethylcoumarin (AFC)-gekoppelten Caspasen-spezifischen Peptidsubstraten in Spaltungspuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM DDT, 1 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 10% Saccharose) bei 37°C für 1h inkubiert. Durch die Spaltung der Substrate wird der Fluoreszenz-Farbstoff frei. Die Aktivität der einzelnen Caspasen wurden anschließend in einem Mikroplatten-Fluoreszenz-Reader (FLx800, BIO-TEK Instruments) fluorometrisch bestimmt. Die Werte der unstimulierten Zellen wurden von jenen der aktivierten Zellen subtrahiert.

2.32 Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von 293T-Zellen wurde die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode verwendet. Für eine 10 cm Petrischale wurde die DNA (1-6 μ g) zu einer Lösung aus 438 μ l H₂O und 61 μ l einer 2M CaCl₂-Lösung gegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch langsam in 500 μ l 2xHBS (8g NaCl; 0,2g Na₂HPO₄·7H₂O; 6,5g HEPES; H₂O ad 500 ml, pH 7.0) getropft, gut gemischt und 10 bis 20 min, RT inkubiert. Das dabei gebildete Präzipitat wurde zu am Tag zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 bis 48 h weiterverarbeitet. Die Transfektionseffizienz lag normalerweise zwischen 60% und 80%. Für die transiente Transfektion anderer Zellen wurde das „Superfect“-Reagenz von Qiagen nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Transfektionseffizienz lag dabei je nach Zelltyp zwischen 10% und 50%.

2.33 Proteinfärbung zur FACS-Analyse

Die Expression von Proteinen in Zellen, sowie das Auftreten von M30- bzw. DEDD-Filamenten (siehe 3.12) wurde durch intrazelluläre Färbung mit spezifischen primären Antikörpern und Fluorochrom-markierten sekundären Antikörpern mit anschließender Messung im Durchflußcytometer („fluorescence activated cell sorter“, FACS) bestimmt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und 30 min bei -20°C in Methanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden 5 min bei 500g pelletiert, das Methanol abgenommen und die Zellen zweimal mit Waschpuffer (PBS mit 5% FKS und 0,1% NaN₃) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erst mit Inkubationspuffer 30 min, RT und dann mit primärem Antikörper (Verdünnung 1:50 oder 1:100 in Inkubationspuffer) 60 min, RT inkubiert. Nach der Bindung des ersten Antikörpers wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit Zweitantikörper (1:100 in Inkubationspuffer) 45 min, RT im Dunkeln inkubiert. Vor der Analyse der Proben im FACS wurden diese mit PBS verdünnt. Die Immunfluoreszenz-gefärbten Zellen wurden dazu in das Durchflußcytometer FACScan durch eine Kapillare eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge $\lambda = 488$ nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts war dann jeweils vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird dabei von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe („forward scatter“, FSC), Granularität („side scatter“, SSC) oder Fluoreszenz („fluorescence detector“, FL) gaben.

2.34 Messung apoptotischer Zellen nach Nicoletti

Apoptose kann mit Hilfe verschiedener Techniken bestimmt werden, z. B. durch elektrophoretische bzw. kolorimetrische Methoden, die die DNA-Fragmentierung in Kernextrakten bestimmen. Der Nachteil dieser Methoden besteht darin, daß sie weder den Prozentsatz an apoptotischen Kernen, noch apoptotische Zellen in einer heterogenen Zellpopulation erkennen können. Mit Hilfe des Cytotoxizitätstests nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991), einer durchflußcytometrischen Methode, kann der prozentuale Anteil apoptotischer Zellkerne nach Propidiumiodid-Färbung in hypotonem Puffer bestimmt werden. Apoptotische Kerne erscheinen als ein breiter hypodiploider DNA-Peak, der leicht von dem sehr schmalen DNA-Doppelpeak nicht-apoptotischer Zellen mit diploidem und tetraploidem DNA-Gehalt unterschieden werden kann. Es wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 250 µl eines hypotonen Fluorochrompuffers (0,1 % Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid) für 16h bei 4°C unter Lichtabschluß lysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff drang dabei in die Zellkerne ein und interkalierte in die DNA, so daß die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszierten. Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen ließen sich daher die apoptotischen Zellkerne im

FL-2-Detektor des Durchflußcytometers als „subdiploider DNA-Peak“ ausmachen und quantifizieren.

2.35 Immunfluoreszenzmikroskopie

Adhärenente Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger („Poly-Prep slides“, Sigma) kultiviert, dreimal mit einer PBS-Lösung, die 1 mM MgCl_2 enthielt (PBS/MgCl_2), gewaschen und in einem -20°C kalten 1:1 Gemisch von Methanol und Aceton für 5 min fixiert. Nachdem die Objektträger luftgetrocknet waren, wurden sie mit PBS rehydriert und für 1 – 2 Stunden mit Primärantikörpern (verdünnt in PBS) inkubiert. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper waren wie folgt: anti-DEDD2 (8 $\mu\text{g/ml}$), anti-humane Nukleoli (1:200), anti-FLAG M2 (8 $\mu\text{g/ml}$), anti-BrdU Antikörper (1 $\mu\text{g/ml}$), anti-K8 (1:100), anti-Tubulin α (1:100), M30 (1:100). Anschließend wurden die Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/MgCl_2 vom Präparat entfernt und der Objektträger mit entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:200 in PBS) und DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindol; 2 $\mu\text{g/ml}$) für 45 min, RT inkubiert. Die Präparate wurden erneut mit PBS/MgCl_2 gewaschen und nach Schwenken in H_2O und 100% Ethanol luftgetrocknet. Auf die getrockneten Objektträger wurden mit Eindecklösung (Vectorshield Mounting Medium, Vector Laboratories, Inc., New Haven) auf Deckplättchen aufgebracht. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines Axiovert S100 Immunfluoreszenz-Mikroskop (Zeiss), das mit einer digitaler Kamera (Axiocam) und entsprechender Software ausgestatte war, analysiert.

Für Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop und zur Lokalisation aktiver Caspase-6 (siehe 2.37) wurden Zellen auf „Poly-Prep“-Objektträgern mit 2% Paraformaldehyd für mind. 30 min bei 4°C fixiert. Die Objektträger wurden anschließend drei mal drei Minuten in 50 mM NH_4Cl (in PBS) gewaschen, um freie Aldehyd-Gruppen abzusättigen. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch eine einminütige Inkubation mit eiskaltem 0,3% TX-100 in PBS permeabilisiert, erneut kurz in PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen für mind. 10 min in Blockierungsspuffer (PBS mit 0,01% Saponin; 0,25% Gelatine und 0,02% NaN_3) abgesättigt. Danach erfolgte die Färbung durch primäre und sekundäre Antikörper wie oben beschrieben. Die Färbungen wurden sowohl mit Hilfe eines Axiovert S100 Immunfluoreszenz-Mikroskops (Zeiss), als auch einem konfokalen Mikroskop analysiert.

2.36 *in vivo*-Transkriptionsanalyse in permeabilisierten Zellen

293T Zellen wurden auf „Poly-Prep“-Objektträgern kultiviert und mit DEDD bzw. N-DEDD transfiziert (siehe 2.29). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Tris-Glyzerol-Puffer TB

(20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 25% Glycerol; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM EGTA) gewaschen, mit eiskalten 0,5% Triton X-100 in TB für 3 min permeabilisiert und erneut mit TB gewaschen. Die „Run-on“-Transkription erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Transkriptions-Puffer (100 mM KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM EGTA; 25% Glycerol; 25 µM S-Adenosyl-L-Methionin; 5 U/ml Rnase-Inhibitor, 1 mM PMSF, 0,1 mM ATP; 0,1 mM CTP; 0,1 mM GTP; 0,1 mM BrUTP) mit und ohne α-Amanitin (100 µg/ml) für 30 min, RT. Danach wurden die Zellen mit TB (5 U/ml RNase-Inhibitor) gewaschen und mit Methanol:Azeton fixiert und gefärbt (siehe 2.32). Der Einbau von BrUTP im Verlauf der „Run-on“-Transkription wurde durch Färbung der Zellen mittels eines kreuzreaktiven anti-BrdU Antikörper (1 µg/ml) nachgewiesen.

2.37 Detektion von aktiver Caspase-6 in einzelnen Zellen

24 h nach der Transfektion von 293T Zellen mit DEDD-3'FLAG bzw. DEDD(F47Y)-3'FLAG wurden diese trypsinisiert, mit PBS/MgCl₂ (1mM) gewaschen und in einem kleinen Volumen Medium mit 1x CaspaTag 6 (Intergeren) inkubiert. CaspaTag 6 entspricht einem für Caspase-6 spezifischen Peptidinhitor mit angekoppeltem Fluorochrom (PE) und bindet daher aktive Caspase-6. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen, in Medium ohne FKS aufgenommen und auf L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgetragen, auf denen die Zellen für 10 min, RT adhärten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS/MgCl₂ gewaschen und wie unter 2.32 beschrieben mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-FLAG gefärbt.

2.38 Apoptose-Induktion durch Kotransfektion des CD8:Casp-8-Konstruktes

Das CD8:Casp-8-Fusionsprotein, das uns freundlicherweise von Dr. Michael Lenardo (NIH, Washington) zur Verfügung gestellt wurde, besteht aus der extrazellulären und der Transmembran-Domäne des CD8-Moleküls, fusioniert mit der enzymatischen Domäne der Caspase-8 (Martin et al., 1998). Während der Expression des Proteins kommt es zu einer konstitutiven Dimerisierung der Immunglobulin-Domänen von CD8, was wiederum die Aktivierung der enzymatischen Domänen der Caspase-8 durch Autoproteolyse (aufgrund der „Induced Proximity“ - siehe Abschnitt 1.03) zur Folge hat (Martin et al., 1998). Überexpression von CD8/Casp-8 aktiviert somit sehr spezifisch Caspase-8 und nachfolgende Caspasen, was letztlich einem starken Apoptose-Stimulus in den transfizierten Zellen gleichkommt. In der Regel werden bei einer Kotransfektion zweier DNAs beide gleichzeitig aufgenommen. Eine Kotransfektion von CD8:Casp-8 mit einem anderen Konstrukt ermöglicht es daher spezifisch nur transfizierte Zellen zu töten, die auch die zweite DNA beinhalten (und gegebenenfalls exprimieren).

3. Ergebnisse

DEDD ist ein ubiquitäres, hoch konserviertes und neuartiges Multi-Domänen-Protein mit einer funktionellen Todesdomäne (DED). Neben der N-terminalen DED konnten wir zunächst zwei Kernlokalisierungssignale (NLS), eine Prolin-reiche Region in der Mitte des Proteins und einen Bereich mit Homologien zu Histonen am C-Terminus identifizieren. Endogenes DEDD befindet sich im Cytoplasma, konnte aber nach Apoptose-Induktion in einer unlöslichen Fraktion mit Kernproteinen nachgewiesen werden. Überexprimiertes Protein lokalisierte hingegen ausschließlich im Nukleus in Nukleoli-artigen Strukturen. Überexpression von DEDD induzierte zudem, wie die Überexpression anderer DED-Proteine auch, Apoptose in transient transfizierten Zellen.

3.01 Die Exon / Intron Struktur von DEDD

Um den Einfluß der verschiedenen Domänen auf die Lokalisation und Cytotoxizität von DEDD zu untersuchen, sollte zunächst das *dedd*-Gen analysiert und eventuell weitere Domänen identifiziert werden. In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Ressourcen-Zentrum/Primäre Datenbank (RZPD) des humanen Genom-Projekts in Heidelberg und Berlin wurden genomische Klone mit DEDD-cDNA hybridisiert. Mit Hilfe der so identifizierten, für DEDD-cDNA positiven PACs (Plasmid Artificial Chromosomes) und der PCR-Technik wurden Teile des humanen und murinen *dedd*-Gens amplifiziert und sequenziert. Die zusammengeführten Sequenzen ergaben die vollständigen Gen-Loki beider Spezies (Abb. 3.01a). Die PACs wurden auch verwendet, um in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Peter Lichter (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) die chromosomale Lokalisation des *dedd*-Gens zu bestimmen. Das Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 1 im Bereich q21.2-21.3 und dem distalen Band G-H des murinen Chromosoms 1 (Daten nicht gezeigt). Für diese Region wurde gefunden, daß es sich um einen Ort häufiger Chromosomen-Abnormalitäten in einer Reihe menschlicher Krebsgeschwüre, wie z. B. Brustkarzinomen handelt (Bieche et al., 1995).

Beide *dedd*-Gene sind relativ klein und von ihrer Struktur her identisch (murines *dedd* = 2.9 kb, humanes *dedd* = 2.3 kb). Exon 1 umfaßt die Kernlokalisierungssignale (NLS) 1 und 3 (siehe Abschnitt 3.02) und ist 324 bp lang. Exon 2 (108 bp) und Exon 3 (147 bp) umfassen den Prolin-reichen Bereich und NLS 2. Exon 4 kodiert den C-terminalen Bereich von DEDD, der Homologien zu Histonen besitzt (Stegh et al., 1998). Die genomische Sequenz beider Gene wurde mit Hilfe der GENSCAN-Software (HUSAR, DKFZ, Heidelberg) einer Exon/Intron-Vorhersage unterzogen. Es stellte sich heraus, daß das vorhergesagte murine Exon 3 102 Basen länger als das humane ist, ansonsten aber mit der cDNA, die ursprünglich aus der murinen Zelllinie EL-4 und der

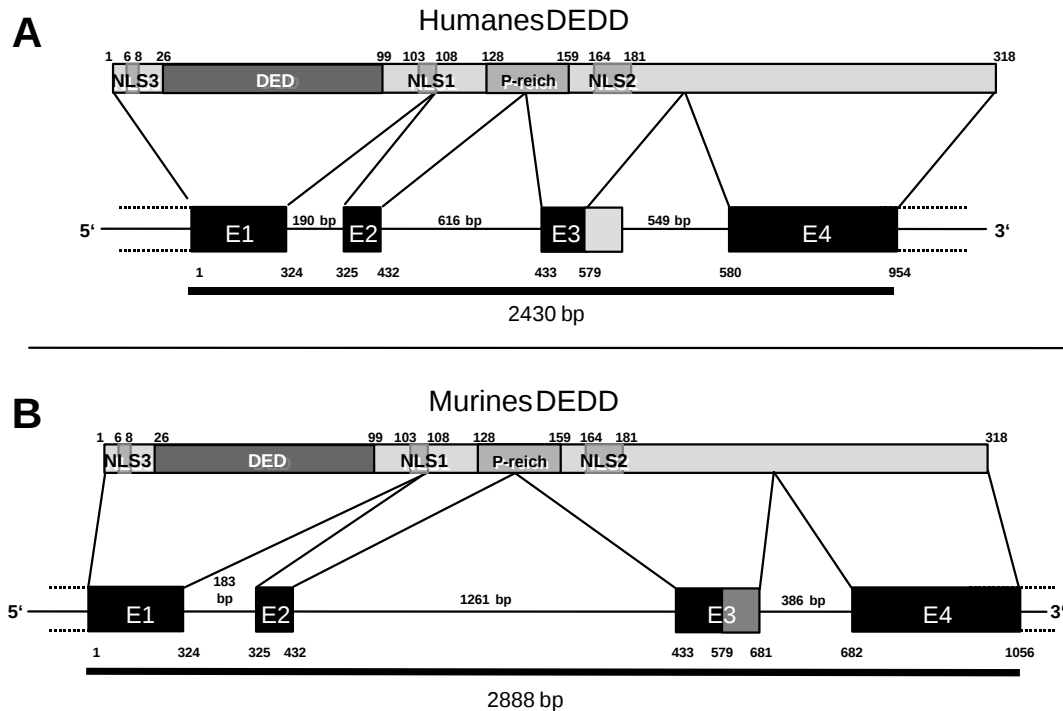


Abbildung 3.01a: Die Exon/Intron-Struktur des *dedd*-Gens. **(A)** Das humane Gen. **(B)** Das murine Gen. Der obere Teil der beiden Schemata zeigt das Protein und seine Domänen mit korrespondierenden Aminosäure-Positionen, der untere die Exon/Intron-Struktur mit Angaben der Position der Base in der cDNA und der Größe der Introns. Die graue Box am Ende von Exon 3 zeigt einen Bereich von 102 bp, der aufgrund differentiellen Spleißens Teil des Exon 2 sein kann.

humanen Jurkat Zelllinie kloniert wurde (Stegh et al., 1998), identisch ist. Das daraus resultierende Maus-Protein hat eine vorhergesagte Größe von 355 Aminosäuren (AS), während das menschliche Protein 317 AS groß ist. Western Blot-Analysen von Zell-Lysaten haben gezeigt, daß DEDD in EL-4 Zellen entsprechend 4 kDa größer ist als in humanen Zellen (Abb. 3.01b). Dies läßt vermuten, das es für DEDD, wie für viele andere Signalmoleküle der Apoptose auch, unterschiedliche Spleiß-Formen gibt. Tatsächlich wurde die RNA für eine längere Spleiß-Form von DEDD auch durch RT-PCR in menschlichen peripheren T-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In Zell-Lysaten läßt sich zudem durch Western Blot-Analysen eine größere DEDD-Bande von ca. 55 kDa identifizieren (Abb. 3.01b), die wahrscheinlich eine aggregierte Form von DEDD repräsentiert (vergl. Abschnitt 3.18).

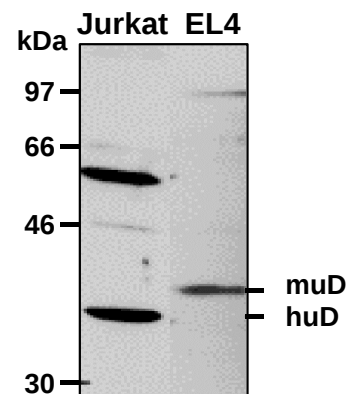


Abbildung 3.01b: Western Blot Analyse von Lysaten humaner Jurkat und muriner EL4 Zellen mit anti-DEDD1. muD, murines DEDD. huD, humanes DEDD.

3.02 Identifizierung eines dritten NLS

Überexprimiertes DEDD reichert sich ausschließlich im Zellkern transfizierter Zellen an. Da bereits zwei nukleare Lokalisationssignale (NLS) in der Aminosäuren-Sequenz von DEDD identifiziert wurden (Stegh et al., 1998), ist es wahrscheinlich, daß das Protein mit Hilfe des klassischen aktiven Transports in den Zellkern transloziert. Es ist bekannt, daß Exons häufig funktionelle Domänen eines Proteins kodieren. Um weitere Domänen in DEDD zu identifizieren und um den Einfluß der von den Exons kodierten Bereiche auf Lokalisation und Cytotoxizität des Proteins zu untersuchen, wurden entsprechend der Exon / Intron-Struktur des *dedd*-Gens Deletionsmutanten hergestellt: Exon 1 (N-DEDD, beinhaltet NLS1) und die verkürzte Mutante N'-DEDD (N-DEDD ohne NLS1), sowie Exon 2/3 und Exon 4 (Abb. 3.02a). Diese Mutanten ermöglichten es zunächst, mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen, den Einfluß der einzelnen NLS auf die Lokalisation des Gesamt-Proteins zu untersuchen (Abb. 3.02a).

Wie schon gezeigt wurde (Stegh et al., 1998), befindet sich C-DEDD (beinhaltet NLS 2) sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma transfizierter Zellen. Exon 2/3 (beinhaltet ebenfalls

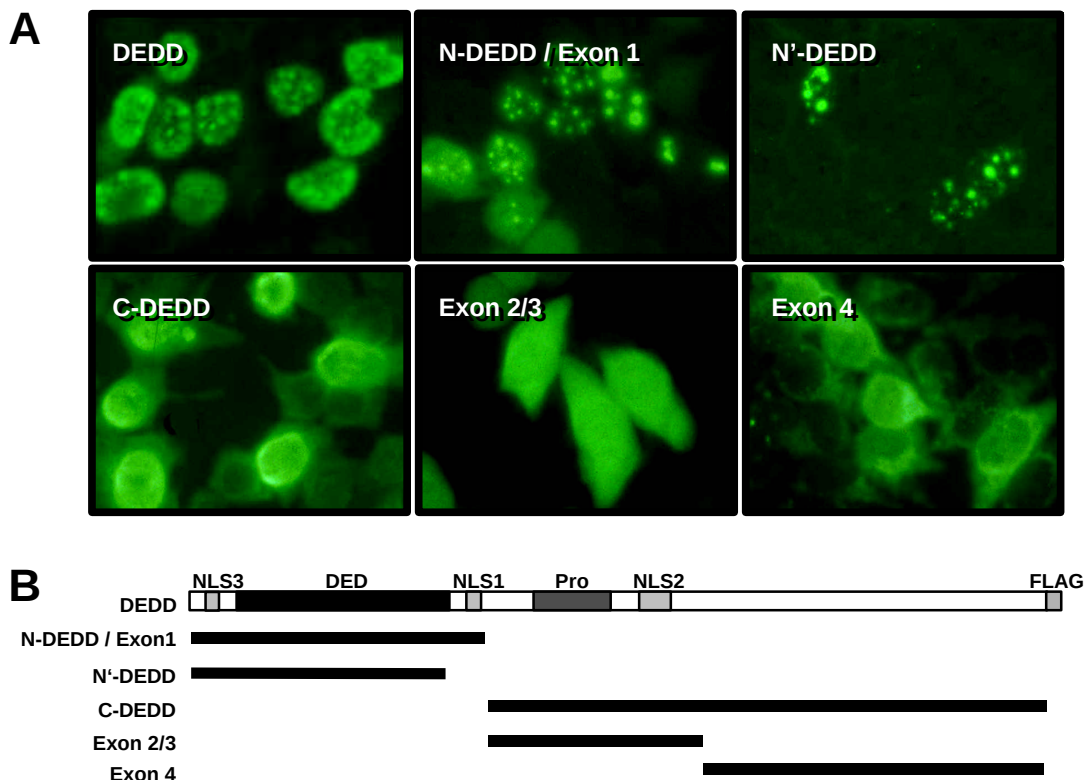


Abbildung 3.02a: Identifizierung eines dritten NLS in DEDD. **(A)** Lokalisation verschiedener Domänen von DEDD in transient transfizierten 293T Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die mit einem FLAG-Markerpeptid versehenen Domänen durch einen anti-FLAG Antikörper Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen. **(B)** Schematische Darstellung der in (A) verwendeten Mutanten.

NLS 2) ist gleichmäßig in Kern und Cytoplasma verteilt und Exon 4, das kein NLS besitzt, befindet sich nur im Cytoplasma. Im Gegensatz dazu befindet sich Exon 1 (N-DEDD) ausschließlich im Zellkern und reichert sich dort in noch stärkerem Maße als das vollständige Protein in den für transfiziertes DEDD typischen Nukleoli-artigen Strukturen an. N'-DEDD, eine verkürzte Mutante von N-DEDD, der NLS 1 fehlt, lokalisierte überraschenderweise immer noch in diesen Kernstrukturen, was auf ein weiteres NLS in diesem Protein-Abschnitt hindeutete. Um ausschließen zu können, daß N'-DEDD nur aufgrund seiner geringen Größe (ca. 12 kDa) in den Kern transloziert, wurde zunächst eine Fusionsprotein-Mutante von N'-DEDD mit GFP (ca. 30 kDa) hergestellt und deren Lokalisation in transient transfizierten 293T Zellen überprüft. GFP-N'-DEDD reichte sich ebenfalls im Zellkern in den subnuklearen Strukturen an (Daten nicht gezeigt), ein deutlicher Hinweis, daß die ersten 100 Aminosäuren ein weiteres NLS enthielten.

Bei einer erneuten Analyse der Aminosäuren-Sequenz von DEDD wurde ein Lys-Arg-Arg Motiv im Bereich vor der DED identifiziert (AS 4-6), bei dem es sich um eine dritte NLS handeln konnte. Durch Einführung von Punktmutationen in die cDNA von DEDD wurden Mutanten

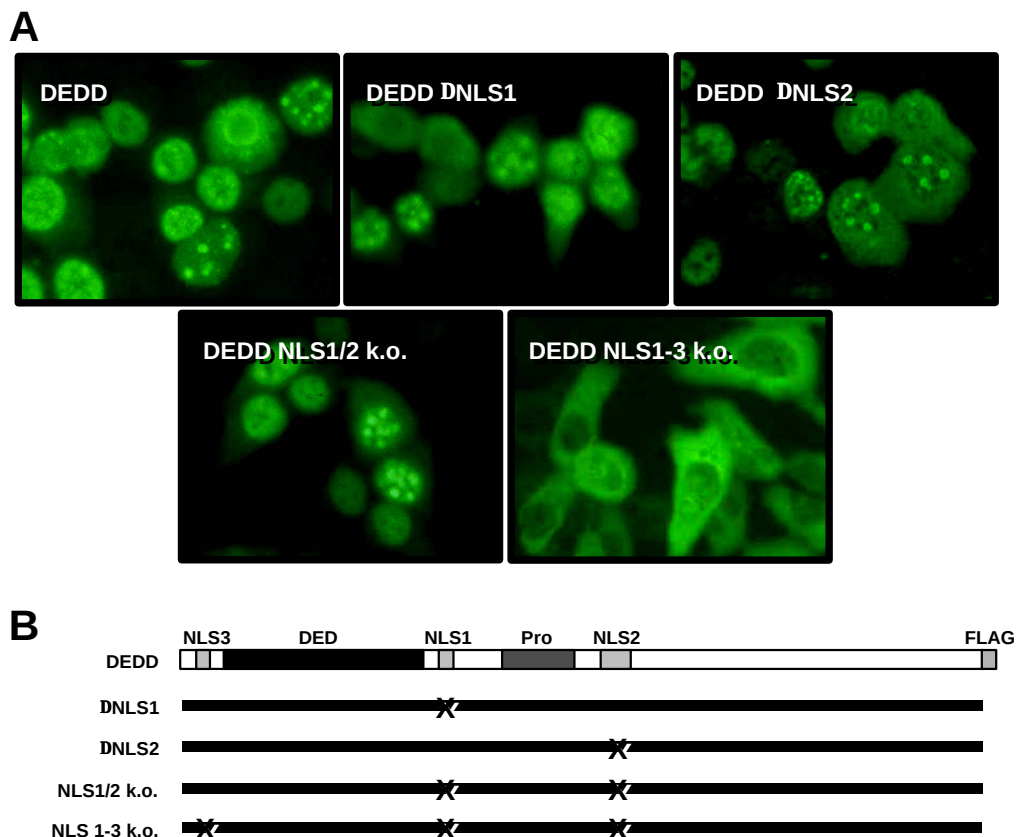


Abbildung 3.02b: Einfluß der NLS von DEDD auf dessen Lokalisation. **(A)** Lokalisation verschiedener Mutanten in transient transfizierten 293T Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die mit einem FLAG-Markerpeptid versehenen Mutanten durch einen anti-FLAG Antikörper Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen. **(B)** Schematische Darstellung der in (A) verwendeten Mutanten. Ein X zeigt ein mutiertes NLS an.

hergestellt, bei denen die Schlüssel-Aminosäuren eines, zweier oder aller drei Signalmotive ausgetauscht waren. Während die Mutation von einer oder zwei NLS nur geringfügigen Einfluß auf den Kerntransport von DEDD hatte (Abb. 3.02b), resultierte die Mutation aller drei NLS in einer Mutante (DEDD-NLS1-3 k.o.), die ausschließlich cytoplasmatisch vorlag. Dies bestätigte, daß es sich bei dem Lys-Arg-Arg Motiv tatsächlich um ein weiteres NLS handelt, und daß alle drei Motive an der Kernlokalisierung des Proteins beteiligt sind.

Um sicherzustellen, daß die Lokalisation der DEDD-Mutanten unabhängig von der transfizierten Zelllinie ist, wurden HeLa Zellen mit Hilfe des „Superfect“-Reagenz (Qiagen) transient mit verschiedenen DEDD-Mutanten transfiziert. Die Lokalisation der Mutanten, die Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen wurde, war in allen transfizierten Zelltypen identisch (Abb. 3.02b). Die Lokalisation der Mutanten ist daher unabhängig von der transfizierten Zelllinie.

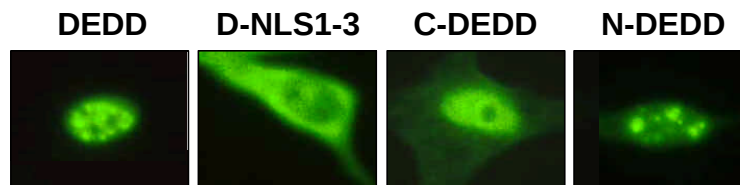


Abbildung 3.02c: Lokalisation verschiedener DEDD-Mutanten in transient transfizierten HeLa und Ntera-2 Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die mit einem FLAG-Markerpeptid versehenen Mutanten durch einen anti-FLAG Antikörper Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen. D, DEDD-3'FLAG, D-NLS1-3, DEDD-NLS 1-3 K.O.

3.03 DEDD benötigt die Kernlokalisierung, um proapoptotisch zu wirken

Wir hatten gezeigt, daß DEDD schwach Apoptose auslöst und seine cytotoxische Aktivität wahrscheinlich von der DED ausgeht (Stegh et al., 1998). Dies war zu erwarten, da bereits für andere Mitglieder der DED-Proteinfamilie wie FADD, Caspase-8 und c-FLIP gezeigt wurde, daß sie bei Überexpression durch ihre DED Apoptose auslösen (Chinnaiyan et al., 1995; Muzio et al., 1996; Shu et al., 1997). Alle diese Proteine befinden sich im Cytoplasma und es wurde vorgeschlagen, daß die Überexpression der DED im Cytoplasma zur Aggregation dieser Domänen und dadurch zur Bildung sogenannter Todeseffektor-Filamente (DEF) führt, die dann Caspase-8 rekrutieren und aktivieren können (Siegel et al., 1998). Um herauszufinden, ob DEDD über einen ähnlichen Mechanismus Apoptose induziert, wurde die cytotoxische Aktivität der NLS-Mutanten nach Expression in 293T Zellen anhand von DNA-Fragmentierung (siehe Abschnitt 2.34) bestimmt. Da sich transfiziertes DEDD in transient transfizierten 293T Zellen im Gegensatz zu den anderen genannten DED-Proteinen fast ausschließlich im Zellkern befindet, vermuteten

wir, daß eine Retention des Proteins im Cytoplasma durch Mutation der NLS zu einer Verstärkung der Cytotoxizität führen würde. Das Gegenteil war jedoch der Fall: Mutationen der NLS in DEDD führten zu einer Verringerung der Apoptose-Induktion und die rein cytoplasmatisch exprimierte Mutante DEDD-NLS1-3 k.o. besaß keine cytotoxische Aktivität mehr (Abb. 3.03).

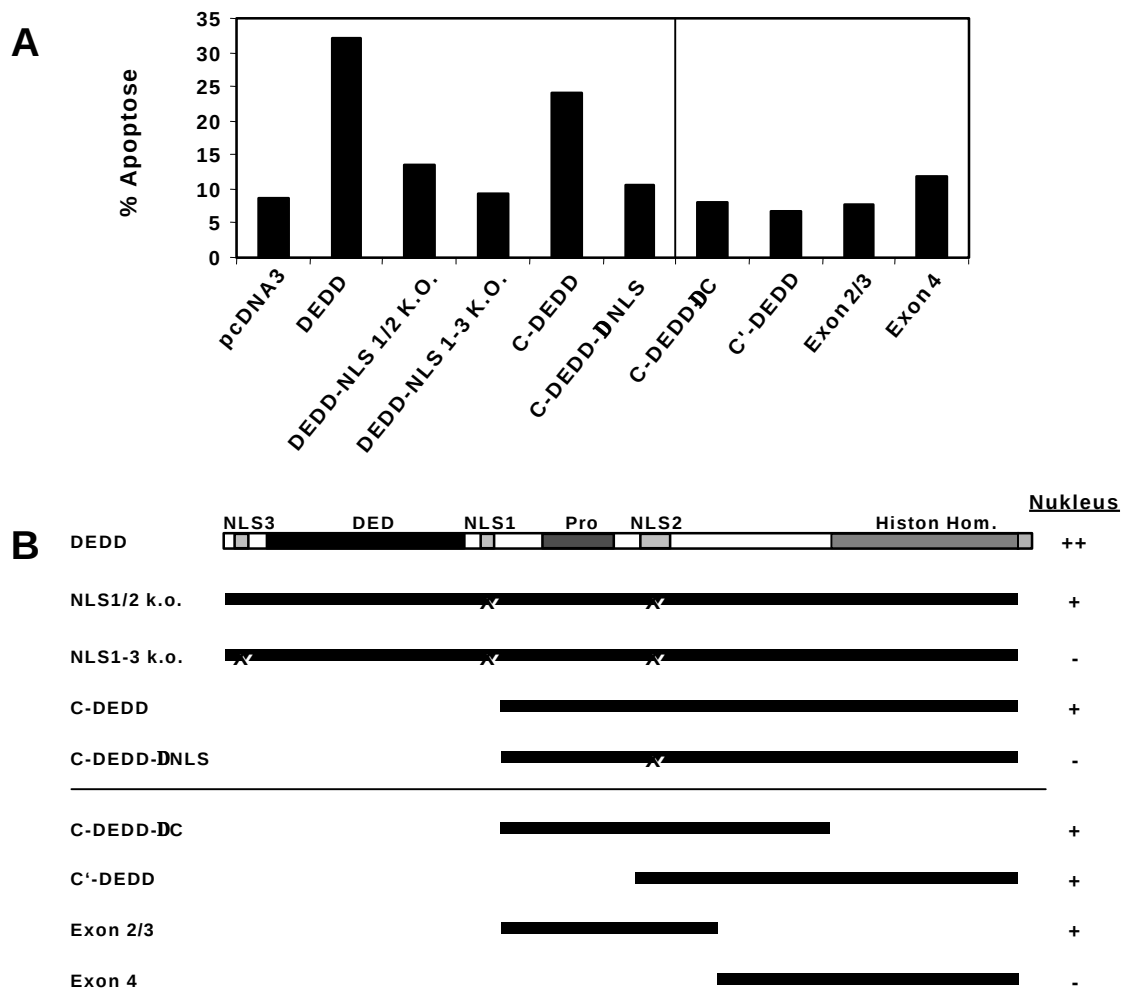


Abbildung 3.03: DEDD benötigt eine nukleare Lokalisation, um proapoptotisch zu wirken. **(A)** Cytotoxizität verschiedener DEDD-Mutanten. 40% konfluente 293T-Zellen in 6-Well-Schalen wurden mit 3 µg DNA transient transfiziert. 36 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Apoptose-Induktion anhand der DNA-Fragmentierung quantifiziert (Nicoletti et al., 1991). Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. **(B)** Schematische Darstellung der in (A) transfizierten Konstrukte. Rechts ist die Kernlokalisation des betreffenden Konstruktes angezeigt, die durch Immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen und subzelluläre Fraktionierung transient transfizierter Zellen bestimmt wurde (siehe Abschnitt 3.02 und Daten nicht gezeigt): ++ ausschließlich im Kern, + Kern und Cytoplasma, - ausschließlich im Cytoplasma.

Einen ähnlichen Effekt hatte die Mutation von NLS2 in C-DEDD. Wie bereits beschrieben wurde, besitzt C-DEDD eine eigene proapoptotische Wirkung, die offensichtlich unabhängig von

der DED ist (Stegh et al., 1998). Die Apoptose-Induktion von C-DEDD war jedoch ebenfalls aufgehoben, wenn das Konstrukt aufgrund einer Mutation des NLS2 rein cytoplasmatisch vorlag (Abb. 3.03 und Daten nicht gezeigt). Beide Ergebnisse deuten darauf hin, daß DEDD im Kern Apoptose auslöst. Interessanterweise scheint der gesamte Bereich von C-DEDD für dessen DED-unabhängige proapoptotische Wirkung nötig zu sein, da die verkürzten C-DEDD Mutanten C-DEDD- C und C'-DEDD, sowie Exon 2/3 und Exon 4 im selben System keine Apoptose auslösten (Abb. 3.03).

Die cytotoxische Wirkung von DED-Proteinen wurde bisher nur im Cytoplasma untersucht. Ein DED-Protein, das nach Überexpression im Kern Apoptose auslöst, war bisher noch nicht bekannt. Die proapoptotische Wirkung von DEDD nimmt somit eine Sonderstellung ein, da sie die nukleare Lokalisation benötigt.

3.04 Die Apoptose-Induktion von DEDD basiert auf einer funktionellen DED

Die meisten bekannten DED-interagierenden Proteine befinden sich im Cytoplasma. Da DEDD eine nukleare Lokalisation benötigt, um proapoptotisch zu wirken, war unklar, ob tatsächlich eine funktionelle DED für die Apoptose-Induktion verantwortlich ist. Vor kurzem wurde die NMR-Struktur der DED von FADD beschrieben (Eberstadt et al., 1998). Ähnlich der Todesdomäne (death domain, DD), der Caspasen-Rekrutierungsdomäne (CARD), sowie der Pyrin-Domäne besteht die DED aus sechs amphipatischen α -Helices. Es konnte gezeigt werden, daß ein hoch konservierter Phenylalanin-Rest in der DED (Phe-25) kritisch für die Bindung der FADD-DED an die erste DED von Caspase-8 ist. Dieser Phenylalanin-Rest liegt in einer von zwei

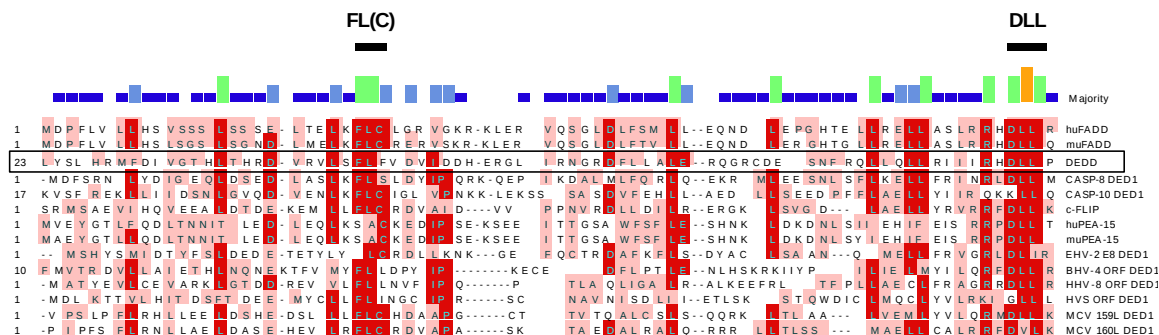


Abbildung 3.04a: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener Todeseffektordomänen (DED). Konservierte Aminosäuren wurden je nach Grad der Konservierung dunkelrot (identische Aminosäure) oder hellrot (konservativer Aminosäuren-Austausch) unterlegt. Wie häufig die Aminosäuren in den DED konserviert ist, wird durch farbige Rechtecke oberhalb der Sequenzen angezeigt: Dunkelblau = selten, hellblau = manchmal, grün = häufig, orange = fast immer. Die schwarzen Balken markieren die beiden funktionell wichtigen lipophilen Taschen mit den konservierten Aminosäuren Motiven.

funktionell wichtigen und in allen bekannten DED konservierten lipophilen Tasche (FL(C)-Motiv) und korrespondiert mit Phe-47 in der DED von DEDD (Abb. 3.04a). Die zweite lipophile Tasche, die ebenfalls zwischen verschiedenen Mitglieder der DED-Proteinfamilie hoch konserviert ist, befindet sich am Ende der DED (DLL-Motiv).

Um den Einfluß der DED auf die proapoptotische Wirkung und auch die Lokalisation von DEDD zu untersuchen, sollte eine DEDD-Mutante mit einer funktionslosen DED generiert werden. Dazu wurde, analog zu den Untersuchungen der FADD-DED (Eberstadt et al, 1998), der innerhalb der Familie der DED-Proteine hochkonservierte Aminosäure-Rest Phe-47 durch Tyrosin oder Glyzin ersetzt. Bei einer weiteren Mutante wurden die ebenfalls konservierten Leuzin-Reste des DLL-Motivs in der zweiten lipophilen Tasche (AS 97/98) durch Glyzin ersetzt.

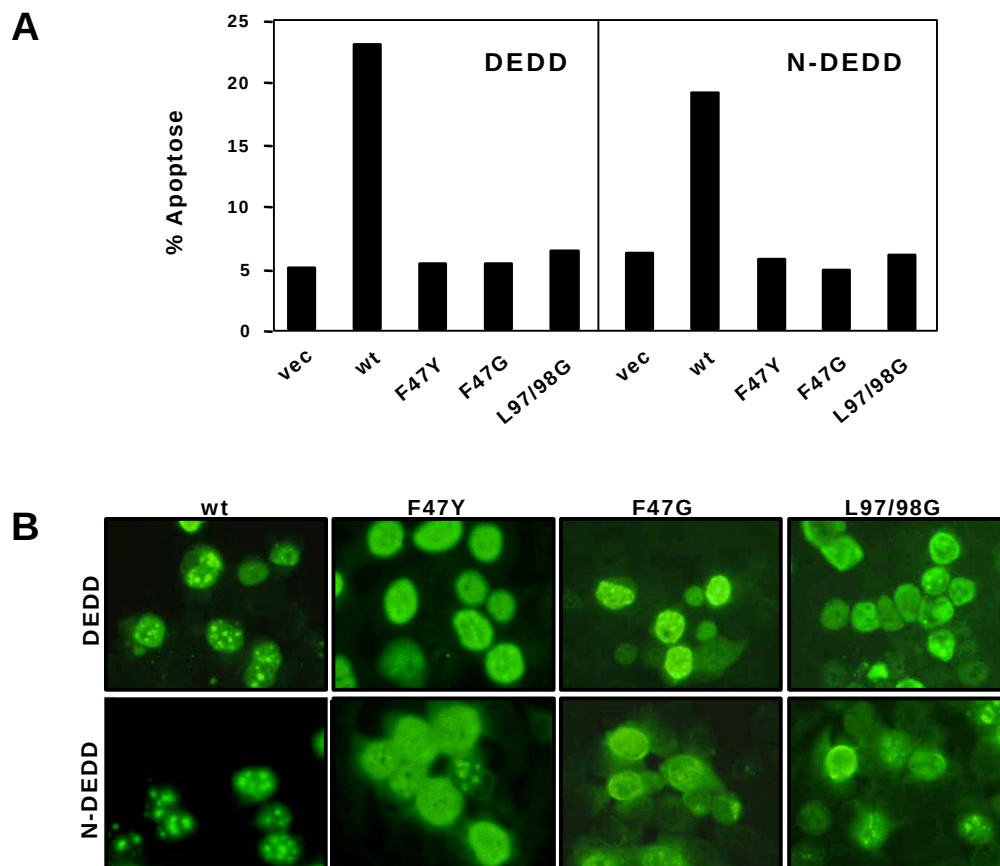


Abbildung 3.04b: Die Apoptose-Induktion von DEDD basiert auf einer funktionellen DED. **(A)** Cytotoxizität verschiedener DEDD-Mutanten. 40% konfluente 293T-Zellen in 6-Well-Schalen wurden mit 3 µg DNA transient transfiziert. 36 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Apoptose-Induktion anhand der DNA-Fragmentierung quantifiziert. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. **(B)** Lokalisation der DED-Mutanten in transient transfizierten 293T Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die mit einem FLAG-Markerpeptid versehenen Domänen durch einen anti-FLAG Antikörper Immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

Die so geschaffenen Mutanten wurden transient in 293T Zellen exprimiert und ihre Cytotoxizität anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt. Alle drei Mutationen führten dazu, daß sowohl DEDD als auch N-DEDD nicht mehr in der Lage waren, Apoptose zu induzieren (Abb. 3.04b (A)).

Für seine proapoptotische Wirkung benötigt DEDD demnach nicht nur die Lokalisation im Kern, sondern auch eine funktionelle DED. Zusätzlich lokalisierte keine der DED-Mutanten mehr in den subnuklearen Strukturen, in denen sich DEDD oder N-DEDD normalerweise anreichern (Abb. 3.04b (B)). Die N-DEDD-Mutanten zeigten sogar eine schwache cytoplasmatische Färbung, was darauf hindeutet, daß eine funktionelle DED nicht nur für die Apoptose-Induktion und die Lokalisation in den Nukleoli-artigen Unterstrukturen verantwortlich ist, sondern eventuell auch eine Rolle bei der Retention des Proteins im Nukleus spielt.

3.05 DEDD aktiviert mit Hilfe seiner DED Caspase-6 im Nukleus

Die Überexpression von Mitgliedern der DED-Proteinfamilie in 293T Zellen führt zur Induktion von Apoptose. Auch DEDD besitzt in diesem Zusammenhang eine proapoptotische Wirkung, die Caspasen-abhängig ist (Stegh et al., 1998). Da sich transient transfiziertes DEDD im Gegensatz zu FADD im Nukleus anreichert, stellte sich die Frage, welche Caspasen von beiden Proteinen aktiviert werden und in welchen Kompartimenten diese Aktivierung stattfindet. Mit Hilfe von Caspase-spezifischen fluorogenen Substraten sollten daher Caspasen-Profile für die cytotoxische Aktivität von FADD und DEDD erstellt werden (siehe Material und Methoden). Aufgrund der nuklearen Lokalisation von DEDD wurden cytoplasmatische und nukleare Fraktion der transfizierten 293T Zellen getrennt voneinander untersucht.

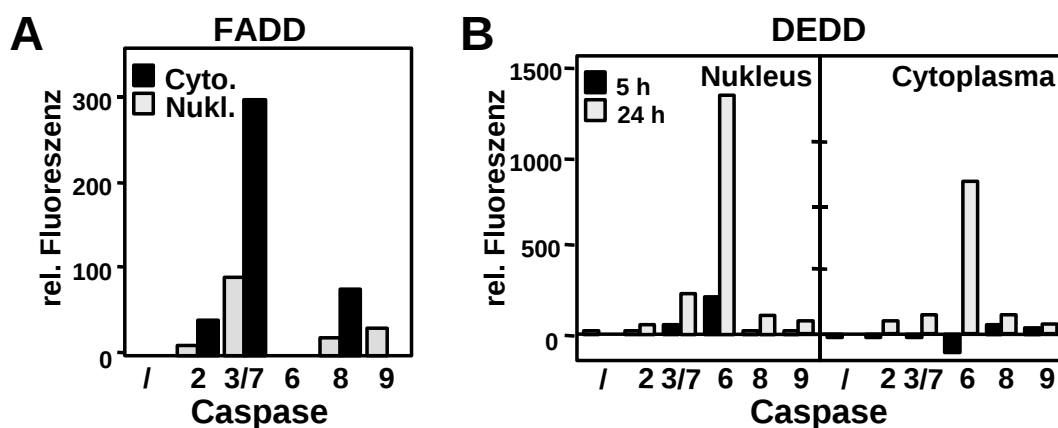


Abbildung 3.05a: DEDD aktiviert Caspase-6 im Nukleus. (A), (B) Caspasen-Aktivität im Cytosol und der nuklearen Fraktion von mit FADD (A) bzw. DEDD (B) transient transfizierter 293T Zellen. Die Zellen wurden mit je 9 µg DNA pro Zellkulturschale transfiziert, Kernfraktion und Cytosol voneinander getrennt und die Aktivität der Caspasen mit Hilfe von spezifischen fluorogenen Peptidsubstraten fluorimetrisch bestimmt.

Die Überexpression von FADD resultierte in der Aktivierung von Caspase-3 und zu einem geringeren Grad in der Aktivierung von Caspase-8. Beide Aktivitäten wurden hauptsächlich im Cytoplasma gefunden (Abb. 3.05a). Im Gegensatz dazu führte die Expression von DEDD zu einer VEID-spaltenden Aktivität, die eine Aktivierung von Caspase-6 widerspiegelt (Abb. 3.05a). Interessanterweise wurde die Aktivierung von Caspase-6 zuerst im Zellkern (5 h nach Transfektion) und erst später im Cytoplasma (24 h nach Transfektion) beobachtet. Dies deutet an, daß während der Apoptose-Induktion durch DEDD zuerst Caspase-6 im Nukleus aktiviert wird. Andere Caspasen, wie Caspase-8 oder 9, wurden erst 48 h nach Transfektion aktiviert (Daten nicht gezeigt), was auf eine sekundäre Aktivierung schließen läßt.

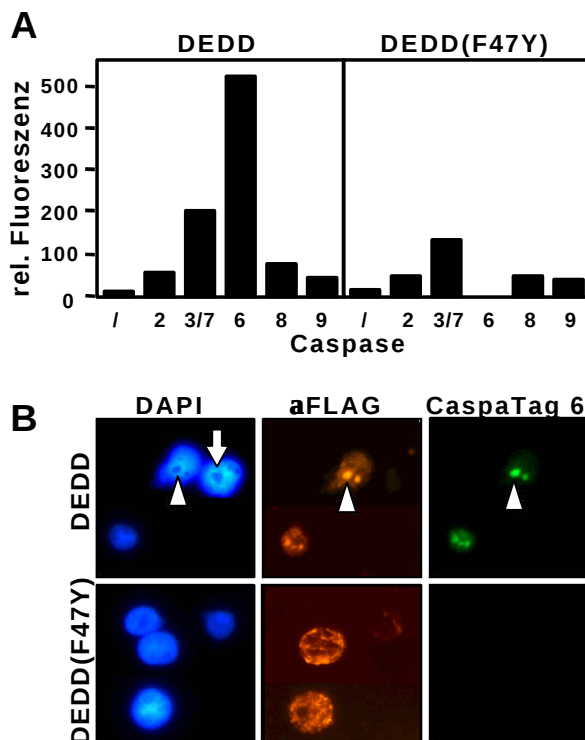


Abbildung 3.05b: DEDD benötigt eine funktionelle DED um Caspase-6 im Nukleus zu aktivieren. **(A)** Caspasen-Aktivität in DEDD bzw. DEDD(F47Y) transient transfizierter 293T Zellen. Die Zellen wurden mit je 9 µg DNA pro Zellkulturschale transfiziert und die Aktivität der Caspasen mit Hilfe von spezifischen fluorogenen Peptidsubstraten fluorimetrisch bestimmt. **(B)** 293T Zellen wurden mit C-terminal FLAG-markiertem DEDD oder DEDD(F47Y) transfiziert, 24 h nach Transfektion 1 h mit dem Fluorochrom-markierten Caspase-6 Inhibitor CaspaTag 6 inkubiert und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden mit DAPI (DNA, blau) und anti-FLAG (transfiziertes Protein, grün) gefärbt. Aktive Caspase-6 (CaspaTag 6) ist rot markiert. Pfeil: Nukleolus in untransfizierter Zelle Pfeilspitze: Nukleolus in transfizierter Zelle.

Um zu testen, ob eine funktionelle DED in DEDD für die Aktivierung von nuklearer Caspase-6 nötig ist, wurden sowohl DEDD, als auch die DEDD(F47Y)-Mutante in 293T Zellen exprimiert und die Aktivität verschiedener Caspasen bestimmt. Mit der DED-Mutante wurde dabei keine Aktivierung von Caspase-6 oder einer anderen Caspase gefunden (Abb. 3.05b (A)). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß die cytotoxische Aktivität DEDDs von seiner DED ausgeht (siehe Abschnitt 3.04).

Die Aktivierung von Caspase-6 nach Expression von DEDD ließ sich mit Hilfe eines Membran-permeablen, Fluorochrom-markierten und Caspase-6-spezifischen Peptid-Inhibitors (CaspaTag 6, Bedner et al., 2000) auch direkt in einzelnen, transfizierten Zellen zeigen. DEDD, das Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen wurde, reichte sich, wie bereits beschrieben, in

subnuklearen Strukturen an, die den nukleolaren Strukturen untransfizierter Zellen ähnlich sind. Nur in Zellen, in denen DEDD in nukleolaren Strukturen zu finden war, wurde aufgrund der Spaltung des Substrates eine Caspase-6 Aktivität beobachtet (Abb. 3.05b (B)). Keine mit DEDD(F47Y) transfizierte Zelle zeigte eine Caspase-6 Aktivierung. DEDD scheint demnach eine funktionelle DED zu benötigen, um Caspase-6 im Nukleus, bzw. in Nukleoli zu aktivieren.

3.06 DEDD interagiert über seine DED mit DEDAF

DEDD transloziert mit Hilfe seiner NLS in den Kern und aktiviert dort mit einer funktionellen DED Caspase-6. Da die DED eine Protein/Protein-Interaktionsdomäne ist, wurde angenommen, daß im Kern ein DED-bindendes Protein existiert, das mit DEDD interagiert. Ein vielversprechender Kandidat wurde vor kurzem in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Lenardo (NIH, Washington), mit Hilfe des „yeast two-hybrid“-Systems und unter Verwendung der ersten DED der Caspase-10 als Köder, identifiziert (Zheng et al., 2001). Das 227 AS lange Zink-Finger-Protein, das mit einer Reihe von DED-Proteinen interagiert und keine eigene DED besitzt, wurde DEDAF („Death Effector Domain Associated Factor“) genannt. Das zu DEDAF homologe Maus-Protein RYBP („Ring1 and YY1 Binding Protein“) war bereits bekannt und wurde als Transkriptionsrepressor von *Polycomb* Genen (PcG) beschrieben (Garcia et al., 1999). Murines und humanes DEDAF sind 98.7% identisch und sind damit ebenso stark konserviert wie murines und humanes DEDD. Ähnlich wie DEDD befindet sich überexprimiertes DEDAF ausschließlich im Nukleus, während stabil transfiziertes und damit der physiologischen Menge eher entsprechendes DEDAF hauptsächlich im Cytoplasma vorliegt (Daten nicht gezeigt). Diese Eigenschaften machten DEDAF zu einem potentiellen Interaktionspartner von DEDD.

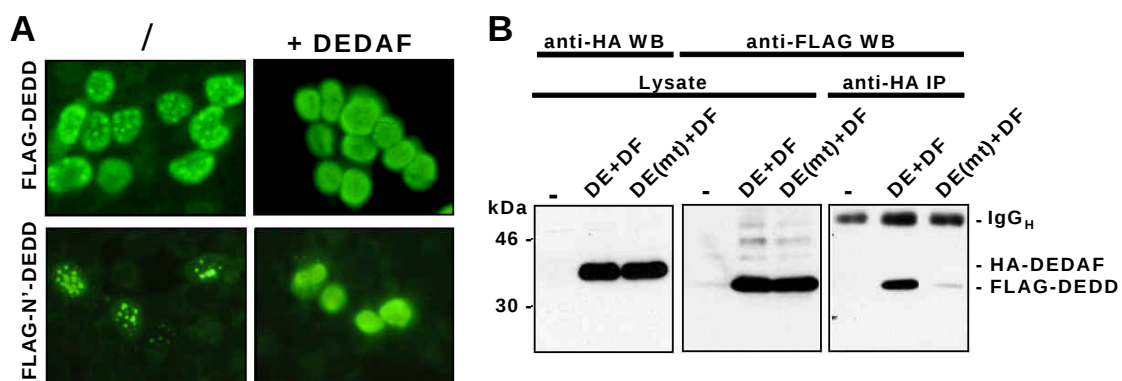


Abbildung 3.06a: DEDD interagiert über seine DED mit DEDAF. **(A)** FLAG-markiertes DEDD bzw. N'-DEDD wurde in 293T Zellen mit DEDAF koexprimiert und die Lokalisation der DEDD-Mutanten mit Hilfe eines anti-FLAG Antikörpers Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen. **(B)** Kotransfektion von HA-DEDAF und FLAG-markiertem DEDD bzw. DEDD(F47Y) in 293T Zellen. Die für Western Blot-Analyse und Immunpräzipitation (IP) verwendeten Antikörper sind angegeben. IgG_H, schwere γ -Immunglobulin-Kette (IgG "heavy chain"). WB, Western Blot-Analyse. IP, Immunpräzipitation.

Um zu testen, ob DEDD und DEDAF tatsächlich miteinander interagieren, sollten beide Proteine gemeinsam in 293T Zellen exprimiert werden, wo sie sich im gleichen nuklearen Kompartiment anreichern. Koexpression von DEDD und DEDAF in 293T Zellen führte dazu, daß DEDD sich nicht, wie bereits beschrieben, in Nukleoli-ähnlichen subnuklearen Strukturen anreicherte, sondern diffus im Nukleoplasma verteilt vorlag. Dieser Effekt war sogar noch ausgeprägter, wenn N'-DEDD (NLS3 und DED) mit DEDAF koexprimiert wurde (Abb. 3.06a (A)). Diese Veränderungen in der Lokalisation deuten eine nukleare Interaktion zwischen DEDD und DEDAF im Bereich der DED an. Um zu prüfen, ob diese Interaktion eine funktionelle DED benötigt, wurde DEDAF zusammen mit DEDD bzw. DEDD(F47Y) in 293T Zellen exprimiert und anschließend immunpräzipitiert. Die verwendeten Konstrukte codierten HA-markiertes DEDAF, bzw. FLAG-markierte DEDD-Mutanten, die mit anti-HA bzw. anti-FLAG Antikörpern immunpräzipitiert und nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.06a (B) und Daten nicht gezeigt). Durch die Immunpräzipitationen ließ sich eine direkte Interaktion von DEDAF und DEDD nachweisen, die durch die Mutation der DED in DEDD(F47Y) sehr stark reduziert wurde (Abb. 3.06 (B)). Folglich interagiert DEDD über seine DED direkt mit DEDAF.

Lixin Zheng in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Lenardo bestimmte mit Hilfe einer Reihe von DEDAF-Deletionsmutanten den Bereich, mit dem DEDAF mit der ersten DED der Capase-10 interagiert (Zheng, et al., 2001). Die so identifizierte DED-Bindungsregion liegt in der Mitte des

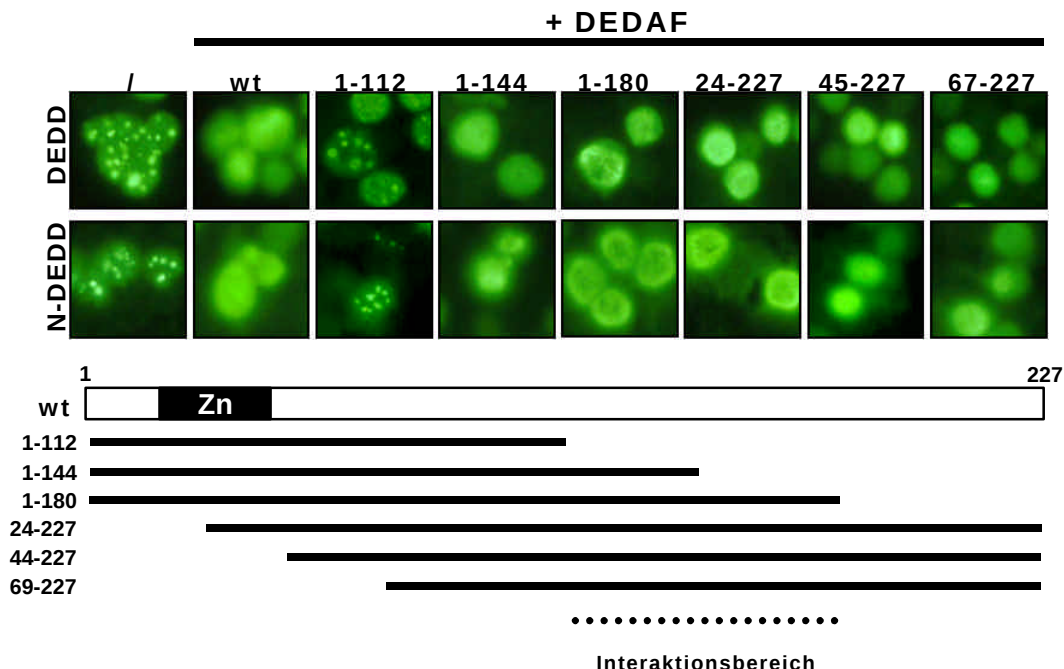


Abbildung 3.06b: Kartierung des DEDD-Interaktionsbereiches in DEDAF. FLAG-markiertes DEDD bzw. N-DEDD wurde in 293T Zellen mit verschiedenen DEDAF-Deletionsmutanten koexprimiert und die Lokalisation der DEDD-Mutanten mit Hilfe eines anti-FLAG Antikörpers Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen. Die Zahlen geben jeweils den Aminosäuren-Bereich des vollständigen DEDAF-Proteins an, den eine Deletionsmutante beinhaltet.

Proteins zwischen den Aminosäuren (AS) 66 und 180. Diese Deletionsmutanten wurden nun verwendet, um den Interaktionsbereich von DEDAF mit DEDD einzugrenzen. Die verschiedenen Mutanten wurden jeweils mit DEDD bzw. N-DEDD koexprimiert, deren Lokalisation (subnukleare Strukturen oder Nukleoplasma) anzeigte, ob eine Interaktion statt fand (Abb. 3.06b). Der auf diese Weise identifizierte Interaktions-Bereich liegt zwischen AS 112 und 180, was auf eine generelle DED-Interaktionsdomäne in der Mitte von DEDAF schließen läßt.

3.07 Endogenes DEDD befindet sich im Cytoplasma und im Nukleus

Im Verlauf der ersten Charakterisierung des Proteins fanden wir, daß DEDD in einer Reihe von Tumor-Zelllinien im Cytoplasma exprimiert wird (Stegh et al., 1998). In 293T Zellen überexprimiertes DEDD befindet sich jedoch fast ausschließlich im Nukleus. Der ursprünglich verwendete polyklonale Kaninchen-Antikörper anti-DEDD1, der gegen ein Peptid in der Prolin-reichen Region von DEDD gerichtet ist (Schema in Abb. 3.07a), besitzt eine hohe Sensitivität in der Western Blot-Analyse, ermöglichte es aber nicht, endogenes DEDD in Immunfluoreszenz-

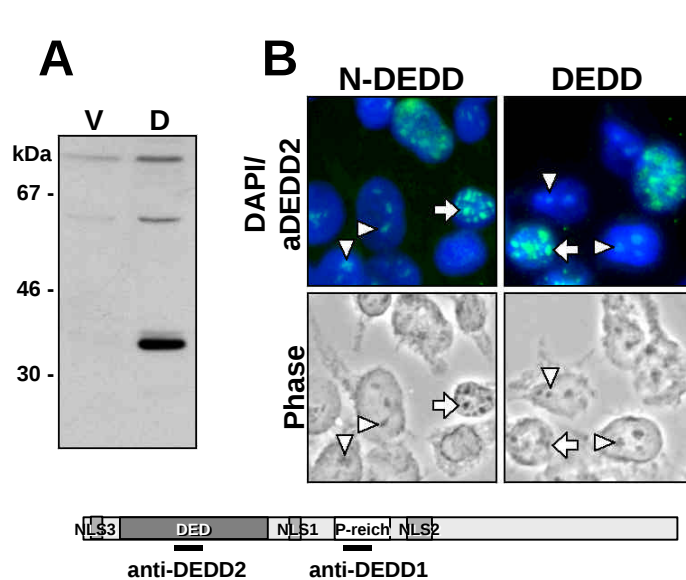


Abbildung 3.07a: Der polyklonale Antikörper anti-DEDD2 erkennt transfiziertes und endogenes DEDD. **(A)** Western Blot-Analyse von Zellextrakten aus pcDNA3- (V) bzw. DEDD- (D) transfizierten 293T Zellen, die mit anti-DEDD2 analysiert wurde. **(B)** Detektion von überexprimiertem N-DEDD und DEDD in Nukleoli-artigen Strukturen in transient transfizierten 293T Zellen. Die Pfeile zeigen auf stark DEDD/N-DEDD-positive Strukturen im Kern transfizierter Zellen. Die Pfeilspitzen zeigen auf endogenes DEDD in Nukleoli untransfizierter Zellen. Phase-contrast-Aufnahmen. Das Schema zeigt die Lokalisation der Peptide (schwarze Balken) an, die verwendet wurden, um anti-DEDD1 (Prolin-reiche Region) und anti-DEDD-2 (DED) zu generieren.

Experimenten nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Um endogenes DEDD auch Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachweisen zu können, wurde ein neuer polyklonaler Kaninchen-Antikörper (anti-DEDD2) erzeugt. Dieser Antikörper, der gegen ein Peptid in der DED von DEDD gerichtet ist (siehe Schema in Abb. 3.07a), erkannte in der Western Blot-Analyse im Lysat von transfizierten 293T-Zellen die selbe 37 kDa Bande wie anti-DEDD1 (Abb. 3.07a (A)). Er detektierte auch transient transfiziertes DEDD und N-DEDD in Immunfluoreszenz-Analysen (Abb. 3.07a (B)). Zusätzlich zum transient transfizierten DEDD detektierte anti-DEDD2 jedoch auch endogenes DEDD, das in

untransfizierten 293T Zellen in subnuklearen Strukturen nachgewiesen wurde (Pfeilspitzen in Abb. 3.07a (B)).

Um zu untersuchen, ob der Nachweis des endogenen Proteins durch anti-DEDD2 spezifisch ist, sollte die Bindung des Antikörpers durch das Peptid, gegen das er ursprünglich gerichtet wurde, kompetitiert werden. Es zeigte sich, daß der Nachweis spezifisch ist, da er sich durch das Peptid kompetitieren ließ (Abb. 3.07b (A)). Die Detektion von nuklearem DEDD ist zudem unabhängig von der gefärbten Zelllinie, da die selben Strukturen auch in den Zellkernen von HeLa, Ntera-2 und MCF7 Zellen nachgewiesen wurden (Abb. 3.07b (B) und Daten nicht gezeigt). Da sich in manchen Zelllinien Teile des endogenen DEDDs offensichtlich im Zellkern befinden, wurde erneut untersucht, ob sich endogenes DEDD generell im Nukleus verschiedener Zellen nachweisen läßt. Dazu wurden Jurkat-, BJAB- und HeLa-Zellen subzellulär fraktioniert und DEDD mit Hilfe der Western Blot-Analyse mit anti-DEDD1 nachgewiesen.

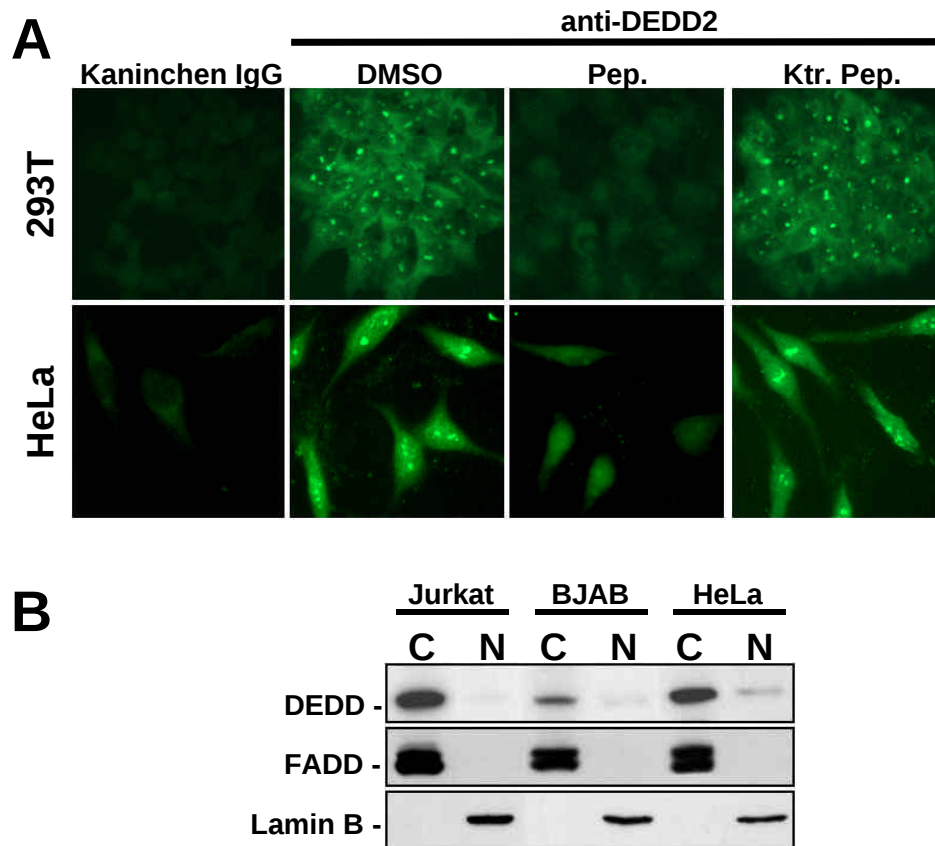


Abbildung 3.07b: DEDD wird im Cytosol und im Nukleus exprimiert. **(A)** Indirekte Immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse von fixierten 293T und HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit anti-DEDD2 oder zur Kontrolle mit Kaninchen-IgG (rabbit IgG, rb IgG) gefärbt. Die Färbung durch den Antikörper erfolgte entweder in der Gegenwart von 1% DMSO, 10 µM DEDD2-Peptid (Pep.) oder einem nicht verwandten Kontrollpeptid (Ktr. Pep.). **(B)** Western Blot-Analyse von DEDD in subzellulären Fraktionen von Jurkat, BJAB und HeLa Zellen. C, Cytosol; N, Nukleus. Verschiedene Teile der selben Membran wurden mit anti-DEDD1, anti-FADD oder anti-Lamin B entwickelt.

In Übereinstimmung mit unseren ursprünglichen Beobachtungen (Stegh et al., 1998), konnte DEDD in der nuklearen Fraktion von Jurkat T-Zellen nur nach sehr langer Exposition nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Kerne von BJAB-Zellen enthielten eine sehr geringe Menge DEDD (Abb. 3.07b (B)) und zeigten übereinstimmend dazu auch eine schwache Kernfärbung in der Immunfluoreszenz-Analyse mit anti-DEDD2 (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls eine kleine, aber signifikante Menge endogenen DEDDs wurde in der Kernfraktion von HeLa-Zellen gefunden (Abb. 3.07b (B)). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine kleine Menge von DEDD im Kern aller getesteten Zellen nachgewiesen wurde.

3.08 Nukleares DEDD befindet sich in Nukleoli

Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen von Zellen mit Hilfe des neuen polyklonalen Antikörpers anti-DEDD2 zeigten, daß endogenes DEDD sich sowohl im Cytoplasma, als auch in signifikanten Mengen in subnuklearen Strukturen befindet. Da das Epitop, das durch anti-DEDD2 erkannt wird, im Cytoplasma nicht zugänglich ist, es sei denn die Zellen werden apoptotisch (siehe Kapitel 3.10), besteht eine Diskrepanz zwischen den Mengen an DEDD, die in Nukleus und Cytoplasma durch Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen detektiert werden. Um die DEDD-positiven subnuklearen Strukturen zu identifizieren, wurden fixierte HeLa Zellen einer Doppelfärbung mit einem kommerziell-erhältlichen anti-Nukleolus Antikörper und anti-DEDD2 unterzogen. Dabei wurde nukleares DEDD hauptsächlich in den Nukleoli gefunden (Abb. 3.08a (A)). Dies

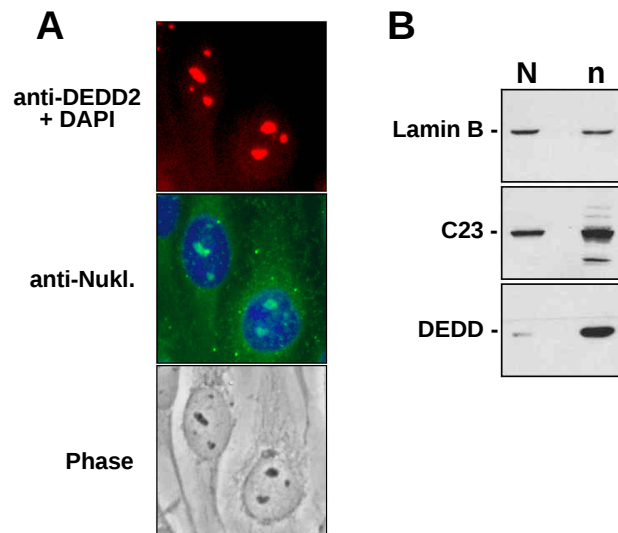


Abbildung 3.08a: Endogenes nukleares DEDD befindet sich in Nukleoli. **(A)** Doppelfärbung von DEDD und Nukleoli mit anti-DEDD2 und einem anti-Nukleoli Antikörper. Die Proteine wurden mit einem TRITC-konjugierten anti-Maus-IgG Ziegen-Antikörper (anti-Nukl., rot) und einem FITC-konjugierten anti-Kaninchen-IgG Antikörper (anti-DEDD, grün) sichtbar gemacht. DNA wurde mit Hilfe von DAPI (blau) gefärbt. Phase, Phasenkontrast-Aufnahme. **(B)** Aus HeLa-Extrakten wurden Nuklei (N) isoliert, aus denen anschließend Nukleoli (n) angereichert wurden. 10 µg der nuklearen bzw. 50 µg der nukleolaren Fraktion wurde im Western Blot-Verfahren mit Hilfe eines anti-Lamin B, eines anti-C23/Nukleolin und des anti-DEDD1 Antikörpers analysiert. Lamin B, C23 und DEDD migrierten entsprechend ihrer Größe bei 70, 100 und 37 kDa.

bestätigt die ursprüngliche Identifikation von DEDD als nukleolares Protein, die durch Doppelfärbungen von DEDD mit den nukleolaren Proteinen PARP, Topoisomerase I und B23 noch zusätzlich unterstützt wurde (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Bestätigung, und um herauszufinden, ob nukleolares DEDD die selbe Größe wie cytoplasmatisches hat, wurde eine mit Nukleoli angereicherte Fraktion aus HeLa Zellen isoliert und im Western Blot-Verfahren mit anti-DEDD1 analysiert (Abb. 3.08a (B)). Die Isolierung von Nukleoli führte zu einer spezifischen Anreicherung des nukleolaren Proteins C23/Nukleolin. Für Lamin B, das nicht in Nukleoli enthalten ist, wurde keine Anreicherung gefunden. Obwohl fünfmal mehr Protein der nukleolaren Fraktion analysiert wurde, war die Menge an detektiertem Lamin B leicht geringer als in der Fraktion mit intakten Nuklei. Im Gegensatz dazu war das 37 kDa lange DEDD-Protein in der nukleolaren Fraktion sogar noch stärker angereichert, als C23. Diese Ergebnisse etablieren DEDD als nukleolares Protein *in vivo*.

Im Verlauf der Zellteilung kann man zwei Arten von nukleolaren Proteinen unterscheiden: Jene Proteine, die auch während der Mitose mit den nukleolaren Organisationsregionen (NOR) auf der DNA verbunden bleiben (z.B. Teile der Polymerase I-Transkriptionsmaschinerie; Roussel et al., 1996) und als Ausgangspunkt für eine Neubildung der Nukleoli dienen und diejenigen, die die NOR verlassen und erst während der Neubildung zurückkehren. Um zu verstehen, wie stark die Assoziation von DEDD mit den Nukleoli ist, wurden fixierte und mit anti-DEDD2 gefärbte HeLa Zellen in verschiedenen Stadien der Zellteilung untersucht. Trotz der starken DNA-Bindung, die DEDD *in vitro* zeigt (Stegh et al., 1998), blieb das Protein im Verlauf der Mitose nicht mit der DNA verbunden, sondern änderte seine Lokalisation (Abb. 3.08b): Als sich im Rahmen der Metaphase Nukleoli und Zellkern auflösten, tauchte es zunächst im perichromosomalen Bereich

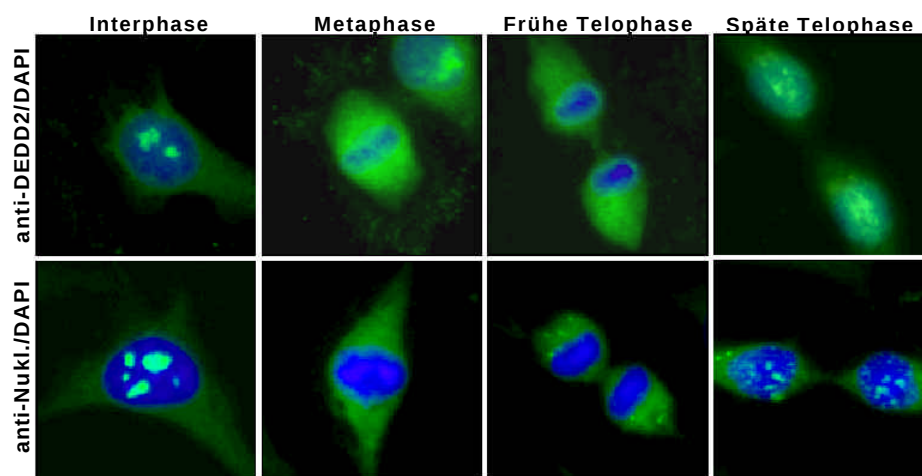


Abbildung 3.08b: Nukleolares DEDD verläßt während der Zellteilung den Nukleus. Immunfluoreszenz-Analysen von DEDD (A) und Nukleoli (B) in verschiedenen Stadien der Zellteilung von HeLa Zellen mit Hilfe von anti-DEDD2 und anti-Nukleoli. DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

auf, verteilte sich dann aber bis zum Beginn der Telophase im gesamten Cytoplasma. Erst als sich in der späten Telophase Zellkern und Nukleoli erneut bildeten, kehrte DEDD zu den Nukleoli zurück. DEDD ist demnach wahrscheinlich für die Neubildung der Nukleoli nicht essentiell.

3.09 DEDD inhibiert spezifisch Polymerase I-abhängige Transkription

Wie bereits gezeigt wurde, hat rekombinantes GST-DEDD die Fähigkeit, die Transkription eines Mini-rDNA Gens *in vitro* zu inhibieren (Stegh et al., 1998). Dieses experimentelle System ermöglicht jedoch keine Aussage über die Spezifität einer DEDD-vermittelten Polymerase I (Pol I)-abhängigen Transkriptions-Inhibition. Um die Auswirkungen von DEDD auf die rDNA-Transkription *in vivo* zu testen, wurden 293T Zellen mit DEDD transfiziert, 24 Stunden später permeabilisiert und eine Transkriptionsanalyse in lebenden Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.36). Dabei wurde neusynthetisierte RNA durch den Einbau von BrUTP markiert, welches mit einem kreuzreaktiven anti-BrdU Antikörper nachgewiesen wurde. Solange die RNA Polymerase II (Pol II)-abhängige Transkription durch Zugabe des Pol II-Inhibitors α -Amanitin blockiert war,

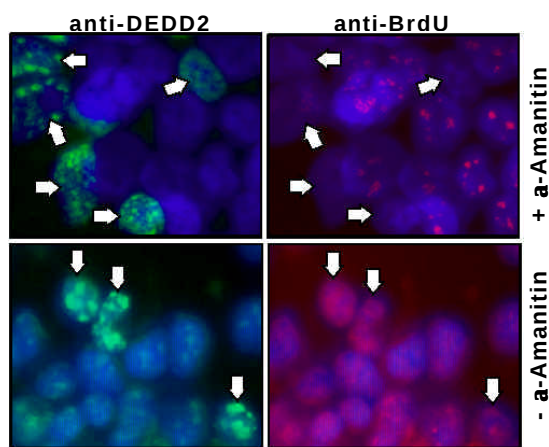


Abbildung 3.09a: DEDD inhibiert spezifisch Polymerase I-abhängige Transkription. 293T Zellen wurden mit DEDD transient transfiziert und in der Gegenwart von 50 μ M zVAD-fmk kultiviert, um Effekte der Caspasen-Aktivierung auszuschließen. 24 h nach Transfektion wurde die Transkriptionsaktivität in den Zellen durch 30 minütigen Einbau von BrUTP in Gegenwart (oben) und Abwesenheit von α -Amanitin (unten) bestimmt. Die Zellen wurden mit anti-DEDD2 (grün) und anti-BrdU (rot, kreuzreaktiv mit BrUTP) doppelt gefärbt. DNA wurde durch DAPI sichtbar gemacht. Pfeile zeigen Zellen an, die exogene Mengen an DEDD exprimieren.

wurde BrUTP nur im Bereich der Nukleoli (dem Ort der rDNA-Transkription) eingebaut und lokalisierte dort gemeinsam mit endogenem DEDD. In Zellen, deren Kerne aufgrund der Transfektion große Mengen an DEDD enthielten, war der Einbau von BrUTP, und somit die Transkription der rDNA, vollständig inhibiert (Abb. 3.09a). Ohne α -Amanitin wurde aufgrund der Pol II-abhängigen Transkription im gesamten Nukleus BrUTP-Einbau nachgewiesen, was von der Transfektion mit DEDD unbeeinflusst blieb. Alle Experimente wurden in Gegenwart des Polycaspasen-Inhibitors zVAD-fmk wiederholt. Auch in Gegenwart von zVAD-fmk inhibierte DEDD die Pol I-abhängige Transkription in den Nukleoli. Dies bedeutet, daß DEDD als spezifischer Pol I-Inhibitor wirken kann, und daß diese Aktivität unabhängig von einer Caspasen-Aktivierung und somit nicht einfach Folge der Apoptose-Induktion ist.

DEDD bindet DNA mit hoher Affinität (Stegh et al., 1998). Wir konnten zeigen, daß DEDD eine Reihe von Funktionen besitzt, die im Zellkern eine Rolle spielen und von einer funktionellen DED abhängig sind: Proapoptotische Wirkung, Anreicherung in Nukleoli, Aktivierung von Caspase-6 und Interaktion mit DEDAF. Daher sollte mit Hilfe von N-DEDD (N-terminaler Bereich mit NLS3, DED und NLS2; entspricht Exon 1) untersucht werden, ob die DED auch an der DNA-Bindung des Proteins beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes His-N-DEDD (N-DEDD mit N-terminalem 6-Histidin-Markerpeptid) hergestellt (siehe Abschnitt 2.21) und zunächst in einem DNA-Bindungsassay mit verschiedenen λ -DNA Fragmenten eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß N-DEDD DNA in fast den gleichen Konzentrationen wie das vollständige DEDD-Protein (Stegh et al., 1998) bindet (Abb. 3.09b (A)). Während aber die Zugabe von DEDD zu einer Aggregation von Protein und DNA führt, die verhindert, daß der Komplex auf einem Gel aufgetrennt werden kann (Stegh et al., 1998), führt die Zugabe von N-DEDD zu einer Retardation der DNA-Fragmente im Agarosegel. Dies zeigt, daß N-DEDD zwar in der Lage ist DNA zu binden, aber keine Strukturen höherer Ordnung (Aggregate) bilden kann, wie es für das vollständige DEDD-Protein gezeigt wurde. Als Kontrolle, daß die DNA-Bindung N-DEDDs spezifisch ist, wurden His-FADD und BSA in gleichen Konzentrationen eingesetzt, ohne daß es zu einer Retardation der λ -DNA Fragmente kam (Abb. 3.09b (A)). Die DNA-Bindung ist zudem unabhängig von der DED, da His-N-DEDD (F47Y) trotz mutierter DED mit vergleichbarer Aktivität wie nicht mutiertes His-N-DEDD die DNA bindet (Abb. 3.09b (A)). Dies bestätigt, daß durch die Mutation der DED nicht die tertiäre Struktur des Proteins völlig verändert und somit jede seiner

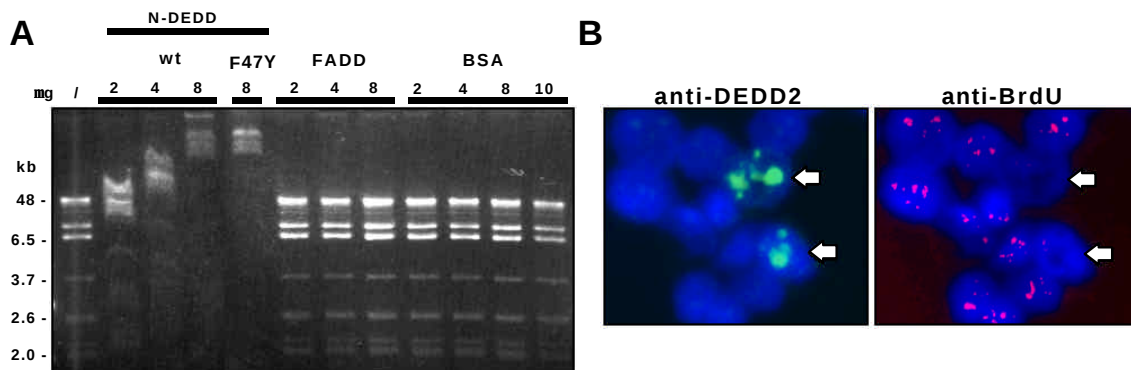


Abbildung 3.09b: Die DED von DEDD bindet DNA und inhibiert Pol I-abhängige Transkription. **(A)** 1 μ g restriktionsverdauter λ -Phagen-DNA (siehe Abschnitt 2.22) wurde 10 min mit den angegebenen Konzentrationen an His-markierten Proteinen oder BSA bei Raumtemperatur inkubiert, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid Färbung sichtbar gemacht. **(B)** 293T Zellen wurden mit N-DEDD transient transfiziert und in der Gegenwart von 50 μ M zVAD-fmk kultiviert, um Effekte der Caspasen-Aktivierung auszuschließen. 24 h nach Transfektion wurde die Transkriptionsaktivität in den Zellen durch 30 minütigen Einbau von BrUTP in der Gegenwart von α -Amanitin bestimmt. Die Zellen wurden mit anti-DEDD2 (grün) und anti-BrdU (rot, kreuzreaktiv mit BrUTP) doppelt gefärbt. DNA wurde durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Pfeile zeigen Zellen an, die exogene Mengen an DEDD exprimieren.

Funktionen gestört wird, sondern spezifisch nur die Protein/Protein-Interaktionsdomäne beeinträchtigt ist.

Als nächstes wurde untersucht, ob auch N-DEDD die Pol I-abhängige Transkription inhibieren kann. Dazu wurden 293T Zellen mit N-DEDD transfiziert und eine *in vivo*-Transkriptionsanalyse in permeabilisierten Zellen durchgeführt. Genauso wie vollständiges DEDD inhibiert N-DEDD *in vivo* in der Gegenwart von α -Amanitin die Transkription der Pol I (Abb. 3.09b (B)). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Transkriptions-Repressor Domäne von DEDD im Bereich der DED liegt. Die DED hat demnach eine Reihe von Funktion, die alle eine wichtige Rolle im Kern spielen.

3.10 DEDD bildet filamentförmige Aggregate im Cytoplasma apoptotischer Zellen

Endogenes DEDD wurde in der Western Blot-Analyse hauptsächlich im Cytosol nachgewiesen, während in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen mit Hilfe von anti-DEDD2 eine starke Färbung endogenen Proteins in Nukleoli, aber nicht im Cytoplasma zu beobachten war. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Epitop, das durch anti-DEDD2 erkannt wird, in nicht-apoptotischen Zellen unzugänglich ist. In unserer ursprünglichen Charakterisierung des Proteins stellten wir fest, daß DEDD im Verlauf der Apoptose aus einer löslichen in eine unlösliche Zell-Fraktion transloziert (Stegh et al., 1998). Um herauszufinden, ob DEDD im Verlauf der Apoptose seine Lokalisation verändert, wurde zunächst untersucht, ob in apoptotischen Zellen das Epitop des anti-DEDD2 Antikörpers zugänglich und somit cytoplasmatisches DEDD durch Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen sichtbar wird. Zu diesem Zweck wurden in HeLa-Zellen mit Hilfe von 1 μ M Staurosporine (STS) Apoptose induziert und die Zellen in einer Kinetik fixiert und mit anti-DEDD2 gefärbt.

In unbehandelten HeLa Zellen wurde DEDD in den Nukleoli nachgewiesen. Durch subzelluläre Fraktionierung und Analyse von HeLa-Extrakten war jedoch bekannt, daß sich der Großteil des Proteins im Cytoplasma befindet (siehe Abb. 3.07b). Nach einer Stunde Behandlung mit STS zeigten erste Zellen eine Filament-artige DEDD-Färbung, die von einer perinuklearen Struktur auszugehen schien (Abb. 3.10a (A)). 2 h nach Apoptose-Induktion durch STS war das Cytoplasma der apoptotischen Zellen mit einem DEDD-Filament-Netzwerk gefüllt. Interessanterweise waren die Nukleoli zu diesem Zeitpunkt, obwohl noch vollständig intakt, fast negativ für DEDD (vergl. Pfeile in den 0 und 2 h-Aufnahmen in Abb. 3.10a (A)). In der Endphase der Apoptose, in der die Nuklei fragmentierten und die Zellen sich auflösten, zerbrachen die Filamente und DEDD lokalisierte in sehr stark gefärbten granulären Strukturen, die sich zum Teil außerhalb des Zellkörpers befanden (Abb. 3.10a (A)).

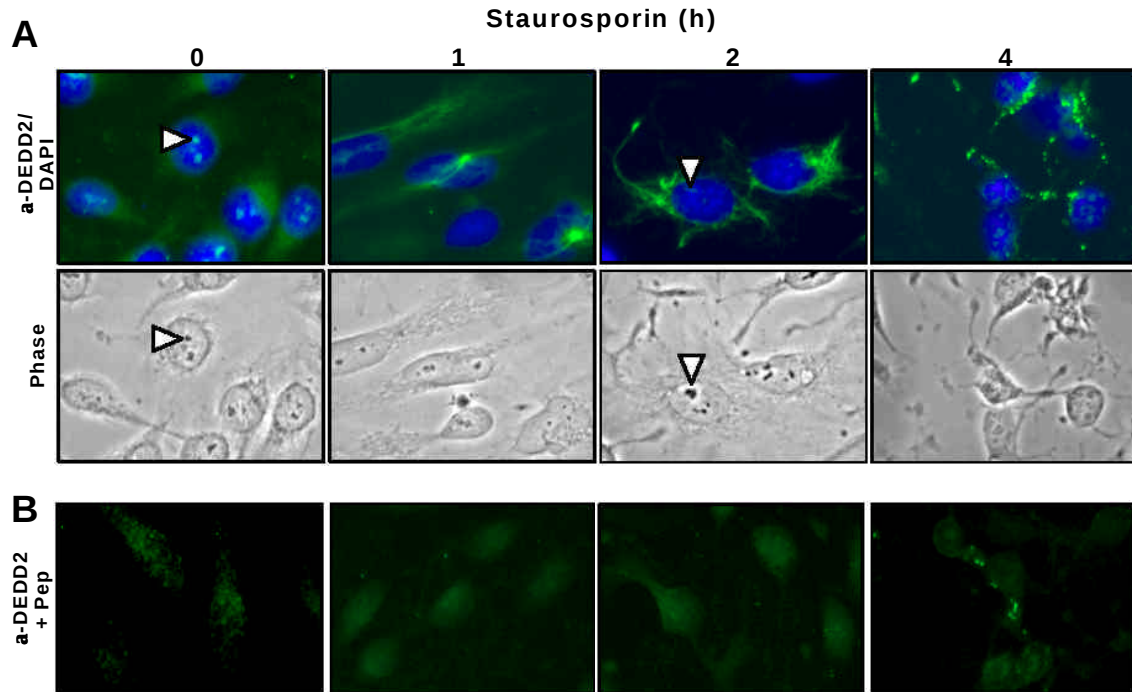


Abbildung 3.10a: DEDD formt Filamente in apoptotischen Zellen. **(A)** HeLa Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 1 μ M STS inkubiert. Nach Methanol/Aceton-Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 gefärbt, gefolgt von einem FITC-konjugierten anti-Kaninchen IgG Ziegen-Antikörper. Zellkerne (DNA) wurden mit Hilfe von DAPI sichtbar gemacht. Phase, Phasenkontrast-Aufnahmen. Pfeilspitzen: Nukleoli. **(B)** HeLa Zellen wurden wie in (A) behandelt, aber die Färbung mit anti-DEDD2 erfolgte in der Gegenwart des DEDD2-Peptids (Kompetition um die Bindungsstellen des Antikörpers).

Zusätzlich wurde die Spezifität der Färbungen von DEDD durch den Antikörper wie zuvor durch Kompetitionsstudien mit dem DEDD2-Peptid nachgewiesen: Eine Inkubation mit dem Antikörper in Anwesenheit des Peptids führte dazu, daß keine der zuvor beschriebenen Strukturen gefärbt wurde (Abb. 3.10a (B)). Nur einige der granulären Strukturen, die in späten Phasen der Apoptose auftraten, wiesen eine so hohe Dichte von DEDD-Molekülen auf, daß ihre Färbung nicht vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 3.10a (B)). Die Daten lassen zwei mögliche Modelle zu: Entweder assoziiert DEDD im Verlauf der Apoptose mit cytoplasmatischen Filamenten, oder es bildet sie in Abhängigkeit apoptotischer Prozesse. In jedem Fall erlaubt ein Zugänglichwerden des anti-DEDD2 Epitops den Nachweis cytoplasmatischen DEDDs.

Die Tatsache, daß DEDD im Verlauf der Apoptose die Nukleoli verläßt, konnte durch Elektronen-mikroskopische Aufnahmen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Gerald Cohen (University of Leicester, UK) gezeigt werden (Abb. 3.10b). TRAIL-sensitive A549 Zellen wurden für 7 h mit 1 μ g/ml TRAIL („TNF-related apoptosis-inducing ligand“) behandelt, fixiert und anschließend die Lokalisation von DEDD Elektronen-mikroskopisch nachgewiesen (Methode:

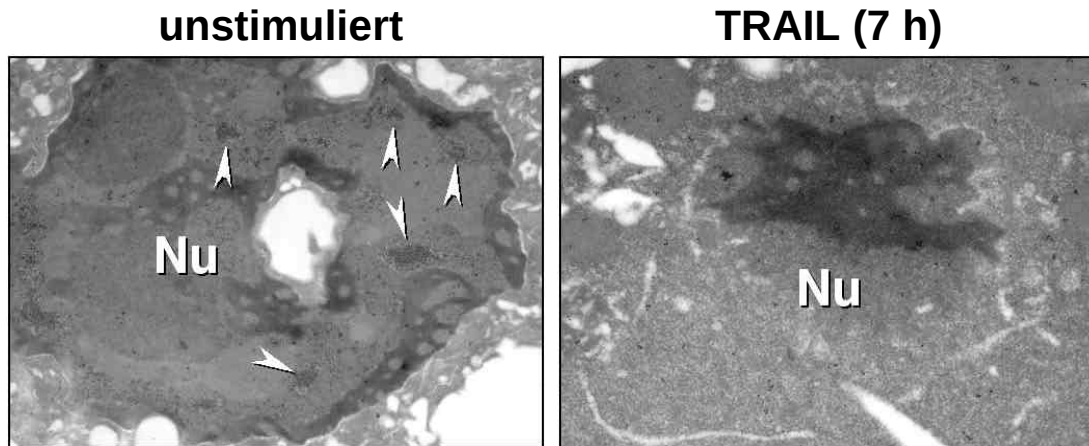


Abbildung 3.10b: DEDD verläßt die Nukleoli apoptotischer Zellen. TRAIL-sensitive A549 Zellen wurden für 7 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ TRAIL inkubiert. Kryoskopische Schnitte der Zellen wurden mit anti-DEDD2, gefolgt von Immunogold, gefärbt und im Elektronen-Mikroskop analysiert. Pfeilspitzen zeigen DEDD-positive Nukleoli an. Nu, Nukleus. (Methode: siehe MacFarlane et al., 2000).

siehe MacFarlane et al., 2000). Während sich in unbehandelten Zellen ein Teil des Proteins im Nukleus, genauer in Nukleoli befindet, wurde in apoptotischen A549 Zellen kaum mehr DEDD im Nukleus identifiziert. Es ist unklar, ob sich das nukleolare DEDD im Nukleoplasma verteilt hat und aufgrund seiner geringen Menge nicht mehr nachgewiesen werden kann, oder ob es sogar ganz aus dem Kern transloziert ist.

Um zu testen, ob die Filament-Bildung Caspasen-abhängig ist, wurden HeLa Zellen vor der Apoptose-Induktion durch STS mit dem universellen Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk 30 min vorinkubiert (Abb. 3.10c). Es zeigte sich, daß DEDD sich unter diesen Umständen wie zuvor in einer perinuklearen Struktur anreichert. Es kam jedoch nicht zur Bildung von Filamenten. Somit scheint zumindest in HeLa Zellen die Ausbildung der Filamente, aber nicht die Anreicherung von DEDD nahe des Kerns Caspasen-abhängig zu sein.

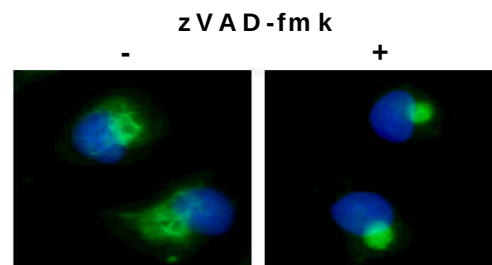


Abbildung 3.10c: Die Ausbildung der DEDD-Filamente ist Caspasen-abhängig. HeLa Zellen wurden für 30 min mit DMSO (-) oder 50 μM zVAD-fmk (+) vorinkubiert. Anschließend wurde STS bis zu einer Konzentration von 1 μM hinzugegeben und die Zellen weitere 2 h inkubiert. Nach Methanol/Aceton-Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 gefärbt, gefolgt von einem FITC-konjugierten anti-Kaninchen IgG Ziegen-Antikörper.

3.11 Die Entstehung der DEDD-Filamente ist Caspase-3 abhängig

DEDD-Filamente werden nach Apoptose-Induktion sichtbar und ihre Ausbildung scheint Caspasen-abhängig zu sein. MCF7 Zellen exprimieren keine Caspase-3 (Jänicke et al., 1998). Um die Rolle von Caspase-3 bei der Bildung der DEDD-Filamente zu untersuchen, wurden stabil transfizierte MCF7 Zellen, die entweder mit Vektor (Vek) oder Procaspase-3 (Casp-3) rekonstituiert waren und uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. A. G. Porter (Nationale Universität Singapur; Jänicke et al., 1998) zur Verfügung gestellt wurden, mit 1 μ M STS behandelt, fixiert und die DEDD-Lokalisation untersucht.

In nicht apoptotischen Zellen wurde DEDD sowohl in MCF7(Vek) als auch in MCF7(Casp-3) Zellen nur in Nukleoli detektiert (Abb. 3.11a (A)). Nach 2 h STS-Behandlung war DEDD in den MCF7(Vek) Zellen immer noch in den Nukleoli lokalisiert, die aufgrund der Apoptose-Induktion zu segregieren begannen. 4 h nach Zugabe von STS war der größte Teil des nukleolaren DEDD aus den Nuklei verschwunden und die Nukleoli hatten sich fast vollständig aufgelöst. Letztendlich lösten sich die Zellen ab und starben. Die Entstehung von Filamenten im Cytoplasma der sterbenden Zellen wurde zu keiner Zeit beobachtet.

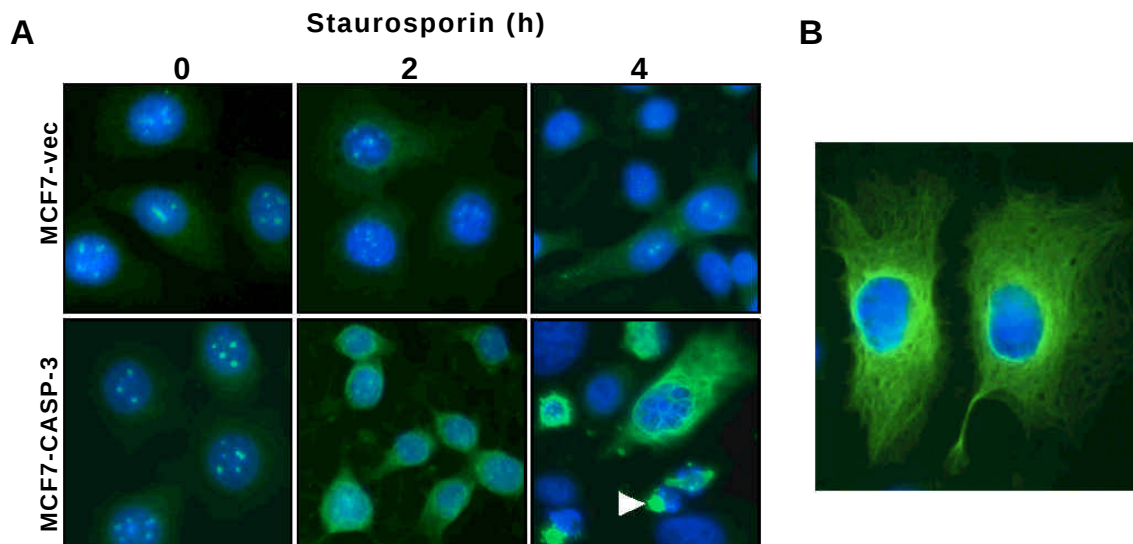


Abbildung 3.11a: Die Entstehung der DEDD-Filamente ist Caspase-3 abhängig. **(A)** MCF7(Vek) und (Casp-3) Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 1 μ M STS inkubiert. Nach Methanol/Aceton-Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 gefärbt, gefolgt von einem FITC-konjugiertem anti-Kaninchen IgG Ziegen-Antikörper. Pfeilspitze: Stark DEDD-positiver Granulus einer apoptotischen Zelle im Endstatus. **(B)** MCF7(Casp-3) Zellen wurden 4 h mit 1 μ M STS inkubiert, mit Paraformaldehyd fixiert und gefärbt wie in (A).

Im Gegensatz dazu wurden in den MCF7(Casp-3) Zellen bereits nach 2 h STS-Behandlung Filamente sichtbar. Anders als in den HeLa Zellen scheinen die Filamente in den MCF7(Casp-3) Zellen nicht von einer perinuklearen Struktur auszugehen, sondern entstehen gleichmäßig rund um den Zellkern. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die Tatsache sein, daß MCF7 Zellen kein Vimentin exprimieren, für das gezeigt wurde, daß es sich in solchen Strukturen anreichert (Sarria et al., 1990 und siehe Abschnitt 3.13). Nach 4 Stunden wurden im Cytoplasma der MCF7(Casp-3) Zellen große Mengen an DEDD-Filamenten beobachtet. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in HeLa Zellen, zerfallen die Filamente in den späteren Stadien der Apoptose und lassen stark gefärbte, DEDD-positive granuläre Strukturen zurück (siehe Pfeilspitze in Abb 3.11a (A)). Um sicherzustellen, daß es sich bei der Färbung der DEDD-Filamente nicht um eine unspezifische Kreuzreaktivität des Antikörpers aufgrund der Fixierungsmethode handelt, wurde der Versuch wiederholt und die Zellen mit Paraformaldehyd anstelle von Methanol/Aceton fixiert. Färbungen der Paraformaldehyd-fixierten Zellen zeigten, daß der Nachweis der DEDD-Filamente unabhängig von der Fixierungsmethode ist (Abb. 3.11a (B)).

Doppel-Färbungen von DEDD und Zellkernen (bzw. DNA) mit Hilfe von anti-DEDD2 und DAPI zeigten, daß die Entstehung der DEDD-Filamente der Kondensation des Nukleus voraus geht (Abb. 3.11b).

Es wurde gezeigt, daß DED-Proteine in Überexpressions-Experimenten durch Interaktionen der DED sogenannte DED-Filamente bilden, von denen man annimmt, daß sie cytoplasmatische Caspase-8 rekrutieren und aktivieren (Siegel et al., 1998). Um zu testen, ob die von DEDD gebildeten Filamente analog zu diesen Experimenten ebenfalls Caspase-8 rekrutieren, wurden

MCF7(Casp-3) Zellen mit STS behandelt und anschließend mit anti-DEDD2, sowie C15, einem monoklonalen Antikörper, der die p18 Untereinheit der Caspase-8 nachweist, gefärbt (Abb. 3.10c). Es wurde jedoch keine Kolo-kalisation von DEDD und aktiver Caspase-8 beobachtet, was

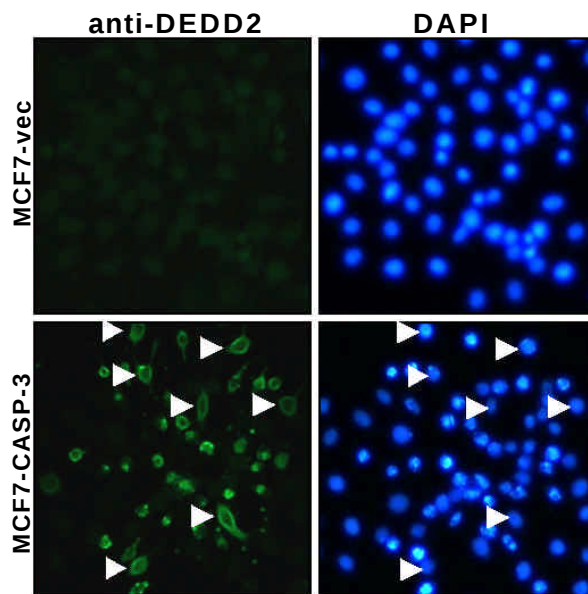


Abbildung 3.11b: DEDD-Filamente entstehen, bevor der Kern kondensiert. MCF7(Vek) und (Casp-3) Zellen wurden für 4 h mit 1 μ M STS inkubiert, fixiert und mit anti-DEDD2 gefärbt. Die Pfeilspitzen zeigen MCF7(Casp-3) Zellen, die große Mengen an DEDD-Filamenten aufweisen, aber deren Kerne noch völlig intakt sind.

daraufhin deutet, daß DEDD keine Caspase-8 rekrutiert und die Filamente daher möglicherweise keine DED-Filamente darstellen.

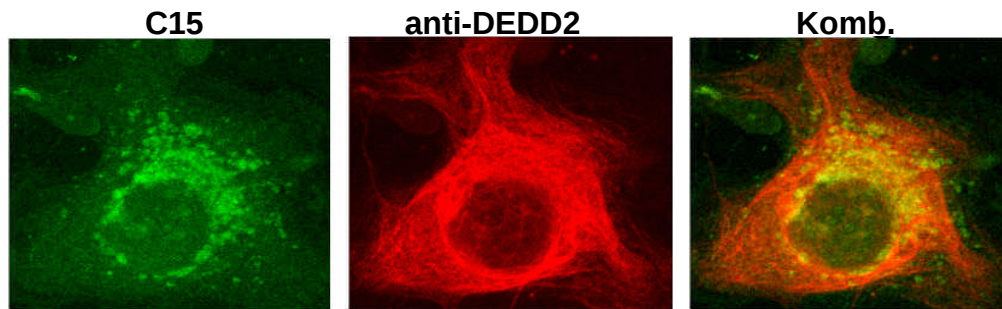


Abbildung 3.11c: Die DEDD-Filamente rekrutieren keine Caspase-8. MCF7(Casp-3) Zellen wurden für 4 h mit STS (1 μ M) behandelt, mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-Caspase-8 (C15), sowie mit anti-DEDD2 gefärbt und analysiert. Komb., Kombination der beiden Färbungen.

3.12 DEDD-Filamente treten nach verschiedenen Apoptose-Stimuli auf

Apoptose kann durch eine Reihe von Stimuli induziert werden. Dazu zählen neben der Behandlung durch den Kinase-Inhibitor Staurosporin, der den Mitochondrien-abhängigen Signalweg der Apoptose aktiviert, unter anderem auch DNA-schädigende Chemikalien (z. B. Etoposid), Energie-reiche Strahlen (z. B. UV-Licht) oder die Liganden der Todesrezeptoren (z. B.

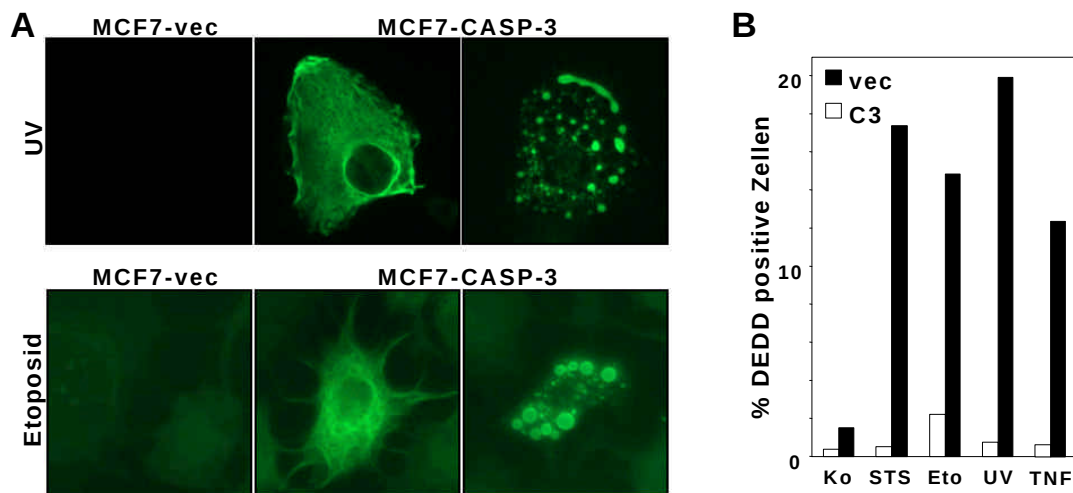


Abbildung 3.12a: DEDD-Filamente bilden sich nach verschiedenen Apoptose-Stimuli. **(A)** In MCF7(Vek) und (Casp-3) Zellen wurde durch UV-Licht-Bestrahlung, bzw. Etoposid-Behandlung Apoptose induziert (siehe Material & Methoden). Nach Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 gefärbt und Immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht. **(B)** Quantifizierung des Auftretens von DEDD-Filamenten in MCF7(Vek) und (Casp-3) Zellen nach Induktion von Apoptose durch verschiedene Stimuli (siehe Material und Methoden). Die Zellen wurden mit anti-DEDD2 (und FITC-anti-Kaninchen IgG) gefärbt und der Grad der Fluoreszenz im FACS analysiert. Ko, unbehandelte Kontrolle; STS, Staurosporin; Eto, Etoposid; UV, UV-Licht-Bestrahlung; TNF; Tumor Nekrose Faktor α .

TNF). Um zu klären, ob das Auftreten der DEDD-Filamente vom Apoptose-Stimulus abhängig ist, wurde in MCF7(Vek) und (Casp-3) Zellen durch UV-Licht-Bestrahlung oder Behandlung mit Etoposid Zelltod induziert, die Zellen anschließend fixiert, mit anti-DEDD2 gefärbt und Immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht (Abb. 3.12a). Es zeigte sich, daß unabhängig davon welcher Stimulus Apoptose induzierte, in allen apoptotischen MCF7(Casp-3) Zellen eine Ausbildung von DEDD-Filamenten beobachtet werden konnte, die in einem späteren Stadium der Apoptose in granuläre Strukturen zerfallen. Besonders nach Etoposid-Behandlung konnten große, blasenförmige, DEDD-positive Strukturen beobachtet werden. MCF7(Vek) Zellen bildeten unter keinen Umständen DEDD-Filamente.

Zur Quantifizierung der Filament-Bildung wurde in MCF7(Vek) und (Casp-3) durch verschiedene Stimuli (Staurosporin, Etoposid, UV-Licht und $\text{TNF}\alpha$) Apoptose ausgelöst, die Zellen anschließend geerntet, fixiert, mit anti-DEDD2 gefärbt und die Fluoreszenz im FACS bestimmt (Abb. 3.12a (B)). Jeder der getesteten Stimuli führte dabei in 10 bis 20% der Caspase-3 rekonstituierten Zellen zu einem DEDD-positiven Signal. MCF7(Vek) Zellen zeigten keine Zunahme in der Färbung für DEDD. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Gerald Cohen (University of Leicester, UK) konnte gezeigt werden, daß auch in HeLa Zellen, die für 2 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ TRAIL behandelt wurden, DEDD in Filament-artigen Strukturen im Cytoplasma lokalisiert ist (Abb. 3.12b).

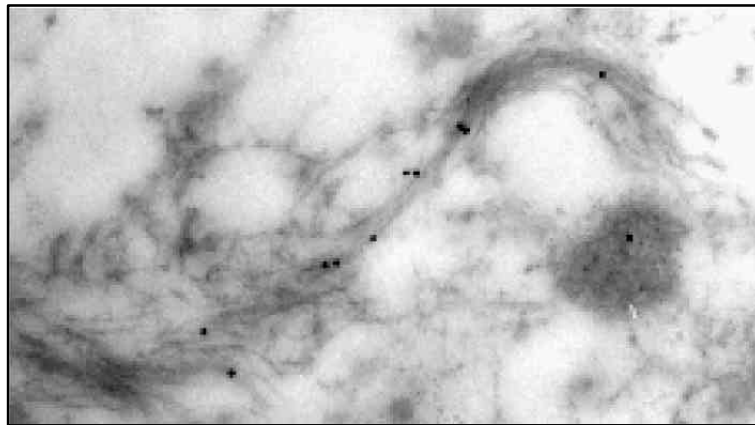


Abbildung 3.12b: DEDD lokalisiert in Filament-artigen Strukturen im Cytoplasma TRAIL-behandelter HeLa Zellen. Die Zellen wurden für 2 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ TRAIL inkubiert. Kryoskopische Schnitte der Zellen wurden mit anti-DEDD2, gefolgt von Immunogold (10 nm) gefärbt und im Elektronen-Mikroskop analysiert.

3.13 DEDD-Filamente kolokalisieren mit Keratin 8/18 und Vimentin

Die DEDD-Filamente, die während der Apoptose sichtbar wurden, erinnerten an Färbungen von Cytoskelett-Proteinen und speziell von Intermediärfilamenten. Daher wurde

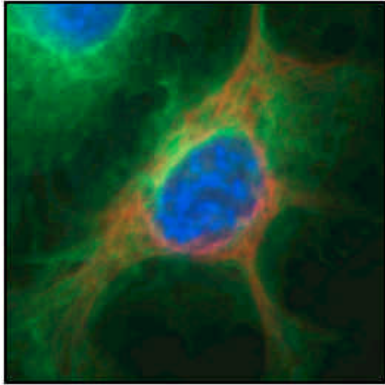


Abbildung 3.13a: DEDD kolokalisiert nicht mit Mikrotubuli. MCF7(Casp-3) Zellen wurden für 4 h mit 1 μ M STS inkubiert. Nach Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 (grün) und anti- α Tubulin (rot) gefärbt und Immunfluoreszenz-mikroskopisch analysiert.

untersucht, ob DEDD mit Proteinen des Cytoskeletts kolokalisiert. Mit Hilfe von Doppelfärbungen von DEDD und verschiedenen Komponenten des Cytoskelett-Systems in apoptotischen MCF7(Casp-3) Zellen konnte gezeigt werden, daß DEDD mit Intermediärfilamenten (IF), aber nicht mit Mikrotubuli (Abb. 3.13a) oder Mikrofilamenten kolokalisiert. Zu dem Zeitpunkt, an dem DEDD-Filamente sichtbar wurden, waren die Aktin-Mikrofilamente als Folge der Apoptose-Induktion bereits depolymerisiert, so daß keine Kolokalisation möglich war (Daten nicht gezeigt).

DEDD-Filamente in HeLa Zellen bilden sich ausgehend von einer perinuklearen Struktur, die in MCF7 Zellen nicht beobachtet wurden. Da bekannt war, daß das IF-Protein Vimentin in ähnlichen Strukturen lokalisiert ist und zudem in MCF7 Zellen nicht exprimiert wird (Sarria et al., 1990), wurde in HeLa Zellen eine mögliche Kolokalisation von DEDD und Vimentin untersucht. Die ersten DEDD-Filamente, die in HeLa Zellen kurz nach Beginn der Behandlung mit STS auftraten, kolokalisierten mit Vimentin in den schon beschriebenen perinuklearen Strukturen (Abb. 3.13b). Da sich in diesem Bereich jedoch auch das K8/K18-Keratin-Netzwerk konzentriert (vergl. Abb. 3.14), ist unklar, ob DEDD mit beiden IF-Proteinen kolokalisiert ist.

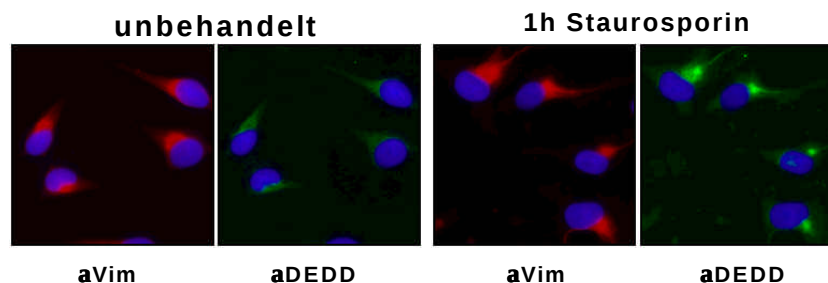


Abbildung 3.13b: DEDD kolokalisiert mit Vimentin. HeLa Zellen wurden entweder unbehandelt oder nach 1 h STS-Behandlung (1 μ M) fixiert und mit anti-DEDD2 (grün) und anti-Vimentin (rot) gefärbt.

MCF7(Casp-3) Zellen enthalten nur wenige IF-Proteine: Keratine K8, K18 und K19, sowie Lamine. K8 bildet zusammen mit K18 ein Netzwerk und wird nicht wie sein Partner im Verlauf der Apoptose gespalten (Caulin et al., 1997). Um eine Kolokalisation der DEDD-Filamente mit dem K8/K18-Netzwerk zu prüfen, wurden MCF7(Casp-3) Zellen mit STS behandelt und mit anti-

DEDD2, anti-K8 und M30 gefärbt. M30 weist spezifisch ein Neoepitop nach, das durch die Spaltung von K18 durch Caspase-3 an Position D397 entsteht (Leers et al., 1999). Konfokale Laser-Mikroskopie Aufnahmen von DEDD und K8 zeigten, daß die Kolokalisation mit K8/K18 vollständig ist (Abb. 3.13c). Nicht alle K8/K18-Filamente sind jedoch auch DEDD positiv: In der Peripherie der Zelle gibt es K8-positive Filamente, die nicht DEDD-positiv sind. Kofärbungen von DEDD mit M30 zeigten ebenfalls, daß im perinuklearen Raum gespaltenes K18 und DEDD-Filamente kolokalisiert sind, während in der Peripherie häufig nur M30-positive Filamente (und kein DEDD) zu finden sind (Abb. 3.13c).

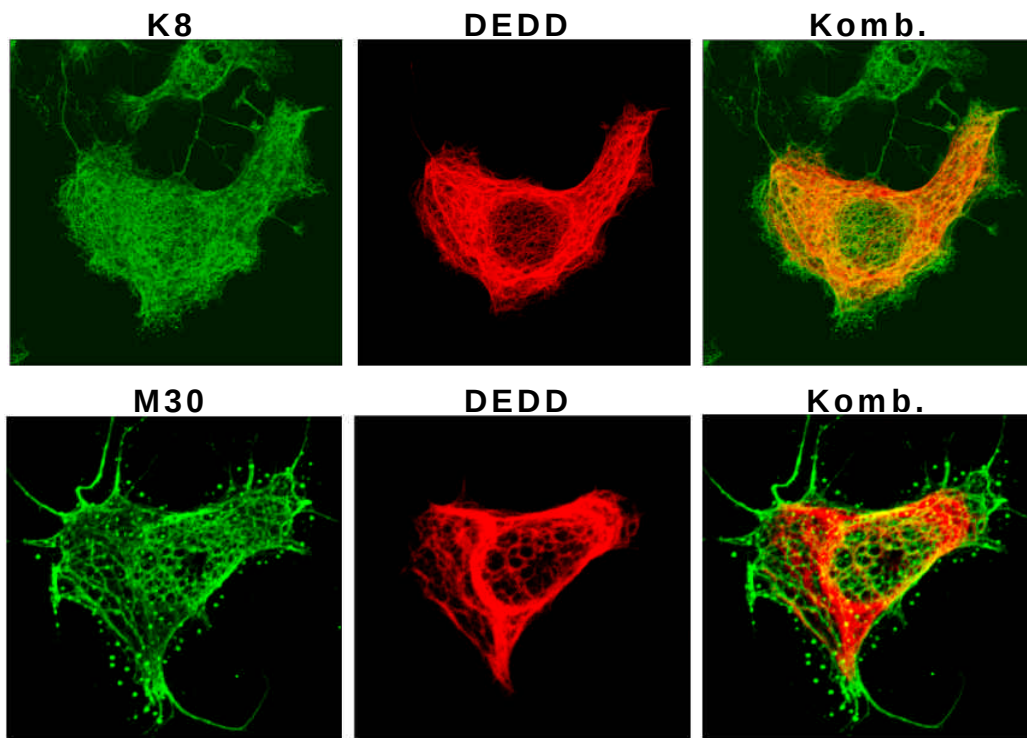


Abbildung 3.13c: DEDD kolokalisiert mit dem Keratin 8/18 Netzwerk. MCF7(Casp-3) Zellen wurden für 4 h mit 1 μ M STS inkubiert. Nach Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Zellen mit anti-K8, bzw. M30 (grün) und anti-DEDD2 (rot) gefärbt und mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops analysiert. M30 ist ein Antikörper, der spezifisch durch Caspasen-gespaltenes Keratin 18 erkennt. Bei den Bildern handelt es sich jeweils um die 2D-Darstellung eines 3D-Bildes, das sich aus 20 übereinanderliegender z-Sektionen zusammensetzt, die jeweils 0.5 μ m voneinander entfernt liegen. Komb., Kombination der beiden Färbungen.

3.14 Die Bildung von DEDD-Filamenten geht der Spaltung von Keratin 18 durch Caspase-3 voraus

DEDD-Filamente kolokalisieren mit dem K8/K18-Netzwerk. K18 wird während der Apoptose durch die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 gespalten. Um die Bildung der DEDD-

Filamente in der Abfolge der apoptotischen Vorgänge einordnen zu können, und um einen Zusammenhang zwischen DEDD-Filamenten und K18-Spaltung herzustellen, wurden HeLa Zellen in einer Kinetik mit STS behandelt, mit anti-DEDD2 und M30 gefärbt und sowohl Immunfluoreszenz-mikroskopisch, als auch mit Hilfe des FACS analysiert (Abb. 3.14).

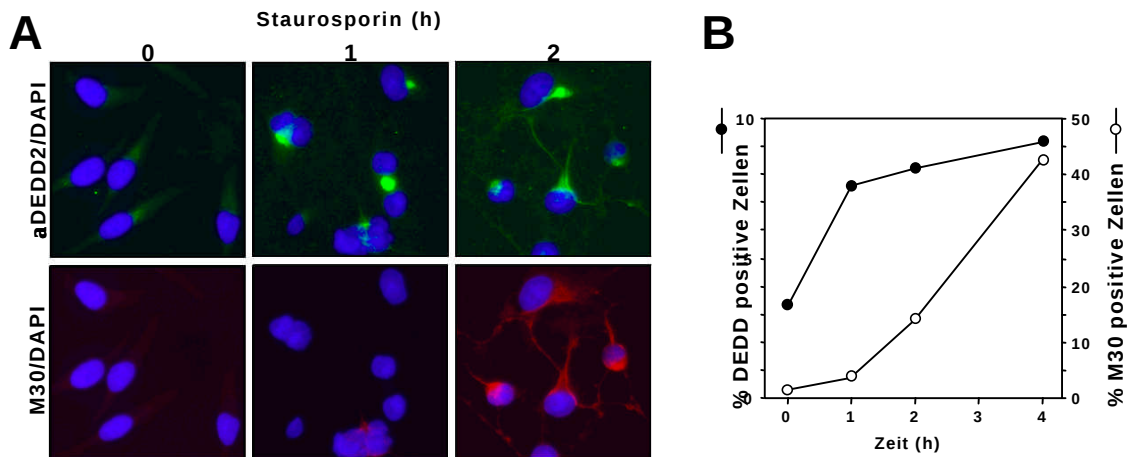


Abbildung 3.14: DEDD-Filamente gehen der Spaltung von K18 voraus. **(A)** HeLa Zellen wurden für 4 h mit 1 μ M STS inkubiert. Nach Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 (grün) und M30 (rot) gefärbt und Immunfluoreszenz-mikroskopisch analysiert. **(B)** HeLa Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit 1 μ M STS inkubiert. Nach Fixierung wurden die Zellen mit anti-DEDD2 oder M30 gefärbt und im FACS analysiert

Die Kinetik zeigte, daß sich sowohl Immunfluoreszenz-mikroskopisch, als auch in der FACS-Analyse DEDD-Filamente nachweisen lassen, bevor M30 eine Spaltung von K18 durch Caspase-3 anzeigt. Das bedeutet, daß K18 zuerst eine Kofärbung mit DEDD zeigt, bevor es durch Caspase-3 gespalten wird. Dies könnte auch bedeuten, daß DEDD an der Regulation der Spaltung von K18 beteiligt ist. Die Assoziation von DEDD und K18 ist möglicherweise eine Voraussetzung für die Spaltung des Keratins durch Caspase-3.

3.15 Die Aggregation von DEDD in apoptotischen Zellen ist nicht von Keratinen abhängig

Da DEDD ein häufig vorkommendes Protein ist und in allen bisher untersuchten Geweben und Zelllinien gefunden wurde (Stegh et al., 1998), stellte sich die Frage, ob auch in nicht-adhären Zellen, die kein K8 und K18 exprimieren, DEDD nach Induktion von Apoptose eine Veränderung durchläuft, die das Epitop, das durch anti-DEDD2 nachgewiesen werden kann, zugänglich macht. Daher wurden verschiedene lymphoide Zelllinien in einer Kinetik mit STS behandelt, fixiert und intrazellulär mit anti-DEDD2 gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des

FACS (Abb. 3.15) und zeigte, daß Keratine für die zunehmende Färbung von cytoplasmatischem DEDD im Verlauf der Apoptose nicht essentiell sind.

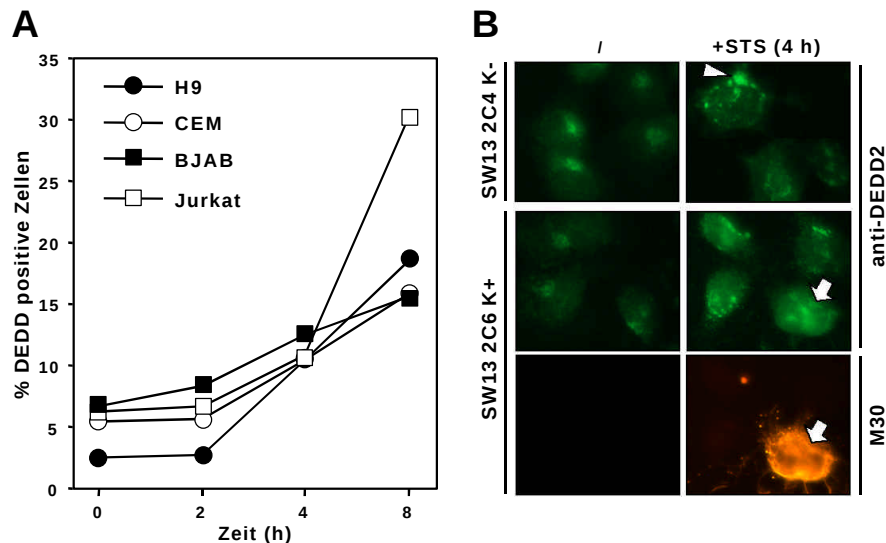


Abbildung 3.15: Die Ausbildung DEDD-positiver Strukturen ist nicht abhängig, wird aber beeinflusst vom K8/K18-Netzwerk. **(A)** DEDD wird auch in apoptotischen Lymphozyten sichtbar. Quantifizierung der Färbung von DEDD in H9, CEM, BJAB und Jurkat Zellen nach Induktion von Apoptose durch Staurosporin (1 μ M). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert, mit anti-DEDD2 (und FITC-anti-Kaninchen IgG) gefärbt und der Grad der Fluoreszenz im FACS analysiert. **(B)** In SW13 Zellen, die kein K8/K18 exprimieren (2C4 K-), und mit K8/K18 stabil transfizierten SW13 Zellen (2C6 K+) wurden mit STS (1 μ M) Apoptose induziert. Die Zellen wurden anschließend mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-DEDD2 oder M30 gefärbt.

DEDD durchläuft in apoptotischen Zellen eine Konformationsänderung, die das Epitop des anti-DEDD2 Antikörpers zugänglich werden läßt. Diese Veränderung ist in lymphoiden Suspensions-Zellen unabhängig von der Expression von Keratinen. Um diese Veränderung auch Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachzuweisen, wurden Keratin-negative und mit Keratinen rekonstituierte, adhärenzte Zellen untersucht. Zellen der humanen Nebennierenkarzinom-Zelllinie SW13 exprimieren kein K8 oder K18. Die Arbeitsgruppe von Dr. Robert G. Oshima (Burnham Institute, La Jolla, California) stellte uns freundlicherweise SW13 Kontrollzellen zur Verfügung, die keine K8/K18-Filamente aufwiesen (2C4 K-), sowie Zellen, die stabil mit Plasmiden für beide Keratine transfiziert waren (2C6 K+). Staurosporinbehandlung und anschließende anti-DEDD2-Färbung der Keratin-negativen Zellen (2C4 K-) zeigte auch hier, daß die Ausbildung von stark gefärbten DEDD-Strukturen unabhängig von Keratinen ist. (Abb. 3.15). Obwohl die SW13-Zellen Vimentin exprimieren (Daten nicht gezeigt), waren die gebildeten Strukturen nicht Filament-artig im Cytoplasma verteilt, sondern erinnerten eher an granuläre Aggregate, wie sie sonst erst nach der Desintegration der Filamente zu beobachten waren (siehe Abb 3.15). In den SW13 Zellen, die K8/K18-Filamente und nach Apoptose-Induktion auch M30-Positivität aufwiesen (2C6 K+),

konnte hingegen das Auftreten einer breiteren, häufig auch Filament-artigen Verteilung DEDD-positiver Strukturen beobachtet werden. Für eine Konformationsänderung von DEDD entlang von Filamenten, scheint daher das K8/K18-Netzwerk notwendig zu sein. Dennoch bestätigen die Ergebnisse, daß die Veränderung im Verlauf der Apoptose, die zu einer Aggregation des Proteins führt, nicht von IF-Proteinen abhängig oder auf Zellen beschränkt ist, die IF-Proteinen exprimieren. Das war bei der Häufigkeit und hohen Konservierung von DEDD in allen Zelltypen auch nicht zu erwarten. Es ist eher wahrscheinlich, daß die DEDD-Aggregation eine Funktion in einer Vielzahl von verschiedenen, wenn nicht gar in allen Zellen besitzt.

3.16 DEDD, K18, gespaltenes K18 und Vimentin lokalisieren in intrazellulären Granuli

Die erste Charakterisierung von Apoptose erfolgte anhand morphologischer Veränderungen apoptotischer Zellen: Kondensation des Nukleus und Abschnürung membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet wurden (Kerr et al., 1972). Die Bildung von Granuli innerhalb apoptotischer Zellen ist für mehrere apoptotische Stimuli beschrieben worden und die Bildung cytoplasmatischer Einschlüsse scheint ein charakteristisches Merkmal der Apoptose epithelialer Zellen zu sein (Caulin et al., 1997; MacFarlane et al., 2000). Es wurde berichtet, daß die Einschlüsse Keratin 8, 18 und 19, gespaltenes K18, sowie aktive Caspase-3 beinhalten (MacFarlane et al., 2000). Die DEDD-Filamente, die sich innerhalb STS-behandelter Zellen bildeten, wichen nach länger anhaltender Apoptose-Induktion zunehmend granulären DEDD-Strukturen. Diese waren als dunkle Strukturen auch im Phasenkontrast zu sehen, und es wurde angenommen, daß es sich dabei um die Reste zerfallener Filamente handelte (Abb. 3.16 (A)).

Um zu prüfen, ob es sich bei diesen DEDD-positiven Strukturen um apoptotische Körperchen oder deren Vorstufen handelt, die im Verlauf der Apoptose zu apoptotischen Körperchen verschmelzen, wurden sie mit Hilfe des konfokalen und des Elektronen-Mikroskops genauer untersucht. Dabei sollte auch analysiert werden, welche anderen Proteine sich gemeinsam mit DEDD in diesen Strukturen befinden. Zunächst wurden deshalb MCF7(Casp-3) Zellen 8 h mit STS behandelt und anschließend mit anti-DEDD2 und M30 Immunfluoreszenz-mikroskopisch gefärbt. Konfokale Aufnahmen, die Schnitte durch die Zellen darstellen, zeigten, daß es sich bei den Strukturen tatsächlich um granuläre Körperchen handelt, die neben DEDD auch gespaltenes K18 enthalten. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die mit Hilfe der konfokalen Aufnahmen der DEDD- und M30-Filamente gemacht wurden (siehe Abschnitt 3.13), scheinen in der Peripherie der Zelle vorwiegend M30- und im perinuklearen Raum DEDD-positive Granuli zu überwiegen, während andere deutlich doppelt-positiv sind (Abb. 3.16 (B)).

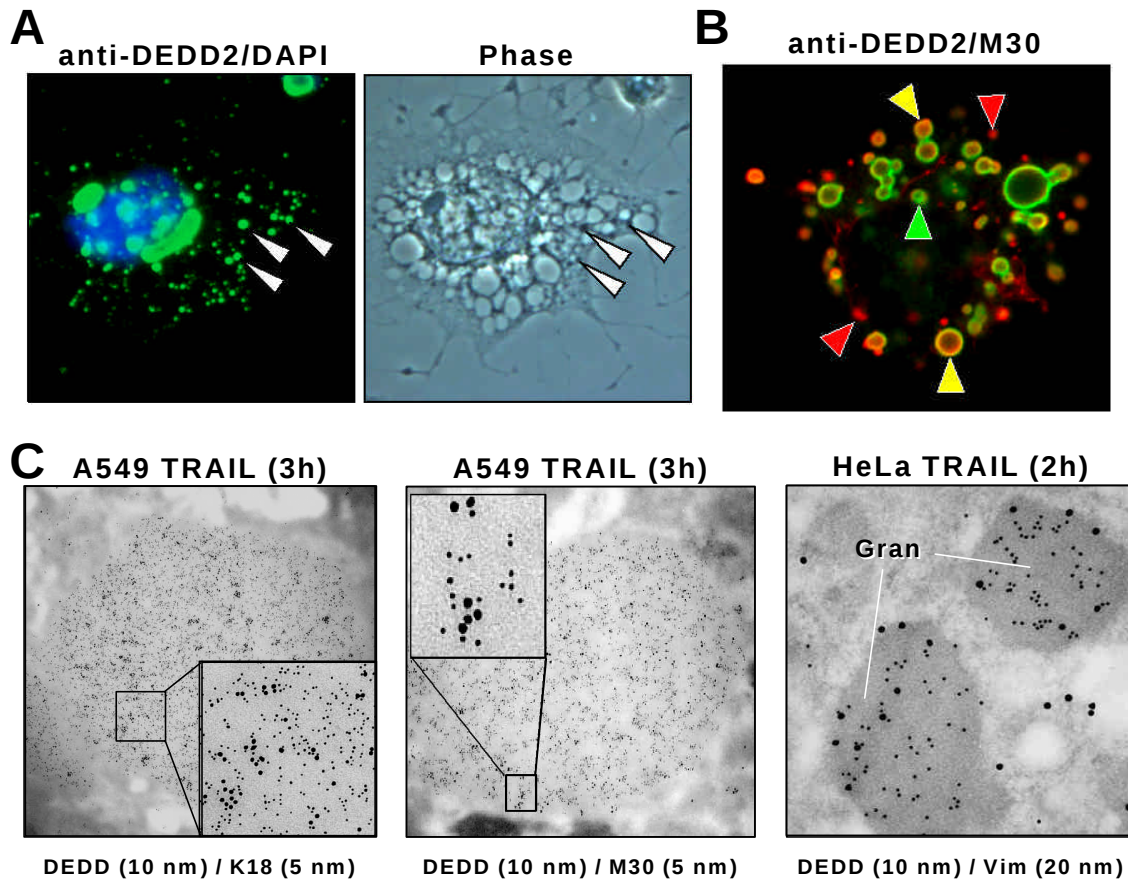


Abbildung 3.16: DEDD lokalisiert in späten Stadien der Apoptose mit IF-Proteinen in intrazellulären Granuli. **(A)** MCF7(Casp-3) wurden für 8 h mit Staurosporin (STS) behandelt, mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-DEDD2 und DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Zellen Immunfluoreszenz- und lichtmikroskopisch analysiert. Die Pfeilspitzen weisen auf DEDD-positive Granuli, die auch in der Phasenkontrastaufnahme sichtbar sind. Phase, Phasenkontrast. **(B)** Kolokalisation von DEDD und gespaltenem K18. Schnitt durch eine MCF7(Casp-3) Zelle, die zuvor für 8 h mit Staurosporin (STS) behandelt, mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-DEDD2 und M30 gefärbt wurden. Das Bild, das auf einer Auswertung mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes basiert, zeigt die Überlagerung zweier z-Sektionen unterschiedlicher Wellenlänge. Die Pfeilspitzen zeigen unterschiedlich gefärbte apoptotische Granuli an: Grün, DEDD-positiv. Rot, M30-positiv. Gelb, doppelt-positiv. **(C)** Kolokalisation von DEDD mit K18 und Vimentin. EM-Aufnahmen von mit TRAIL (1 µg/ml) behandelten Zellen. Die Zellen wurden mit anti-DEDD2 und anti-K18 bzw. M30 oder anti-Vimentin gefolgt von Immunogold gefärbt und im EM analysiert. Zelllinie, Dauer der Behandlung und Größe der unterschiedlichen Goldpartikel sind angegeben. Gran, Granuli.

Durch die Immunfluoreszenz-Färbung von DEDD wurde nur der äußere Ring der Granuli gefärbt. Da es sich aber bei diesen Strukturen um dicht mit Protein gepackte Körperchen handelt, nahmen wir an, daß der primäre Antikörper nicht in der Lage war, tiefer in die Granuli einzudringen. Dieses Phänomen war bereits für M30 gezeigt worden (MacFarlane et al., 2000). Um herauszufinden, ob sich auch in den inneren Bereichen der Granuli DEDD-Proteine befinden,

deren Epitope für die Immunfluoreszenz-Färbung unzugänglich sind, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gerald Cohen (University of Leicester, UK) Elektronen-mikroskopische Aufnahmen von anti-DEDD2 und anti-K18 bzw. M30 und anti-Vimentin gefärbten apoptotischen Zellen gemacht (Methode: siehe MacFarlane et al., 2000). Diese bestätigten nicht nur, daß sich DEDD auch im Inneren der Einschlüsse befindet, sondern daß es dort auch mit verschiedenen IF-Proteinen (bzw. deren Spaltprodukten) kolokalisiert (Abb.3.16 (C)).

3.17 Die DEDD-positiven intrazellulären Granuli sind Vorläufer der apoptotischen Körperchen

Die Bildung von intrazellulären DEDD-positiven Granuli wurde nicht nur in STS-behandelten Zellen, sondern auch nach Apoptose-Stimulation durch TRAIL (siehe Abschnitt 3.16). bzw. UV-Licht und Etoposid (siehe Abschnitt 3.12) beobachtet und ist, wie das Erscheinen der DEDD-Filamente, Caspase-3 abhängig. Ein anderer Caspase-3 abhängiger Prozess ist das Bläsenschlagen der Membran apoptotischer Zellen gefolgt von der Abschnürung der sogenannten apoptotischen Körperchen (Jänicke et al., 1998; Zheng et al., 1998). Der Kinaseinhibitor Staurosporin inhibiert die für die Abschnürung wichtige Phosphorylierung der leichten Kette des Motorproteins Myosin (Mills et al., 1998). Die im Rahmen der STS-vermittelten Apoptose auftretenden DEDD-Granuli wurden dementsprechend nur intrazellulär beobachtet (siehe Abschnitt 3.16). Es stellte sich daher die Frage, ob die DEDD-Granuli, die unter anderem auch gespaltenes K18 und Vimentin enthalten, Vorläufer apoptotischer Körperchen sind, die sich nur aufgrund der STS-Behandlung nicht abschnüren. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Zell-Morphologie und die Lokalisation der DEDD-Granuli in MCF7(Casp-3) Zellen nach Induktion von Apoptose durch Etoposid mit Hilfe des konfokalen Mikroskops genauer untersucht.

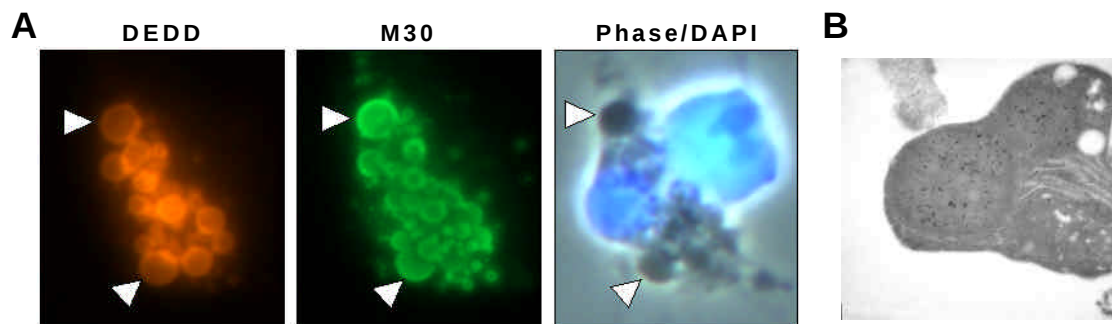


Abbildung 3.17: DEDD und gespaltenes K18 lokalisierten in einem späten Stadium der Apoptose in blasenförmigen Ausstülpungen der Plasmamembran, die Vorläufer der apoptotischen Körperchen sind. **(A)** Zweidimensionale Darstellung einer konfokalen 3D-Aufnahme von MCF7(Casp-3) Zellen, die für 24 h mit 200 μ M Etoposid behandelt, fixiert und mit anti-DEDD2, M30 und DAPI gefärbt wurden. **(B)** A549 Zellen wurden für 7 h mit 1 μ g/ml TRAIL behandelt, fixiert, geschnitten und mit anti-DEDD2 gefolgt von Immunogold-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte elektronenmikroskopisch analysiert (Methode: MacFarlane et al., 2000).

Die im Verlauf der Etoposid-induzierten Apoptose gebildeten Granuli lokalisierten, im Gegensatz zu jenen der STS-induzierten Apoptose, als große Blasen auf der Oberfläche der Zellen. Diese Membranausstülpungen waren sowohl positiv für DEDD, als auch gespaltenes Keratin 18 (Abb. 3.17 (A)) und legten die Vermutung nahe, daß es sich bei den DEDD-Granuli tatsächlich um die Vorläufer der apoptotischen Körperchen handelt. Auch in den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen apoptotischer A549 Zellen, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gerald Cohen (University of Leicester, UK) entstanden, konnte gezeigt werden, daß die Granuli, die DEDD und verschiedene IF-Proteine bzw. ihre Spaltprodukte enthalten, sich in Strukturen befanden, die Vorläufer der apoptotischen Körperchen sein könnten (Abb. 3.17 (B)).

3.18 DEDD bildet SDS-stabile Aggregate, die im Verlauf der Apoptose unlöslich werden

Ursprünglich wurde DEDD in einer Reihe von Zelllinien in Western Blot-Analysen als 37 kDa Protein identifiziert (Stegh et al., 1998). Nach Entdeckung der DEDD-Filamente, die möglicherweise auf eine Aggregation des Proteins zurückzuführen sind, rückte jedoch eine weitere Bande mit der Größe von ca. 55 kDa, die bis dahin als unspezifische Hintergrundbande des polyklonalen Antikörpers anti-DEDD1 angesehen worden war, in den Mittelpunkt des Interesses. Diese Bande wurde in den Lysaten aller untersuchten Zelllinien gefunden (Abb. 3.18a (A)). Um zu testen, ob die 55 kDa Bande ein Dimer von DEDD mit ungewöhnlichem Laufverhalten (20 kDa kleiner als erwartet) repräsentiert, wurden 293T Zellen mit DEDD (ohne Markerpeptid) oder DEDD-3'FLAG transfiziert und deren Lysate im Western Blot mit Hilfe des anti-DEDD2 Antikörpers analysiert (Abb. 3.18 (B)). Neben der erwarteten 37 kDa Bande, die in den Lysaten der Zellen mit FLAG-Markerpeptid leicht retardiert war, wurde auch eine Bande um 55 kDa detektiert. Diese hohe Form von DEDD mit FLAG-Markerpeptid war ebenfalls gegenüber derjenigen ohne die zusätzlichen Aminosäuren des Markerpeptids leicht retardiert, was darauf

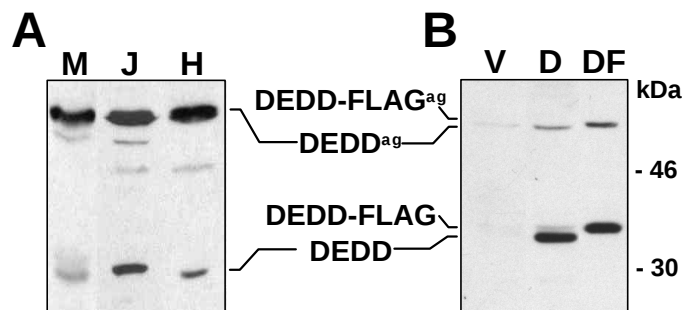


Abbildung 3.18a: DEDD bildet SDS-stabile Aggregate. **(A)** Jurkat (J), HeLa (H) und MCF7(Casp-3) (M) Zellen wurden lysiert und DEDD, bzw. DEDD^{ag} in einer Western Blot Analyse mit anti-DEDD1 detektiert. **(B)** Nachweis von DEDD, bzw. DEDD^{ag} mit Hilfe von anti-DEDD2 in den Lysaten von 293T Zellen, die mit Vektor (V), DEDD (D) oder DEDD-3'FLAG (DF) transient transfiziert wurden. Diese Western Blot-Analyse ist teilweise schon in Abb. 3.07 gezeigt worden.

hindeutet, daß es sich bei der 55 kDa Bande tatsächlich um aggregiertes DEDD (DEDD^{ag}) handelt. Diese Aggregate sind sehr stabil, da sie dem Kochen der Probe in 1x RSB (inkl. 1% SDS, siehe Abschnitt 2.02) widerstehen. Die Annahme, daß es sich sowohl bei der 37 kDa-, als auch der 55 kDa-Bande um DEDD handelt, wurde durch die Tatsache unterstützt, daß DEDD und DEDD^{ag} in der Western Blot Analyse eines NEPHGE („non equilibrium pH gel electrophoresis“-Gels den gleichen pI (ca. 9.4) haben (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der NEPHGE werden Proteine in der ersten Dimension abhängig von ihrem pI-Wert und erst in der zweiten Dimension nach Größe aufgetrennt.

In der ersten Charakterisierung des DEDD-Proteins (Stegh et al., 1998) berichteten wir, daß DEDD im Verlauf der Apoptose von einer löslichen in eine Detergenz unlösliche Fraktion transloziert. Dies wurde zunächst als Translokation in den Nukleus interpretiert, spiegelte aber im Zusammenhang mit den neuen Erkenntnissen eher die Aggregation von DEDD und die Bildung von Detergenz-unlöslichen Filamenten wieder. Um herauszufinden, wie sich DEDD^{ag} im Verlauf der Apoptose verhält, wurden HeLa und Jurkat Zellen mit STS behandelt und lösliche und unlösliche Fraktionen (siehe Abschnitt 2.28), auf das Vorhandensein von DEDD, bzw. DEDD^{ag} hin untersucht. In HeLa Zellen, die schon vor der Apoptose-Induktion hauptsächlich lösliches DEDD^{ag} enthielten, war nach 8 h STS-Behandlung nahezu das gesamte monomere DEDD verschwunden und eine kleine Menge DEDD^{ag} erschien in der unlöslichen Fraktion, die auch K8 enthielt (Abb. 3.18b (A)). Zur Kontrolle wurde die Löslichkeit von FADD analysiert, das im Cytosol in einer phosphorylierten und einer nicht-phosphorylierten Form vorliegt: Beide Formen von FADD wurden ausschließlich in der löslichen Fraktion nachgewiesen, wobei nach Behandlung mit dem Kinaseinhibitor STS nur noch die nicht-phosphorylierte Form gefunden wurde.

In Jurkat T-Zellen, die vor der Behandlung etwa zu gleichen Teilen DEDD und DEDD^{ag} enthielten, verschwanden sowohl DEDD als auch DEDD^{ag} aus der löslichen Fraktion, während DEDD^{ag} wieder in der unlöslichen Fraktion auftauchte (Abb. 3.18b (B)). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Aggregation von DEDD

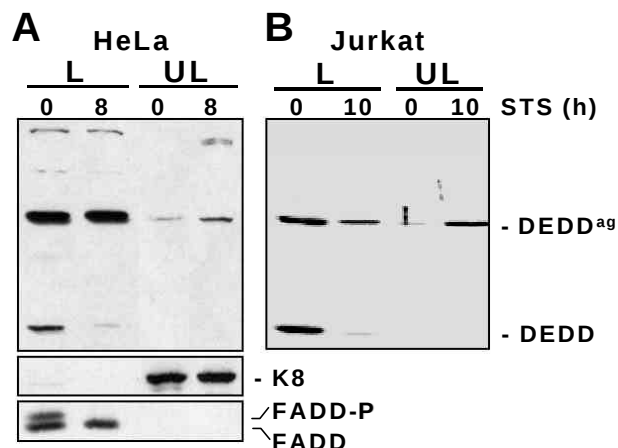


Abbildung 3.18b: DEDD^{ag} transloziert im Verlauf der Apoptose in eine Detergenz-unlösliche Fraktion. HeLa Zellen (A) oder Jurkat T-Zellen (B) wurden für die angegebene Zeit mit STS (1 µM) behandelt, lysiert und in eine Detergenz-lösliche und unlösliche Fraktion getrennt. DEDD, FADD und Keratin 8 wurden in Western Blot Analysen mit anti-DEDD1, anti-FADD und anti-K8 nachgewiesen. L, löslich; UL, unlöslich. FADD-P, phosphorylierte Form des FADD-Moleküls

unabhängig von Keratinen ist, da Jurkat Zellen keine Keratine exprimieren (vergl. Abschnitt 3.15). Das Ergebnis zeigte aber auch, daß DEDD^{ag} im Verlauf der Apoptose zunehmend unlöslich wird. Dies spiegelt wahrscheinlich die Lokalisation in den Granuli wieder. Interessanterweise wurde in isolierten Nukleoli kein DEDD^{ag} nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.08 und Daten nicht gezeigt), daher nehmen wir an, daß nur cytoplasmatisches DEDD Filamente bzw. Aggregate bilden kann.

3.19 DEDD^{ag} assoziiert mit Keratin 18

Es wurde gezeigt, daß DEDD in apoptotischen Zellen Filamente bildet, die mit dem K8/K18-Netzwerk kolokalisieren. Um auch biochemisch eine Interaktion von DEDD und Keratinen nachzuweisen, sollte zunächst das Auftreten der apoptotischen K18-Spaltfragmente analysiert und der monoklonale M30 Antikörper charakterisiert werden. Während der Apoptose wird Keratin 18 an zwei Stellen durch Caspasen gespalten: VEVD²³⁸ und DALD³⁹⁷ (Caulin et al., 1997). Intaktes K18 und ein 45 kDa-Spaltfragment, das nach der Spaltung bei D³⁹⁷ entsteht, weisen in der SDS-PAGE ein sehr ähnliches Laufverhalten auf (Caulin et al., 1997). Eine vollständige Spaltung von K18 resultiert in zwei großen (26,3 und 19 kDa) und einem kleinen Fragment (3,1 kDa). Acht Stunden nach Behandlung von MCF7(Vek und Casp-3) Zellen mit Staurosporin, konnte eine signifikante Menge des 26,3 kDa Fragments im Lysat der MCF7(Casp-3) Zellen durch einen anti-Keratin 18-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Das Epitop des Antikörpers befindet sich daher im N-terminalen Bereich des Keratins. Zur gleichen Zeit detektierte der Antikörper M30 zwei Fragmente (45 kDa und 19 kDa), die beide das Neoepitop, welches nach Spaltung von K18 an der Position D397 zugänglich wird, enthalten.

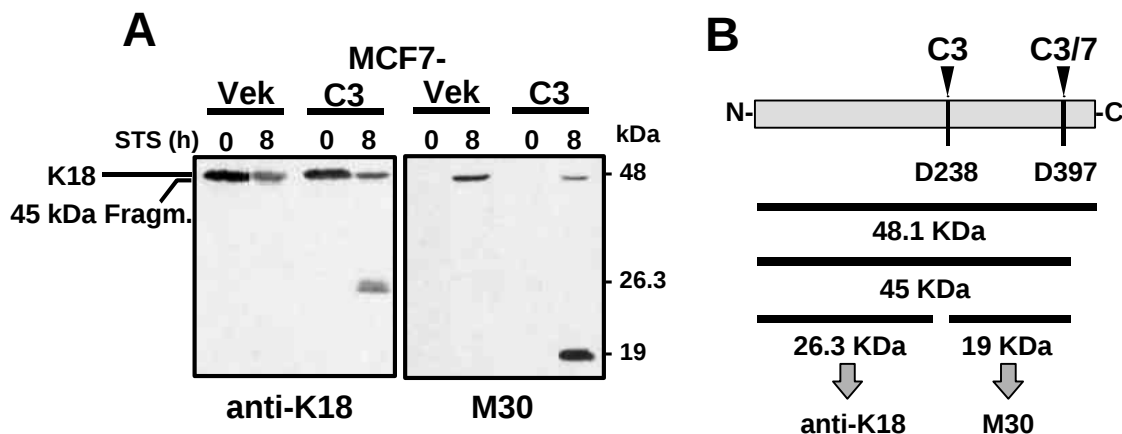


Abbildung 3.19a: Keratin 18 wird im Verlauf der Apoptose zweimal durch Caspasen gespalten. **(A)** Western Blot-Analyse von MCF7(Vek und Casp-3) Zellen, die 8 h mit STS (1 µM) behandelt wurden. Intaktes K18 und das 45 kDa-Spaltfragment weisen ein ähnliches Laufverhalten in der SDS-PAGE auf. Vek, Vektor; C3, Caspase-3. **(B)** Schematische Darstellung der Spaltung von K18 durch Caspasen.

Interessanterweise erkennt M30 auch im Lysat der Caspase-3-negativen MCF7(Vek) Zellen das 45 kDa-Spaltfragment. Dies deutet daraufhin, daß die Spaltung an Position D397 auch durch eine andere Caspase – höchstwahrscheinlich Caspase-7 – erfolgen kann. Die Spaltung an Position D238 ist hingegen zumindest in diesem System von aktiver Caspase-3 abhängig. Dem Nachweis einer Bande durch M30 in den Lysaten apoptotischer MCF7(Vek) Zellen in der Western Blot-Analyse steht das Ausbleiben einer Färbung von K18 in der Immunfluoreszenz-Analyse entgegen. Es wird daher angenommen, daß das Epitop des Antikörpers M30 in fixierten Zellen erst nach zusätzlicher Spaltung von K18 an der Position D238 zugänglich wird.

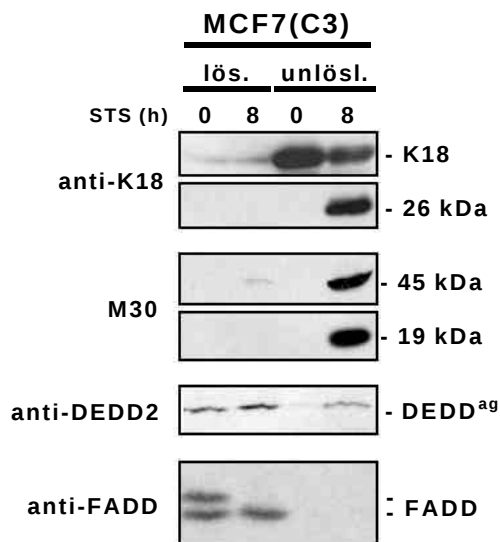


Abbildung 3.19b: Die Spaltfragmente von Keratin 18 befinden sich in der unlöslichen Fraktion von apoptotischen MCF7(Casp-3) Zellen. Die Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit STS behandelt und anschließend lösliche und unlösliche Fraktionen voneinander getrennt und mit Hilfe von anti-K18, bzw. M30 im Western Blot analysiert.

Um bestimmen zu können, ob die Spaltprodukte von K18 löslich oder unlöslich sind, wurden durch Fraktionierung von STS-behandelten MCF7(Casp-3) Zellen lösliche und unlösliche Bestandteile voneinander getrennt und mit Hilfe der Western Blot-Analyse untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die durch anti-K18 und M30 detektierten Spaltfragmente von K18 ausschließlich in der Detergenz-unlöslichen Fraktion zu finden sind, in der sich auch intaktes K18 befindet (Abb. 3.19b). Gleichzeitig wurde die Löslichkeit von DEDD^{ag} und FADD untersucht. FADD befand sich ausschließlich in der löslichen Fraktion, während ein Teil des DEDD^{ag}, wie schon zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 3.18), nach Induktion von Apoptose zusammen mit den Spaltfragmenten in der unlöslichen Fraktion auftauchte.

Bisher wurde nur Immunofluoreszenz- bzw. Elektronen-mikroskopisch eine Kolo-kalisation von DEDD und K18 beobachtet. Um biochemisch eine Interaktion von DEDD mit K18 nachweisen zu können, wurden mit Hilfe des Detergenz Empigen BB (Calbiochem) Lysate von HeLa Zellen hergestellt (siehe Abschnitt 2.24), die K18 und lösliche Spaltprodukte von K18 enthielten. Es wurde gezeigt, daß Empigen BB ca. 40% der ansonsten meist unlöslichen Keratine einer Zelle solubilisieren kann (Zhou et al., 1999). Die Zellen waren zuvor in einer Kinetik mit Etoposid (100 µM) behandelt worden. Aus den Lysaten wurden mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers Keratin 18 immunpräzipitiert, und die Menge an koimmunpräzipitiertem

und damit assoziiertem DEDD durch Western Blot-Analyse mit Hilfe der polyklonalen anti-DEDD1 und anti-DEDD2-Antikörper bestimmt (siehe Abbildung 3.19c). Als positive Kontrolle wurden zudem die koimmunpräzipitierten Spaltfragmente untersucht. Überraschenderweise war DEDD^{ag} schon in nicht-apoptotischen Zellen und nicht erst im Verlauf der Apoptose mit K18 assoziiert. Dies bedeutet, daß im Verlauf der Apoptose wahrscheinlich nicht die Interaktion mit K18 die Konformationsänderung von DEDD auslöst, die das Epitop des anti-DEDD2 Antikörpers zugänglich werden läßt. Der Nachweis der selben DEDD^{ag}-Bande durch die beiden anti-DEDD Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope des gleichen Proteins gerichtet sind, bestätigt zusätzlich, daß es sich bei der höheren Bande um eine Form von DEDD handelt.

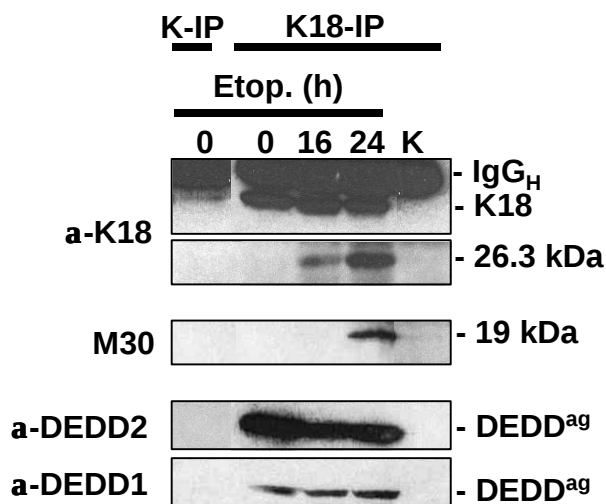


Abbildung 3.19c: DEDD assoziiert mit K18. HeLa Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit Etoposid (100 μM) behandelt und mit Hilfe von 2% Empigen BB lysiert. Aus den Lysaten wurde K18 mit dem Antikörpern anti-K18 immunpräzipitiert (IP) und danach im Western Blot mit Hilfe der links angegebenen Antikörpern untersucht. K-IP, Kontroll-IP mit Isotyp-spezifischem Antikörper. K, Kontrolle ohne Lysat. IgG_H schwere γ -Immunglobulin-Kette (IgG "heavy chain"). α , anti.

3.20 DEDD und K18 kolokalisieren zusammen mit aktiver Caspase-3 in Filamenten und Granuli

DEDD ist mit Keratin 18 assoziiert. Der Nachweis von DEDD-Filamenten erfolgte, bevor M30-Filamente eine Spaltung von K18 durch Caspase-3 anzeigten. Zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose kolokalisierte DEDD mit gespaltenem K18 und anderen IF-Proteinen in den granulären Vorläufern der apoptotischen Körperchen, für die gezeigt wurde, daß sie außerdem aktive Caspase-3 beinhalten (MacFarlane et al., 2000). Um nun zu untersuchen, ob aktive Caspase-3 auch zusammen mit DEDD und gespaltenem K18 in den vor den Granuli beobachteten Filamenten nachgewiesen werden kann, wurden MCF7(Casp-3) Zellen 4 h mit STS behandelt und anschließend mit einem Antikörper, der spezifisch aktive Caspase-3 erkennt, sowie M30 gefärbt. Die Immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse der Färbungen zeigte, daß aktive-Caspase-3 wie DEDD eine Filament-artige Lokalisation aufweist, die sich mit dem Netzwerk aus gespaltenem K18 deckt (Abb. 3.20 (A)). Während die Filamente der aktiven

Caspase-3 zu 100% mit gespaltenem Keratin kolokalisieren, sind nicht alle M30-positiven Filamente auch positiv für Caspase-3. Die Kolokalisation erstreckt sich vor allem im perinuklearen Raum. In der Zell-Peripherie konnten hingegen keine Filamente mit aktiver Caspase-3 beobachtet werden. Ein sehr ähnliches Verteilungsmuster hatten zuvor auch die DEDD-Filamente gezeigt, was auf eine Verbindung der Lokalisations der beiden Proteine hinweist.

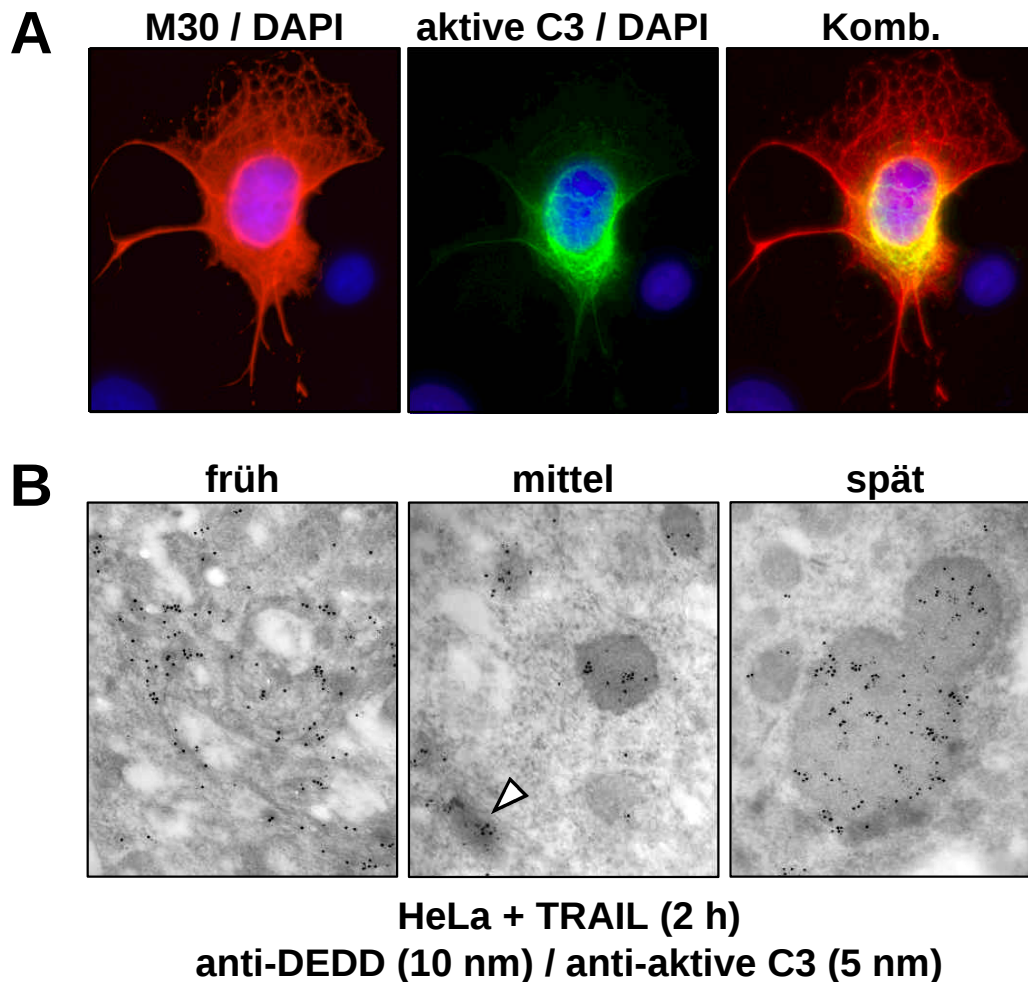


Abbildung 3.16a: Aktive Caspase-3 kolokalisiert mit gespaltenem K18 und DEDD in Filamenten und Granuli. **(A)** MCF7(Casp-3) wurden für 4 h mit Staurosporin (STS) behandelt, mit Paraformaldehyd fixiert und mit anti-aktive Caspase-3, M30 und DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Zellen Immunfluoreszenz-mikroskopisch analysiert. Komb., Kombination der beiden Färbungen. **(B)** Kolokalisation von aktiver Caspase-3 mit DEDD. EM-Aufnahmen von HeLa Zellen in unterschiedlichen apoptotischen Stadien. Die Zellen wurden 2 h mit TRAIL (1 µg/ml) behandelten fixiert, geschnitten, mit anti-aktiver Caspase-3 und anti-DEDD2 gefolgt von Immunogold gefärbt und im EM analysiert. Die Größe der unterschiedlichen Goldpartikel sind angegeben. Die Pfeilspitze zeigt Filamente an, die gerade zu Granuli zerfallen.

Die Tatsache, daß auch DEDD im Verlauf der Apoptose mit aktiver Caspase-3 kolokalisiert, konnte durch Elektronen-mikroskopische Aufnahmen gezeigt werden, die in

Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Gerald Cohen (University of Leicester, UK) entstanden (Abb. 3.20 (B)). HeLa Zellen wurden für 2 h mit 1 µg/ml TRAIL behandelt, fixiert, mit anti-DEDD2 und anti-aktive Caspase-3 gefärbt und anschließend die Lokalisation von DEDD und der Caspase Elektronen-mikroskopisch nachgewiesen. Während in Zellen mit fortgeschrittener apoptotischer Morphologie DEDD und aktive Caspase-3 in den schon beschriebenen Granuli kolokalisierten, konnte auch in Zellen, die noch eine filamentöse Färbung für DEDD aufwiesen, eine Kolokalisation gezeigt werden (Abb. 3.20 (B)). Erst kürzlich konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen eine Kolokalisation von DEDD und aktiver Caspase-3 nachgewiesen werden, bei der alle DEDD-positiven Filamente auch für Caspase-3 positiv sind und umgekehrt (Justine Lee, persönliche Kommunikation). Dies bedeutet, daß aktive Caspase-3 sich möglicherweise im Verlauf der Apoptose an DEDD anlagert oder dort aktiviert wird und sich daraufhin in direkter Nachbarschaft zu ihrem Substrat K18 befindet. Die EM-Aufnahmen legen außerdem nahe, daß die zunächst durch den Zerfall der DEDD- bzw. Keratin-Filamente entstehenden kleinen Granuli im Verlauf der Apoptose zu größeren Einschlüssen verschmelzen (Abb. 3.20 (B) und siehe Abschnitt 3.16).

3.21 Transiente Transfektion von DEDD-NLS1-3 k.o. inhibiert die Spaltung von K18

Da DEDD mit Keratin 18 assoziiert, DEDD-Filamente vor M30-Filamenten sichtbar wurden und aktive Caspase-3 mit DEDD und K18 sowohl in Filamenten als auch in Granuli kolokalisiert ist, wurde die Hypothese aufgestellt, daß DEDD die Spaltung von Keratin 18 durch Caspase-3 reguliert. Sollte diese Hypothese zutreffen, so müßte es möglich sein, durch die transiente Transfektion einer dominant-negativen Mutante von DEDD die Spaltung von Keratin 18 im Verlauf der Apoptose negativ zu beeinflussen. Da die Spaltung des Keratins im Cytoplasma stattfindet, müßte es sich dabei um eine cytoplasmatische Mutante handeln. Transient exprimiertes DEDD-NLS1-3 k.o. ist eine rein cytoplasmatische Mutante, bei der die Struktur des größten Teils des Proteins inklusive der DED intakt ist, und die zudem keine Apoptose induziert. Um unsere Hypothese zu testen, wurde daher der Effekt der cytoplasmatischen Mutante DEDD-NLS1-3 k.o. auf die K18-Spaltung untersucht. Dabei sollte der Einfluß von Zellen eliminiert werden, die zwar aufgrund der Apoptose-Induktion sterben, aber nicht mit DEDD-NLS1-3 k.o. transfiziert sind. Um dies zu erreichen, wurde ein CD8:Casp-8-Konstrukt in 293T Zellen kotransfiziert und so Apoptose nur in transfizierten Zellen induziert (siehe Abschnitt 2.38). Das CD8:Casp-8-Fusionsprotein wurde uns freundlicherweise von Dr. Michael Lenardo (NIH, Washington) zur Verfügung gestellt und ist in exprimierenden Zellen ein starker Apoptose-Stimulus: Während der Expression des Fusionsproteins kommt es zu einer Dimerisierung der Immunglobulin-Domänen von CD8, was die Aktivierung der enzymatischen Domänen der Caspase-8 durch Autoproteolyse zur Folge hat. Die induzierte Apoptose konnte im FACS anhand

der Spaltfragmente von K18, gefärbt durch M30, quantifiziert werden. Wurden steigende Mengen an DEDD-NLS1-3 k.o. kotransfiziert, nahm im gleichen Maße die M30-Positivität der transfizierten Zellen ab. Um sicherzustellen, daß dies kein Effekt reduzierter CD8:Casp-8-Expression ist, wurde in den Lysaten der transfizierten Zellen mit Hilfe eines Caspase-8-spezifischen fluorogenen Substrates die Aktivität von Caspase-8 bestimmt (Abb. 3.20).

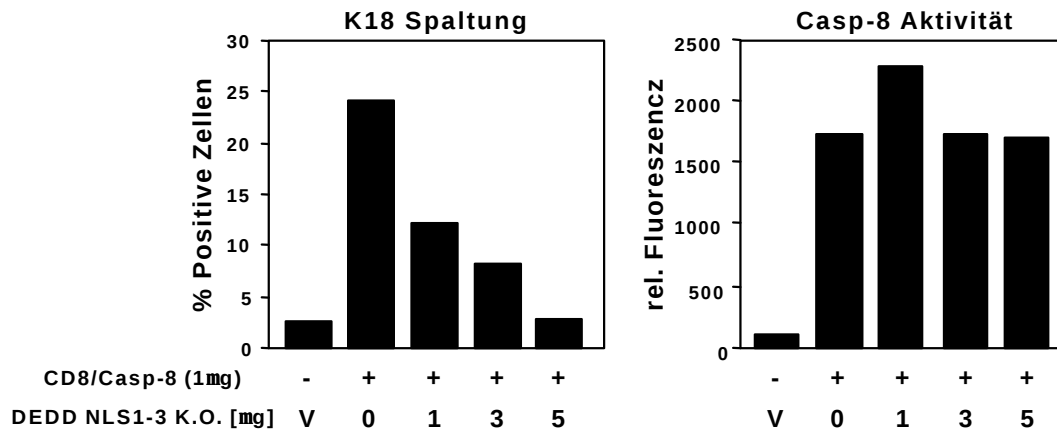


Abbildung 3.20: Die cytoplasmatische Mutante DEDD-NLS1-3 k.o. inhibiert die Spaltung von K18. 293T Zellen in 10 cm-Schalen wurden mit CD8:Casp-8 und pcDNA3 (V) bzw. steigenden Mengen des Konstruktes DEDD-NLS1-3 k.o. transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde eine Hälfte der Zellen fixiert, mit M30 gefärbt und im FACS analysiert. Die andere Hälfte wurde lysiert (TX-100) und die Aktivität der Caspase-8 mit Hilfe von spezifischen fluorogenen Peptidsubstraten fluorimetrisch bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Vorhandensein der cytoplasmatischen Mutante DEDD-NLS1-3 k.o. die Spaltung von K18 durch aktive Caspase-3 inhibiert. Diese Inhibition der Caspasen-Spaltung von K18 durch DEDD-NLS1-3 k.o. ist ein erster funktioneller Hinweis, daß endogenes DEDD die Spaltung des Keratins auch *in vivo* regulieren könnte. Zusammen mit den Immunfluoreszenz- und Elektronen-mikroskopischen Daten und den biochemischen Untersuchungen scheint es sehr wahrscheinlich, daß dies eine Funktion des Proteins DEDD ist.

4. Diskussion

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein, der Zellproliferation entgegengesetzter Prozeß, der für die Homöostase in jedem multi-zellulären Organismus vom Wurm bis zum Säugetier essentiell ist (Clarke und Clarke, 1996). Etwa 10 Milliarden Zellen eines erwachsenen Menschen sterben täglich durch Apoptose. Apoptose hilft während der Entwicklung den Körper zu formen und entfernt Zellen des Nerven- bzw. Immunsystems, die falsch verschaltet, nutzlos, veraltet oder gar schädlich für den eigenen Organismus sind (Krammer 2000; Meier et al., 2000; Yuan & Yanker, 2000). Aufgrund der fundamentalen Rolle des programmierten Zelltods für die Zell-Homöostase eines Organismus, geht eine Dysregulation dieses Prozesses mit Entwicklungsdefekten, Autoimmunkrankheiten, Neurodegenerationen oder Krebs einher (Peter et al., 1997). Um therapeutisch in solche Fehlregulationen eingreifen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die Signalwege der Apoptose zu entschlüsseln.

Die Signaltransduktion der sogenannten Todesrezeptoren, einer Familie proapoptotischer Oberflächenmoleküle der TNF-Rezeptor-Superfamilie, ist detailliert analysiert worden. Im Rahmen dieser Signalwege spielen spezialisierte Protein/Protein-Interaktionsdomänen, die in einer Vielzahl von Apoptose-Signalmolekülen identifiziert wurden, eine essentielle Rolle. Eine dieser Domänen wird als Todeseffektordomäne (DED) bezeichnet und wurde unter anderem in den Molekülen FADD und Caspase-8 identifiziert, die essentiell für die Signaltransduktion von Todesrezeptoren sind. Für alle Proteine, in deren Aminosäuresequenz man bisher durch Sequenzvergleiche eine DED identifiziert hat, konnte gezeigt werden, daß sie eine Rolle im programmierten Zelltod spielen. Eines dieser Moleküle ist das neuartige Multidomänen-Protein DEDD („**DED**-containing **D**NA-binding protein“), das wie andere Mitglieder der DED-Proteinfamilie eine funktionelle N-terminale DED besitzt (Stegh et al., 1998). DEDD ist mit einer Identität auf Protein-Ebene von 98.7% zwischen Maus und Mensch stark konserviert und seine mRNA konnte in allen getesteten Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden. Neben der DED identifizierten wir eine Prolin-reiche Region, einen C-terminalen Bereich mit Homologien zu Histonen und zwei nukleare Lokalisierungssignale (NLS). Endogenes DEDD wurde im Cytoplasma gefunden, während transient exprimiertes Protein in den Kern translozierte und sich dort in Nukleoli-artigen Strukturen anreicherte, die den für die Transkription der rDNA durch Polymerase I (Pol I) essentiellen Faktor UBF beinhalten. Rekombinantes DEDD band DNA und Mononukleosomen und inhibierte *in vitro* die Pol I-vermittelte Transkription eines Mini-rDNA-Gens. Wie für andere Mitglieder der DED-Proteinfamilie gezeigt, induzierte die Überexpression von DEDD Apoptose in 293T Zellen. Trotz der großen Ähnlichkeit der DEDs von FADD und DEDD und einer schwachen Interaktion der beiden Moleküle zu einem späten Zeitpunkt der Apoptose, ist DEDD nicht an dem Tod-induzierenden Protein-Komplex beteiligt, der sich nach Aktivierung des CD95-Rezeptors

bildet und in dem FADD eine wichtige Rolle spielt. Auch *in vitro* konnte nur eine schwache Interaktion von DEDD mit FADD oder Caspase-8 nachgewiesen werden. Daher war es wahrscheinlich, daß DEDD mit anderen DED-bindenden Proteinen interagiert und neuartige Funktionen in Kern und Cytoplasma übernimmt.

4.01 Das *dedd*-Gen

Nur Proteine, die wichtige Schlüsselpositionen in der Zellmaschinerie einnehmen, sind aufgrund des hohen Selektionsdruckes bis zu 100% identisch. Evolutionärer Selektionsdruck entsteht durch die Notwendigkeit, wichtige Interaktionen mit anderen Molekülen zu erhalten. Mit Hilfe von humanen und murinen PACs (Plasmid Artificial Chromosomes) und der PCR-Technik wurde die Exon/Intron-Struktur des *dedd*-Gens bestimmt. Die Analyse der Struktur des humanen und murinen *dedd*-Gens zeigte, daß die Genomorganisation, gekennzeichnet durch vier Exons, in beiden Spezies identisch ist. Dies unterstreicht den hohen Grad an evolutionärer Verwandtschaft des Gens in Maus und Mensch. Abbildung 4.01 zeigt einen Vergleich der beiden Gene und den Grad an Identität auf DNA-Ebene. Ein Selektionsdruck auf die zwischen den codierenden Bereichen lokalisierten Introns besteht nicht. Dies spiegelt sich in einer niedrigeren Identität der Introns in beiden Spezies wieder. Die Analyse des Gens ergab auch, daß durch alternative Spleißvorgänge eine zweite DEDD-Form entstehen kann. Diese scheint in Maus-Zellen die am stärksten exprimierte zu sein, da eine entsprechende Protein-Bande durch Western Blot-Analyse in den Lysaten der murinen Zelllinie EL-4 nachgewiesen wurde. Die mRNA der neuen Spleißform wurde aber auch durch RT-PCR in humanen T-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Identität der beiden Gene ist in jenem Bereich des Introns 3, der aufgrund alternativer Spleißvorgänge teil des humanen Exons 3 sein kann, geringer, jedoch immer noch deutlich höher als im Rest der Introns. Dies bedeutet wahrscheinlich, daß die alternative

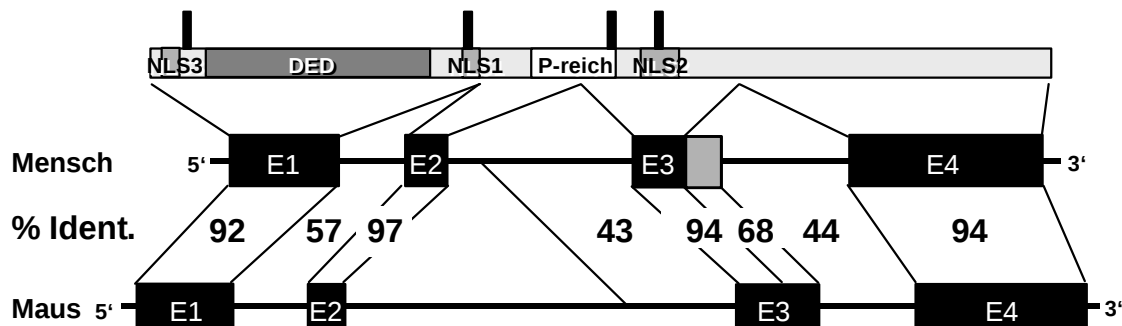


Abbildung 4.01: Schematische Darstellung der Exon/Intron-Struktur des humanen und murinen *dedd*-Gens und des DEDD-Proteins. Der Grad der Identität der Nukleotide zwischen den beiden Spezies ist angegeben. Die vertikalen schwarzen Säulen zeigen einzelne Aminosäureaustausche zwischen Maus und Mensch an. Der graue Bereich am Ende des humanen Exon 2, zeigt den Bereich des Introns 3 an, der aufgrund von alternativem Spleißen Teil des Exons sein kann.

Spleißform von DEDD neue Aufgaben übernommen hat und somit einem geringeren Selektionsdruck unterliegt. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob und wann die verschiedenen Spleißformen exprimiert werden, und welche biologische Bedeutung sie besitzen.

Die Organisation des *dedd*-Gens spiegelt die Domänen-Struktur des Proteins wieder. So ist beispielsweise für die meisten DEDs bekannt, daß sie, wie die DED von DEDD, von nur einem einzigen Exon kodiert werden (Locksley et al., 2001). Häufig sind funktionelle Domänen nur Teil eines einzigen Exons. Im Falle von DEDD gilt dies auch für alle drei identifizierten NLS, während die Prolin-reiche Region von den Exons 2 und 3 gebildet wird. Bisher konnte der Prolin-reichen Region keine Funktion zugeordnet werden, aber es wird angenommen, daß es sich dabei um einen beweglichen Abschnitt des Proteins, eine Art „Scharnier“-Region. Ähnliches ist schon für die Prolin-reichen Regionen anderer Proteinen gezeigt worden (Sansom und Weinstein, 2000). Exon 4 codiert den C-terminalen Bereich des Proteins, der Homologien zu Histonen und anderen DNA-bindenden Proteinen aufweist. Die transiente Expression verschiedener Deletionsmutanten in 293T Zellen und die Analyse ihrer Cytotoxizität anhand von DNA-Fragmentierung, sowie ihrer intrazellulären Lokalisation durch Zellfraktionierung, ergab, daß Teile des C-terminalen Bereiches von DEDD verstärkt SDS-stabile Di- und Multimere bilden (Daten nicht gezeigt). Der C-Terminus wies zudem eine DED-unabhängige Aktivität zur Apoptose-Induktion auf. Ob es sich bei dem durch Exon 4 codierten Teil des Proteins aber um eine weitere funktionelle Domäne handelt ist unklar und muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.02 Die Rolle der DED im Nukleus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß DEDD drei NLS besitzt. Transient exprimiertes Protein translozierte in den Kern, wo es sich in Nukleoli-artigen Strukturen anreicherte. Wie bereits beschrieben, löst DEDD nach Überexpression in 293T Zellen Apoptose aus. Mit Hilfe von Deletionsmutanten, die entsprechend der Exon / Intron-Struktur des *dedd*-Gens generiert und in 293T Zellen exprimiert wurden, konnte der Einfluß der verschiedenen Domänen auf die Lokalisation und Cytotoxizität von DEDD untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, daß alle drei NLS eine Translokation des Proteins in den Kern ermöglichen. Die Inaktivierung aller NLS erzeugte eine cytoplasmatische DEDD-Mutante, die keine Apoptose mehr induzierte. Wenn FADD oder Caspase-8 in Zellen überexprimiert werden, bilden sie aufgrund von homophilen Interaktionen der Todeseffektordomänen im Cytoplasma sogenannte Todeseffektor-Filamente („death effector filaments“, DEF), die Caspase-8 rekrutieren und aktivieren und dadurch Apoptose induzieren (Siegel et al., 1998). Der durch Exon 1 (N-DEDD) kodierte Bereich von DEDD, indem sich auch die DED befindet, besaß wie das vollständige Protein eine proapoptotische Aktivität und translozierte in den Kern, wo er sich in den Nukleoli anreicherte. Dies deutete auf eine Apoptose-Induktion durch die DED hin. Die DED ist eine Protein/Protein-

Interaktionsdomäne und ihre Struktur ist konserviert. Mutationen von Schlüssel-Aminosäuren der DED, für die gezeigt wurde, daß sie die Struktur und somit die Interaktionen mit DED-bindenden Proteinen stören (Eberstadt et al., 1998), resultierten in DEDD-Mutanten, die weder cytotoxisch wirkten, noch in der Lage waren sich in den Nukleoli anzureichern. Somit ist eine funktionelle DED für die proapoptotische Wirkung von DEDD verantwortlich. Sie spielt aber im Gegensatz zur DED von FADD oder Caspase-8 hauptsächlich im Nukleus eine Rolle, da sie dort ihre cytotoxische Wirkung entfaltet.

Transient transfiziertes DEDD reicherte sich nicht nur in Nukleoli-artigen Strukturen im Kern an, sondern kolokalisierte dort auch spezifisch mit aktiver Caspase-6. Ein möglicher Mechanismus für die Induktion von Apoptose durch DEDD könnte somit Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-6 analog zu der Aktivierung von Caspase-8 durch die cytoplasmatischen DED-Proteine sein. Die Überexpression von FADD resultierte in einer Aktivierung von Caspase-8 und in starkem Maße von Caspase-3, die mit Hilfe von Caspase-spezifischen fluorogenen Substraten im Cytoplasma nachgewiesen wurden. DEDD hingegen aktivierte Caspase-6 innerhalb des Nukleus. Diese Aktivierung war, wie die Apoptose-Induktion, von einer funktionellen DED abhängig, da die Expression eines DEDD-Konstrukts mit mutierter DED keine Caspasen-Aktivierung zur Folge hatte. Es ist unklar, ob DEDD Caspasen direkt über seine DED oder indirekt über andere Interaktionspartner aktiviert, oder ob die Aktivierung in den Nukleoli erfolgt oder bereits aktivierte Caspase-6 von DEDD zu den Nukleoli rekrutiert wird. Daß Caspase-6 zunächst im Cytoplasma aktiviert wird und nur die aktive Form in den Kern transloziert, scheint eher unwahrscheinlich, da nach Expression von DEDD aktive Caspase-6 zunächst nur im Kern nachgewiesen wurde.

Ein Großteil der mehr als 200 bekannten Caspasen-Substrate befindet sich im Zellkern (Thiede et al., 2001). Daher ist es wichtig zu verstehen, wie Caspasen im Kern aktiviert werden, bzw. wie aktive Caspasen in den Kern translozieren. Für eine Reihe von Caspasen wurde gezeigt, daß sie während der Apoptose im Kern auftreten können. Aktive Caspase-9 war in einigen Hirnregionen nach Ischemie-Induktion cytoplasmatisch und nuklear lokalisiert (Krajewski et al., 1999). Procaspase-2 wurde im Nukleus von nicht-apoptotischen Jurkat Zellen gefunden, die nach der Apoptose-Induktion neben aktiver Caspase-2 auch aktive Caspase-3 im Nukleus enthielten (Zhivotovsky et al., 1999). Für Caspase-1 wurde gezeigt, daß das Proenzym in HeLa Zellen nach TNF α -Stimulation mit Hilfe einer N-terminalen NLS in der Prodomäne in den Kern transloziert und dort zum aktiven Enzym prozessiert wird (Mao et al., 1998). Es existieren demnach Mechanismen im Kern, die die Aktivierung von Caspasen bewirken. Auch Caspase-6 wurde im Nukleus gefunden (Shikama et al., 2001). Eine andere Studie zeigte hingegen, daß sowohl überexprimierte als auch endogene Caspase-6 vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert ist (Orth et al., 1996). Es ist nicht bekannt, ob Caspase-6 im Cytosol aktiviert wird und anschließend

in den Nukleus transloziert oder ob sie direkt im Kern aktiviert wird. Vor kurzem ist das neuartige Todesdomänen (DD)-Protein p84N5 beschrieben worden, das nach Überexpression spezifisch nukleare Caspase-6 aktiviert und Apoptose induziert. Die Expression von p84N5 führt außerdem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Doostzadeh-Cizeron et al., 2000). Im Gegensatz zu p84N5 induziert DEDD keine NF- κ B Aktivierung (Daten nicht gezeigt) und besitzt eher eine Transkriptions-inhibitorische Aktivität. Beide Proteine aktivieren jedoch nukleare Caspase-6 über einen zur Zeit unbekannten Signalweg. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sie synergistisch an der Aktivierung der Caspase beteiligt sind oder ob sie unabhängig voneinander Caspase-6 aktivieren.

4.03 DEDD als nukleolares Protein

Überexprimiertes DEDD befindet sich in subnuklearen Strukturen, die wir als Nukleoli identifizierten (Stegh et al., 1998). Diese Aussage gründete auf der Tatsache, daß endogenes UBF, ein essentieller Faktor der Pol I-Transkription und nukleolares Protein, mit transient exprimiertem DEDD in diesen subnuklearen Strukturen kolokalisierte. Immunfluoreszenz-Färbungen von Zellen mit Hilfe des neuen polyklonalen anti-DEDD2 Antikörpers und die Analyse von mit Nukleoli angereicherten Fraktionen haben jetzt bestätigt, daß sich auch ein Teil des endogenen DEDDs im Nukleus befindet, wo es sich in den Nukleoli anreichert. Obwohl DEDD ein nukleolares Protein ist und rekombinantes DEDD *in vitro* sowohl DNA als auch rekonstituierte Mononukleosomen band, zeigten Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen von Zellen in verschiedenen Stadien der Zellteilung, daß DEDD wahrscheinlich kein essentieller Bestandteil der Nukleoli ist. Nukleares DEDD blieb während der Mitose nicht mit den Chromosomen bzw. den nukleolaren Organisationsregionen (NORs) auf den Chromosomen verbunden, die als Ausgangspunkt für die Neubildung von Nukleoli in der Telophase dienen (Roussel et al., 1996). Daher ist es unwahrscheinlich, daß DEDD bei der Neubildung von Nukleoli eine Rolle spielt. Wahrscheinlicher ist, daß ein oder mehrere nukleolare Proteine mit DEDD über dessen DED interagieren und das Protein so in die Nukleoli rekrutieren. Unterstützt wird diese Annahme von der Tatsache, daß die Mutation von Schlüssel-Aminosäuren der DED dazu führte, daß transient transfiziertes DEDD nicht mehr in den Nukleoli, sondern im nukleoplasmatischen Raum lokalisierte.

Rekombinantes DEDD konnte *in vitro* die Transkription der Pol I inhibieren. Durch Untersuchungen der Transkriptionsaktivität in intakten Zellen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, daß DEDD spezifisch die Transkription der Pol I in den Nukleoli inhibiert, während die Aktivität der DNA-Polymerase II nicht beeinträchtigt wurde. Dadurch wurde unsere ursprüngliche Annahme, daß DEDD aufgrund seiner starken DNA-Bindung generell Transkription inhibiert, nicht bestätigt. Die Transkriptionshemmung durch DEDD scheint von einer funktionellen

DED abhängig zu sein, da auch N-DEDD die Pol I-abhängige Transkription inhibierte. Nicht klar ist, ob eine direkte Interaktion nukleolarer Proteine mit einer funktionellen DED notwendig sind, um Pol I zu inhibieren. DEDD-Konstrukte mit mutierter DED lokalisieren nicht mehr in den Nukleoli, so daß die räumliche Trennung von der Transkriptionsmaschinerie keine Inhibition mehr zulassen würde. Demnach ist die DED zumindest für die Anreicherung in den Nukleoli, wenn nicht sogar für eine direkte Inhibition der rDNA-Transkription verantwortlich. Da die Inhibition auch in Gegenwart des universellen Caspasen-Inhibitors zVAD-fmk zu beobachten war, scheint sie Caspasen-unabhängig zu sein. Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, daß DEDD auch *in vivo* die Transkription von rDNA moduliert.

Die Nukleoli wurden lange Zeit nur als Ort der rDNA-Transkription angesehen. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, daß sie auch aktiv an apoptotischen Prozessen teilnehmen. So ist beispielsweise ein signifikanter Teil von nicht-aktiviertem p53 in Nukleoli lokalisiert, wo es wahrscheinlich die transkriptionelle Aktivität der Polymerase überwacht, um so schnell auf Schädigungen der rDNA reagieren zu können (Rubbi und Milner, 2000). Der für die Pol I-abhängige Transkription essentielle Faktor UBF läßt sich in apoptotischen Zellen im Gegensatz zu anderen nukleolaren Proteinen wie Nukleophosmin (B23) oder Nukleolin (C23) nicht mehr in den Nukleoli nachweisen. Es wird angenommen, daß dies eine Folge der Degradation von UBF ist, da gezeigt wurde, daß UBF früh im Verlauf der Apoptose von Caspasen gespalten wird (Casiano et al., 1996; Torres-Montaner et al., 2000). Es wurde aber auch gezeigt, daß UBF in apoptotischen Zellen in gewundenen fibrogranularen Körpern lokalisiert ist, während B23, C23, und Fibrillarin in den Mikronuklei verblieben (Martelli et al., 2000). Die Relokalisation und die Spaltung von UBF durch Caspasen könnte somit ein Mechanismus sein, rDNA-Transkription zu inhibieren. Es ist nicht verwunderlich, daß im Laufe der Evolution Mechanismen zur Abschaltung Energie-verbrauchender Prozesse Teil des apoptotischen Programmes wurden. Auch die Tatsache, daß höhere ATP-Konzentrationen Apoptose begünstigen, während niedrige ATP-Konzentrationen zu Nekrose führen (Leist et al., 1997; Egushi et al., 1997), unterstreicht die Notwendigkeit solcher Mechanismen. So führt beispielsweise die Spaltung von RF-C140, einem wichtigen Teil des DNA-Replikationskomplexes, zum Zellzyklus-Arrest (Rheaume et al., 1997; Ubeda et al., 1997; Song et al., 1997) und auch die Protein-Biosynthese wird durch Degradation der 28S-rRNA im Ribosom abgeschaltet (Houge et al., 1995).

Der Mechanismus der Transkriptionshinhibition durch DEDD ist bisher unklar. Folgende Modelle sind denkbar: Entweder interagiert DEDD über seine DED mit Proteinen, die ihrerseits die Transkription regulieren, oder DEDD bindet in den Nukleoli an die rDNA und blockiert dadurch die Transkriptionsmaschinerie. Es ist bekannt, daß DEDD sehr stark DNA bindet (Stegh et al., 1998). Es konnte zudem gezeigt werden, daß auch rekombinantes N-DEDD DNA bindet, und diese Bindung nicht von einer funktionellen DED abhängig ist. Ein anderer möglicher

Mechanismus zur Inhibition der rDNA-Transkription basiert auf einer direkten Interaktion von DEDD und UBF. Dieses Protein ist ein möglicher Interaktionspartner von DEDD im Nukleolus, da beide in mit DEDD transfizierten Zellen kolokalisiert sind. DEDD verläßt ebenso wie UBF im Verlauf der Apoptose die Nukleoli. Ob DEDD eine Translokation von UBF bewirkt, könnte durch Koimmunpräzipitationen von DEDD und UBF gezeigt werden. Da überexprimiertes DEDD nicht nur mit UBF, sondern auch mit aktiver Caspase-6 im Nukleus kolokalisierte, könnte schließlich auch durch DEDD rekrutierte aktive Caspase-6 UBF spalten und somit einen essentiellen Initiationsfaktor der Pol I-vermittelte rDNA-Transkription inaktivieren. Welche Caspase UBF im Verlauf der Apoptose spaltet, ist bisher nicht bekannt. Eine Spaltung durch Caspase-6 könnte daher in weiteren Experimenten, beispielsweise mit Hilfe von spezifischen Caspase-6-Inhibitoren, nachgewiesen werden. Dies scheint zunächst ausgeschlossen, da DEDD auch in Gegenwart des universellen Caspasen-Inhibitors zVAD-fmk die Transkription der rDNA inhibierte. Die Inhibition von Caspase-6 durch zVAD-fmk wurde jedoch als nicht sehr effektiv beschrieben (Garcia-Calvo et al., 1998).

4.04 DEDD und DEDAF interagieren im Nukleus

Unsere Studien zeigen, daß die DED von DEDD nicht nur eine reine Interaktionsdomäne zur Weiterleitung des apoptotischen Signals ist, sondern darüber hinaus eine Vielzahl von Eigenschaften besitzt, die vorwiegend im Nukleus eine Rolle spielen. DEDD benötigt eine funktionelle DED, um proapoptotisch zu wirken, sich im Nukleolus anzureichern und Caspase-6 im Nukleus bzw. Nukleolus zu aktivieren. Der N-terminale Bereich mit der DED kann außerdem die Pol I-abhängige Transkription inhibieren und DNA binden. All dies macht die DED von DEDD zu einer außergewöhnlichen multifunktionellen Domäne, deren Wichtigkeit von einer 100%igen Konservierung zwischen den Spezies Maus, Ratte, Rind und Mensch noch unterstrichen wird.

Die DED ist eine Protein/Protein-Interaktionsdomäne, daher sind die Eigenschaften der DED von DEDD höchstwahrscheinlich darauf zurück zu führen, daß DEDD mit ihrer Hilfe im Nukleus mit anderen Proteinen interagiert. Eines dieser Proteine ist der DED-assoziierte Faktor DEDAF. Koimmunpräzipitationen und Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der im Kern koexprimierten Proteine zeigten, daß DEDAF, der selber keine DED besitzt, über einen nicht-homotypischen Mechanismus mit DEDD interagiert, aber nicht an eine DEDD-Mutante bindet, deren DED strukturell gestört ist. Die Identität zwischen humanem und murinem DEDAF-Protein beträgt wie beim DEDD-Protein 98,7%. Dies bedeutet, daß ein gleich hoher Selektionsdruck auf den beiden Interaktionspartnern lastet, und daß diese Interaktion somit möglicherweise für den Organismus von großer Wichtigkeit ist. RYBP, das murine DEDAF-Homolog, wurde wie DEDD als Transkriptionsinhibitor beschrieben (Garcia et al., 1999). Stabil transfiziertes DEDAF befindet sich wie endogenes DEDD im Cytoplasma, während transient

exprimiertes Protein in den Kern transloziert. DEDAF interagiert mit verschiedenen DED-Proteinen, wie FADD, Procaspase-8 und Procaspase-10, die vorwiegend im Cytoplasma zu finden sind (Zheng et al., 2001). Außerdem förderte es die Bildung des CD95-DISC in stabil transfizierten Zellen und verstärkte die Todesrezeptor-vermittelte, sowie die DED-vermittelte Apoptose (Zheng et al., 2001). Mit Hilfe verschiedener DEDAF-Deletionsmutanten konnte zudem gezeigt werden, daß immer der gleiche Bereich des Proteins mit den verschiedenen DEDs wechselwirkt. Es ist denkbar, daß DEDAF als Vermittler zwischen Cytoplasma und Nukleus sowohl die verschiedenen Funktionen von DEDD im Kern reguliert, als auch eine direkte Verbindung von DEDD zur cytoplasmatischen bzw. Membran-nahen Todesrezeptor-vermittelten Apoptose herstellt. Der genaue Mechanismus der Interaktion der beiden Proteine ist jedoch noch ungeklärt. Durch weitere Untersuchungen, zum Beispiel mit stabil exprimierenden DEDD-, DEDAF- oder Doppel-Transfektanten, könnten neue Erkenntnisse über diese Verbindung der cytoplasmatischen und nuklearen Ereignissen der Apoptose gewonnen werden.

4.05 DEDD bildet Aggregate

Geringe Mengen des endogenen DEDD sind nukleolar lokalisiert, der weitaus größere Teil des zellulären DEDD wurde jedoch im Cytoplasma nachgewiesen. Da DEDD über drei funktionelle NLS verfügt, bedeutet dies, daß beim überwiegenden Teil der DEDD-Moleküle die NLS maskiert und für die Kerntransport-Maschinerie unzugänglich sind. Aufgrund der Eigenschaften von DEDD ist es wahrscheinlich, daß die Maskierung der NLS entweder durch Bindung an ein bisher unbekanntes cytoplasmatisches Protein, oder durch homophile Interaktion mit anderen DEDD-Molekülen erfolgt. Für letzteres spricht, daß DEDD eine Tendenz zur Selbst-Aggregation besitzt. Wie bereits beschrieben, bildet rekombinantes DEDD mit DNA unlösliche Komplexe (Stegh et al., 1998), wobei der C-terminale Bereich des Proteins für diese Aggregation verantwortlich zu sein scheint. Darüber hinaus bilden C-terminale DEDD-Mutanten verstärkt SDS-stabile Di- und Multimere in transient transfizierten 293T Zellen (Daten nicht gezeigt) und rekombinantes N-DEDD bindet zwar DNA, aggregiert aber nicht zu unlöslichen Komplexen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden auch SDS-stabile Aggregate, wahrscheinlich Dimere, von endogenem DEDD (DEDD^{ag}) biochemisch nachgewiesen. DEDD^{ag} repräsentiert einen Großteil – in einigen Zelllinien sogar fast die gesamte Menge – des in cytoplasmatischen Extrakten von verschiedenen Zelllinien nachgewiesenen DEDD-Proteins. Daher scheint es wahrscheinlich, daß DEDD durch Aggregation bzw. Oligomerisierung seine eigene Translokation durch Maskierung der NLS blockiert. Interessanterweise wurde in den Fraktionen, in denen nukleolare Proteine angereichert waren, nur nicht-aggregiertes DEDD nachgewiesen (vergl. Abschnitt 3.08 und Daten nicht gezeigt). Die Selbst-Aggregation scheint demnach im Nukleus inhibiert oder nur im Cytoplasma möglich zu sein.

Der neue polyklonale Antikörper anti-DEDD2 ermöglichte es, endogenes DEDD Immunfluoreszenz- und Elektronen-mikroskopisch darzustellen. Dabei kann in nicht-apoptotischen Zellen nur das nukleolare DEDD, nicht aber das cytoplasmatisch lokalisierte Protein nachgewiesen werden. Das Epitop, das durch den anti-DEDD2 Antikörper erkannt wird, ist demnach in nicht-apoptotischen Zellen kaum zugänglich. Dieses Epitop besteht aus 16 AS, die inmitten der Sequenz der DED des DEDD-Proteins liegen und so gewählt wurden, daß trotz der Homologie der DEDs verschiedener Proteine, der Antikörper nur DEDD erkennt. Es ist anzunehmen, daß die Dimerisierung cytoplasmatischen DEDDs neben den NLS auch die DED in nicht-apoptotischen Zellen maskiert. Dies ändert sich jedoch nach Apoptose-Induktion, woraufhin die DED für anti-DEDD2 zugänglich wird. Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen mit Hilfe des anti-DEDD2 Antikörpers zeigten, daß DEDD im Verlauf der Apoptose im Nukleus zunehmend weniger nachgewiesen werden konnte, während im Cytoplasma DEDD in Filamenten sichtbar wurde, die an Intermediärfilamente (IF) erinnerten. Dabei ist unklar, ob DEDD den Nukleus verläßt, oder ob es sich nur im Nukleoplasma verteilt und die geringe Dichte an DEDD-Molekülen nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Der für die ursprüngliche Charakterisierung von DEDD verwendete polyklonale Antikörper anti-DEDD1 (Stegh et al., 1998) ist gegen ein Peptid in der Prolin-reichen Region gerichtet. Er ist nicht in der Lage, endogenes DEDD in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Analysen nachzuweisen, detektiert jedoch transient exprimiertes Protein. Dies bedeutet, daß das Epitop in der Prolin-reichen Domäne in endogenem DEDD maskiert, in transfiziertem DEDD aber zugänglich ist. DEDD ist ein stark exprimiertes Protein (Stegh et al., 1998), daher ist es unwahrscheinlich, daß seine endogene Konzentration unterhalb der Detektionsschwelle des Antikörpers liegt. Die Struktur des endogenen und transfizierten Moleküls ist demnach unterschiedlich, was noch durch die ausschließlich nukleare Lokalisation und einer verringerten Selbst-Aggregation des transfizierten DEDDs unterstrichen wird. Wahrscheinlich besitzt die Prolin-reiche Region des endogenen Proteins eine besondere Faltung, die die Bindung von anti-DEDD1 verhindert. Tatsächlich weist der Antikörper das denaturierte Protein in der Western Blot-Analyse nach. Im Gegensatz zur DED, die nach Induktion von Apoptose aufgrund einer Konformationsänderung von DEDD durch anti-DEDD2 Immunfluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen werden kann, erkennt anti-DEDD1 die Prolin-reiche Region auch in apoptotischen Zellen nicht. Beide Antikörper erkennen jedoch im Western Blot die selben DEDD, bzw. DEDD^{ag}-Banden und bestätigen somit die Existenz der beiden DEDD-Formen.

Kofärbungen von DEDD und Keratinen zeigten, daß die im Verlauf der Apoptose mit Hilfe des anti-DEDD2 Antikörpers nachgewiesenen DEDD-Filamente mit dem Keratin 8/18-Netzwerk kolokalisieren. Zudem wurde durch Koimmunpräzipitation gezeigt, daß DEDD^{ag} schon in nicht-apoptotischen Zellen mit K18 assoziiert ist. Dies bedeutet, daß DEDD auch ohne apoptotischen

Stimulus mit dem K8/K18-Netzwerk interagiert. Wird die Zelle apoptotisch, kommt es zu einer Konformationsänderung des aggregierten DEDD und die DED wird für anti-DEDD2 zugänglich, der daraufhin DEDD^{ag} entlang des K8/K18-Netzwerkes nachweist (K8/K18/DEDD-Filamente). Abbildung 4.05 zeigt eine schematische Darstellung dieser Vorgänge.

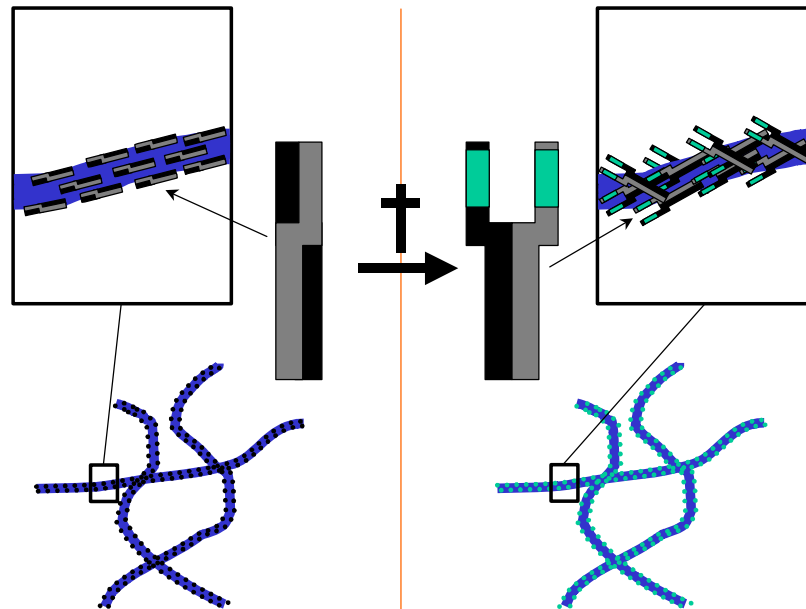


Abbildung 4.05: Schematische Darstellung des Modells zur Konformationsänderung von DEDD^{ag} im Verlauf der Apoptose. **Links:** Cytoplasmatisches DEDD bildet zunächst Homo-Dimere (DEDD^{ag}, grau und schwarz). Diese assoziieren mit K18, einem Bestandteil des K8/K18-Netzwerkes (blau). Die DED des DEDD-Proteins ist aufgrund der Oligomerisierung nicht zugänglich. **Rechts:** Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einer Konformationsänderung und einer weiteren Aggregation von DEDD-Molekülen, bzw. Bildung von Komplexen höherer Ordnung. Dabei wird die DED (hellgrün) zugänglich und kann durch den polyklonalen Antikörper anti-DEDD2 nachgewiesen werden.

Die Konformationsänderung von DEDD im Verlauf der Apoptose ist nicht von der Expression oder der Interaktion mit Keratinen abhängig, da auch in Zellen, die diese IF-Proteine nicht exprimieren, DEDD nach Induktion von Apoptose durch anti-DEDD2 nachgewiesen werden konnte. In apoptotischen K8/K18-negativen SW13 Zellen wurde DEDD in granulären, lokal begrenzten Strukturen im Cytoplasma nachgewiesen. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Aggregate bzw. Komplexe höherer Ordnung. Ihre Bedeutung in K8/K18-negativen Zellen ist bisher unklar, sie zeigt aber, daß DEDD neben der Keratin-Bindung noch weitere Funktionen besitzt, und daß diese nicht auf die einfachen Keratin-exprimierenden epithelialen Gewebe beschränkt sind. Ebenfalls ungeklärt ist die Beziehung von DEDD und Vimentin, einem weiteren IF-Protein: In HeLa-Zellen wurde neben einer Kolo-kalisation mit Keratinen, auch eine Kolo-kalisation mit Vimentin beobachtet. Beide IF-Systeme sind in diesen Zellen allerdings in ähnlichen Strukturen lokalisiert. Da außerdem in den K8/K18-negativen SW13 Zellen trotz der

Expression von Vimentin (Daten nicht gezeigt) keine Filament-artige Färbung von DEDD durch anti-DEDD2 beobachtet wurde, scheint Vimentin keinen größeren Einfluß auf die Lokalisation von DEDD zu haben. Koimmunpräzipitationsexperimente von Vimentin und DEDD könnten die Frage nach einer Interaktion der beiden Proteine beantworten.

4.06 DEDD und seine Rolle bei der Spaltung von Keratin 18

Es ist schon länger bekannt, daß die Caspasen-Spaltungen von IF-Proteinen im Verlauf der Apoptose für die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen mitverantwortlich sind. So führt die Spaltung von Lamin A und B, den Hauptbestandteilen der Kernlamina, zum Kollaps der Kernarchitektur (Rao et al., 1996). Auch Keratine durchlaufen während der Apoptose eine dramatische Reorganisation von einem filamentösen Netzwerk hin zu intrazellulären Granuli (Caulin et al., 1997). In K8-defizienten Mäusen führt der Verlust eines Proteins der K8/K18-Filamente zum Verlust des kompletten Netzwerkes. Neuere Untersuchungen mit Hilfe dieser Mäuse stellten eine direkte Verbindung von Keratinen zur Todesrezeptor-vermittelten Apoptose her. So zeigten epitheliale Zelllinien, die vom Endoderm und den Milchdrüsen K8-negativer Mäuse abstammen, eine höhere Sensitivität gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose (Caulin et al., 2001). K8-negative primäre Hepatozyten waren hingegen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sensibler (Gilbert et al., 2001). Es wird vermutet, daß Keratine den Transport von CD95-Molekülen vom Golgi zur Zellmembran und dort die Verteilung des Rezeptors regulieren können (Gilbert et al., 2001). Dies setzt jedoch eine Interaktion mit Mikrotubuli (Vesikeltransport) und Aktin-Filamenten (Organisation von Oberflächen-Molekülen) voraus, die noch wenig charakterisiert sind. Zusammenfassend legen diese Studien nahe, daß Keratine als Strukturproteine nicht nur rein für die morphologischen Veränderungen während der Apoptose mitverantwortlich sind, sondern daß sie darüber hinaus Sensitivität und Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose regulieren.

Im Gegensatz zu K8, wird K18 im Verlauf der Apoptose von Caspasen gespalten. DEDD^{ag} assoziiert mit K18. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers M30, der spezifisch ein Neopepitop nachweist, das nach Caspase-3-vermittelter Spaltung von K18 an Position D397 entsteht, konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß DEDD nicht nur mit K8 und intaktem K18, sondern auch mit gespaltenem K18 kolokalisiert ist. Die Konformationsänderung von DEDD, die durch intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbungen mit Hilfe des anti-DEDD2 Antikörpers nachgewiesen wurde, ging dabei der Spaltung von K18, detektiert durch M30, voraus. Weitere Untersuchungen mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch aktive-Caspase-3 nachwies, zeigten zudem, daß auch aktive Caspase-3 mit DEDD und den Filamenten kolokalisierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Modell konstruiert, indem DEDD die Spaltung von K18 durch Caspase-3 reguliert (Abb. 4.06). Dieses Modell schlägt vor, daß DEDD nach der Konformationsänderung Caspase-3 zu ihrem

Substrat K18 rekrutiert und dadurch dessen Spaltung ermöglicht. Wie auch schon bei der Rekrutierung von Caspase-6 im Nukleus ist bisher unklar, ob Procaspase-3 an DEDD bindet und daraufhin aktiviert wird, oder ob die Aktivierung unabhängig von DEDD erfolgt und sich erst die aktive Protease anlagert. Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen von Procaspase-3 im Verlauf der Apoptose könnten helfen, dies aufzuklären. Es ist bekannt, daß einige potentielle Caspase-3 Substrate trotz Konsensus-Spaltstelle (z. B. DEVD) nicht gespalten werden. Es wird vermutet, daß die Anwesenheit eines „Klappen-artigen Ringes“ in der Tertiär-Struktur von aktiver Caspase-3 das Andocken an diese potentiellen Substrate sterisch verhindert (Earnshaw et al., 1999). In diesem Zusammenhang könnte DEDD als Plattform („Scaffold“-Protein) die Interaktion von Caspase-3 mit K18 ermöglichen oder zumindest fördern. Weiterhin ist nicht bekannt, ob Caspase-3 direkt mit DEDD interagiert (wie in der Abb. 4.06 dargestellt) oder ob ein anderes Protein als Adapter fungiert. Zukünftige Untersuchungen, beispielsweise mit Hilfe von Immunpräzipitationen von DEDD oder Caspase-3, müssen zeigen, ob und wenn ja, welche anderen Proteine an dem Komplex beteiligt sind.

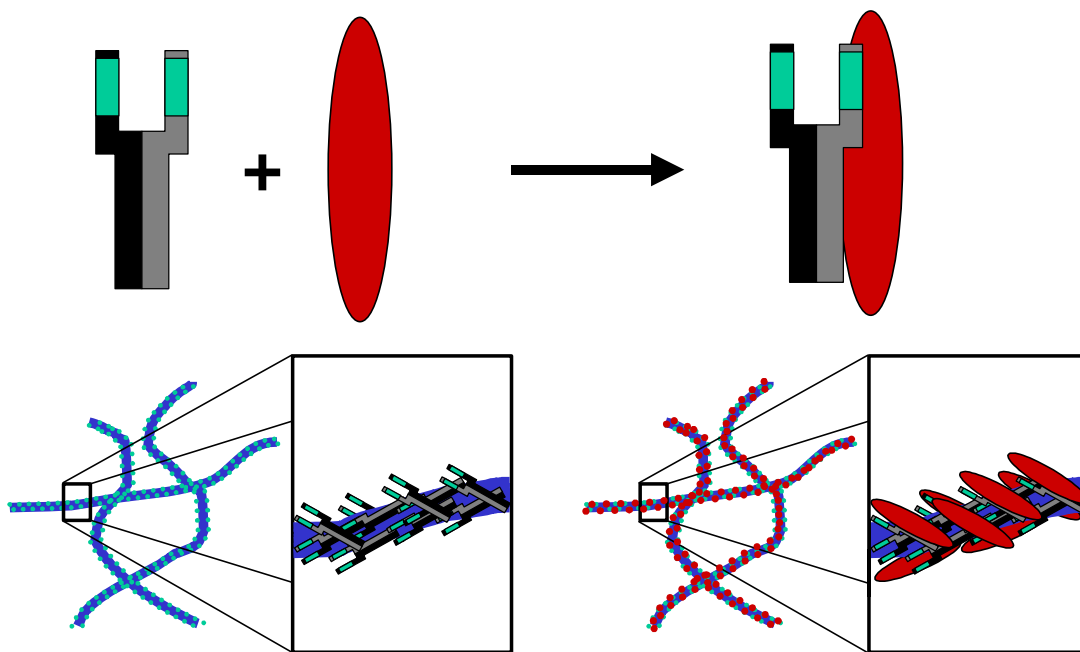


Abbildung 4.06: Caspase-3 (rot) bindet nach dessen Konformationsänderung an DEDD^{ag}. Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einer Konformationsänderung und weiteren Aggregation von DEDD-Molekülen entlang des K8/K18-Netzwerkes. Dies ermöglicht Caspase-3, sich an DEDD (und K18) anzulagern und nachfolgend K18 zu spalten. Unklar ist, ob sich aktive Caspase-3 oder Procaspase-3, die anschließend aktiviert wird, anlagert

Unklar ist auch, ob die DED bei der Rekrutierung (und eventuell auch Aktivierung) der Caspase-3 eine Rolle spielt. Zumindest im Zellkern war eine funktionelle DED für die Aktivierung und Kolokalisation von transient transfiziertem DEDD und aktiver Caspase-6 essentiell. Es ist

bisher aber weder für Caspase-6 noch Caspase-3 beschrieben worden, daß sie mit DED-Proteinen interagieren. Nur für die Caspasen 8 und 10, den Mitgliedern der DED-Proteinfamilie, wurde bisher gezeigt, daß sie an andere DED-Proteine binden können (Peter et al., 1999). Für Caspase-8 wurde außerdem gezeigt, daß sie im Überexpressions-System an die Todeseffektor-Filamente (DEF) bindet und daraufhin, wahrscheinlich aufgrund einer lokal erhöhten Caspase-8 Konzentration, autoproteolytisch aktiviert wird (Siegel et al., 1998; Muzio et al., 1998). Die DEF, die nach der Überexpression der DED von FADD und Caspase-8 beobachtet wurden, sind Filament-förmige, Cytoskelett-artige, Detergenz-unlösliche cytoplasmatische Strukturen (Siegel et al., 1998). Diese Eigenschaften haben sie mit den K8/K18/DEDD-Filamenten gemein. Allerdings gibt es auch Unterschiede: DEF wurden bisher lediglich in Überexpressionsexperimenten nachgewiesen und kolokalisierten in HeLa Zellen nicht mit Vimentin, wie es für die DEDD-Filamente beobachtet wurde. Die K8/K18/DEDD-Filamente scheinen zudem, im Gegensatz zu den DEF, keine Caspase-8 zu rekrutieren. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob DEF auch Caspase-3 (oder 6) rekrutieren können. Eine Kolokalisation der DEF mit dem Keratin-Netzwerk wurde bisher ebenfalls nicht überprüft. Insgesamt deuten die bisherigen Beobachtungen allerdings daraufhin, daß es sich bei DEF und Keratin-Netzwerk um voneinander unabhängige Strukturen handelt.

Einen ersten funktionellen Hinweis darauf, daß DEDD die Spaltung von K18 durch Caspase-3 reguliert, lieferte die transiente Expression der cytoplasmatischen Mutante DEDD-NLS1-3 k.o. in Zellen, in denen durch Kotransfektion des CD8:Caspase-8-Konstruktes Apoptose induziert wurde. Die Spaltung des Keratins 18 wurde durch ansteigende Mengen transient exprimierten DEDD-NLS1-3 k.o. zunehmend inhibiert. Zur gleichen Zeit blieb die Aktivität der Caspase-8 unverändert hoch. Dies bedeutet, daß DEDD-NLS1-3 k.o. nicht die Initiator-Caspase inhibiert oder die Expression des CD8:Caspase-8-Konstruktes herunter reguliert. Der genaue Mechanismus der Inhibition ist jedoch nach wie vor unklar. Es ist wahrscheinlich, daß die Mutante mit einem der drei an dem Modell zur K18-Spaltung beteiligten Moleküle (DEDD, Caspase-3 oder K18) interagiert und dadurch die Spaltung inhibiert. Transient exprimiertes DEDD-NLS1-3 k.o. wurde bisher nur diffus im Cytoplasma und nicht in Filamenten nachgewiesen. Daher ist eine Interaktion mit dem K8/K18-Netzwerk eher unwahrscheinlich. Die Mutante besitzt eine intakte DED, induziert aber keine Apoptose, d.h. die Expression des Proteins aktiviert keine Caspase. Mit Hilfe Caspase-3-defizienter MCF7 Zellen wurde gezeigt, daß das Protein α -Fodrin im Verlauf der Apoptose nur durch Caspase-3 und nicht durch eine andere Caspase gespalten wird (Jänicke et al., 1998). Daher könnte eine Untersuchung der Spaltung von α -Fodrin in apoptotischen Zellen, die zuvor mit DEDD-NLS1-3 k.o. transient transfiziert wurden, zeigen, ob die Aktivität der Caspase-3 insgesamt durch die Mutante inhibiert wird. Aufgrund der Eigenschaften von DEDD, insbesondere seiner Tendenz zur Selbst-Aggregation, ist davon auszugehen, daß DEDD-NLS1-3 k.o. mit dem endogenen DEDD interagiert und dessen Assoziation an K18 stört, so daß es nach

Apoptose-Induktion nicht zu einer Spaltung von K18 durch Caspase-3 kommt. Um den genauen Mechanismus aufzuklären, könnten stabile DEDD-NLS1-3 k.o. Transfektanten (z.B. in HeLa Zellen), ein wichtiges Hilfsmittel darstellen. Diese würden es erlauben, Proteine, die mit der Mutante interagieren, durch Koimmunpräzipitationen zu identifizieren.

In den Immunfluoreszenz-Färbungen von gespaltenem K18 und DEDD bzw. aktiver Caspase-3 waren nicht alle M30-positiven Filamente mit dem jeweiligen anderen Protein kolokalisiert. Die DEDD- und Caspase-3-positiven Filamente, die hingegen eine völlige Übereinstimmung zeigten (Justine Lee, persönliche Kommunikation), wurden vor allem im perinuklearen Raum nachgewiesen, während in der Zell-Peripherie nur Keratin gefärbt wurde. Der Nachweis der Proteine in fixierten Zellen zeigt nur eine Momentaufnahme, die Intermediärfilamente *in vivo* unterliegen jedoch dynamischen Prozessen (Chou und Goldmann, 2000). Daher ist es denkbar, daß gespaltenes K18 bevorzugt zur Zell-Peripherie transportiert wird und deshalb nicht mehr mit DEDD oder Caspase-3 kolokalisiert ist. Diese Hypothese ließe sich durch mikroskopische Zeitraffer-Videoaufnahmen („time-lapse video-microscopy“) von fluoreszenz-markiertem gespaltenem K18 überprüfen. Da vermutet wird, daß Mikrotubuli, sowie die Motorproteine Kinesin (Transport zur Peripherie) und Dynein (Transport Richtung Nukleus) an der Dynamik der IF-Proteine beteiligt sind (Chou und Goldmann, 2000), könnten auch Inhibitoren von Kinesin und Dynein zeigen, ob gespaltenes K18 transportiert wird. Es ist bekannt, daß *in vitro* verschiedene Dynein- und Kinesin-Antikörper, sowie 5'-Adenylylimido-Diphosphat (AMP-PNP, ein Kinesin-Inhibitor) oder Vanadat (Dynein-Inhibitor) die Funktion der Motorproteine inhibieren können (Bananis et al., 2000). Diese könnten daher auch in permeabilisierten Zellen helfen, die Dynamik der Keratin-Spaltfragmente zu analysieren.

4.07 Die Auswirkungen der Keratin-Spaltung

Im Verlauf der Apoptose zerfallen die Keratin-Filamente und bilden kleine spheroiden Granuli, die zu größeren Einschlüssen verschmelzen. Die Desintegration der Filamente erfolgt, bevor der Zellkern morphologische Veränderungen aufweist und geht mit der Phosphorylierung und der Spaltung von Keratin 18 einher (Caulin et al., 1997). Unklar ist bisher, welchen Einfluß die Phosphorylierung auf die Spaltung und Desintegration der K8/K18-Filamente ausübt. Durch verschiedene Immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen und mit Hilfe Elektronen-mikroskopischer Aufnahmen, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Gerald Cohen (University of Leicester, UK) entstanden, konnte gezeigt werden, daß die Granuli neben K8 und K18 auch DEDD enthalten. Außerdem befinden sich in den Einschlüssen aktive Caspase-3 und 7 (MacFarlane et al., 2000), sowie Vimentin. Ursprünglich wurde postuliert, daß die NLS des cytoplasmatischen DEDDs im Verlauf der Apoptose demaskiert werden und das Protein daraufhin in den Nukleus transloziert (Stegh et al., 1998). Da endogenes DEDD durch anti-

DEDD1 Immunfluoreszenz-mikroskopisch nicht dargestellt werden konnte, basierte diese Annahme auf der Tatsache, daß DEDD nach Apoptose-Induktion in einer Fraktion nachgewiesen wurde, in denen nukleare Proteine angereichert waren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß jene Fraktion neben nuklearen Proteinen auch unlösliche cytoplasmatische Moleküle, beispielsweise IF-Proteine, enthielt. Der Nachweis von DEDD und speziell DEDD^{ag}, in der unlöslichen Fraktion apoptotischer Zellen, spiegelt daher die Entstehung unlöslicher Aggregate und Granuli wieder und nicht, wie zuvor vermutet, eine Translokation des Proteins in den Nukleus.

Apoptotische Zellen zeigen eine Reihe von charakteristischen strukturellen Veränderungen, zu denen die Chromatin-Kondensation, die Fragmentierung des Nukleus, die Zeiose, sowie die Bildung apoptotischer Körperchen zählen (Wyllie et al., 1980). Einige der Aufnahmen DEDD-positiver Granuli zeigen, daß sich diese in Membran-Ausstülpungen auf der Zelloberfläche befinden, die möglicherweise als apoptotische Körperchen abgeschnürt werden. Die Abschnürung apoptotischer Körperchen erfolgt mit Hilfe des Aktin-Filament-Systems und wird mit der Caspasen-Spaltung einer Reihe von Proteinen in Verbindung gebracht (Coleman et al., 2001). Es wurde gezeigt, daß die Aktivierung von Caspase-3 (Jänicke et al., 1998) und die Phosphorylierung des Myosin Motorproteins durch die Kinase ROCK I (Coleman et al., 2001) dafür essentiell sind. In Zellen, in denen durch Behandlung mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin (STS) Apoptose induziert wurde, konnten die DEDD-positiven Granuli nur intrazellulär und nicht, wie nach Etoposid-, UV- oder TRAIL-induzierter Apoptose, in Membran-Austülpungen auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf die Inhibition der Phosphorylierung des Motorproteins durch STS zurückzuführen. Die spheroiden Granuli, die DEDD, IF-Proteine und aktive Caspase-3 enthalten, scheinen demnach tatsächlich Vorläufer der Einschlüsse zu sein, die im weiteren Verlauf der Apoptose als membranumschlossene apoptotische Körperchen abgeschnürt werden. Durch Videoaufnahmen von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteinen (DEDD, IF-Proteine oder aktive Caspase-3) in apoptotischen Zellen könnte sich diese Annahme bestätigen lassen.

Die Fähigkeit des DEDD-Proteins, Aggregate bzw. Komplexe höherer Ordnung zu bilden, könnte dazu führen, daß die Bruchstücke des K8/K18-Netzwerkes, die auch nach der Desintegration der Filamente noch mit DEDD und aktiver Caspase-3 assoziiert sind, als Ausgangspunkt für die Bildung größerer Einschlüsse dienen. Der Inhalt der apoptotischen Körperchen scheint vom Apoptose-Stimulus und dem Zelltyp abzuhängen. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß u.a. Proteasomen (Pitzer et al., 1996), Proteine der nuklearen Matrix (Zweyer et al., 1997), fragmentierte DNA (Coleman et al., 2001), RNA (Halicka et al., 2000) oder aktive Caspase-8 (Packard et al., 2001) in apoptotischen Körperchen lokalisiert sein können. Die Identifizierung weiterer, in den DEDD-positiven Einschlüssen abgelagerter

Zellkomponenten, wie Proteine, DNA oder Membran-Reste, könnte daher Rückschlüsse auf deren Ursprünge zulassen. Unklar ist, ob die Granuli nur der Entsorgung von nicht mehr benötigten Zell-Komponenten dienen, oder ob sie darüber hinaus noch als besonderer Ort der Prozessierung verschiedener Caspasen-Substrate eine übergeordnete Bedeutung für den programmierten Zelltod besitzen.

4.08 Ein Modell zur Aktivierung von DEDD

Die Immunfluoreszenz-Färbungen von DEDD bzw. aktiver Caspase-3 in apoptotischen Zellen zeigten, daß die nachgewiesenen Filamente nicht Netzwerk-artig im gesamten Cytoplasma einer apoptotischen Zelle verteilt vorlagen, sondern vorwiegend perinuklear zu beobachten waren. In HeLa Zellen wurde nach Induktion von Apoptose zunächst eine aggregatförmige perinukleare DEDD-positive Struktur beobachtet, von der aus sich die DEDD-Filamente entlang des K8/K18-Netzwerkes auszubreiten schienen. In etwas anderer Form wurde dies auch in den für DEDD-gefärbten apoptotischen MCF7(Casp-3) Zellen beobachtet. Diese zeigten zwar keine polarisierte Aggregation bzw. Anreicherung von DEDD auf einer Seite des Nukleus, dafür wurde es zunächst in einem Ring um den Zellkern sichtbar, von dem aus sich die Filamente ausbreiteten. Es scheint demnach, als würde die Konformationsänderung von DEDD, die den Nachweis des Proteins durch anti-DEDD2 ermöglicht, zuerst in der Nähe des Nukleus ausgelöst und sich entlang des Keratin-Netzwerkes fortsetzen.

Wie die Apoptose-Induktion in den Caspase-3-defizienten und den mit Caspase-3 rekonstituierten MCF7 Zellen gezeigt hat, ist die Konformationsänderung des cytoplasmatischen DEDD abhängig von aktiver Caspase-3. Obwohl Caspase-3 in einer Vielzahl von Apoptose-Signalwegen aktiviert wird und etwa drei Viertel aller bisher identifizierten Caspasen-Substrate spaltet, gibt es nur wenige apoptotische Ereignisse, für die die Aktivierung dieser Effektor-Caspase essentiell ist (Porter und Jänicke, 1999). Dazu zählen vor allem die Fragmentierung der DNA und die Ausbildung von Membranbläschen an der Zelloberfläche, die anschließend als apoptotische Körperchen abgeschnürt werden. Diese charakteristischen Vorgänge des programmierten Zelltods basieren unter anderem auf der proteolytischen Degradation einzelner Proteine durch Caspase-3: Für die DNA-Fragmentierung ist die Spaltung von ICAD/DFF-45 (Enari et al., 1998) und für die Bildung der apoptotischen Körperchen die Spaltungen von α -Fodrin (Jänicke et al., 1998) und Gelsolin (Kothakota et al., 1997) mitverantwortlich. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei weitere Phänomene beschrieben, für die aktive Caspase-3 essentiell ist: Die Konformationsänderung von DEDD, sowie die Spaltung von K18 an der Spaltstelle VEVD²³⁸, für die zuvor angenommen wurde, daß sie auch durch Caspase-6 und 7 erfolgen könnte. Bisher wurde nicht untersucht, ob die Spaltung des Keratins an dieser Stelle für die Desintegration des K8/K18 Netzwerkes und die Bildung von K8/K18-Granuli notwendig ist. In

Phasen-Kontrastaufnahmen apoptotischer MCF7(Vek) Zellen konnten zumindest keine dichten granulären Körperchen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), wie sie im Cytoplasma apoptotischer MCF7(Casp-3) Zellen nachgewiesen wurden. Färbungen des K8/K18-Netzwerkes in Caspase-3-defizienten MCF7 Zellen müssen dies jedoch noch bestätigen.

DEDD besitzt eine Reihe von Eigenschaften und Funktionen, die vor allem auf seiner Fähigkeit zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen und anderen DEDD-Molekülen beruhen. Daher soll nun versucht werden, die unterschiedlichen Beobachtungen und Erkenntnisse zur Rolle des DEDD-Proteins im Signalweg der Apoptose in einem hypothetischen Modell zusammenzufassen. Abbildung 4.08 zeigt eine schematische Darstellung dieses Modells. In nicht-apoptotischen Zellen liegt das endogene Protein in verschiedenen Zuständen vor. Im Cytoplasma wird es in einer monomeren und einer aggregierten Form gefunden, bei der es sich aufgrund ihres Laufverhaltens in SDS-PAGE wahrscheinlich um ein Dimer handelt. Das Verhältnis zwischen den beiden Formen ist in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich, liegt aber in den meisten Zelllinien weitestgehend auf der Seite des aggregierten DEDDs. Die Aggregation führt dazu, daß die DED und NLS maskiert sind und ein Teil des Dimers wahrscheinlich entlang

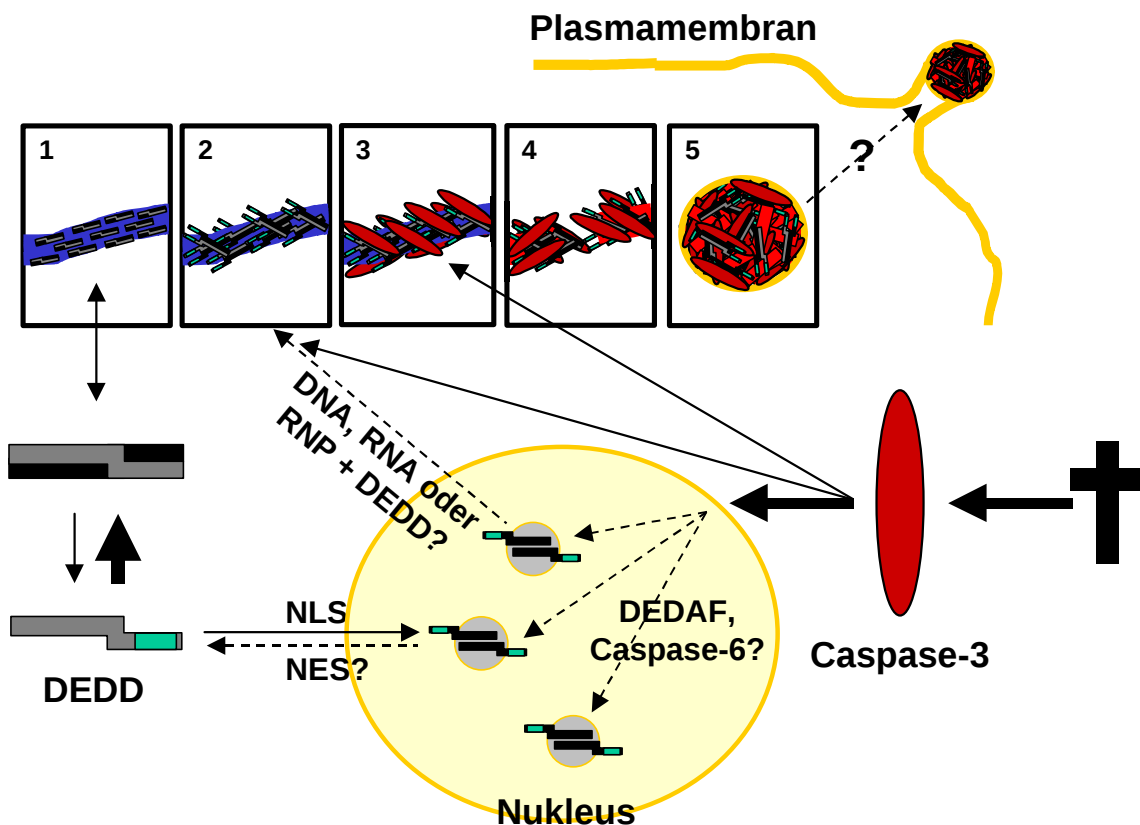


Abbildung 4.08: Ein Modell zur Rolle des DEDD-Proteins im apoptotischen Signalweg. Erläuterungen siehe Text.

der K8/K18-Filamente mit K18 assoziiert (1 in Abb. 4.08). Die NLS der monomeren Form sind für die Kerntransportmaschinerie zugänglich und erlauben daher den Transport des Proteins in den Nukleus. Dort reichert sich DEDD in den Nukleoli an. Die DED der monomeren Form kann durch den Antikörper anti-DEDD2 in den Nukleoli, sowie diffus im Cytoplasma nachgewiesen werden. Unklar ist, ob es auch einen Transport von DEDD aus dem Nukleus gibt. Nukleare Export Signale (NES) sind nicht so gut charakterisiert wie NLS, beinhalten aber häufig eine Leuzin-reiches Motif (Görlisch und Kutay, 1999). Der C-Terminus von DEDD besitzt eine Reihe von Leuzinen, genauere Untersuchungen müssen jedoch erst noch zeigen, ob es sich dabei um ein NES handelt. Zumindest während der Mitose, wenn der Zellkern sich auflöst und DEDD die Nukleoli verläßt, scheint es zu einem Austausch von nuklearem und cytoplasmatischen DEDD zu kommen.

Im Verlauf der meisten Apoptose-Formen wird Caspase-3 aktiviert. Dies ist die Voraussetzung dafür, daß die aggregierte Form von DEDD ihre Konformation ändert (2 in Abb. 4.08). Die Konformationsänderung der aggregierten DEDD-Form führt zur Anlagerung von Caspase-3, die daraufhin K18 spaltet (3 und 4 in Abb. 4.08). Nicht bekannt ist, ob die Caspase sich als aktives Enzym anlagert oder erst nach der Anlagerung aktiviert wird. Letztendlich kommt es zur Desintegration des Keratin 8/18-Netzwerkes und zur Bildung intrazellulärer Granuli, die IF-Proteine, DEDD und aktive Caspasen beinhalten (5 in Abb. 4.08) und wahrscheinlich als apoptotische Körperchen abgeschnürt werden. Wie die Konformationsänderung DEDDs, die aktive Caspase-3 benötigt, ausgelöst wird, ist nicht bekannt. Es wurde gezeigt, daß während der Apoptose DNA, RNA und Ribonukleoproteine (RNP) den Zellkern verlassen (Biggiogera et al., 1998; Halicka et al., 2000). Das apoptotische Signal erreicht über die Caspasen-Kaskade den Zellkern und führt dort dazu, daß DEDD die Transkription der RNA Polymerase I in den Nukleoli inhibiert. Dies ist möglicherweise durch DEDAF reguliert und könnte darüber hinaus auf der Aktivierung von Caspase-6 basieren. Gleichzeitig führt ein bisher unbekannter Vorgang dazu, daß ein nuklearer Faktor den Zellkern verläßt und als Ausgangspunkt für die Konformationsänderung des cytoplasmatischen DEDDs dient. Wir vermuten, daß es sich bei diesem Faktor um DNA, RNA oder eventuell auch RNP handelt, die möglicherweise schon im Komplex mit nukleolarem DEDD den Nukleus verlassen. Daß DEDD DNA bindet und dadurch unlösliche Komplexe bildet, ist bekannt. Die DNA-Bindung ist Sequenz-unabhängig und wurde auch für kleine DNA-Oligomere (22 Basen) beobachtet (Stegh et al., 1998). Rekombinantes DEDD war außerdem in der Lage, rekonstituierte Mononukleosom zu binden. Daher ist anzunehmen, daß DEDD auch RNA, bzw RNP bindet. Da die Konformationsänderung von DEDD im Cytoplasma der Kondensation des Nukleus vorausgeht, muß es sich um einen Faktor handeln, der früh den Zellkern verläßt. Daß die Konformationsänderung abhängig von aktiver Caspase-3 ist, die außerdem für die Degradation von DNA essentiell ist, spricht für eine Beteiligung von DNA. Mikroinjektionen verschiedener Faktoren, z.B. apoptotische nukleare

Extrakte, DNA, Nukleosomen, RNA oder RNP, könnten helfen den Mechanismus, der der Konformationsänderung des DEDD-Proteins zugrunde liegt, aufzuklären. Auch mit Hilfe apoptotischer Zellen, die vor der Apoptose-Induktion enukleiert wurden, kann der Einfluß des Zellkerns auf cytoplasmatisches DEDD untersucht werden. Zellen einer DFF45/ICAD-defizienten Maus weisen nach Apoptose-Induktion keine DNA-Fragmentierung auf (Enari et al., 1998). Aufgrund der hohen Konservierung des DEDD Proteins in Maus und Mensch ist es wahrscheinlich, daß der anti-DEDD2 Antikörper auch in apoptotischen Maus-Zellen DEDD entlang des K8/K18-Netzwerkes nachweist. Daher könnte mit Hilfe von Zellen der DFF45/ICAD-defizienten Maus speziell der Einfluß der DNA-Spaltung auf eine Konformationsänderung von DEDD im Verlauf der Apoptose untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß DEDD innerhalb des apoptotischen Signalweges sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma eine wichtige Rolle spielt. Ein Teil des endogenen DEDD-Proteins ist im Nukleolus lokalisiert. In transient transfizierten Zellen aktiviert DEDD spezifisch Caspase-6 im Nukleus und inhibiert die Polymerase I-abhängige rDNA-Transkription. Ein möglicher Regulator der nuklearen DEDD-Funktionen ist der Faktor DEDAF, mit dem DEDD im Nukleus interagiert und der eine direkte Verbindung zur Todesrezeptor-vermittelten Apoptose darstellen könnte. Der größte Teil des zellulären DEDD wurde jedoch im Cytoplasma nachgewiesen, wo er SDS-stabile Aggregate bildet, die mit K18 assoziieren. Im Verlauf der Apoptose kommt es zu einer Caspase-3-abhängigen Konformationsänderung des mit K18 assoziierten Proteins. Diese ermöglicht es Caspase-3, sich an DEDD und K18 anzulagern und daraufhin K18 zu spalten. Mit Hilfe einer cytoplasmatischen dominant-negativen Mutante von DEDD konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß DEDD für die Regulation der K18-Spaltung durch Caspase-3 verantwortlich ist. Zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose zerfallen die Keratin-Filamente und bilden intrazelluläre Granuli, die neben Intermediärfilament-Proteinen auch DEDD und aktive Caspase-3 beinhalten.

5. Zusammenfassung

Apoptose ist ein fundamentaler Prozeß, der an der Regulation der Homöostase aller Gewebe beteiligt ist und zudem ungewollte oder gefährliche Zellen eliminiert. Eine Zelle, die apoptotisch wird, zeigt eine charakteristische Abfolge morphologischer Veränderungen: z. B. bläschenförmige Austülpungen der Membran, Schrumpfung des Zellkörpers und Kondensation und Fragmentierung des Nukleus. Biochemisch gehen diese Veränderungen unter anderem mit der Translokation von Phosphatidylserin in die äußere Schicht der Plasmamembran und der Aktivierung einer Endonuklease, die genomische DNA in Vielfache eines internukleosomalen Fragments spaltet, einher. Sogenannte Todesrezeptoren können nach Bindung des entsprechenden Liganden Zelltod induzieren. Die wichtigsten proapoptotischen Signalmoleküle sind Cysteinyl-Aspartasen, oder kurz Caspasen. Verschiedene apoptotische Stimuli aktivieren nachfolgend verschiedene Kombinationen von Caspasen, die eine Reihe zellulärer Substrate spalten und dadurch die morphologischen Veränderungen in Cytoplasma und Nukleus hervorrufen. In den vergangenen Jahren sind verschiedene Aspekte des Signalwegs der Todesrezeptoren detailliert untersucht worden. Spezialisierte Protein/Protein-Interaktionsdomänen, wie die Todesdomäne („death domain“, DD) oder die Todeseffektor-Domäne („death effector domain“, DED), kennzeichnen Moleküle, die Schlüsselfunktionen im Rahmen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose besitzen. Eines dieser Proteine ist DEDD, das aufgrund seiner starken Konservierung und seiner Abundanz eine Sonderstellung innerhalb der DED-Proteinfamilie einnimmt. Ratten-, Maus- und Rinder-Protein sind mit dem menschlichen DEDD praktisch identisch. DEDD befindet sich im Cytoplasma und, aufgrund dreier Kernlokalisierungssignale innerhalb seiner Aminosäuren-Sequenz, im Nukleus, wo es in den Nukleoli lokalisiert ist.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Rolle des Proteins DEDD im Signalweg der Apoptose analysiert. Es zeigte sich, daß die DED von DEDD nicht nur eine reine Interaktionsdomäne zur Weiterleitung des apoptotischen Signals ist, sondern darüber hinaus eine Vielzahl von Eigenschaften besitzt, die vorwiegend im Nukleus eine Rolle spielen. Ein Teil des endogenen Proteins ist nukleolar lokalisiert. Überexpressions- und *in vitro*-Experimente zeigten, daß DEDD spezifisch die RNA Polymerase I-abhängige Transkription in den Nukleoli inhibiert. Zudem aktiviert DEDD spezifisch Caspase-6 im Nukleus und kolokalisiert dort mit der aktiven Form des Enzyms. DEDD benötigt eine funktionelle DED, um proapoptotisch zu wirken, sich im Nukleolus anzureichern und Caspase-6 im Nukleus bzw. Nukleolus zu aktivieren. Im Zellkern interagiert DEDD zudem mit dem neuen DED-assoziierten Protein DEDAF („DED associating factor“), das eine direkte Verbindung zur Todesrezeptor-vermittelten Apoptose darstellt.

Im Cytoplasma bildet DEDD SDS-stabile Dimere, die mit Keratin 18 assoziieren. Nach der Induktion von Apoptose kommt es zu einer Konformationsänderung des aggregierten

DEDD in Abhängigkeit von Caspase-3 und zur Filamentbildung entlang des Keratin 8/18-Netzwerkes. Diese Konformationsänderung erlaubt aktiver Caspase-3, sich an DEDD und K18 anzulagern, was zur Spaltung von K18 durch Caspase-3 führt. Nachfolgend zerfallen die Filamente des K8/K18-Netzwerkes und bilden intrazelluläre Granuli, die außer Intermediärfilament-Proteinen auch DEDD und aktive Caspase-3 beinhalten. Diese Granuli verschmelzen zu größeren Protein-Einschlüssen und werden wahrscheinlich als apoptotische Körperchen abgeschnürt. DEDD reguliert die Spaltung von K18 durch Caspase-3, da eine cytoplasmatische dominant-negative Form des DEDD-Proteins die Spaltung von K18 durch Caspase-3 inhibierte.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit entscheidende Effektormechanismen des Proteins DEDD in den nuklearen und cytoplasmatischen Ereignissen der Apoptose aufgeklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Adachi S, Cross AR, Babor BM, Gottlieb RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272:21878-82.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998; 281:1305-8.
- Azuma T, Kohts K, Flanagan L, Kwiatkowski D. Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. *J Biol Chem.* 2000; 275:3761-6.
- Banani E, Murray JW, Stockert RJ, Satir P, Wolkoff AW. Microtubule and motor-dependent endocytic vesicle sorting in vitro. *J Cell Biol.* 2000 Oct 2;151(1):179-86.
- Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JL. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:1172-6.
- Bertini E, Bosman C, Bevilacqua M, Ricci E, Gagliardi GM, Parisi F, Servidei S, Dionisi-Vici C, Ballerini L. Cardiomyopathy and multicore myopathy with accumulation of intermediate filaments. *Eur J Pediatr.* 1990; 149:856-8.
- Bieche I, Champeme MH and Lidereau R. 1995. Loss and gain of distinct regions of chromosome 1q in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1:123-127.
- Biggiogera M, Bottone MG, Pellicciari C. Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *J Histochem Cytochem.* 1998 Sep; 46(9):999-1005.
- Bird PI. Serpins and regulation of cell death. *Results Probl Cell Differ.* 1998; 24:63-89.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 24:1513-23.
- Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grutter MG. The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des.* 1999; 7:1125-33.
- Boesen-de Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 1999; 274:14255-61.
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH and Wallach DA. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* 1995; 270:7795-7798.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996; 85:803-15.

- Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem.* 1996;67:2484-93.
- Brancolini C, Benedetti M, Schneider C. Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* 1995; 14:5179-90.
- Brockstedt E, Otto A, Rickers A, Bommert K, Wittmann-Liebold B. Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein Chem.* 1999 Feb; 18(2):225-31.
- Brown SB, Bailey K, Savill J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J.* 1997; 323:233-7.
- Casiano CA, Tan EM. Antinuclear autoantibodies: probes for defining proteolytic events associated with apoptosis. *Mol Biol Rep.* 1996a; 23:211-6.
- Casiano CA, Martin SJ, Green DR, Tan EM. Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med.* 1996b; 184:765-70.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.* 1997; 138:1379-94.
- Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2000 Apr 3;149(1):17-22
- 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.* 1998; 273(18):10815-8.
- Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T. Activation of actin-cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1996; 56:5224-9.
- Cheng EH-YA, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecular Cell*, Vol. 8, 705–711.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995; 81:505-12.
- Chinnaiyan, AM, Tepper, C, Lou, L, O'Rourke, K, Seldin, MA, Kischkel, F, Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. FADD/MORT1 is a common mediator of Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-induced apoptosis *J Biol Chem* 1996; 271:4961-4965.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science.* 1997; 275:1122-6.
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001 Apr;3(4):339-45

- Colussi PA, Harvey NL, Kumar S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem.* 1998; 273:24535-42.
- Condorelli G, Vigliotta G, Iavarone C, Caruso M, Tocchetti CG, Andreozzi F, Cafieri A, Tecce MF, Formisano P, Beguinot L and Beguinot F. PED/PEA-15 gene controls glucose transport and is overexpressed in type 2 diabetes mellitus. *EMBO J*, 1998; 17:3858-6386.
- Conradt B and Horvitz HR.. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998; 93:519-529.
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 1993; 67:2168-74.
- Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol.* 1992; 149:3166-73.
- Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1999; 59:5386-91.
- Doostzadeh-Cizeron J, Yin S, Goodrich DW.. Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is associated with caspase-6 and NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* 2000; 275:25336-25341.
- Earnshaw WC. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 7:337-343.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:383-424.
- Eberstadt M, Huang B, Chen Z, Meadows RP, Ng SC, Zheng L, Lenardo MJ and Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 1998; 392:941-945.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57:1835-1840
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999; 6:1081-6.
- Enari M, Hase A, Nagata S. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J.* 1995; 14:5201-8.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998; 391:43-50.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* 1998; 281:1317-22.
- Farrah T, Smith CA. Emerging cytokine family. *Nature.* 1992; 358:26.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:7464-9.

- Fraser AG, James C, Evan GI, Hengartner MO. Caenorhabditis elegans inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol*. 1999; 9:292-301.
- Fuchs E, Yang Y. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell*. 1999; 98:547-50.
- Garcia E, Marcos-Gutierrez C, del Mar Lorente M, Moreno JC, Vidal M. 1999. RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *EMBO J*. 18:3404-3418.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*. 1998; 273:32608-13.
- Geng YJ, Azuma T, Tang JX, Hartwig JH, Muszynski M, Wu Q, Libby P, Kwiatkowski DJ. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol*. 1998; 7:294-302.
- Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol*. 2001 Aug 20;154(4):763-73.
- Görllich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15:607-60.
- Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem*. 1997; 272:19641-4.
- Gotzmann J, Meissner M, Gerner C. The fate of the nuclear matrix-associated-region-binding protein SATB1 during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2000; 7:425-438.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Millman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while Bcl-x_L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*. 1999; 274:1156-63.
- Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol*. 1998; 8:537-40.
- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000 Nov 1;260(2):248-56
- Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, Hood L. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and Bcl-x_L and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:11333-8.
- Hay BA, Wolff T, Rubin GM. Expression of baculovirus p35 prevents cell death in Drosophila. *Development*. 1994; 120:2121-9.
- Houge G, Robaye B, Eikhom TS, Golstein J, Mellgren G, Gjertsen BT, Lanotte M, Doskeland SO. Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1995; 15:2051-62.
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997; 272:17255-7.

- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-x_L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:4386-91.
- Hu Y, Ding L, Spencer DM and Nunez G. WD-40 repeat region regulates apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem*, 1998. 273:33489-33494.
- Huang, B, Eberstadt, M, Olejniczak, ET, Meadows, RP, Fesik, SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. 1996; 384:638-41.
- Huot J, Houle F, Rousseau S, Deschesnes RG, Shah GM, Landry J. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 1998; 143:1361-73.
- Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:10717-22.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997; 388:190-5.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991; 66:233-43.
- Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. 1993; 268:10932-7.
- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998a. 273:9357-9360.
- Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML and Porter AG. Caspase-3 is required for cleavage of α -fodrin but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem*. 1998b; 273: 15540:15545
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol*, 1998. 8:1001-1008.
- Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:2234-8.
- Kerr, JFR, Wyllie, A H, Currie, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995; 14:5579-88.
- Kitsberg D, Formstecher E, Fauquet M, Kubes M, Cordier J, Canton B, Pan G, Rolli M, Glowinski J, Chneiweiss H. Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF α -induced apoptosis. *J Neurosci*. 1999; 19:8244-51.

- Klein J and Grummt I. Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:6096-6101.
- Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-classinhibition. *J Biol Chem*. 1994;269:19331-7.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997; 278:294-8.
- Koya RC, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 2000; 275:15343-9.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:5752-7.
- Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):789-95.
- Krebs JF, Armstrong RC, Srinivasan A, Aja T, Wong AM, Aboy A, Sayers R, Pham B, Vu T, Hoang K, Karanewsky DS, Leist C, Schmitz A, Wu JC, Tomaselli KJ, Fritz LC. Activation of membrane-associated procaspase-3 is regulated by Bcl-2. *J Cell Biol*. 1999;144:915-26.
- Kroemer G. The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol* 1995; 58:211-296
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997; 3:614-20
- Kroemer G, Dallaporta B and Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 1998. 60:619-642.
- Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem*. 1997; 272:33197-203.
- Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. 1998. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem*, 273:16589-16594.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998; 17:3247-59.
- Längst G, Becker PB, Grummt I. TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J*. 1998; 17:3135-45.
- Längst G, Blank TA, Becker PB, Grummt I. RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: the transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *EMBO J*. 1997; 17:16:760-8.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Exp Med* 1997;185:1481-1486

- Leo CP, Hsu SY, McGee EA, Salanova M and Hsueh AJ. DEFT, a novel death effector domain-containing molecule predominantly expressed in testicular germ cells. *Endocrinology*, 1998; 139:4839-4848.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479-489
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94:491-501.
- Lin QA, Hengartner MO. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:92-104.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996b;86:147-57.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT and Wang X. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:8461-8466.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001 Feb 23;104(4):487-501
- Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer PH, Fiers W, Schulze-Osthoff K. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature*. 1995; 375:81-3.
- Luger K, Richmond TJ. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8:140-6.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94:481-90.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*. 1998; 140:1485-95.
- Mao PL, Jiang Y, Wee BY, Porter AG. Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. *J Biol Chem*. 1998; 273:23621-4.
- Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH α 1) death signal. *J Biol Chem*. 1998; 273:4345-9.
- Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*. 1995; 82:349-52.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995; 182:1545-56.
- Martinon F, Hofmann D, Kummerow K, Tschopp J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* 2001 Feb 20;11(4):R118-20

- Martins LM, Mesner PW, Kottke TJ, Basi GS, Sinha S, Tung JS, Svingen PA, Madden BJ, Takahashi A, McCormick DJ, Earnshaw WC, Kaufmann SH. Comparison of caspase activation and subcellular localization in HL-60 and K562 cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Blood*. 1997; 90:4283-4296.
- Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK, Nicholson DW, Tsuruo T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene*. 1997; 14:1007-12.
- Mashima T, Naito M, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene*. 1999; 18:2423-30.
- Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):796-801.
- Metzstein MM, Stanfield GM and Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 1998. 14:410-416.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*. 1998; 140:627-36.
- Mittl PR, Di Marco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ, Grutter MG. Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethylketone. *J Biol Chem*. 1997; 272:6539-47.
- Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T, Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ*. 1998. 5:1034-1041.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982; 31:11-24.
- Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H and Nagata S. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95:9123-9128.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85:817-27.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*. 1998; 273:2926-30.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000; 403:98-103.
- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999; 6:1028-42.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991; 139:271-9.
- Nigg EA. The nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*. 1989;1:435-40.

- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte-Hermann R. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *Hepatology*. 1993; 18:1238-46.
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. 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*. 1992; 267:10709-15.
- Ohtsu M, Sakai N, Fujita H, Kashiwagi M, Gasa S, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Sakiyama Y, Kobayashi K, Kuzumaki N. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J*. 1997; 16:4650-6.
- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem*. 1996; 271:16443-6.
- Packard BZ, Komoriya A, Brotz TM, Henkart PA. Caspase 8 activity in membrane blebs after anti-fas ligation. *J Immunol* 2001 Nov 1;167(9):5061-6
- Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-x_L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*. 1998; 273:5841-5.
- Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL, Marcineviciute A. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 1999; 274:31734-9.
- Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):12736-7.
- Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F, Krammer PH. The death receptors. *Results Probl Cell Differ*. 1999; 23:25-63.
- Pitzer F, Dantes A, Fuchs T, Baumeister W, Amsterdam A. Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. *FEBS Lett*. 1996; 394:47-50.
- Prasad SC, Thraves PJ, Dritschilo A, Kuettel MR. Protein expression changes associated with radiation-induced neoplastic progression of human prostate epithelial cells. *Electrophoresis*. 1997; 18:629-37.
- Rao JY, Jin YS, Zheng Q, Cheng J, Tai J, Hemstreet GP 3rd. Alterations of the actin polymerization status as an apoptotic morphological effector in HL-60 cells. *J Cell Biochem*. 1999; 75:686-97.
- Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*. 1996; 135:1441-55.
- Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature*, 1998. 396:119-122.
- Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*. 1998; 5:271-88.

- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*. 1992; 69:597-604.
- Renz A. and Fackelmayer F.O. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. *Nucl. Acids Res*. 1996; 24:43-849.
- Rheaume E, Cohen LY, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sekaly RP, Denis F. The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J*. 1997; 1:6346-54.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*. 1996; 3:619-25.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. 1999; 401:168-73.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998; 391:96-9.
- Samejima K and Earnshaw WC. 1998. ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear. *Exp Cell Res*, 243:453-459.
- Sansom MS, Weinstein H. Hinges, swivels and switches: the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Nov;21(11):445-51. Review.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274:1541-8.
- Schattner EJ, Elkon KB, Yoo DH, Tumang J, Krammer PH, Crow MK, Friedman SM. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med*. 1995;182:1557-65.
- Schickling O, Stegh AH, Byrd J, Peter ME. Nuclear localization of DEDD leads to caspase-6 activation through its death effector domain and inhibition of RNA polymerase I dependent transcription. *Cell Death Differ* 2001; In Druck.
- Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PH. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol*. 1994;127:15-20.
- Sgorbissa A, Benetti R, Marzinotto S, Schneider C, Brancolini C. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci*. 1999;112:4475-82.
- Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*. 1997;6:751-63.
- Siegel RM, Martin DA, Zheng L, Ng SY, Bertin J, Cohen J, Lenardo MJ. Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*. 1998;141:1243-53.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated

- caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999;144:281-92.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 1994;76:959-62.
- Song Q, Lu H, Zhang N, Luckow B, Shah G, Poirier G, Lavin M. Specific cleavage of the large subunit of replication factor C in apoptosis is mediated by CPP32-like protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;233:343-348.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 272:18542-5.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998; 1:949-57.
- Stegh, AH, Schickling, O, Ehret, A, Scaffidi, C, Peterhänsel, C, Längst, G, Hoffmann, T, Grummt, I, Krammer, PH und Peter, ME DEDD, a novel death effector containing apoptosis-inducing protein targeted to nucleoli. *EMBO J* 1998. 17, 5974-5986.
- Stegh, AH, Herrmann, H, Lampel, S, Weisenberger, D, Andrä, K, Seper, M, Wiche, G, Krammer, PH and Peter, ME Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase-8 during CD95 and TNF-receptor mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20:5665-5679.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993; 75:1169-78.
- Sulston J, Du Z, Thomas K, Wilson R, Hillier L, Staden R, Halloran N, Green P, Thierry-Mieg J, Qiu L, et al. The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature.* 1992; 356:37-41
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* 1999; 189:381-94.
- Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:8395-400.
- Tan X, Wang JY. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:116-20.
- Tartaglia, LA, Ayres, TM, Wong, GH, Goeddel, DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 1993; 74:845-53.
- Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem.* 1995; 270:3255-60.
- Thiede B, Dimmler C, Siejak F, Rudel T. Fas-induced apoptosis by proteome analysis. *J Biol Chem.* 2001; 13;276(28):26044-50.

- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 1997; 386:517-21.
- Thornberry NA. Inflammation. Key mediator takes shape. *Nature*. 1994; 370:251-2.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997; 272:17907-11.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998; 281:1312-6.
- Torres-Montaner A, Bolivar J, Astola A, Gimenez-Mas JA, Brieva JA, Valdivia MM. Immunohistochemical detection of ribosomal transcription factor UBF and AgNOR staining identify apoptotic events in neoplastic cells of Hodgkin's disease and in other lymphoid cells. *J Histochem Cytochem* 2000; 48(11):1521-30
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989; 245:301-5.
- Ubeda M, Habener JF. The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:19562-8.
- Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci*. 1998; 23:159-62.
- Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:10170-5.
- Vandelaer M, Thiry M and Goessens G. AgNOR proteins from morphologically intact isolated nucleoli. *Life Sci*. 1999. 64:2039-2047.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*. 2000. 126:633-42.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *Exp Med* 1998; 187:1477-1485
- Vincenz CA and Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1 β -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling. *J Biol Chem*, 1997. 272:6578-6583.

- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. 1994; 78:343-52.
- Watanabe H, Kanbe K, Shinozaki T, Hoshino H, Chigira M. Apoptosis of a fibrosarcoma induced by protein-free culture involves DNA cleavage to large fragments but not internucleosomal fragmentation. *Int J Cancer*. 1995; 62:191-8.
- Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD. The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*. 1999; 7:1135-43.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001 Apr 27;292(5517):727-30
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 1994; 370:270-5.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 1980. 68:251-306.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980. 284:555-556.
- Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A, Stern D. An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1997; 389:689-95.
- Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*. 1996 Jul 15;88:386-401.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 1990; 250:279-82.
- Yasuhara N, Eguchi Y, Tachibana T, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes Cells*. 1997. 2:55-64.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999 Aug 26;400(6747):886-91
- Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*. 2000; 12:633-42.
- You Z, Ouyang H, Lopatin D, Polver PJ, Wang CY. Nuclear factor-kappa B-inducible death effector domain-containing protein suppresses tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting caspase-8 activity. *J Biol Chem*. 2001 Jul 13;276(28):26398-404.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):802-9.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*. 1995;181:1661-72.

- Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Godzik A, Reed JC. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:2597-602.
- Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH and Winoto A. 1998a. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, 392:296-300.
- Zhang J, Liu X, Scherer DC, van Kaer L, Wang X and Xu M. 1998b. Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:12480-12485.
- Zhang J, Reedy MC, Hannun YA, Obeid LM. Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;145:99-108.
- Zheng L, Schickling O, Peter ME, Lenardo MJ. The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):31945-52.
- Zhivotovsky B, Gahm A, Orrenius S. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;233:96-101.
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999 Jul;6(7):644-51
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90:405-413.
- Zweyer M, Riederer BM, Ochs RL, Fackelmayer FO, Kohwi-Shigematsu T, Bareggi R, Narducci P, Martelli AM. Association of nuclear matrix proteins with granular and threaded nuclear bodies in cell lines undergoing apoptosis. *Exp Cell Res*. 1997 Feb 1;230(2):325-36.

*“... Long is the way
And hard, that out of Hell leads up to light.”*

John Milton, *Paradise lost*