



Molekulare Mechanismen der CD95-Aktivierung

Molecular mechanisms of CD95 activation

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Isabell Lang

aus

Neuendorf am Main

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Bert Hecht

1. Betreuer: Prof. Dr. Harald Wajant

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

3. Betreuer: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Molekulare Mechanismen der CD95-Aktivierung" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,.....

Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Molecular mechanisms of CD95 activation" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,.....

Date

Signature

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Januar 2009 bis 29. Juni 2012 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Wajant, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit unter seiner wissenschaftlichen Leitung und Betreuung durchführen zu können. Es war stets eine gute, professionelle und ideenreiche Zusammenarbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Müller und Prof. Dr. Krohne bedanken, die sich bereit erklärt haben, mich während meiner Promotion als Zweit- und Drittgutachter zu betreuen.

Ferner möchte ich mich bei Tina Giner und Martina Jossberger aus der Hautklinik für die Kooperation bei den Caspase-8 Knockdown-Experimenten bedanken.

Ein großer Dank geht natürlich an meine jetzigen und ehemaligen Kollegen aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin. Für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Betriebsklima und vor allem auch für die heiteren Momente im und außerhalb des Labors.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mich jederzeit unterstützt und motiviert haben. Ihr habt mir alles ermöglicht und immer an mich geglaubt! Ein großes Dankeschön geht auch an meine Oma Agnes für die vielen Gebete und angezündeten Kerzen.

Zuletzt und ganz besonders möchte ich mich bei meinem Mann Richard für den Rückhalt, die unendliche Geduld und die Unterstützung während des Studiums und der Promotion bedanken. Du warst immer an meiner Seite und hast mir stets die nötige Energie gegeben. Vielen vielen Dank dafür!

„...and don't you ever, ever, ever stop rockin'!“

Für Richard

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	TNF-Rezeptoren und ihre Liganden.....	11
1.1.1	Rezeptoren der TNF-Familie.....	11
1.1.2	Liganden der TNF-Familie.....	12
1.2	Das CD95/CD95L-System.....	14
1.2.1	CD95.....	14
1.2.2	CD95L.....	15
1.3	CD95-vermittelte Signalwege.....	16
1.3.1	Mechanismen der CD95-vermittelten Apoptose.....	16
1.3.2	Regulation der CD95-vermittelten Apoptose.....	18
1.3.2.1	cFLIP-Proteine.....	18
1.3.2.2	Proteine der Bcl2-Familie.....	18
1.3.2.3	Proteine der IAP-Familie.....	19
1.3.3	Frühe Ereignisse der CD95-Aktivierung.....	20
1.3.4	Nicht-apoptotische Signalwege des CD95L/CD95-Systems.....	22
1.4	Die Rolle des detergenzunlöslichen „Lipid Raft“-Membrankompartiments bei der CD95-Aktivierung.....	22
1.5	Physiologie und Pathophysiologie von CD95.....	24
1.6	Das CD95L/CD95-System in der Krebstherapie.....	25
1.7	Zielsetzung.....	27
2	Material.....	28
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien.....	28
2.1.1	Enzyme.....	29
2.1.2	siRNA Oligonukleotide.....	29
2.2	Antikörper.....	29
2.3	Kits.....	31
2.4	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	31
2.5	Lösungen und Puffer.....	32
2.6	Zellen.....	34
2.6.1	Eukaryotische Zelllinien.....	34
2.6.2	Prokaryotische Zellen.....	34
2.7	Fusionsproteine/Plasmide.....	35

3	Methoden	36
3.1	Zellkultur	36
3.2	Klonierung von GpL-Fusionsproteinen	36
3.3	Produktion und Aufreinigung von GpL-Fusionsproteinen	37
3.3.1	Produktion	37
3.3.2	Aufreinigung	37
3.4	Retrovirale Infektion und Zellsortierung	38
3.5	Transfektion mit siRNA Oligonukleotiden	38
3.6	Western Blot	38
3.6.1	SDS-PAGE	38
3.6.2	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose	39
3.6.3	Immundetektion	39
3.7	Silberfärbung	40
3.8	Durchflusszytometrie	40
3.9	IL8 ELISA	40
3.10	Zytotoxizitätsassay	41
3.11	Luziferaseassays	41
3.11.1	Gleichgewichtsbindungsstudien	41
3.11.2	Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten k_{off}	42
3.11.3	Bestimmung der Assoziationsratenkonstanten k_{on}	42
3.11.4	Homologe Konkurrenzexperimente	43
3.11.5	Analyse der Bindungsdaten	43
3.11.5.1	Dissoziationskonstante K_D	43
3.11.5.2	Dissoziationskonstante des Inhibitors K_i	44
3.11.5.3	Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten k_{off} und k_{on}	44
3.11.5.4	Bindungsstellen pro Zelle	44
3.12	Herstellung von Zelllysaten	44
3.13	Isolation von „Lipid Rafts“	45
3.14	Immunpräzipitation	46
3.15	Statistische Analysen	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Die Translokation von CD95 in „Lipid Raft“-Mikrodomänen wird durch die Oligomerisierung von löslichem trimerem CD95L verstärkt	47
4.1.1	Oligomerisierter CD95L hat eine höhere Bioaktivität als löslicher trimerer CD95L	47

4.1.2	Oligomerisierter CD95L, nicht aber trimerer CD95L, induziert die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“	49
4.2	Die höhere Avidität von multimerem CD95L hat keinen Einfluss auf die Rezeptorbelegung	51
4.2.1	Konstruktion und Reinigung von <i>Gaussia princeps</i> Luziferase (GpL)-Fusionsproteinen	51
4.2.2	GpL-CD95L-Fusionsproteine weisen die gleiche biologische Funktionalität auf wie ihre korrespondierenden konventionellen CD95L-Varianten	53
4.2.3	CD95-Aktivierung in TypI- und TypII-Zellen	54
4.2.4	Bindungsstudien mit GpL-CD95L-Fusionsproteinen	55
4.2.4.1	Gleichgewichtsbindungsstudien	55
4.2.4.2	Homologe Kompletionsassays	58
4.2.4.3	Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten der Interaktion von GpL-Flag-CD95L mit CD95	59
4.2.5	Analyse der „Lipid Raft“-Translokation von CD95 mit Hilfe von GpL-CD95L-Fusionsproteinen	61
4.3	Bindungsstudien mit monomeren und trimeren Varianten von löslichem CD95-Flag-GpL	62
4.3.1	Gleichgewichtsbindungsstudien mit monomerem und trimerem CD95-Flag-GpL	62
4.3.2	Neutralisationsstudien mit monomerem und trimerem CD95-Flag-GpL	63
4.4	Die Aktivierung eines kleinen Teils an endogenem CD95 kann ausreichend sein, um effizient Zelltod zu induzieren	64
4.5	Charakterisierung chimärer CD40-CD95-Rezeptoren	68
4.5.1	Herstellung stabiler CD40-CD95-Transfektanten	68
4.5.2	Funktionsanalyse chimärer CD40-CD95-Rezeptoren	70
4.6	Aktivierte CD95-Rezeptoren triggern die Caspase-8-vermittelte Translokation von inaktiven CD95-Molekülen in „Lipid Rafts“	72
4.6.1	Die Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen induziert die Translokation von ligandenfreien CD40-CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“	72
4.6.2	CD95-assoziierte Signalwege vermitteln die Translokation von ligandenfreien endogenen CD95-Molekülen in „Lipid Rafts“	74
5	Diskussion	76
5.1	Die Interaktion zwischen CD95L und CD95	76
5.2	Mechanismen der CD95-„Lipid Raft“-Translokation	81

6	Zusammenfassung	83
7	Summary.....	85
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Anhang.....	97
9.1	Sequenzen	97
9.1.1	GpL-Flag-CD95L	97
9.1.2	GpL-Fc-Flag-CD95L	98
9.1.3	CD95-Flag-GpL	99
9.1.4	CD95-TNC-Flag-GpL.....	101
9.1.5	CD40-CD95	102
9.1.6	CD40-CD95 _(V238N)	103
9.2	Abkürzungsverzeichnis	105
9.3	Publikationen	108
9.4	Lebenslauf.....	109

1 Einleitung

1.1 TNF-Rezeptoren und ihre Liganden

Höhere Organismen bestehen aus Zellen und Geweben, die miteinander kommunizieren müssen, um ihre Funktionen zu regeln und aufrecht zu erhalten. Dies wird u.a. durch ein Netzwerk von Hormonen und Zytokinen gewährleistet, welche als Liganden für intra- und extrazelluläre Rezeptoren fungieren. Beispiele für solche Systeme sind die Liganden und Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Superfamilie. Sie sind wichtig für die Steuerung der Gewebshomöostase, für Entwicklungsprozesse und das Immunsystem (Bodmer et al., 2002).

1.1.1 Rezeptoren der TNF-Familie

Rezeptoren der TNF-Familie werden hauptsächlich als TypI-Transmembranproteine exprimiert, d.h. der N-Terminus liegt extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär. Hierbei gibt es allerdings einige Ausnahmen, wie z.B. BCMA, TACI, BAFFR und XEDAR, welche man zu den TypIII-Transmembranproteinen zählt. TRAILR3 ist kovalent über ein C-terminales Glykolipid verankert und OPG (Osteoprotegerin), als auch DcR3 (Decoy-Rezeptor 3) liegen als lösliche Rezeptoren vor. Lösliche TNF-Rezeptoren können auch durch Proteolyse (TNFR1, TNFR2, CD40, CD30, CD27) oder alternatives Spleißen des Exons, welches für die Transmembrandomäne kodiert (z.B. CD95 und 4-1BB), generiert werden (Gruss & Dower, 1995; Smith et al., 1994).

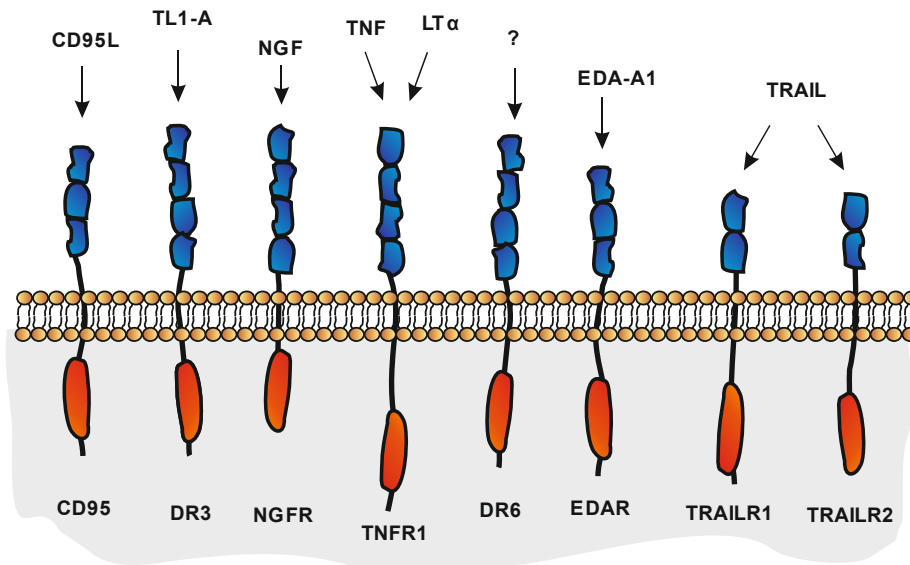
Die Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie sind durch eine bis sechs cysteinreiche Domänen („cysteine rich domain“, CRD) in ihrem extrazellulären Teil charakterisiert, welche jede drei Cysteinbrücken ausbildet (Bodmer et al., 2002; Naismith & Sprang, 1998). Desweiteren weisen TNF-Rezeptoren typischerweise eine so genannte N-terminale „pre-ligand assembly domain“ (PLAD) auf, welche die Bildung inaktiver homotrimerer Komplexe vermittelt. Dieser Bereich ist nicht an der Ligandenbindung beteiligt und beinhaltet die erste CRD (Chan et al., 2000). Bindet nun ein Ligand an seinen korrespondierenden Rezeptor, kommt es zur Umorganisation der vorformierten Komplexe, welche die Bildung von aktiven Rezeptorsignalkomplexen ermöglicht.

Die intrazelluläre Domäne der Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie hat keine enzymatische Aktivität. Deshalb erfolgt die Signaltransduktion über zyttoplasmatische Adaptermoleküle. Anhand dessen lassen sich die Rezeptoren in drei Gruppen einteilen: die Todesrezeptoren, die TRAF („TNFR associated factor“)-bindenden Todesrezeptoren und die Decoy-

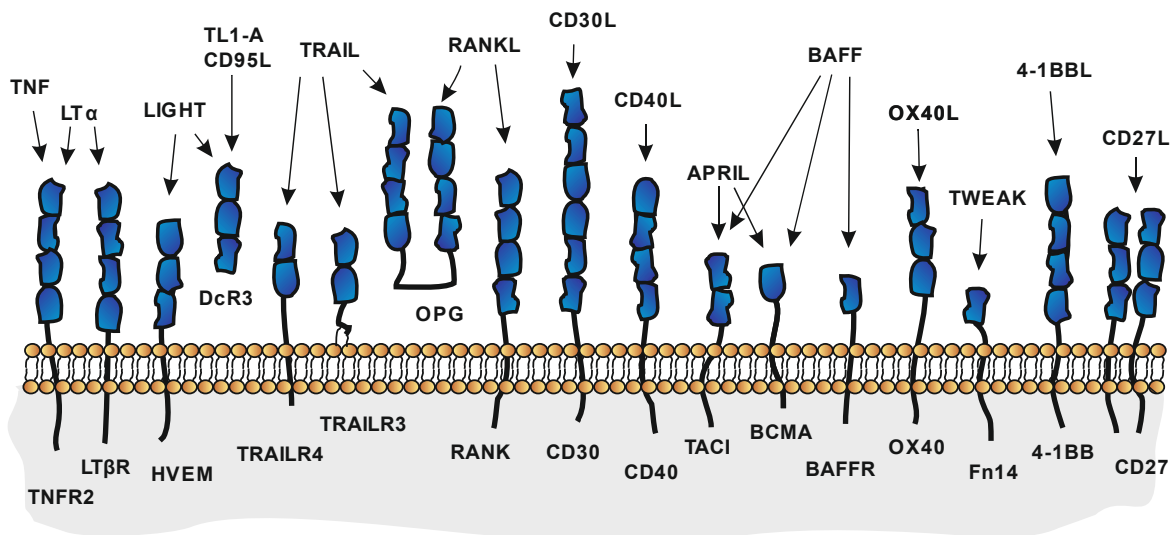
Rezeptoren (Abbildung 1). Die Nicht-Todesrezeptoren interagieren vor allem mit Adapterproteinen der TRAF-Familie, welche an der Aktivierung von verschiedenen MAPK („mitogen-activated protein kinase“)-Kaskaden und der Anschaltung des NF κ B („nuclear factor kappa B“)-Systems beteiligt sind (Locksley et al., 2001). Die Todesrezeptoren hingegen zeichnen sich durch eine konservierte C-terminale Todesdomäne („death domain“, DD) aus, welche zwischen 70 und 80 Aminosäuren lang ist. Über diese Domäne werden DD-tragende Adaptermoleküle rekrutiert, welche die Aktivierung apoptotischer Signalwege ermöglichen. Zur Gruppe der Todesrezeptoren gehören TNFR1, TRAILR1 und TRAILR2, DR3, EDAR, DR6, p75-NGFR sowie CD95 (Fas). In den folgenden Abschnitten wird vor allem das CD95L/CD95-System beschrieben.

1.1.2 Liganden der TNF-Familie

Die Familie der TNF-Liganden besteht im Menschen aus 19 TypII-Transmembranproteinen (N-Terminus intrazellulär und C-Terminus extrazellulär), welche durch 18 Gene kodiert werden. Ein gemeinsames Merkmal der TNF-Liganden ist die so genannte „TNF-Homologiedomäne“ („TNF homology domain“, THD), welche den extrazellulären C-Terminus der Liganden umfasst, für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich ist und die Bildung von trimeren Molekülen vermittelt. Sie besteht aus zwei übereinander angeordneten β -Faltblättern, die sich zu einer Struktur zusammenlagern, welche einer Biskuitrolle ähnelt („jelly roll“) (Fesik, 2000). Die THD ist stark konserviert und die Sequenzhomologie zwischen den Familienmitgliedern beträgt ungefähr 20-30 % (Bodmer et al., 2002). Mit Ausnahme von LT α werden TNF-Liganden zunächst als trimere membranständige Formen exprimiert. Durch Proteolyse (z.B. Metalloproteasen, Furin) werden aber auch lösliche trimere Formen generiert. TNF-Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit von membrangebundenen und löslichen TNF-Liganden aktiviert werden zu können, obwohl beide Ligandformen trimer organisiert sind. TNF α ist sowohl als membranständiges, als auch als lösliches Molekül in der Lage, an TNFR1 zu binden und diesen zu aktivieren (Grell et al., 1995). CD95L hingegen hat als membranständige Form eine enorm höhere Bioaktivität als die lösliche Variante, obwohl der lösliche Ligand auch an CD95 bindet (Schneider et al., 1998). Lösliche trimere TNF-Liganden, welche in der Lage sind ihren korrespondierenden Rezeptor zu binden ohne diesen zu aktivieren, können jedoch nach Oligomerisierung oder Immobilisierung an der Zelloberfläche, ähnlich wie die membranständige Form, stark rezeptoraktivierend wirken (Müller et al., 2008; Wyzgol et al., 2009). Dies kann z.B. für therapeutische Zwecke von Nutzen sein.



Todesrezeptoren



Nicht-Todesrezeptoren



Abbildung 1: Übersicht über einige TNF-Rezeptoren und ihre korrespondierenden TNF-Liganden

1.2 Das CD95/CD95L-System

1.2.1 CD95

CD95 (Fas: „FS7-associated cell surface antigen“, APO-1, TNFRSF6) gehört, wie bereits erwähnt, zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und wird zur Untergruppe der Todesrezeptoren gezählt. Das humane CD95-Gen ist auf Chromosom 10q24.1 lokalisiert und umfasst 9 Exons auf 26 kb DNA (Cheng et al., 1995). Das Genom von CD95 weist unterschiedliche Startpunkte für die Transkription auf, da zum 5'-Ende hin Konsensussequenzen für „TATA“ und „CAAT“ fehlen. Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Transkripte, welche auch für lösliche CD95-Varianten kodieren. Diese können *in vitro* negative regulatorische Effekte auf membranständige CD95-Moleküle haben (Cheng et al., 1994; Papoff et al., 1996). CD95 ist ein TypI-Glykoprotein mit einer Transmembrandomäne und besteht aus 319 Aminosäuren (AS). Der extrazelluläre Teil von CD95 umfasst drei CRDs, welche jeweils eine Länge von ca. 40 AS haben (Abbildung 2). Intramolekulare Disulfidbrücken stabilisieren die Faltung der CRDs, und CRD2/CRD3 bilden die Kontaktstellen für CD95L, wobei CRD1 ebenfalls für die Bindung von CD95L benötigt wird (Orlinick et al., 1997b; Starling et al., 1997). Außerdem befindet sich in der CRD1 die PLAD, welche die Organisation von CD95 zu inaktiven homotrimeren Komplexen ermöglicht. Intrazellulär hat CD95 eine Todesdomäne (ca. 80 AS), welche dem Rezeptor die Fähigkeit verleiht, apoptotische Signalwege zu stimulieren. DDs sind homophile Interaktionsdomänen, die sechs antiparallele α -Helices beinhalten (Itoh & Nagata, 1993). Die Expression von CD95 kann man auf vielen verschiedenen Zelltypen beobachten, so z.B. auf Fibroblasten, epithelialen Zellen oder auf Zellen des hämatopoetischen Systems (Stahnke et al., 1998).

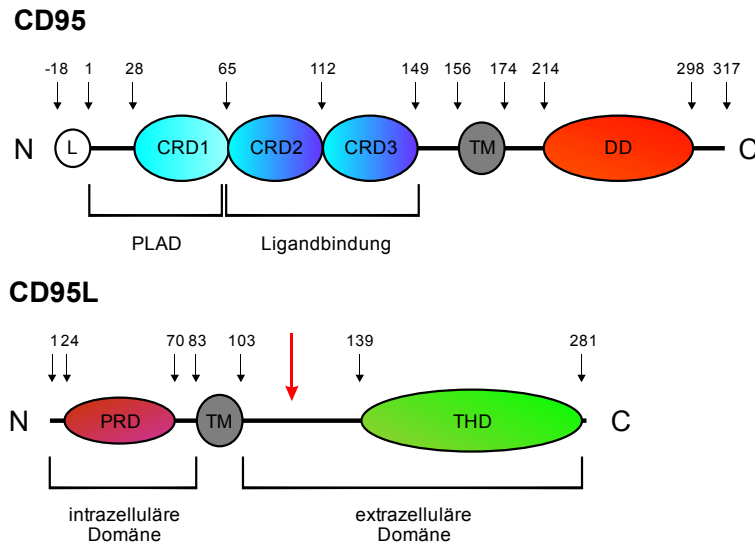


Abbildung 2: Schematische Struktur von CD95 und CD95L

Dargestellt sind die schematischen Strukturen von CD95 und CD95L. Die Zahlen repräsentieren die Aminosäurepositionen der reifen Proteine. Die Spaltungsstelle 129/130 im CD95L ist durch einen roten Pfeil markiert. L = leader, CRD = cysteinreiche Domäne, PLAD = pre-ligand assembly domain, TM = Transmembrandomäne, PRD = prolinreiche Domäne, DD = death domain, THD = TNF-Homologiedomäne

1.2.2 CD95L

Das Gen für humanen CD95L ist auf Chromosom 1q23 lokalisiert und setzt sich aus 4 Exons zusammen, welche etwa 8 kb DNA umfassen (Takahashi et al., 1994b). CD95L gehört zur Familie der TNF-Liganden und ist ein TypII-Transmembranprotein, welches als Homotrimer aus CD95L-Untereinheiten von 40 kDa vorliegt. In der extrazellulären Domäne sind drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen zu finden, welche die Quantität der Expression beeinflussen (Orlinick et al., 1997a). Die extrazelluläre Domäne besteht aus 179 AS und besitzt die für TNF-Liganden typische THD (Bodmer et al., 2002). Die intrazelluläre Domäne von CD95L hat 80 Aminosäuren und enthält eine prolinreiche Region mit einigen SH3-Bindungsmotiven („Src homology 3“). Wie auch andere Vertreter der TNF-Ligandenfamilie, kann CD95L in der extrazellulären Domäne durch Metalloproteasen gespalten werden und folglich können lösliche trimere CD95L-Moleküle freigesetzt werden (Kayagaki et al., 1995; Suda et al., 1997; Tanaka et al., 1998). Sowohl löslicher, als auch membranständiger CD95L sind in der Lage an CD95 zu binden, doch nur die membranständige Form kann apoptotische Signalwege effizient induzieren. Lösliche CD95L-Trimere können dabei sogar eine antagonistische Wirkung auf Membran-CD95L haben (Schneider et al., 1998). Desweiteren kann löslicher trimerer CD95L als chemotaktisches Zytokin wirken und die

Migration von Neutrophilen und Phagozyten zu Inflammationsherden begünstigen (Otonello et al., 1999; Seino et al., 1998).

1.3 CD95-vermittelte Signalwege

1.3.1 Mechanismen der CD95-vermittelten Apoptose

Nicht alle Zellen verhalten sich nach Aktivierung von CD95 gleich bezüglich der intrazellulären Schritte die nötig sind, um Apoptose einzuleiten (Barnhart et al., 2003). Nach Bindung von membranständigem CD95L an CD95 kommt es an dessen intrazellulärer Todesdomäne („death domain“, DD) zur Ausbildung des so genannten „death inducing signaling complex“ (DISC), welcher sich aus dem Adapterprotein FADD („Fas-associated death domain protein“) und den Initiatorcaspasen-8 und -10 zusammensetzt (Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996). FADD selbst hat eine DD-Domäne, über welche es mit der DD von CD95 interagieren kann. Die Procaspase-8 wird mittels einer DED-DED-Interaktion („death effector domain“, DED) an FADD rekrutiert. Die räumliche Nähe der Initiatorcaspasen innerhalb des DISC führt zu deren Dimerisierung und autoproteolytischen Prozessierung. Aktive prozessierte Caspase-8, welche als Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten vorliegt, wird dann ins Zytosol freigesetzt. Abhängig vom Zelltyp kommt es nun auf zwei unterschiedlichen Wegen zur Aktivierung von Effektorcaspasen. In so genannten Typl-Zellen ist die aktive prozessierte Caspase-8 ausreichend, um direkt Effektorcaspasen wie Caspase-3 zu aktivieren. Diese wiederum initiiert die „Exekutionsphase“ der Apoptose, d.h. den eigentlichen Zelltod. Dieser Weg der Apoptoseinduktion wird auch als extrinsisch bezeichnet. In TyplI-Zellen hingegen ist die Aktivierung von Effektorcaspasen durch Initiatorcaspasen meist nicht ausreichend. Deshalb braucht es hier einen Amplifikationsloop, welcher auf der Caspase-8-vermittelten Spaltung des Bcl2-verwandten Proteins Bid („Bcl2 homology domain 3-interacting domain death agonist“) beruht. Die Spaltung von Bid resultiert in der Freisetzung des tBid-Proteins („truncated Bid“). Dieses wiederum transloziert zu den Mitochondrien und induziert dort Bax/Bak-abhängig („Bcl2-associated X protein“/„Bcl2 antagonist/killer“) die Freisetzung von mitochondriellen pro-apoptotischen Faktoren (z.B. Cytochrom c) und Antagonisten von Caspaseinhibitoren der IAP-Familie wie SMAC/Diablo („second mitochondria-derived activator of apoptosis“/„direct IAP binding protein with low pI“). Ferner wird Apaf-1 („apoptotic protease-activating factor-1“) von den Mitochondrien freigesetzt, welches dann an Cytochrom c bindet und zusammen mit der Procaspase-9 das so genannte Apoptosom bildet. Die Aktivierung der Caspase-9 innerhalb des Apoptosoms führt anschließend zur Aktivierung der Caspase-3 und die Apoptose kann eingeleitet werden. Dieser Weg der Apopto-

seinduktion wird auch als intrinsisch bezeichnet. Eine Übersicht der Abläufe der Apoptoseinduktion ist in Abbildung 3 gezeigt.

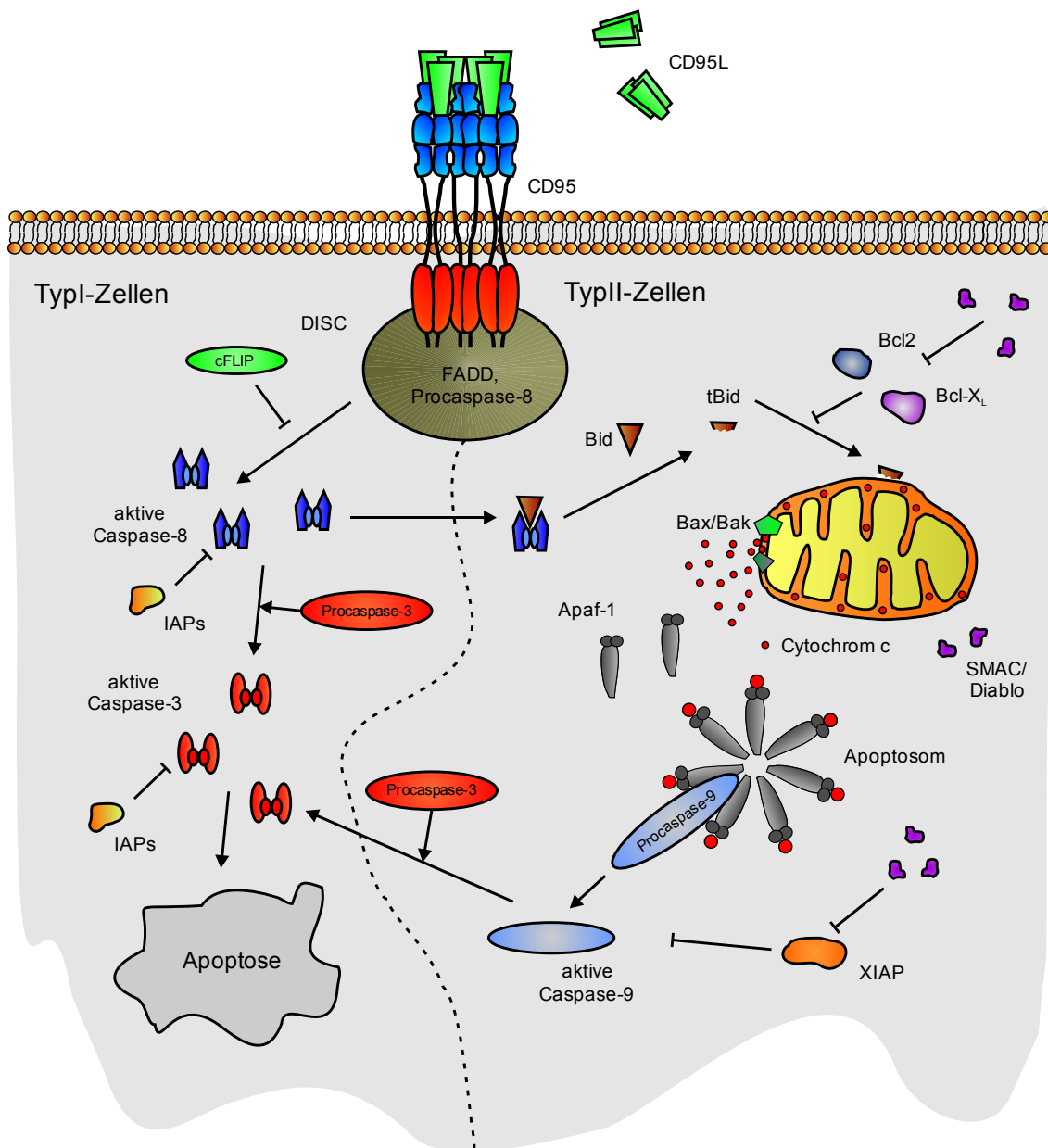


Abbildung 3: Übersicht über die Apoptoseinduktion von CD95. Details sind im Text beschrieben.

1.3.2 Regulation der CD95-vermittelten Apoptose

1.3.2.1 cFLIP-Proteine

Die Aktivierung der Caspasen-8 und -10 innerhalb des DISC kann durch so genannte „cellular FLICE-inhibitory proteins“ (cFLIPs) inhibiert werden (Tschopp et al., 1998). cFLIPs werden durch ein Gen kodiert, wobei es durch alternatives Spleißen zur Generierung von mehr als zehn verschiedenen cFLIP-mRNAs kommt, von denen aber nur drei auf Proteinebene detektierbar sind: die lange Form cFLIP_L (cFLIP_L), die kurzen Formen cFLIP_S (cFLIP_S) und cFLIP_R (cFLIP_R) (Golks et al., 2005; Krueger et al., 2001). Desweiteren gibt es einige virale Homologe von FLIP (Thome et al., 1997). FLIP-Proteine haben zwei DEDs und können über diese mit dem Adapterprotein FADD interagieren und an den DISC rekrutiert werden. Die lange cFLIP-Isoform weist zudem eine caspaseähnliche Domäne auf. FLIP_L ähnelt somit der Caspase-8, jedoch fehlt diesem Protein ein katalytisches Cystein, was zur Folge hat, dass cFLIP_L keine Proteaseaktivität besitzt. Alle cFLIP-Isoformen werden an den DISC rekrutiert, interferieren aber an verschiedenen Punkten mit der Prozessierung der Caspase-8. Die kurzen cFLIP-Isoformen FLIP_S und FLIP_R blockieren die Caspase-8-Prozessierung vollständig durch die Bildung inaktiver heteromerer dimerer Komplexe mit Caspase-8. Die Überexpression von cFLIP_L resultiert in der Rekrutierung von cFLIP_L und der Caspase-8 an den DISC, worauf die Caspase-8 zwar initial gespalten wird, die p43/41-Intermediate aber an den DISC gebunden bleiben (Krueger et al., 2001; Lavrik & Krammer, 2012). Es kommt somit nicht zur Bildung und Freisetzung der aktiven heterodimeren Form der Caspase-8. Einige Arbeiten postulieren auch, dass cFLIP_L eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen, wie der Aktivierung von NFκB und MAPK, spielt. Dies sei darauf zurück zu führen, dass cFLIP_L in der Lage ist, Adapterproteine zu rekrutieren, welche in den betreffenden Signalwegen eine tragende Rolle spielen (Kataoka et al., 2000).

1.3.2.2 Proteine der Bcl2-Familie

In TypII-Zellen, in denen die Todesrezeptor-induzierte Apoptose die Stimulation des intrinsischen Wegs erfordert, erfolgt die Regulation der Apoptoseinduktion auch durch anti-apoptotische Proteine der Bcl2-Familie (Youle & Strasser, 2008). Proteine, die zu den Bcl2-Mitgliedern gehören, zeichnen sich durch Aminosäuresequenzhomologien aus, welche konzentriert in bestimmten Regionen vorliegen, die als BH („Bcl2 homology domain“)-Domänen 1-4 bezeichnet werden (Reed, 2006). Innerhalb der Bcl2-Familie kann man drei Subgruppen

unterscheiden: Zum einen gibt es Proteine, die eine anti-apoptotische Wirkung haben, über BH1-, BH2-, BH3- und BH4-Domänen verfügen und wichtig für das Zellüberleben sind. Dazu gehören Bcl2, Bcl-X_L („a Bcl2-like protein“), Mcl-1 („myeloid cell leukaemia sequence-1“), Bfl-1 („Bcl2 regulated protein A1“) und Bcl-w („Bcl2-like 2“) (Kaufmann et al., 2012). Weiterhin gibt es Bax, Bak und Bok („Bcl2-related ovarian killer“), welche zwar eine strukturelle Ähnlichkeit zu den oben genannten Molekülen haben, aber im Gegensatz zu diesen keine BH4-Domäne besitzen und eine pro-apoptotische Wirkung haben. Nach Aktivierung vermitteln Bax/Bak die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, worauf es zur Freisetzung von apoptotischen Faktoren ins Zytosol kommt (Chipuk & Green, 2008). Bax/Bak können durch Bcl2 inhibiert werden. Die dritte Untergruppe stellen die so genannten BH3-only-Proteine dar, welche nur die BH3-Domäne haben (Huang & Strasser, 2000). Sie sind essentiell für die Initiierung des apoptotischen Signalings, indem sie an Bcl2 binden und dessen inhibierende Wirkung auf Bax/Bak verhindern. Zu ihnen werden unter anderem Bim, Puma und Bid gezählt.

1.3.2.3 Proteine der IAP-Familie

Weitere Proteine, welche eine regulatorische Wirkung auf die CD95-induzierte Apoptose haben, sind die „inhibitors of apoptosis“ (IAPs) (Srinivasula & Ashwell, 2008). IAPs sind gekennzeichnet durch eine variable Anzahl von so genannten BIR-Domänen („baculoviral IAP repeat“). Sie bestehen aus ca. 70-80 Aminosäuren und kodieren für ein Zinkfingermotiv (Hinds et al., 1999; Sun et al., 1999). Mitglieder der IAP-Familie können zudem funktionelle RING- oder CARD-Domänen („really interesting new gene“, „caspase-associated recruitment domain“) aufweisen. Die bekanntesten Vertreter XIAP („X-linked IAP“), cIAP1 und cIAP2 enthalten drei BIR-Domänen und eine RING-Domäne. Desweiteren gehören Survivin, ILP2 („inhibitor of apoptosis like protein 2“), ML-IAP („melanoma inhibitor of apoptosis“), NAIP („NLR family apoptosis inhibitory protein“) und BRUCE („BIR containing ubiquitin conjugating enzyme“) zur IAP-Familie. Am besten charakterisiert ist XIAP. XIAP kann Apoptose inhibieren, indem es Caspasen bindet und dadurch inaktiviert. Dazu gehören sowohl Effektorcaspasen, als auch die Initiatorcaspase-9 (Deveraux et al., 1999; Riedl et al., 2001). XIAP ist der einzige Vertreter der IAP-Familie, welcher in der Lage ist, aktive Caspasen zu blockieren. Dabei ist die Bindung an Caspase-3 sehr stark (Eckelman et al., 2006). Desweiteren besitzt die RING-Domäne E3-Ligaseaktivität und kann Signalproteine ubiquitylieren und so deren Degradation vermitteln (Galban & Duckett, 2010). Es liegen Befunde vor, dass die Menge an XIAP in einer Zelle entscheidend ist, ob es sich um eine TypI- oder TypII-Zelle handelt (Jost et al., 2009).

1.3.3 Frühe Ereignisse der CD95-Aktivierung

In Abwesenheit des CD95L liegen CD95-Moleküle in inaktiven Komplexen vor, deren Bildung durch die „pre-ligand assembly domain“ (PLAD) vermittelt wird (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). Die Bindung von CD95L resultiert in einer Konformationsänderung der vorgeformten Rezeptorkomplexe, wodurch diese signaltransduktionskompetent werden. Trimerer löslicher CD95L ist zwar in der Lage an CD95 zu binden, jedoch ist diese Bindung nicht ausreichend, um effektiv CD95-assoziierte Signalwege anzuschalten, d.h. die Formation von supramolekularen aktiven Rezeptorkomplexen einzuleiten. Die Oligomerisierung, d.h. Aktivierung trimerer CD95-Komplexe, kann jedoch durch membranständigen CD95L, Multimerisierung des trimeren Liganden, oder CD95-spezifische agonistische Antikörper erreicht werden (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Die Bindung von membranständigem oder multimerem CD95L führt zur Bildung von SDS- und β -Mercaptoethanol-stabilen Mikroaggregaten, wobei die Palmytylierung von CD95 an der Aminosäureposition des Cysteins 199 eine wichtige Rolle spielt. Es wurde auch beschrieben, dass diese Palmytylierung eine Voraussetzung für die Translokation von CD95 in detergentenzunlösliche Membrankompartimente, die so genannten „Lipid Rafts“, ist. Diese Translokation wiederum erleichtert die Internalisierung der Rezeptoren und führt zu einer verstärkten Aktivierung der Caspase-8 (Chakrabandhu et al., 2007; Feig et al., 2007). Anschließend formieren sich hoch stabile Cluster von CD95L und CD95, welche Adapterproteine, wie z.B. FADD, rekrutieren (Henkler et al., 2005). Gleichzeitig kann die Translokation dieser Cluster in „Lipid Rafts“ beobachtet werden. Es kommt zur Bildung so genannter SPOTS („signaling protein oligomeric transduction structures“), wobei eine effektive homophile Interaktion von FADD und der DD des Rezeptors essentiell ist (Siegel et al., 2004). Ferner kommt es zur Rekrutierung von Ezrin, einem Adapterprotein, welches die Verknüpfung von CD95 mit dem Aktin-Zytoskelett vermittelt. Die Aufgabe der SPOTS liegt laut Literatur darin, die effektive Rekrutierung und Prozessierung der Caspase-8 zu gewährleisten, worauf die CD95-Moleküle größere „Lipid Raft“-Plattformen ausbilden, was als weiteres Rezeptor-Clustern oder „Capping“ bezeichnet wird (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Eramo et al., 2004). Die nächsten Schritte sind die Clathrin-vermittelte Endozytose und Internalisierung der Rezeptor-Cluster, wonach diese in ein frühes endosomales Kompartiment entlassen werden (Lee et al., 2006). Die Signalkaskaden, welche nun durch Caspase-8 stimuliert werden, wurden bereits unter Punkt 1.3.1 erläutert. Abbildung 4 gibt einen vereinfachten Überblick über die Ereignisse der CD95-Aktivierung.

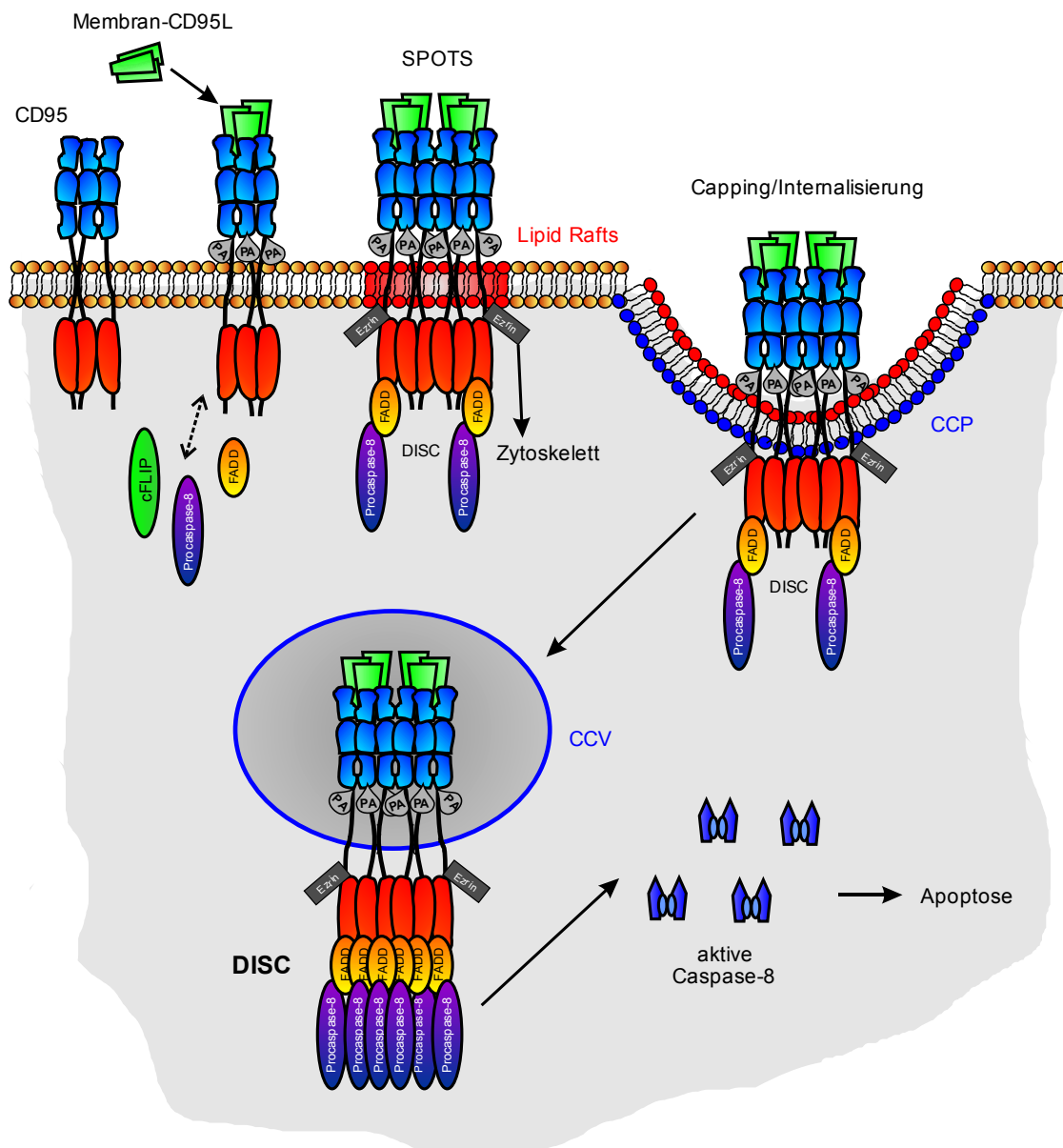


Abbildung 4: Eine schematisch vereinfachte Übersicht über die initialen Ereignisse der CD95-Aktivierung (modifiziert nach Schütze et al., 2008)

PA = Palmylierung, SPOTS = signaling protein oligomeric transduction structures, CCP = clathrin-coated pit, CCV = clathrin coated vesicle, DISC = death inducing signaling complex

1.3.4 Nicht-apoptotische Signalwege des CD95L/CD95-Systems

Der Todesrezeptor CD95 kann nicht nur Zelltod induzieren, sondern hat auch die Fähigkeit nicht-apoptotische zelluläre Antworten, wie z.B. Zellproliferation oder Differenzierungsprozesse, einzuleiten (Wajant et al., 2003). So wurde bereits 1993 beschrieben, dass CD95 die Proliferation von TCR-stimulierten („T-cell receptor“) T-Zellen und Thymozyten verstärkt und einen kostimulatorischen Effekt auf die Thymozytenaktivierung während der positiven Selektion hat (Alderson et al., 1993; Kurasawa et al., 2000). Dies ist auf einen Caspase-abhängigen, FADD-vermittelten Signalweg zurück zu führen (Kennedy et al., 1999). Desweiteren kann CD95 die Aktivierung von ERK1/2 („extracellular signal-regulated kinase“) vermitteln (Ahn et al., 2001). ERK1/2 gehören zur Gruppe der MAP-Kinasen. Eine weitere MAP-Kinase, die durch CD95 aktiviert wird, ist die so genannte „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK). Sie kann ebenfalls Proliferations- und Differenzierungsprozesse vermitteln, aber situationsabhängig auch Apoptose unterdrücken oder induzieren (Davis, 2000; Ham et al., 2003). Es liegen ferner Befunde vor, die aufzeigen, dass die Aktivierung von CD95 die Regeneration von Leberzellen nach partieller Hepatektomie beschleunigt (Desbarats & Newell, 2000). Das CD95L/CD95-System kann darüber hinaus auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzieren. Dies geschieht unter anderem durch die Aktivierung des NF κ B-Systems und der Freisetzung von Interleukin 8 (Mandal et al., 1996; Wajant et al., 2000). An der CD95-induzierten Aktivierung von NF κ B sind die Moleküle RIP, FADD und Caspase-8 beteiligt, wobei die enzymatische Aktivität Letzterer nicht notwendig ist (Hu et al., 2000; Kreuz et al., 2004). Wie bereits beschrieben, stimuliert CD95L die Aktivierung von nicht-apoptotischen Signalwegen wie NF κ B und MAP-Kinasen, was in der Induktion von onkogenen oder überlebensfördernden Genen resultieren kann (Legembre et al., 2004). Neuere Studien belegen, dass CD95 zudem den „Phosphatidylinositol 3-kinase“ (PI3K)-Signalweg zu stimulieren vermag und so z.B. die Invasivität von Glioblastomzellen erhöht. Dies beruht unter anderem darauf, dass aktivierte PI3K GSK3 β („glycogen synthase kinase 3- β “) inhibiert und es somit zur Expression von Matrix-Metalloproteinasen kommt (Kleber et al., 2008).

1.4 Die Rolle des detergenzunlöslichen „Lipid Raft“-Membrankompartiments bei der CD95-Aktivierung

Die Plasmamembran von Zellen ist eine heterogene Lipid-Doppelschicht, welche kompakte strukturierte detergenzunlösliche Mikrodomänen („detergent resistant microdomain“, DRM) enthält, z.B. so genannte „Lipid Rafts“ (Maxfield, 2002). Es wurde beschrieben, dass sich diese Mikrodomänen wie „Flöße“ in einer fluideren 2D Lipid-Doppelschicht bewegen. Sie können unterschiedliche Zusammensetzungen und verschiedene physikalische

Eigenschaften haben. In „Lipid Rafts“ sind z.B. Cholesterol und Sphingolipide angereichert. Proteine, welche in „Lipid Rafts“ lokalisiert sind, sind in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, frei in der Plasmamembran diffundieren zu können. Desweiteren können sich „Lipid Rafts“, als Reaktion auf extra- oder intrazelluläre Stimuli, in ihrer Größe und Zusammensetzung verändern, was wiederum einen Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen und die Aktivität von Signaltransduktionsproteinen hat (Lingwood & Simons, 2010; Simons & Toomre, 2000). Schon früher konnte demonstriert werden, dass die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“ eine entscheidende Rolle bei dessen Aktivierung spielt (Eramo et al., 2004). Zerstört man die Integrität der „Lipid Rafts“, z.B. durch Depletion von Cholesterol mittels Methyl- β -cyclodextrin, wird eine verringerte Caspase-8-Aktivierung und verminderte Apoptose beobachtet (Grassme et al., 2001). Die Palmylierung und Nitrosylierung von Cystein 199 und eine umliegende lysinreiche Region spielen für die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“ eine bisher wenig verstandene aber wichtige Rolle (Leon-Bollotte et al., 2011). In „Lipid Rafts“ kommt es zur Interaktion von CD95 mit Ezrin, welche die Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett und darauffolgend die Internalisierung des CD95 vermittelt (Parlato et al., 2000). Die Reorganisation von CD95 in DRMs kann auch in Abwesenheit von CD95 erfolgen. Dies kann unter anderem durch bestimmte Chemotherapeutika (z.B. Rituximab) oder synthetische Alkyl-Lysophospholipide, wie Edelfosin oder Perifosin, erreicht werden (Gajate & Mollinedo, 2007; Stel et al., 2007). Die intrazellulären molekularen Vorgänge, die diesem Prozess zu Grunde liegen, sind jedoch noch unzureichend geklärt. Nichtsdestotrotz wird vermutet, dass es zu Veränderungen kommt, welche die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran verändern, wie z.B. deren Fluidität. Diese Veränderungen könnten die CD95L-induzierten initialen Schritte der CD95-Aktivierung nachahmen und die Aggregation und das Clustern von CD95 in „Lipid Rafts“ begünstigen, was folglich die Bildung des DISC und die Induktion von apoptotischen Signalen erleichtert bzw. ligandenunabhängig induziert (Segui & Legembre, 2010). So wird diskutiert, dass die CD95L-unabhängige CD95-Aktivierung auf post-translationalen Modifikationen von CD95 beruht und dadurch die Translokation des Rezeptors in „Lipid Rafts“ unterstützt oder auch verhindert wird (Tauzin et al., 2012). Die Behandlung von entarteten Zellen mit synthetischen Stoffen wie Edelfosin wird als eine neue Apoptose-gerichtete Krebstherapie diskutiert: Die antitumorale Wirkung des CD95L kann therapeutisch nicht direkt genutzt werden, da es bei systemischen Behandlungen mit CD95-Aktivatoren aufgrund der hohen CD95-Sensitivität der Leber zu hoher Lebertoxizität und schweren Leberschäden kommt. Mittels antitumoralen Medikamenten wie Edelfosin kann eine CD95L-unabhängige Therapie angewendet werden, welche den weiteren Vorteil birgt, dass Edelfosin bevorzugt von Tumorzellen aufgenommen wird und normale gesunde Zellen weniger beeinflusst werden (Mollinedo & Gajate, 2006).

1.5 Physiologie und Pathophysiologie von CD95

Befunde zur Physiologie und *in vivo*-Funktionalität von CD95 und CD95L stammen vor allem aus Mäusen (Cohen & Eisenberg, 1991). Eine Mutation im Gen, welches für CD95 kodiert (*lpr*-Mäuse), oder eine Mutation im CD95L-Gen (*gdl*-Mäuse) führt aufgrund von fehlender Immunzellapoptose zu vergrößerten Lymphknoten und zu Autoimmunerkrankungen (Takahashi et al., 1994a; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Beim Menschen entspricht dies dem so genannten autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom („ALPS“), das in Patienten mit Mutationen im CD95 oder CD95-assoziierten Signaltransduktionsmolekülen auftritt (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995). ALPS-Patienten zeigen oft Erkrankungen der Lymphknoten und der Milz. Ferner finden sich vergrößerte Populationen von doppel-negativen α/β -T-Lymphozyten und Betroffene entwickeln häufig autoimmune Erkrankungen, da die Apoptoseinduktion und folglich die Regulation der Lymphozytenentwicklung und die Zerstörung autoreaktiver Zellen gestört ist. Zudem haben ALPS-Patienten ein erhöhtes Risiko Hodgkin-Lymphome zu entwickeln, d.h. bösartige Tumore des Lymphsystems (Straus et al., 2001).

Das CD95/CD95L-System ist auch an der Regulation von Differenzierungs- und Regenerationsprozessen beteiligt. Während der neuronalen Entwicklung kommt es zur Expression von CD95 und/oder CD95L auf Neuronen (Park et al., 1998; Shin et al., 2002). Mäuse, welche Defekte in der CD95-Expression aufweisen, zeigen kognitive und sensomotorische Dysfunktionen (Lambert et al., 2003). Auch in Leberzellen wird CD95, wie bereits erwähnt, konstitutiv exprimiert und ist dort an der Kontrolle der Leberhomöostase und -regeneration beteiligt (Adachi et al., 1995). Es gibt auch Hinweise auf CD95-vermittelte Signalwege im Herzen und den Einfluss des CD95/CD95L-Systems auf die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) (Badorff et al., 2002; Lucas et al., 1998).

In der heutigen Wissenschaft besteht großes Interesse daran, CD95-vermittelte Signalwege in Krebszellen im Detail zu verstehen, d.h. an der Tumorbilogie des CD95/CD95L-Systems. In einem kürzlich erschienenen Review wurden die vielfältigen Mutationen und post-translationalen Regulationen von CD95 aufgezeigt (Tauzin et al., 2012). Das CD95/CD95L-System kann sowohl karzinogene, als auch Tumor-supprimierende Aufgaben übernehmen. Von Seiten des Immunsystems wird das Tumorwachstum vornehmlich durch T-Zellen und NK-Zellen verhindert. Dies geschieht entweder durch die Freisetzung von Perforin und Granzymen oder durch Apoptoseinduktion durch CD95L und TRAIL, wobei Letztere auch proinflammatorische Antworten vermitteln können (Wajant, 2006). Es wurde aber auch beschrieben, dass CD95 Tumorwachstum begünstigt (Chen et al., 2010). Um die entarteten Zellen herum kommt es zur Entwicklung eines Tumormikromilieus, das immunsuppressiv wirken kann. Dabei spielt die CD95L-Expression auf den Tumorzellen eine wichtige Rolle, da dadurch anti-tumorale Immunantworten durch Apoptose in Immunzellen herunter reguliert wer-

den können (Hahne et al., 1996). Tumorexprimierter CD95L ist z.B. dafür verantwortlich, dass in Tumor-infiltrierende Lymphozyten Apoptose induziert wird. Dieser Vorgang wird als „CD95 counterattack“ (Gegenangriff) bezeichnet (Bennett et al., 1998). Desweiteren wird dem CD95L eine Aufgabe bei der Metastasierung und Tumordinvasion zugesprochen. In Lymphknotenmetastasen konnte eine erhöhte CD95L-Expression nachgewiesen werden (Adachi et al., 2003). Ein Hindernis bei der Tumorbekämpfung ist die Tatsache, dass entartete Zellen meist Mechanismen entwickelt haben, welche sie resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose machen, z.B. durch die Freisetzung von löslichen Decoy-Rezeptoren oder durch Inhibition der CD95-Expression und der Induktion anti-apoptotischer Proteine (Irmeler et al., 1997). Die molekularen Mechanismen, welche zwischen pro- und antitumoralem CD95-vermitteltem Signaling entscheiden, müssen in Zukunft noch detaillierter untersucht werden, um wirkungsvolle Therapien entwickeln zu können.

1.6 Das CD95L/CD95-System in der Krebstherapie

Die Identifikation von molekularen Markern, welche mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebs in Verbindung gebracht werden, eröffnet neue Möglichkeiten in der Entwicklung von antitumoralen Therapeutika. Die Aktivierung von Todesrezeptoren wie CD95 auf entarteten Zellen kann als Methode in der Krebsbekämpfung in Erwägung gezogen werden (Bodmer et al., 2002), z.B. durch oligomerisierte lösliche Varianten von CD95L. Es liegen Befunde vor, dass löslicher CD95L nach Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix, im Gegensatz zu freien löslichen Trimeren, eine hohe Aktivität aufweist (Aoki et al., 2001). Aufgrund dessen wurden scFv-Fusionsproteine („single chain variable fragment“) entwickelt, die nach Bindung an ein zellständiges Antigen Membran-CD95L-ähnliche Aktivität zeigen (Abbildung 5). Trimerer scFv-CD95L besitzt N-terminal ein „single chain“-Antikörperfragment, welches ein spezifisches Antigen auf Zelloberflächen erkennt. Adressiert man nun tumor- oder tumorstromaspezifische Marker, ist es möglich CD95 gezielt am Tumor zu aktivieren. Dies ist sehr wichtig in Anbetracht der Tatsache, dass nach systemischer Aktivierung von CD95 gefährliche Nebeneffekte auftreten können. CD95L-Fusionsproteine, welche durch einen Antikörper an der Zelloberfläche immobilisiert wurden, können zudem nicht nur autokrin wirken, sondern auch parakrin, d.h. sie haben auch das Potential, Apoptose in benachbarten Antigen-negativen Zellen zu induzieren (Bremer et al., 2004). Die Immobilisierung von CD95L kann aber nicht nur durch Antikörperfragmente erreicht werden, sondern auch durch andere Bindedomänen, so z.B. die extrazellulären Domänen von CD40 oder RANK, zwei Nicht-Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie. Derartige Fusionsproteine

erzielen dann nach Bindung an ihre membranständigen Liganden eine stark gesteigerte Aktivierung von CD95 (Assouh-Luty et al., 2006) (Abbildung 5).

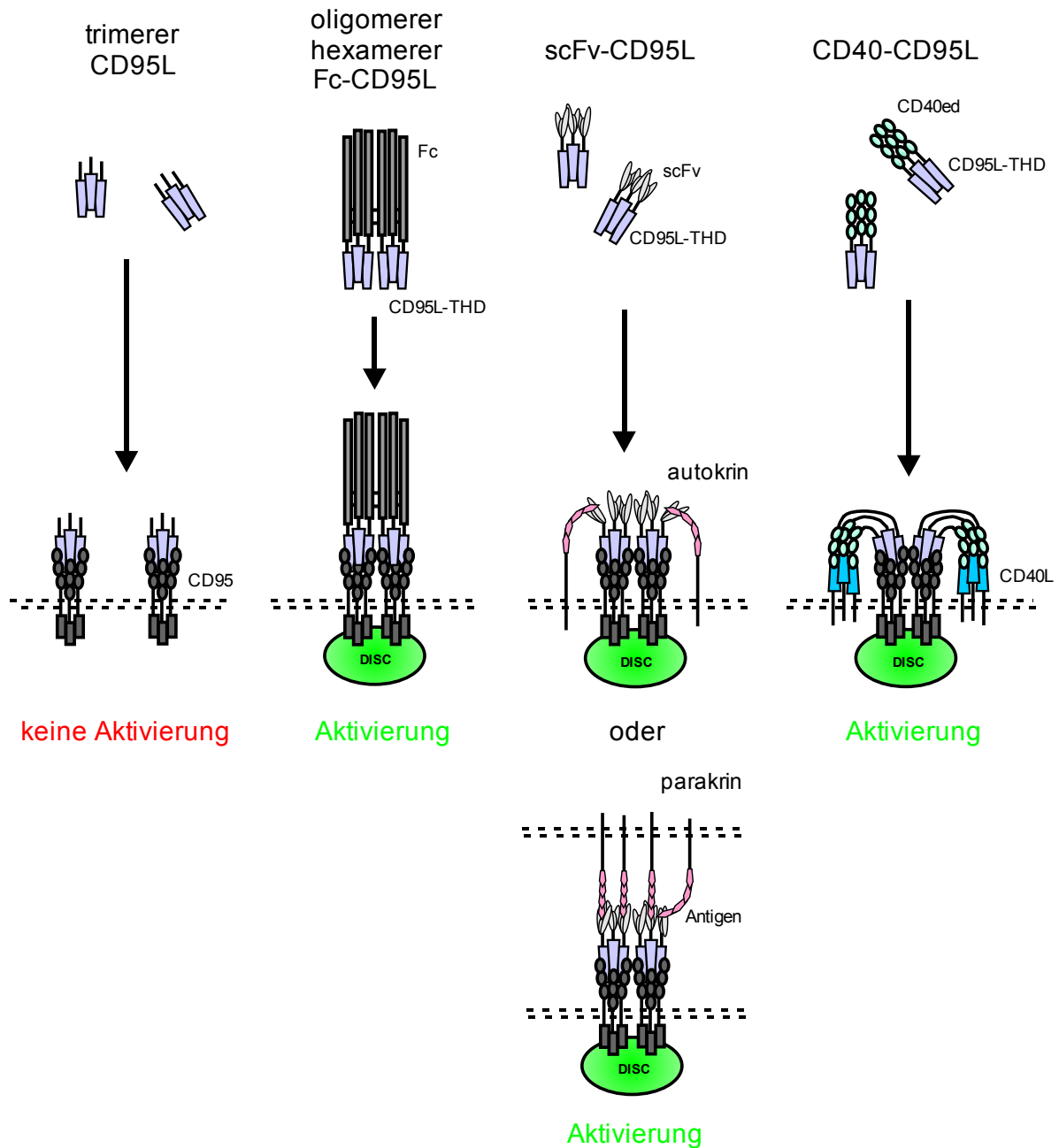


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener Ansätze für die Verwendung von CD95L-Fusionsproteinen in der Tumorthherapie

Die Abbildung zeigt einige Beispiele für den Einsatz von CD95L-Fusionsproteinen in der Tumorthherapie, so z.B. aktive oligomere CD95L-Varianten und scFv-CD95L oder CD40-CD95L. Genauere Details sind im Text beschrieben. scFv = single chain variable fragment, THD = TNF-Homologiedomäne, DISC = death inducing signaling complex, ed = extracellular domain.

1.7 Zielsetzung

Die wichtigsten Schritte der CD95-Signaltransduktion sind in der Vergangenheit eingängig studiert worden, doch insbesondere für die initialen Ereignisse der CD95-Aktivierung sind in der Literatur meist nur kontroverse Daten vorhanden. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die frühen Ereignisse der Aktivierung von CD95 näher zu untersuchen. Zum einen die Interaktion von verschiedenen löslichen trimeren und oligomeren CD95L-Varianten mit CD95 und *vice versa* die Bindung von monomeren und trimeren CD95-Rezeptoren an membranständigen CD95L. Insbesondere galt es die Mechanismen der Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“ zu untersuchen und zu klären, inwieweit hier möglicherweise löslicher und membranständiger CD95L unterschiedlich wirken.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

1kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-FLAG M2 Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Cycloheximid (CHX)	Sigma, Deisenhofen
DMEM Medium	PAA, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	J. T. Baker, Leipzig
Ethanol	J. T. Baker, Leipzig
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Flag-Peptid	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Iodoacetamid	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, Leipzig
Milchpulver	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA, Pasching, Österreich
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphataseinhibitor II	Sigma, Deisenhofen
Polybren	Sigma, Deisenhofen
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Protein G Agarose	Roche, Mannheim
Silbergelmarker (Low Molecular Weight)	GE Healthcare, Garching
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Österreich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma, Deisenhofen

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

2.1.1 Enzyme

T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot

Enzyme, welche für die Klonierungen der verwendeten Fusionsproteine verwendet wurden, stammen von Fermentas, St. Leon-Rot.

2.1.2 siRNA Oligonukleotide

Alle verwendeten siRNA-Oligonukleotide stammen von der Firma Qiagen (Hilden).

Caspase-8: Sense: 5'-CAAAGUUUACCAAUGAAATT-3'
 Antisense: 5'-UUUCAUUUGGUAACUUUGTC-3'

Als Kontrollgruppe wurde in jedem Experiment ebenfalls ein unspezifisches siRNA-Oligonukleotid verwendet (AllStars® Negative Control siRNA).

2.2 Antikörper

Anti-Bcl2	Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Caspase-3	Kaninchen polyclonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Caspase-8	Maus monoklonal	Schulze-Osthoff,

Anti-Caspase-8	Ziege polyklonal	Universität Düsseldorf Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Caspase-8	Maus monoklonal	Enzo, Lörrach
Anti-Caspase-9	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-CD40 (FACS)	Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-CD40 (Western Blot)	Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD95	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-CD95-FITC	Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-ERK	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-FADD	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Flag (M2)	Maus monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-FLIP (NF6)	Maus monoklonal	Enzo, Lörrach
Anti-Flotillin	Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IL8 (OptEIA ELISA)		BD Biosciences, Heidelberg
Anti-IkBa	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Kaninchen IRDye 800	Ziege polyklonal	LI-COR Bioscience, Bad Homburg
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Maus IgG-PE	Ziege polyclonal	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus IRDye 800	Ziege polyklonal	LI-COR Bioscience, Bad Homburg
Anti-Maus-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-NGFR-PE	Maus monoklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-PE-Beads		Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Anti-phospho-IkBa	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Anti-Transferrinrezeptor	Maus monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Tubulin	Maus monoklonal	Dunn Labortechnik, Ansbach
Anti-Ziege-HRP	Kaninchen polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark

2.3 Kits

OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
PageSilver™ Silver Staining Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Gaussia</i> Luciferase Assay Kit	New England Biolabs, Frankfurt
NucleoSpin Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren
Pure Yield Plasmid Miniprep/Midiprep System	Promega, Mannheim

2.4 Verbrauchsmaterial und Geräte

Agfa Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf
Begasungsschrank Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau
Dialyseschlauch "Viking", MWCO 15kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometrie Röhrchen	Falcon, Heidelberg
Elektrophoresesystem "Mini-Protean Tetra Cell"	BioRad, München
Elektroporator Equibio EasyjecT Plus	PeqLab, Erlangen
Gellaufkammern SDS-PAGE	PeqLab, Erlangen
Heizblock	PeqLab, Erlangen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld
Nitrozellulosemembran, 0.2 µM Porengröße	Whatman, Dassel
PCR-Thermocycle Primus	MWG Biotech, Ebersberg
Polyallomerröhrchen	Seton, Los Gatos, CA, USA
Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge OPTIMA-L70	Beckman Coulter, Krefeld
Multi-Well Platten	Greiner, Frickenhausen
Wet-Blotkammer	PeqLab, Erlangen
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen

2.5 Lösungen und Puffer

Assay Diluent:	1 x PBS 10 % (v/v) FCS
Blotpuffer:	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
ELISA Coating Buffer:	0.1 M Carbonat pH 9,5
Kristallviolettlösung:	20 % (v/v) Methanol 0,5 % (w/v) Kristallviolett
Laemmli-Puffer (SDS-PAGE, 4 x):	8 % (w/v) SDS 10 % β -Mercaptoethanol; 40 % Glycerol 0,2 M Tris 0,04 % Bromphenoblau
Laufpuffer (SDS-PAGE):	0,05 M Tris 0,38 M Glycin 0,004 M SDS pH 8,3
LB Medium:	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g/l NaCl
MACS-Puffer:	1 x PBS 0,5 % (w/v) BSA 0,002 M EDTA
PBS:	0,02 M Na-Phosphat 0,7 % (w/v) NaCl pH 7,2

PBST:	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20
PBST in Milch:	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE):	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
TAE-Puffer:	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TBS:	0,02 M Tris 8 % (w/v) NaCl pH 7,6
TBST:	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween-20
TBST in Milch:	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
TNE-Puffer:	0,025 M Tris 0,15 M NaCl 0,005 M EDTA 0,001 M Pefabloc 0,005 M Iodoacetamid 0,001 M NaF 0,001 M Na ₃ VO ₄
Trenngelpuffer (SDS-PAGE):	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8

Triton X-100 Lysispuffer:	0,03 M Tris-HCl
	1 % (v/v) Triton X-100
	10 % Glycerol
	0,12 M NaCl
	pH 7,5

2.6 Zellen

2.6.1 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden.

HEK293	Institutseigener Vorrat	embryonale Nierenzelllinie
HT1080	Institutseigener Vorrat	Fibrosarkom
HaCaT	Institutseigener Vorrat	Keratinocyten
A498	Institutseigener Vorrat	Nierenzellkarzinom
HT1080-CD40-CD95	eigene Herstellung (retrovirale Transfektion)	Fibrosarkom
HT1080-CD40-CD95 _(V238N)	eigene Herstellung (retrovirale Transfektion)	Fibrosarkom
HaCaT-CD40-CD95	eigene Herstellung (retrovirale Transfektion)	Keratinocyten
HaCaT-CD40-CD95 _(V238N)	eigene Herstellung (retrovirale Transfektion)	Keratinocyten
HaCaT-Bcl2	Zu Verfügung gestellt von Tina Giner (Dermatologie, Universitätsklinikum Würzburg) (Haake & Polakowska, 1995)	Keratinocyten
HT1080-GFP-Bcl2	Institutseigener Vorrat (Siegmund et al., 2005)	Fibrosarkom

2.6.2 Prokaryotische Zellen

NEB 5-alpha Competent *E.coli* wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

2.7 Fusionsproteine/Plasmide

Die Fusionsproteine Flag-CD95L, Fc-Flag-CD95L, Fc-Flag-CD40L, CD95-Flag-GpL und CD95-TNC-Flag-GpL wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin, Würzburg, kloniert und wie unter Punkt 3.3 beschrieben in HEK293-Zellen produziert. GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L wurden selbst kloniert und produziert.

Die Plasmide für die Generierung von CD40-CD95- und Kontroll-Transfektanten waren in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die Punktmutation V238N in der Todesdomäne von CD95 wurde von der Firma Entelechon (Regensburg) in das Plasmid für CD40-CD95 eingeführt.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) in RPMI 1640 Medium (PAA, Pasching) mit 10 % FCS (hitzeinaktiviert) kultiviert. HaCaT-Zellen wurden in DMEM Medium (PAA, Pasching) mit 10 % FCS gehalten. Um adhärente Zellen zu ernten, wurden diese mit Trypsin (0,025 %)/EDTA (10 mM) abgelöst und für 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Ein Zellrest von 10 - 20 % wurde jeweils weiterkultiviert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zum Kryokonservieren von Zellen wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) aufgenommen und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

3.2 Klonierung von GpL-Fusionsproteinen

Zur Klonierung von GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L wurden zunächst der Parentalvektor und das entsprechende Insert (unterstrichen) mit Restriktionsenzymen verdaut.

	Parentalvektor	Vektorver- dau	<u>Insertvektor</u>	Insertver- dau
GpL-Flag-CD95L	Flag-CD95L-S2- pCR3	BamH1, Hind3	<u>GpL</u> -luci-pMA	BamH1, Hind3
GpL-Fc-Flag-CD95L	GpL-Fc-Flag- CD40L-pCR3	EcoR1, Xba1	Flag- <u>CD95L</u> - pCR3	EcoR1, Xba1

Anschließend erfolgte die Ligation des verdauten Parentalvektors mit dem entsprechenden verdauten Insert. Der Ligationsansatz wurde dann in kompetente Zellen transformiert und positiven Klone selektioniert. Im Anschluss wurden die selektionierten Plasmide in *E.coli* produziert und isoliert. Zuletzt erfolgte die Überprüfung der Sequenz und Produktion der Liganden in HEK293-Zellen.

3.3 Produktion und Aufreinigung von GpL-Fusionsproteinen

3.3.1 Produktion

Die Plasmide der GpL-CD95L-Konstrukte wurden zunächst mittels Elektroporation in HEK293-Zellen eingebracht. Dafür wurden die Zellen abtrypsinisiert, geerntet und abzentrifugiert (1200 rpm, 4 min, RT). Danach wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert, versetzt mit 40 µg Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette (4 mm) überführt und elektroporiert (250 V, 1800 µF, maximaler Widerstand). Anschließend wurden die elektroporierten Zellen in einer großen Zellkulturschale (Greiner) in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS (+ Penicillin/Streptomycin) über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden für 5-7 Tage in 20 ml RPMI 1640 Medium mit 2 % FCS (+ Penicillin/Streptomycin) weiterkultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellüberstände mit den sekretierten rekombinanten Liganden geerntet und für 10 min bei 4600 rpm abzentrifugiert.

3.3.2 Aufreinigung

Die CD95L-Varianten wurden mittels Flag-spezifischer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurden pro 600 µg aufzureinigendem Protein 1 ml anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die M2 Agarosebeads wurden in eine Säule überführt und zunächst mit TBS gewaschen. Im Anschluss wurde der entsprechende Zellkulturüberstand auf die Beads-Säule gegeben. Die Bindung der darin enthaltenen Flag-getaggten Proteine erfolgte mit einer Tropfgeschwindigkeit von mindestens 10 sec bei 4 °C. Danach wurde die Säule erneut mit TBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in Fraktionen von 0,5 ml nach Zugabe von Elutionspuffer, bestehend aus 100 µg/ml Flag-Peptid in TBS. Dabei durfte die Tropfgeschwindigkeit höchstens 2-3 Tropfen pro Minute betragen. Nach erfolgreicher Elution wurden die Agarosebeads mit TBS gewaschen, in ein 50 ml Falcon überführt und für 10 min bei 4600 rpm zentrifugiert. Die Lagerung der Beads erfolgte nach Zugabe von Glycerollösung (50 % Glycerol in TBS, 0,02 % Natriumazid) bei -20 °C. Die eluierten Proteine wurden über Nacht gegen PBS dialysiert, um das Flag-Peptid zu entfernen. Im Anschluss wurden die Proteinlösungen steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Der Erfolg der Proteinaufreinigung wurde mittels Western Blot analysiert (Auftrag, Durchlauf, Elutionsfraktionen, Waschschriffe, Agarosebeads).

3.4 Retrovirale Infektion und Zellsortierung

Die DNAs, welche für die verwendeten chimären CD40-CD95-Rezeptoren codieren, wurden in den retroviralen Vektor pLZNGFR-PKG kloniert. Dieser Vektor wurde von Dr. Max Topp (Klinische Forschergruppe, Universitätsklinikum Würzburg) bereitgestellt. Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden einem Phosphoglycerat-Kinase (PKG) Promotor nachgeschaltet. Upstream dieses Promoters ist eine verkürzte Form des NGF-Rezeptors („nerve growth factor“) gelegen. Die retroviralen CD40-CD95-Konstrukte wurden in HEK293 Zellen mit einem pCL10-A1 Verpackungsplasmid mittels Lipofectamine™ 2000 nach Herstellerprotokoll ko-transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellüberstände, welche die Viruspartikel enthielten, geerntet und filtriert (0,4 µM). Am nächsten Tag wurden HaCaT- und HT1080-Zellen mit dem entsprechenden Virusüberstand für 2 h bei 32 °C zentrifugiert. Dies geschah in der Anwesenheit von 1 µg/ml Polybren. Nach einigen Tagen wurden die infizierten Zellen im FACS auf die NGF-Rezeptor-Expression hin untersucht und die positiven Zellen mit Hilfe von anti-Phycoerythrin (PE)-Beads nach Herstellerprotokoll immunselektiert.

3.5 Transfektion mit siRNA Oligonukleotiden

Zu Beginn wurden pro Versuchsgruppe jeweils $1,5 \times 10^6$ HaCaT-Zellen in eine mittlere Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden für jede Gruppe 85 pM des jeweiligen siRNA-Oligonukleotids verwendet. Die Transfektion wurde mit Hilfe von Lipofectamin 2000 nach Herstellerangaben durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen weitere 24 h bis zum Versuchsbeginn kultiviert. Ein erfolgreicher Caspase-8-Knockdown wurde im entsprechenden Experiment im Western Blot überprüft. Die Transfektion mit siRNA Oligonukleotiden und die entsprechenden Kontroll-Western Blots wurden von Martina Jossberger (Dermatologie, Universitätsklinikum Würzburg) durchgeführt.

3.6 Western Blot

3.6.1 SDS-PAGE

Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Für das Trenngel wurde ein Trenngelpuffer (0,374 M Tris pH 8,8; 0,0035 M SDS; 0,1 % APS) mit 12 % Acrylamid verwendet. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,1 % TEMED herbeigeführt.

Das Trenngel wurde vor der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgeschüttet und der Rest abgesaugt. Das Trenngel wurde nun mit dem Sammelgel überschichtet (6 % Polyacrylamid in 0,123 M Tris pH 6,8; 0,00375 M SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED). Vor der Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der entsprechende Kamm eingesetzt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Proteinproben auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 90 Minuten bei 120 Volt.

3.6.2 *Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose*

Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Wet-Blotkammer (PeqLab, Erlangen). Die Nitrozellulosemembran wurde in Blotpuffer getränkt und in folgender Anordnung in die Blotkammer gelegt: Anode - 2 Lagen Whatman-Papier - Nitrozellulose - Gel - 2 Lagen Whatman-Papier - Kathode. Das Blotting selbst erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 400 mA.

3.6.3 *Immundetektion*

Zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in PBST-Milch, bzw. TBST-Milch bei phospho-spezifischen Antikörpern, auf einem Schüttler geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in PBST bzw. TBST für 10 min wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit dem Erstantikörper (Konzentrationen nach Angaben des Herstellers) in PBST oder TBST inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut dreimal für 10 min gewaschen. Die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten bzw. fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in PBST oder in TBST-Milch. Anschließend wurde die Membran wieder drei Mal für 10 min in PBST oder TBST gewaschen und dabei geschwenkt. Die Nachweisreaktion erfolgte unter Verwendung des ECL-Systems oder durch das LI-COR Odyssey-System.

3.7 Silberfärbung

100 ng der verschiedenen gereinigten rekombinanten Liganden wurden zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele danach mit dem PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Herstellerprotokoll gefärbt.

3.8 Durchflusszytometrie

Um die Expression der chimären CD40-CD95-Rezeptoren zu bestimmen, wurden die verschiedenen Transfektanten mit gelabelten CD40- bzw. NGF-Rezeptor-Antikörpern und der entsprechenden Isotypkontrolle für 30 min bei 4 °C inkubiert. Dabei wurden pro Probe etwa 10^5 Zellen verwendet. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die zellgebundenen Antikörper im FACS detektiert. Zur Detektion von endogenem CD95 wurden gelabelte CD95-spezifische Antikörper und die entsprechenden Isotypkontrollen verwendet.

3.9 IL8 ELISA

Zur Bestimmung der IL8-Produktion wurden zunächst Zellen in 96-Well Flachbodenplatten ausgesät (20×10^3 Zellen pro Well, Dreifachwerte) und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um den Hintergrund von konstitutiv produziertem IL8 zu minimieren. Im Anschluss wurden die Zellen mit 20 µM des pan-Caspaseinhibitors zVAD-fmk und in den entsprechenden Gruppen mit CHX (2,5 µg/ml) für 30 min vorbehandelt. Die Oligomerisierung von Flag-CD95L bzw. GpL-Flag-CD95L mit dem Flag-tag-spezifischen Antikörper M2 (1 µg/ml) erfolgte auch 30 min vor Stimulation bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen mit sequentiellen Verdünnungsreihen der angegebenen CD95L-Varianten für 6 h inkubiert und im Anschluss die Überstände geerntet und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die IL8-Konzentration in den Überständen nach Herstellervorgaben mittels dem BD „OptEIA Human IL-8 ELISA Kit“ bestimmt.

3.10 Zytotoxizitätsassay

Die verwendeten Zelllinien wurden in 96-Well Flachbodenplatten ausgesät (20×10^3 Zellen pro Well) und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Triplikaten mit der jeweils angegebenen Ligandvariante in sequentiellen Verdünnungen stimuliert. Dies geschah in An- oder Abwesenheit von $2,5 \mu\text{g/ml}$ CHX. Die Vorstimulation mit CHX erfolgte für mindestens 30 min. Die Oligomerisierung von Flag-CD95L bzw. GpL-Flag-CD95L mit dem Flag-spezifischen Antikörper M2 ($1 \mu\text{g/ml}$) wurde ebenfalls 30 min vor Stimulation bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellvitalität wurde nach 18 h mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt. Hierzu wurden die Überstände verworfen und die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur mit $50 \mu\text{l}$ Kristallviolett-Lösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol) behandelt. Danach wurden die Platten dreimal in H_2O gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurde das Kristallviolett mittels Zugabe von $150 \mu\text{l/Well}$ Methanol gelöst und die Platten im ELISA-Reader (Anthos Labtec, Krefeld) bei einer Wellenlänge von 595 nm analysiert.

3.11 Luziferaseassays

3.11.1 Gleichgewichtsbindungsstudien

Um Gleichgewichtsbindungsstudien durchzuführen, wurden Zellen in 24-Well Platten (20×10^4 pro Well) ausgesät und über Nacht kultiviert. Die unspezifische Bindung wurde folgendermaßen bestimmt: Die Hälfte der Zellen wurde mit hohen Konzentrationen eines Antagonisten (Flag-CD95L bzw. Fc-Flag-CD95L) der GpL-CD95L-Varianten für 30 min bei 37°C vorbehandelt (Block). Anschließend wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen GpL-Flag-CD95L, oligomerisiertem GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Oligomerisierung von GpL-Flag-CD95L erfolgte mit $1 \mu\text{g/ml}$ M2-Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur. Um ungebundenen Liganden zu entfernen, wurden die Zellen 10 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden zu jedem Well $50 \mu\text{l}$ Medium (RPMI 1640, 0,5 % FCS, Penicillin/Streptomycin) gegeben, die Zellen abgekratzt und in eine schwarze 96-Well Platte überführt (Greiner). In einem Well wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, um später die Rezeptoranzahl pro Zelle berechnen zu können. Um die GpL-Aktivität in den verschiedenen Proben zu quantifizieren, wurde die enzymatische Reaktion mittels Zugabe von $10 \mu\text{l}$ der Luziferaselösung (GpL-Substrat 1:100 in GpL-Puffer, *Gaussia* Luciferase Assay Kit, New England Biolabs, Frankfurt) gestartet und die Lumineszenz in einem Lucy 2 Luminometer (Anthos Labtec, Kre-

feld) sofort gemessen (Verweildauer 1 Sekunde pro Well). Parallel wurde die Luziferaseaktivität einer definierten Menge des verwendeten GpL-CD95L-Konstrukts gemessen, um die relativen Lichteinheiten in Molekülzahlen umrechnen zu können. Die Messung wurde in Gruppen von jeweils acht Wells (1 Spalte) gemessen, da die Luziferaseaktivität sehr schnell abnimmt. Anhand von Standardmessungen mit GpL-Fusionsproteinen bekannter konstanter Konzentration, ergab sich dabei ein Messfehler ($< 5\%$), der bei der Auswertung korrigiert wurde. Die spezifische Bindung wurde als Differenz der totalen Bindung (Proben ohne Block) und der korrespondierenden nichtspezifischen Bindung (Block) definiert.

3.11.2 Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten k_{off}

Die verschiedenen verwendeten Zelllinien wurden über Nacht in 24-Well Platten ausgesät (20×10^4 pro Well). Zunächst wurde die Hälfte der Zellen mit $2 \mu\text{g/ml}$ Flag-CD95L blockiert (30 min, 37°C), um die unspezifische Bindung bestimmen zu können. Danach wurden alle Zellen mit einer konstanten Konzentration GpL-Flag-CD95L (25 ng/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert, um eine Gleichgewichtsbindung zu erreichen. Im Anschluss wurde zeitabhängig ein Überschuss an Flag-CD95L ($1,5 \mu\text{g/ml}$) zu den einzelnen Gruppen gegeben, um eine erneute Bindung von GpL-Flag-CD95L-Molekülen zu verhindern, die von CD95 dissoziieren. Die Messung der spezifischen Bindung erfolgte, wie unter Punkt 3.11.1, beschrieben.

3.11.3 Bestimmung der Assoziationsratenkonstanten k_{on}

Um die Assoziationskinetik von GpL-Flag-CD95L zu messen, wurden 20×10^4 Zellen pro Well in 24-Well Platten ausgesät und am nächsten Tag für steigende Zeitintervalle mit drei konstanten Konzentration GpL-Flag-CD95L behandelt. Die zellgebundene Luziferaseaktivität wurde wie unter Punkt 3.11.1 beschrieben ermittelt. Um die unspezifische Bindung zu erfassen, wurde die Hälfte der Zellen mit Flag-CD95L ($2 \mu\text{g/ml}$) geblockt und im Anschluss parallel behandelt.

3.11.4 Homologe Konkurrenzexperimente

Für homologe Konkurrenzassays wurden ebenfalls Zellen über Nacht in 24-Well Platten ausgesät (20×10^4 pro Well) und am nächsten Tag mit Mischungen aus konstant 25 ng/ml GpL-Flag-CD95L und steigenden Konzentrationen Flag-CD95L für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die zellassoziierte Lumineszenzaktivität von GpL-Flag-CD95L wurde gemessen, wie es bei den Gleichgewichtsbindungen (Abschnitt 3.11.1) beschrieben ist.

3.11.5 Analyse der Bindungsdaten

Die Regressionsanalysen und die Kalkulation der kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5.0 Analyse-Software durchgeführt. Im Folgenden sind Formeln und Definitionen der berechneten Größen beschrieben:

3.11.5.1 Dissoziationskonstante K_D

Die Dissoziationskonstante K_D beschreibt quantitativ die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor. Sie gibt diejenige Konzentration an, bei welcher die Konzentration des freien Liganden gleich der Konzentration der Ligand-Rezeptor-Komplexe ist. Je niedriger die K_D ist, desto affiner ist die Bindung. Liegt die K_D niedriger als 10 nM spricht man von einer hochaffinen Bindung.

Massenwirkungsgesetz:
$$K_D = R \times L / (RL)$$

Erhaltungsgleichungen:
$$R_0 = R + (RL)$$

$$L_0 = L + (RL)$$

Definitionen:

R: Konzentration des freien Rezeptors

L: Konzentration des freien ungebundenen Liganden, d.h. die bekannte Gesamtkonzentration des Liganden im Bindungsansatz abzüglich der gemessenen Konzentration an insgesamt gebundenem Liganden

(RL): Konzentration der Ligand-Rezeptor-Komplexe

K_D : Dissoziationskonstante

R_0 : Gesamtkonzentration des Rezeptors

L_0 : Summe der Konzentration an freiem und gebundenem Ligand

3.11.5.2 Dissoziationskonstante des Inhibitors K_i

K_i ist als Dissoziationskonstante des Inhibitors definiert und errechnet sich folgendermaßen:

$$K_i = IC50 / (1 + L_0/K_D)$$

Definitionen:

IC50: Konzentration des Inhibitors, bei der 50% der Bindung von GpL-Liganden an den Rezeptor durch den Inhibitor blockiert wird

L_0 : Summe der Konzentration an freiem und gebundenem GpL-Liganden

K_D : Dissoziationskonstante, ermittelt aus den Gleichgewichtsbindungen

3.11.5.3 Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten k_{off} und k_{on}

Die Dissoziationsratenkonstante k_{off} beschreibt die Geschwindigkeit der Dissoziation des Liganden vom Ligand-Rezeptorkomplex, wohingegen die Assoziationsratenkonstante k_{on} die Geschwindigkeit der Assoziation von Ligand und Rezeptor wiedergibt. Anhand der experimentell ermittelten k_{off} - und k_{on} -Werte der GpL-Flag-CD95L-CD95-Interaktion konnte anhand der Formel $K_D = k_{off}/k_{on}$ auch die Dissoziationskonstante ermittelt werden.

3.11.5.4 Bindungsstellen pro Zelle

Um die durchschnittliche Anzahl von CD95L-Bindungsstellen und somit die Anzahl von CD95-Rezeptoren auf einer Zelle bestimmen zu können (N_{BS}), wurde zunächst die Luziferaseaktivität von bekannten Konzentrationen GpL-Flag-CD95L gemessen und daraus die Luziferaseaktivität pro GpL-Domäne ($A_{GpL-Dom}$) bestimmt. Zusammen mit der ermittelten Zellzahl pro Well (ZN_{Well}) und der maximalen spezifischen Bindung (B_{max}) der entsprechenden Bindungsstudie, wurde die durchschnittliche Anzahl von CD95L-Bindungsstellen anhand folgender Formel berechnet:

$$N_{BS} = (B_{max} \times A_{GpL-Dom}) / ZN_{Well}$$

3.12 Herstellung von Zelllysaten

Die Zelllysate zur Western Blot-Analyse für phospho-spezifische Antikörper wurden mit 4 x Ladepuffer (8 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 40 % Glycerol, 0,2 M Tris pH 8,0) hergestellt. Kurz vor dem Ernten der Zellproben wurde dem Ladepuffer der Phosphataseinhibitor II

(Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Die Zellen wurden auf Eis geerntet und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation (2300 rpm, 3 min, 4 °C) wurde das Zellpellet direkt in 150 µl/20 x 10⁶ Zellen 4 x Ladepuffer aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 Sekunden sonifiziert, für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und zum Schluss bei 14000 rpm für ca. 15 min abzentrifugiert.

Die Zelllysate für nicht-phosphospezifische Antikörper wurden in Triton X-100 Lysispuffer hergestellt, welcher zuvor mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) versetzt worden war. Das Zellpellet wurde in 150 µl/20 x 10⁶ Zellen in Triton X-100 Lysispuffer (0,03 M Tris-HCl pH 7,4; 0,120 M NaCl; 10 % Glycerol; 1 % Triton X-100) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer ersten Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Eppi überführt und dieser dann erneut für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die einzelnen Proben wurden mit 4 x Ladepuffer versetzt und im Western Blot analysiert.

3.13 Isolation von „Lipid Rafts“

Um die detergenzunlösliche Membranfraktion zu isolieren, welche so genannte „Lipid Rafts“ enthalten, wurden zunächst pro Versuchsansatz 3 x 10⁷ Zellen in 15 cm Zellkulturschalen über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den jeweils angegebenen Ligandvarianten stimuliert, geerntet und bei 4 °C für 3 min bei 2300 rpm zentrifugiert. Bei Verwendung von GpL-Fusionsproteinen wurden die Zellpellets nach der ersten Zentrifugation mit 10 ml serumfreiem Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets in 200 µl serumfreiem RPMI 1640 Medium resuspendiert und durch die Zugabe von 200 µl eiskaltem Triton X-100-Lysispuffer (0,75 % Triton in TNE-Puffer) für 20 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden die Lysate mit 400 µl 80%iger Sucrose (in TNE-Puffer) gemischt und in Polyallomerröhrchen überführt. Danach erfolgte eine vorsichtige Überschichtung der Proben mit 2,8 ml 30%iger Sucrose (in TNE-Puffer). Nach einer Zentrifugation bei 50.000 rpm, +4 °C, in einem Beckmann SW60 Rotor für 20 h wurden von jedem Versuchsansatz 4 Fraktionen (jeweils 1 ml) von oben nach unten abgenommen. Der Erfolg der jeweiligen Sucrosedichtegradientenzentrifugation wurde im Western Blot durch Detektion von Flo-tillin (Fraktion 1, „Lipid Rafts“, geringste Dichte) und Transferrin (Fraktion 4) überprüft. Desweiteren wurden die verschiedenen Fraktionen von Versuchsansätzen mit GpL-Fusionsproteinen mit Hilfe eines Standard-Luziferaseassays (Abschnitt 3.11.1) analysiert.

3.14 Immunpräzipitation

Um den CD95-Rezeptorkomplex zu analysieren, wurden die entsprechenden Gruppen (jeweils 2 große konfluente Zellkulturflaschen) für 1,5 h mit 1 µg/ml Fc-Flag-CD95L in 5 ml Medium stimuliert. Danach wurden die Zellen der jeweiligen Gruppe abgekratzt und in ein 50 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation für 2300 rpm für 3 min wurden die Zellpellets in 50 ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs wurden die Pellets in 1,5 ml Triton X-100-Lysispuffer, versetzt mit „complete protease inhibitor“ (Roche, Mannheim), resuspendiert, in 2 ml Eppi überführt und für 20 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden unlösliche Membranbestandteile abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation für 30 min, 14000 rpm, 4 °C. Von dem erhaltenen Überstand wurden 200 µl für die Analyse der Lysate im Western Blot zurückgehalten und der Rest wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt. Jede Gruppe wurde mit 40 µl Protein G Agarosebeads (Roche, Mannheim) gemischt und über Nacht bei 4 °C gerollt. Als Kontrolle wurden Lysate von unstimulierten Zellen präzipitiert, welche mit 10 ng Fc-Flag-CD95L versetzt waren. Am nächsten Tag wurden die Agarosebeads fünfmal mit eiskaltem Triton X-100-Lysispuffer gewaschen und im Anschluss mit 60 µl Lysispuffer und 60 µl 2 x Laemmli Probenpuffer versetzt. Die gebundenen Proteine wurden dann durch Aufkochen für 15 min bei 85 °C von den Agarosebeads getrennt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Insulinspritze abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Analyse der immunpräzipitierten Proteine und der entsprechenden Lysate erfolgte mittels Western Blot.

3.15 Statistische Analysen

Statistische Signifikanzen der Unterschiede zwischen experimentellen Variablen wurden mit Hilfe des *student's t test* ermittelt. Dafür wurde die GraphPad Prism 5.0 Software verwendet. Ein Unterschied wurde als signifikant definiert, wenn $p < 0,05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Die Translokation von CD95 in „Lipid Raft“-Mikrodomänen wird durch die Oligomerisierung von löslichem trimerem CD95L verstärkt

4.1.1 Oligomerisierter CD95L hat eine höhere Bioaktivität als löslicher trimerer CD95L

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Multimerisierung von löslichen trimeren CD95L-Molekülen deren Bioaktivität 100-1000fach erhöht (Schneider et al., 1998). Demzufolge sind oligomerisierte CD95L-Varianten in der Lage, CD95-assoziierte Signalkaskaden effektiver, d.h. bei geringeren Konzentrationen, zu aktivieren, als löslicher trimerer CD95L. In dieser Arbeit sollte zunächst dieser Befund demonstriert und bestätigt werden. Dazu wurden funktionelle Studien mit trimerem und multimerem CD95L durchgeführt. So wurden HT1080-Zellen mit trimerem Flag-CD95L, Flag-CD95L, welcher mit einem Flag-spezifischen monoklonalen Antikörper (M2) quervernetzt wurde, und Fc-Flag-CD95L behandelt. Bei Fc-Flag-CD95L wird die Multimerisierung durch die Fusion der löslichen CD95L-Domäne mit der konstanten Region des humanen IgG1 Immunglobulins gentechnisch erreicht. Dieses Fusionsprotein lagert sich zu hexameren Molekülen zusammen, welche ebenfalls eine hohe Bioaktivität aufweisen (Holler et al., 2003). Zytotoxizitätsassays zeigten, dass in mit Cycloheximid (CHX) für Apoptose sensitivierten Zellen die ED₅₀-Werte von M2-oligomerisiertem Flag-CD95L und hexamerem Fc-Flag-CD95L 100-1000fach geringer sind, verglichen mit trimerem CD95L. Multimerisierter CD95L induziert folglich viel effektiver Zelltod als die trimere Variante (Abbildung 6). CHX ist ein Inhibitor der Proteinbiosynthese, was zur Folge hat, dass anti-apoptotische zelluläre Proteine, wie z.B. cFLIP, nicht mehr synthetisiert werden können. Demnach kann in CHX-vorbehandelten Zellen leichter CD95-induzierte Apoptose stattfinden (Wajant et al., 2000).

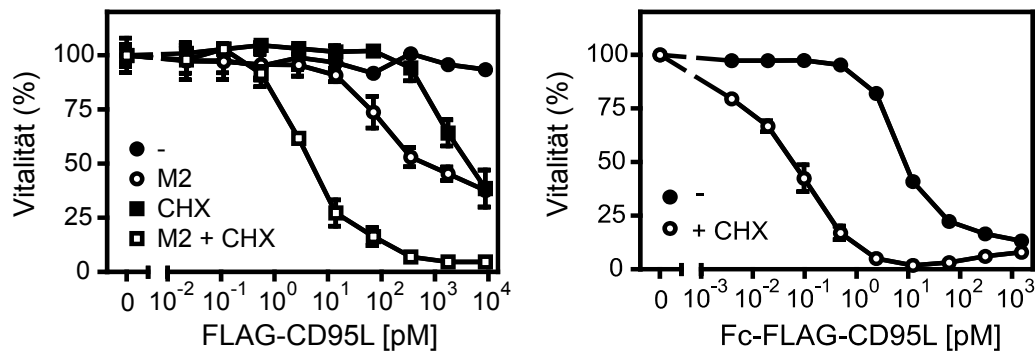


Abbildung 6: Oligomerisierte lösliche CD95L-Trimere und CD95L-Hexamere induzieren effizient Apoptose

HT1080-Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 pro Well) und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Dreifachwerten mit den angegebenen Konzentrationen Flag-CD95L, anti-Flag Antikörper (M2) oligomerisiertem Flag-CD95L und Fc-Flag-CD95L stimuliert. Dies geschah in An- und Abwesenheit von 2,5 µg/ml CHX. Nach 18 h wurde der Prozentsatz überlebender Zellen mittels Kristallviolett färbung bestimmt.

Die erhöhte Bioaktivität von multimerisiertem CD95L ließ sich auch in Bezug auf die Aktivierung nicht-apoptotischer Signalwege nachweisen. Nach Stimulation von HT1080-Zellen mit oligomerisiertem oder hexamerem CD95L konnte eine deutliche Produktion von IL8 beobachtet werden, wohingegen trimerer löslicher CD95L nur eine geringe IL8-Synthese induzierte (Abbildung 7). IL8 ist ein Chemokin, welches durch den klassischen NFκB-Signalweg reguliert wird. Um zu vermeiden, dass die Induktion von Apoptose durch CD95 mit der Produktion von IL8 interferiert, wurde diese durch Zugabe von zVAD, welches Caspasen inhibiert, verhindert.

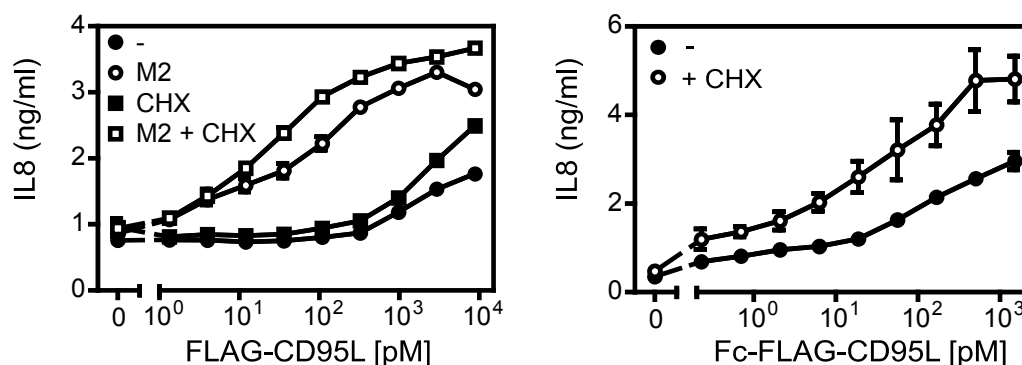


Abbildung 7: Nur multimerisierter CD95L ist in der Lage effizient die Produktion von IL8 zu induzieren

HT1080-Zellen wurden in 96-Well Platten (2×10^4 pro Well) ausgesät und am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen an Flag-CD95L, quervernetztem Flag-CD95L (+ M2) und Fc-Flag-CD95L für 6 h stimuliert. Dies geschah in Anwesenheit von 20 µM zVAD und in den entsprechenden Gruppen mit 2,5 µg/ml CHX. Die Zellüberstände wurden dann abgenommen und die Menge an produziertem IL8 mittels ELISA bestimmt.

Eine weitere Methode, um die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs nachzuweisen, ist die Western Blot-Detektion der Phosphorylierung von I κ B α („inhibitor of NF κ B“) bzw. der darauf folgenden Abnahme von I κ B α , aufgrund der durch die Phosphorylierung ausgelösten proteasomalen Degradation des Proteins. Nach Stimulation von HT1080-Zellen mit oligomerisiertem Flag-CD95L bzw. hexamerem Fc-Flag-CD95L zeigt sich nach 90 Minuten eine deutliche Degradation und bereits nach 30 Minuten eine Phosphorylierung von I κ B α (Abbildung 8). In Zellen, welche mit löslichem trimerem CD95L behandelt wurden, ist keine bzw. eine sehr geringe Phosphorylierung und Degradation von I κ B α zu erkennen.

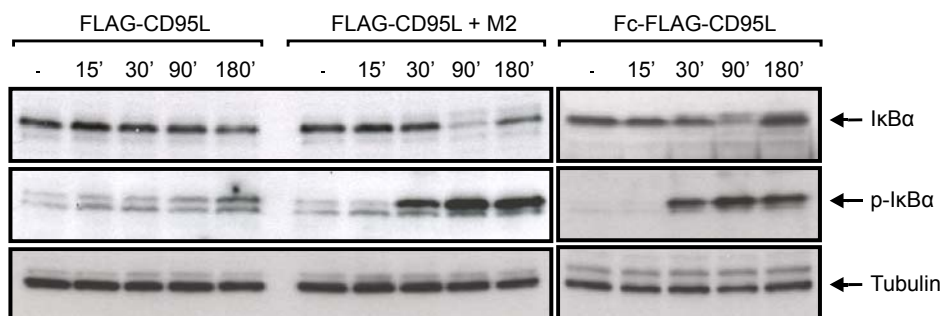


Abbildung 8: Löslicher trimerer CD95L zeigt keine oder nur eine sehr geringe Bioaktivität in Bezug auf die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs

HT1080-Zellen wurden für die angegebenen Zeitwerte mit 200 ng/ml der CD95L-Varianten in Anwesenheit von 20 μ M zVAD und 2,5 μ g/ml CHX stimuliert und im Anschluss wurden Totalzelllysate hergestellt. Die Lysate wurden dann im Western Blot auf die Präsenz der angegebenen Proteine hin untersucht.

4.1.2 Oligomerisierter CD95L, nicht aber trimerer CD95L, induziert die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“

Es ist bekannt, dass für eine effiziente Aktivierung von Apoptose durch CD95 dessen Translokation in detergentunlösliche Membranbestandteile, so genannte „Lipid Rafts“, notwendig ist (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob für die Translokation von CD95 in das „Lipid Raft“-Kompartiment die Oligomerisierung von CD95L von Relevanz ist, oder ob auch bereits die Bindung der löslichen trimeren Form von CD95L ausreichend ist, diese Umverteilung herbeizuführen. Daher wurden HT1080-Zellen mit Flag-CD95L, oligomerisiertem Flag-CD95L und Fc-Flag-CD95L behandelt und daraufhin detergentresistente Membranfraktionen, welche die „Lipid Rafts“ enthalten, mittels Sucrosegichtgradientenzentrifugation aufgetrennt und isoliert. In den Gruppen, welche nur mit M2-Antikörper oder trimerem CD95L stimuliert wurden, konnte nur ein geringer Anteil an CD95 in

der „Lipid Raft“-Fraktion detektiert werden (Abbildung 9). Dahingegen wurde in Zellen, welche mit quervernetztem Flag-CD95L (+ M2) oder Fc-Flag-CD95L behandelt wurden, eine deutliche Umverteilung von CD95 in die „Lipid Raft“-Fraktion detektiert. Darüber hinaus fanden sich in diesen Gruppen in der „Lipid Raft“-Fraktion auch Procaspase-8 (p55/53) und das Caspase-8 Spaltprodukt p43/41, welches typischerweise im CD95-assoziierten „death inducing signaling complex“ (DISC) generiert wird.

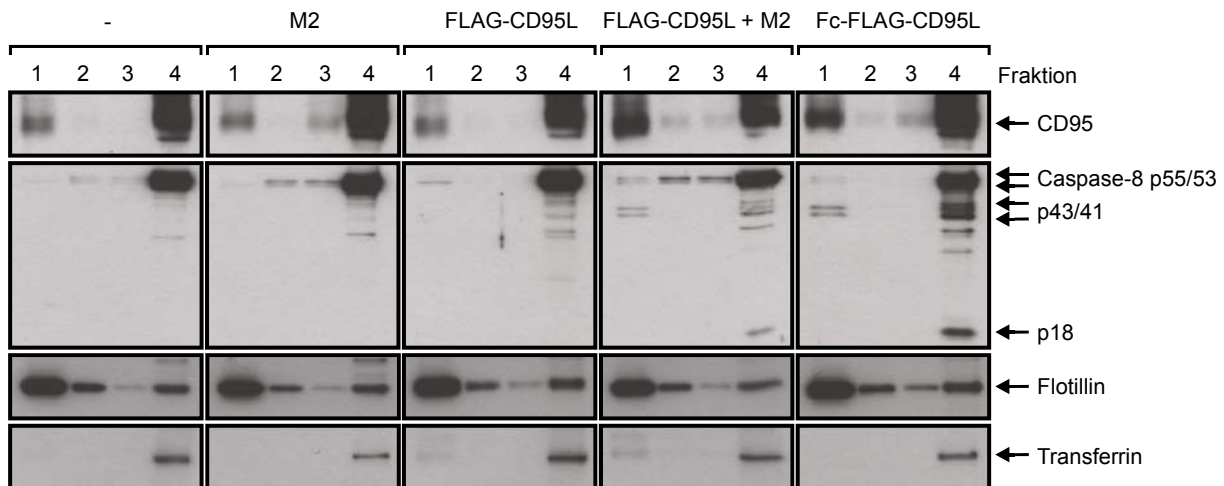


Abbildung 9: Oligomerisierter CD95L, nicht aber lösliche CD95L-Trimere, induzieren die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“

HT1080-Zellen wurden mit den angegebenen CD95L-Varianten (jeweils 200 ng/ml) oder dem monoklonalen M2-Antikörper (1 µg/ml) alleine stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und mittels Triton X-100-Puffer lysiert. Die Lysate wurden im Anschluss mit Hilfe einer Sucrosedichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die oberste Fraktion 1 weist die geringste Sucrosedichte auf und enthält die unlösliche Membranfraktion, in welcher sich auch die „Lipid Rafts“ befinden. In Fraktion 4 befinden sich lösliche Proteine, wie z.B. der Transferrinrezeptor. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Flotillin diente hierbei als Marker für die „Lipid Raft“-Fraktion.

Es ist bekannt, dass lösliche CD95L-Trimere an CD95 binden (Schneider et al., 1998). Obige Ergebnisse weisen daher darauf hin, dass die Belegung von CD95 mit CD95L-Trimeren weder ausreichend ist, um eine effiziente Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen zu induzieren (Abbildung 6-Abbildung 8), noch um eine Umverteilung von CD95 in „Lipid Rafts“ auszulösen (Abbildung 9).

4.2 Die höhere Avidität von multimerem CD95L hat keinen Einfluss auf die Rezeptorbelegung

4.2.1 Konstruktion und Reinigung von *Gaussia princeps* Luziferase (GpL)-Fusionsproteinen

Die Bindung von CD95L-Trimeren an CD95 konnte bisher qualitativ durch FACS-Analysen und verschiedene biochemische Methoden demonstriert werden (Schneider et al., 1998). Exakte quantitative zelluläre Bindungsdaten, welche die Interaktion von CD95 mit löslichem CD95L beschreiben, sind bis jetzt jedoch noch nicht verfügbar. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte Aktivität von oligomerisiertem CD95L daher rührt, dass Veränderungen bezüglich der kinetischen Parameter der CD95L-CD95-Interaktion vorliegen. Man könnte sich z.B. vorstellen, dass eine Aviditäts-vermittelte Zunahme der apparenten Affinität vorliegt, oder dass die Ligand-Rezeptorkomplexe langsamer dissoziieren.

Um den beschriebenen Sachverhalt untersuchen zu können, sollten zelluläre Bindungsstudien durchgeführt werden, um so die Belegung von CD95 durch CD95L direkt mit der CD95-Aktivität korrelieren zu können. Hierfür benötigte man eine markierte Version des CD95L, welche die Quantifizierung von zellgebundenen Molekülen erlaubt. Die biochemische Markierung von CD95L und anderen TNF-Liganden ist prinzipiell möglich, z.B. mit Iod-131 oder Biotin. Es ist allerdings schwierig Bedingungen zu finden, welche eine signifikante und reproduzierbare Markierung zulassen, ohne die Bioaktivität der TNF-Liganden zu beeinträchtigen. Es stellt sich in diesen Fällen darüber hinaus noch immer das intrinsische Problem, dass man ein Gemisch von verschieden stark und an verschiedenen Positionen markierten Molekülen erhält. Diese Heterogenität wiederum kann eine quantitative Analyse verfälschen. Um die genannten Limitationen zu umgehen, wurden in dieser Arbeit Fusionsproteine konstruiert, in welchen Flag-CD95L und Fc-Flag-CD95L an eine N-terminale *Gaussia princeps* Luziferase (GpL)-Reporterdomäne (Tannous et al., 2005) gekoppelt sind (Abbildung 10).

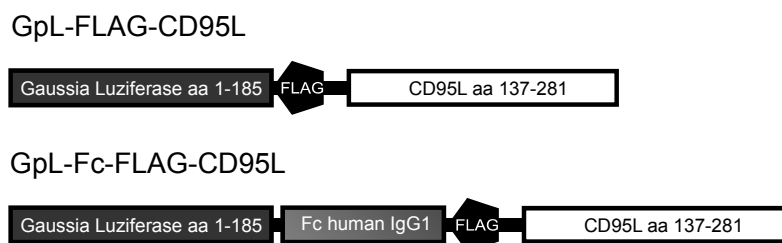


Abbildung 10: Schematischer Aufbau von GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L

An CD95L ist N-terminal ein Flag-Epitop und die *Gaussia Princeps* Luziferase gekoppelt. Beim hexameren CD95L befindet sich zwischen GpL- und Flag-Domäne die Fc-Domäne des humanen IgG1 Immunglobulins.

Die Vorteile dieser Luziferase als „Reporterdomäne“ liegen darin, dass sie nur etwa 20 kDa groß, sekretierbar und darüber hinaus sehr sensitiv nachweisbar ist. Die biolumineszente Signalintensität ist über 1000fach höher, verglichen mit der Luziferase des Glühwürmchens (*Lampyrus noctiluca*) oder der *Renilla* Luziferase (eine Korallenart). GpL-Konzentrationen von < 1 femtomolar ($\sim 10^{-4}$ ng/ml) können deutlich vom Messhintergrund unterschieden werden (Abbildung 11B). Im Vergleich zu anderen Reporterdomänen, wie z.B. *Metridia longa* Luziferase oder SEAP („secreted alkaline phosphatase“), zeigte die *Gaussia princeps* Luziferase in CD95L-Fusionsproteinen die beste Nachweisbarkeit, eine gute Produktivität und darüber hinaus keine ungewollte Autoaggregation der Fusionsproteine (Lang et al., 2012).

Alle in dieser Arbeit verwendeten CD95L-Varianten wurden in den Überstand von transient transfizierten HEK293-Zellen sekretiert und über eine Affinitätschromatographie an anti-Flag-Agarose aufgereinigt. Die Reinheit wurde anschließend im Silbergel überprüft (Abbildung 11A). Desweiteren wurden die Mengen an GpL-Flag-CD95L und herkömmlichem Flag-CD95L im Silbergel angeglichen, um vergleichende Bioassays durchführen zu können.

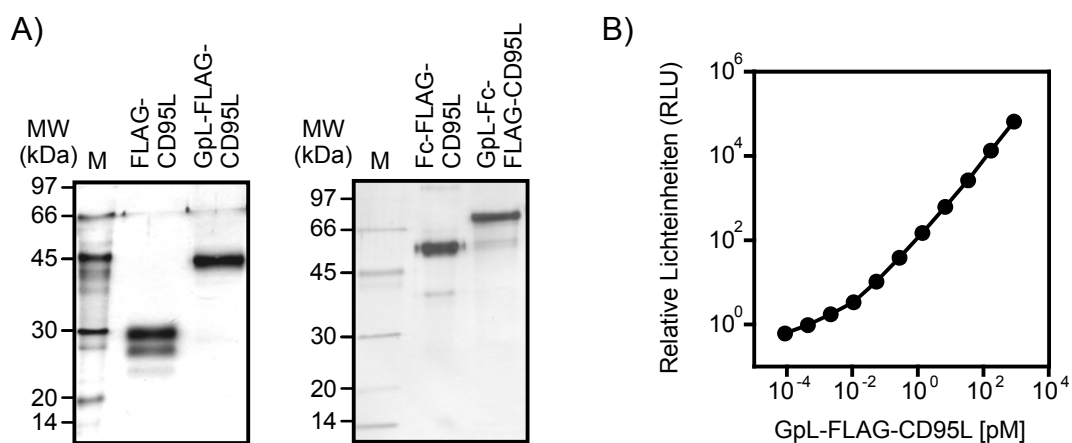


Abbildung 11: Reinheit und Detektionsgrenzen von GpL-CD95L-Fusionsproteinen

A) Die produzierten und aufgereinigten GpL-CD95L-Fusionsproteine (100 ng) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

B) Das Fusionsprotein GpL-Flag-CD95L wurde in Fünferschritten in RPMI 1640 Medium (0,5 % FCS/PenStrep) verdünnt und die Luziferaseaktivität im Luminometer wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben gemessen.

4.2.2 GpL-CD95L-Fusionsproteine weisen die gleiche biologische Funktionalität auf wie ihre korrespondierenden konventionellen CD95L-Varianten

Damit zelluläre Bindungsstudien mit GpL-Fusionsproteinen sinnvoll sind, darf die N-terminale GpL-Domäne nicht mit der TNF-Homologiedomäne wechselwirken und die Funktionalität des Liganden nicht beeinflussen. Um dies zu prüfen, galt es zunächst, vergleichende funktionelle Studien mit den GpL-CD95L-Varianten und den entsprechenden konventionellen CD95L-Varianten durchzuführen. Die Analyse der Dosis-Wirkung-Beziehung, mit der die verschiedenen CD95L-Varianten Apoptose und IL8 induzieren machte deutlich, dass die Anwesenheit einer GpL-Reporterdomäne keinen großen Einfluss auf die Fähigkeit des CD95L hat CD95 zu aktivieren (Abbildung 12). So interferierte die GpL-Reporterdomäne weder mit der oligomerisierungsabhängigen Aktivierung des CD95 durch trimere CD95L, noch mit der spezifischen Aktivität des CD95L. Es ist daher davon auszugehen, dass die Fusion der GpL-Domäne an den CD95L dessen Interaktion mit CD95 nicht beeinträchtigt, und somit die beiden GpL-CD95L-Fusionsproteine für zelluläre Bindungsstudien geeignet sind.

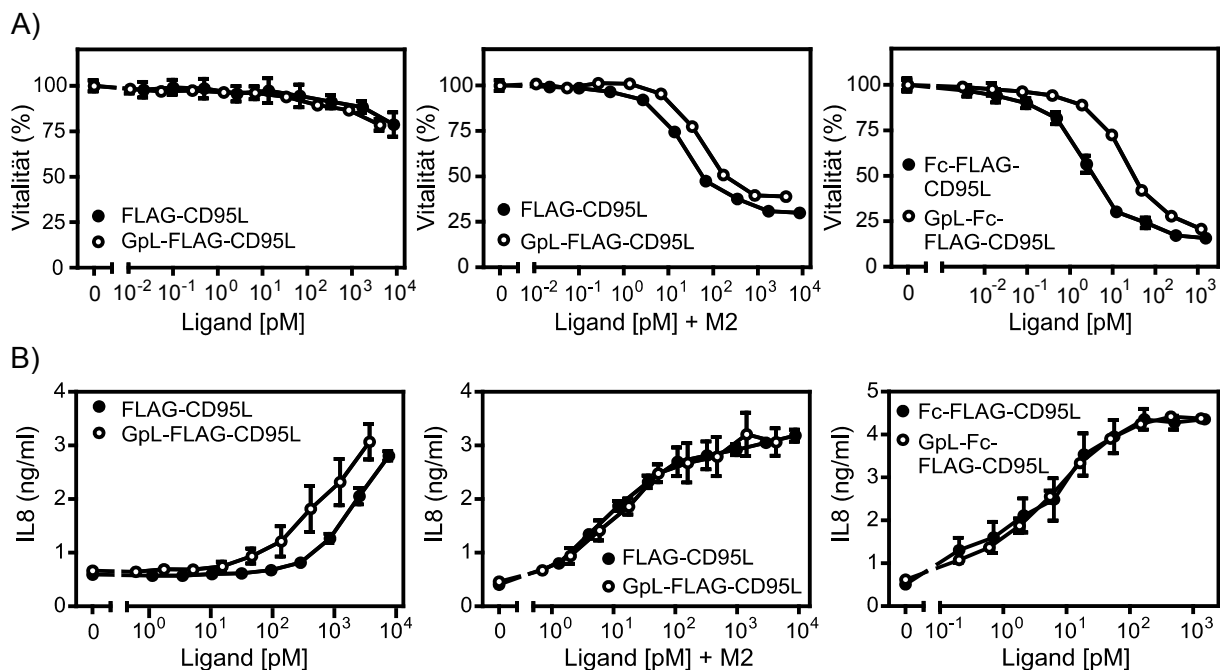


Abbildung 12: Vergleichende funktionelle Assays mit GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L versus Flag-CD95L und Fc-Flag-CD95L

HT1080-Zellen wurden über Nacht in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 pro Well) und am nächsten Tag (Dreifachwerte) mit steigenden Konzentrationen an Flag-CD95L, Fc-Flag-CD95L, GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L stimuliert. In den entsprechenden oligomerisierten Gruppen (+ M2) erfolgte die Quervernetzung vor der Stimulation mit einem anti-Flag monoklonalen Antikörper M2 (1 $\mu\text{g/ml}$). A) Die Zellen wurden zusätzlich mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CHX inkubiert und nach 18 h wurde die Apoptoseinduktion mittels Kristallviolettfröbung bestimmt. B) Für die Analyse der IL8-Produktion wurde vor der Stimulation das Medium gewechselt, um den Hintergrund zu minimieren. Ferner wurden die Zellen mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CHX und 20 μM zVAD behandelt. Nach 6 h Stimulation wurde die Menge an IL8 in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

4.2.3 CD95-Aktivierung in Typl- und Typll-Zellen

Die CD95-vermittelte Apoptose basiert auf der Rezeptor-assoziierten Reifung von Procaspase-8-Dimeren und der anschließenden Freisetzung von enzymatisch aktiven heterotetrameren Caspase-8-Molekülen. Diese wiederum spalten und aktivieren Effektorcaspasen, welche für die Exekutionsphase der Apoptose verantwortlich sind. Zellen, in welchen diese Abfolge an Ereignissen ausreichend ist, um effizient Apoptose zu induzieren, werden als Typl-Zellen bezeichnet. Zellen wiederum, in denen Effektorcaspasen durch Caspase-8 nur unzureichend aktiviert werden und daher keine oder nur ineffizient Apoptose auslösen, benötigen einen Verstärkungsmechanismus, um effizient in die Apoptose zu gehen. In solchen so genannten Typll-Zellen spaltet Caspase-8 das Protein Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl2-Familie, was zur Entstehung eines Bid-Fragments führt, welches die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien induziert. Diese Faktoren kooperieren dann mit Caspase-8 in der Aktivierung von Effektorcaspasen oder induzieren alternative, teilweise Caspase-unabhängige Zelltodmechanismen (Barnhart et al., 2003; Hao & Mak, 2010).

Die CD95L-CD95-Bindungsstudien sollten in dieser Arbeit vergleichend an Typl- und Typll-Zellen durchgeführt werden, um gegebenenfalls Unterschiede zwischen Typl- und Typll-Zellen zu erkennen, die sich auf die CD95L-CD95-Interaktion auswirken. Typll-Zellen können durch die Expression von Bcl2, einem anti-apoptotischen Mitglied der Bcl2-Familie, welches „downstream“ von Bid wirkt, vor dem CD95-induzierten Zelltod protektiert werden, Typl-Zellen hingegen nicht (Jost et al., 2009). Um zunächst sicher zu stellen, dass sich HaCaT- und HT1080-Zellen wie Typl- bzw. Typll-Zellen verhalten, wurden Zytotoxizitätsexperimente mit Bcl2-Transfektanten durchgeführt. Nur in HT1080-Bcl2-Zellen zeigte sich eine Protektion vor CD95-vermitteltem Zelltod. Nach Stimulation mit Fc-Flag-CD95L konnte keine Aktivierung der Effektorcaspase-3 beobachtet werden (Abbildung 13). In HaCaT-Zellen hingegen war kein Unterschied in An- und Abwesenheit von Bcl2 bezüglich der Zellvitalität und der Caspaseprozessierung nach CD95-Stimulation zu erkennen.

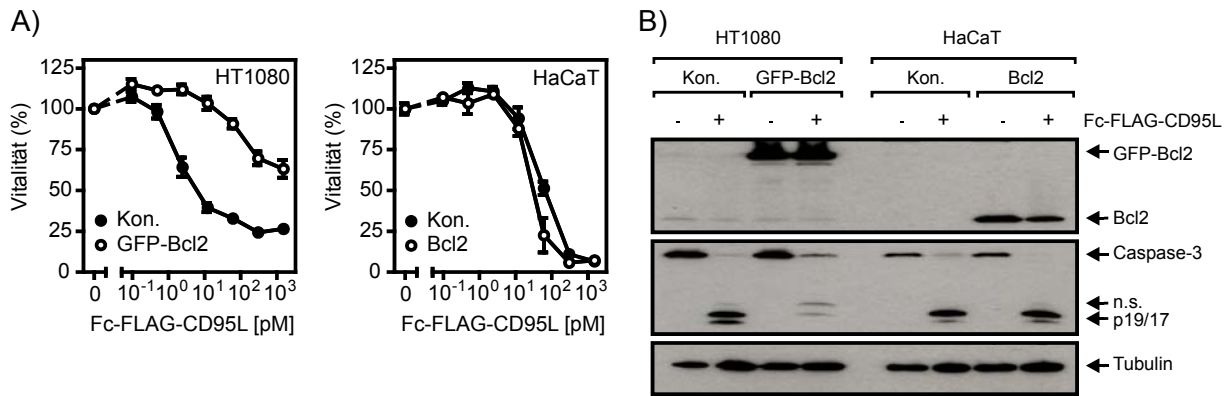


Abbildung 13: Charakterisierung von HaCaT- und HT1080-Zellen als TypI-/TypII-Zellen

A) HT1080- und HaCaT-Transfektanten, welche stabil Bcl2-GFP oder Bcl2 exprimieren, und die korrespondierenden Kontrollzellen, wurden über Nacht in 96-Well Platten kultiviert (2×10^4 pro Well) und am nächsten Tag mit steigenden Konzentrationen (Dreifachwerte) Fc-Flag-CD95L stimuliert. Nach 18 h wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett färbung bestimmt.

B) Die verschiedenen Zelllinien wurden jeweils mit 200 ng/ml Fc-Flag-CD95L stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet und es wurden Triton X-100-Lysate hergestellt, welche dann im Western Blot auf die angegebenen Proteine hin untersucht wurden.

4.2.4 Bindungsstudien mit GpL-CD95L-Fusionsproteinen

4.2.4.1 Gleichgewichtsbindungsstudien

Im ersten Schritt wurden Gleichgewichtsbindungsstudien mit den verschiedenen GpL-CD95L-Konstrukten durchgeführt. Dabei war das Ziel zu klären, inwieweit sich löslicher trimerer Flag-CD95L, anti-Flag (M2) quervernetzter GpL-Flag-CD95L und hexamerer GpL-Fc-Flag-CD95L möglicherweise in ihrer apparenten Affinität zu CD95 unterscheiden. D.h., es ging darum festzustellen, ob die Avidität der CD95L-CD95-Interaktion einen merklichen Einfluss auf die Konzentrationsabhängigkeit der CD95-Belegung durch CD95L hat. Die Gleichgewichtsbindungsstudien wurden auf HT1080- und A498-Zellen, welche man wie HT1080-Zellen zu den TypII-Zellen zählt, und auf HaCaT-Zellen durchgeführt.

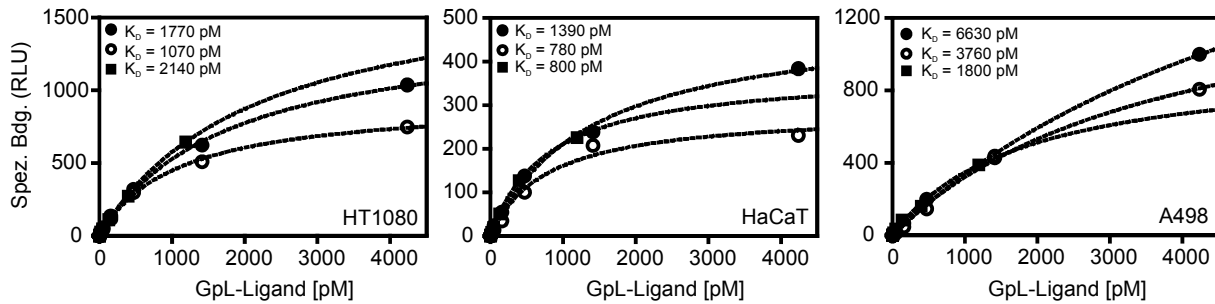


Abbildung 14: Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL-Flag-CD95L-Varianten

Es wurden auf den angegebenen Zelllinien Gleichgewichtsbindungsstudien mit den verschiedenen GpL-Flag-CD95L-Varianten durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 h. Die spezifische Bindung ergibt sich aus totaler Bindung abzüglich unspezifischer Bindung (Erläuterungen im Material- und Methoden-Teil). Die Bindungsdaten wurden mittels nicht-linearer Regression mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 angenähert. Auf der X-Achse ist die Konzentration L an freiem Liganden angegeben. Schwarze Kreise: GpL-Flag-CD95L, weiße Kreise: GpL-Flag-CD95L + M2, Quadrate: GpL-Fc-Flag-CD95L.

Die Gleichgewichtsbindungsexperimente mit GpL-Flag-CD95L ergaben auf den verschiedenen untersuchten Zelllinien K_D-Werte zwischen 2000 (~ 240 ng/ml) und 3600 pM (~ 430 ng/ml). Bemerkenswerterweise ergaben sich für anti-Flag (M2) oligomerisierten GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L trotz ihrer höheren Avidität vergleichbare oder sogar ein wenig geringere K_D-Werte für die CD95-Belegung als für trimeren GpL-Flag-CD95L (Tabelle 1, Abbildung 14). Die Aviditätssteigerung der CD95L-CD95-Interaktion, die ja zur CD95 Aktivierung führt, hat also keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die Ligandenbelegung von CD95.

Tabelle 1: K_D-Werte der Interaktion von CD95 mit trimeren und oligomeren Varianten von löslichem GpL-Flag-CD95L. Mittelwerte aus drei Experimenten.

	GpL-Flag-CD95L				GpL-Flag-CD95L + M2		GpL-Fc-Flag-CD95L	
	Gleichgewichtsbindung		Homologe Konkurrenz		Gleichgewichtsbindung		Gleichgewichtsbindung	
Zelllinie	K _D (pM)	R ²	K _i (pM)	R ²	K _D (pM)	R ²	K _D (pM)	R ²
HT1080	2000 ± 720	0,996 – 0,999	840 ± 90	0,926 – 0,936	1200 ± 110	0,998 – 0,999	2600 ± 300	0,999 – 0,999
HaCaT	2600 ± 1500	0,998 – 0,999	850 ± 110	0,943 – 0,962	1250 ± 280	0,978 – 0,997	1500 ± 350	0,99 – 0,999
A498	3600 ± 1780	0,994 – 0,999	1000 ± 20	0,907 – 0,945	3000 ± 500	0,998 – 0,998	1800 ± 660	0,995 – 0,995

Eine weitere Möglichkeit, um Bindungsdaten zu analysieren und graphisch darzustellen, ist die klassische Auswertung mittels Scatchard-Analyse. Zunächst bestimmt man dabei für jede eingesetzte Ligandenkonzentration die Menge an gebundenem Liganden („gebunden“), an freiem ungebundenem Liganden („frei“ = „eingesetzt“ - „gebunden“) und daraus den Quotienten „gebunden/frei“. „Gebunden/frei“ wird dann gegen die spezifische Bindung („gebunden“) aufgetragen. Bei einer bimolekularen Interaktion erhält man typischerweise einen linearen Zusammenhang zwischen gebundenem Liganden und dem Verhältnis aus gebundenem und freiem Liganden. Die Auswertung der Bindungsdaten von GpL-Flag-CD95L an CD95 ergaben aber eine stark hyperbolische Abhängigkeit (Abbildung 15). Dies ist ein Indiz dafür, dass GpL-Flag-CD95L mit mindestens zwei zellulären Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität interagiert. Der linke Ast der Hyperbel (Abbildung 15B) entspricht hierbei Konzentrationen an freiem Liganden, welche kleiner als 1 pM sind und der rechte Ast hohen Konzentrationen von bis zu 4000 pM. Betrachtet man nun beide Äste der Hyperbel separat, erhält man eine hoch-affine und eine nieder-affine Bindungsstelle (Abbildung 15B), wobei die Anzahl an nieder-affinen Bindungsstellen deutlich überwiegt (99,5%).

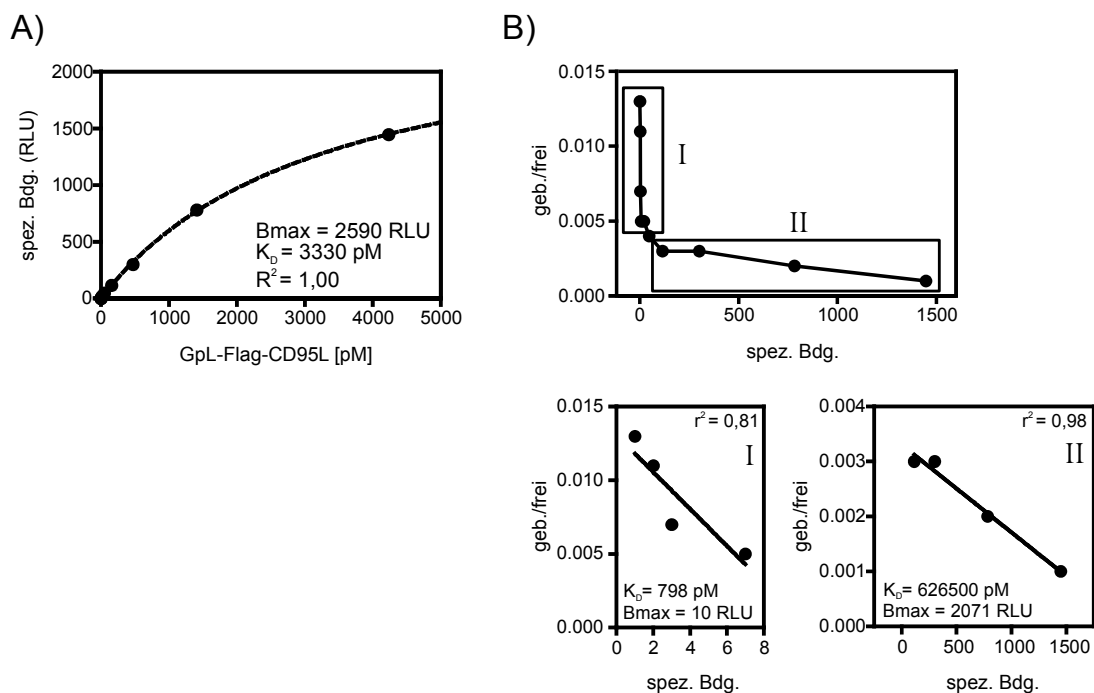


Abbildung 15: Scatchard-Diagramm der Interaktion von GpL-Flag-CD95L und CD95

A) HT1080-Zellen wurden für 2 h bei 37 °C mit den angegebenen Konzentrationen GpL-Flag-CD95L inkubiert und die zellassoziierte GpL-Aktivität bestimmt. Die angegebenen Werte für die K_D und die maximale Bindung (B_{max}) wurden durch nichtlineare Regression bestimmt.

B) Scatchard-Diagramme der Bindungsdaten aus A). Die Diagramme I und II zeigen jeweils die lineare Näherungsgerade der Scatchard-Analyse für niedrige (I) bzw. hohe (II) Konzentrationen GpL-Flag-CD95L.

4.2.4.2 Homologe Wettbewerbsassays

In weiteren Experimenten wurde konventioneller Flag-CD95L als Inhibitor der GpL-Flag-CD95L-Bindung an CD95 verwendet und die Inhibitionskonstante K_i ermittelt. K_i ist als Dissoziationskonstante des Inhibitors definiert und entspricht daher in dem beschriebenen Fall der K_D der Flag-CD95L-CD95-Interaktion.

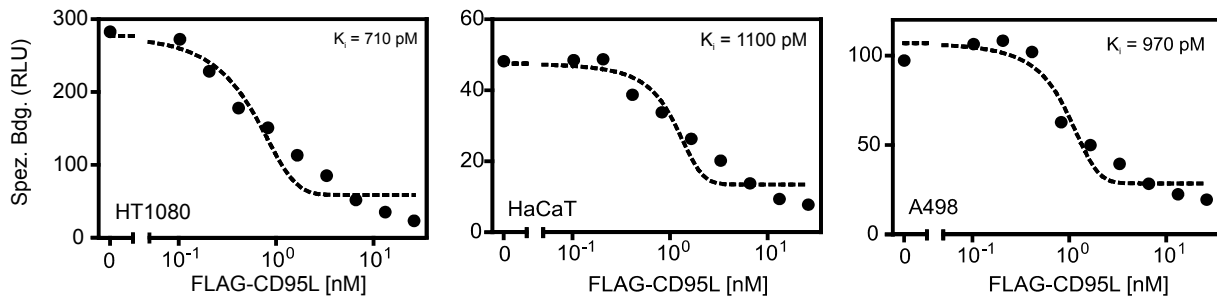


Abbildung 16: Homologe Wettbewerbsassays mit Flag-CD95L

Für die homologen Wettbewerbsassays wurden Zellen in 24-Well Platten (2×10^5 pro Well) über Nacht ausgesät und am nächsten Tag für 1 h konstant mit 25 ng/ml GpL-Flag-CD95L und den angegebenen Konzentrationen an Flag-CD95L inkubiert. Ungebundener Ligand wurde durch 10 x Waschen in kaltem PBS entfernt und die zellassoziierte Luziferaseaktivität im ELISA-Reader gemessen.

Die Inhibitionsexperimente ergaben auf den verschiedenen untersuchten Zelllinien K_i -Werte zwischen 1000 und 840 pM (Abbildung 16, Tabelle 1). Die so erhaltenen K_i -Werte des konventionellen Flag-CD95L für CD95 stimmen gut mit den K_D -Werten des GpL-Flag-CD95L für CD95 überein, welche sich aus den Gleichgewichtsbindungsstudien ergaben (Abschnitt 4.2.4.1). Dies macht erneut deutlich, dass die Fusion von CD95L-Varianten mit einer N-terminalen GpL-Reporterdomäne nicht mit der Funktionalität der CD95L-Domäne und deren Interaktion mit CD95 interferiert.

4.2.4.3 Bestimmung der Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten der Interaktion von GpL-Flag-CD95L mit CD95

Um die Dissoziation von GpL-Flag-CD95L-CD95-Komplexen bestimmen zu können, wurden Zellen mit 25 ng/ml GpL-Flag-CD95L inkubiert und anschließend mit einem Überschuss an Flag-CD95L behandelt, um die Reassoziierung von dissoziierten GpL-Flag-CD95L-Molekülen an CD95 zu verhindern. Die spezifische Bindung wurde dann als Funktion der Zeit dargestellt und die Dissoziationsratenkonstante (k_{off}) kalkuliert. Die k_{off} beschreibt die Geschwindigkeit des Zerfalls von Ligand-Rezeptorkomplexen. Anhand dieser Experimente ergab sich für HT1080-Zellen eine durchschnittliche k_{off} von $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, was einer Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von 11,7 Minuten entspricht, und für HaCaT eine k_{off} von $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Letzteres entspricht einer Halbwertszeit von 8,1 Minuten (Abbildung 17, Tabelle 2).

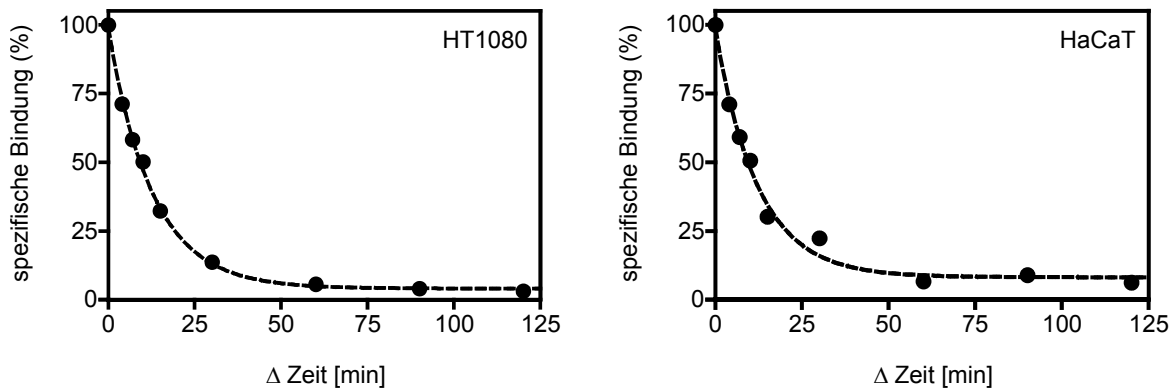


Abbildung 17: Bestimmung der Dissoziationsratenkonstante von GpL-Flag-CD95L

Die angegebenen Zelllinien wurden über Nacht in 24-Well Platten (2×10^5 Zellen pro Well) kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Zellen mit $2 \mu\text{g/ml}$ Flag-CD95L für 30 min vorbehandelt, um die unspezifische Bindung zu bestimmen (Block). Danach wurden alle Zellen für 1 h mit 25 ng/ml GpL-Flag-CD95L inkubiert. Um die Dissoziation als Funktion der Zeit bestimmen zu können, wurden jeweils $1,5 \mu\text{g/ml}$ Flag-CD95L für die angegebenen Zeitintervalle zu den „geblockten“ und nicht-„geblockten“ Ansätzen hinzugegeben. Dann wurde die zellassozierte Luziferaseaktivität gemessen und die verbleibende spezifische Bindung für alle Zeitwerte bestimmt.

Die Assoziationsratenkonstante k_{on} bestimmt die Geschwindigkeit der Assoziation von Ligand und Rezeptor bei verschiedenen Konzentrationen. Um k_{on} zu kalkulieren, wurden die verschiedenen Zelllinien zeitabhängig mit drei verschiedenen konstanten Konzentrationen an GpL-Flag-CD95L stimuliert. Dabei ließ sich für HT1080-Zellen eine k_{on} von $2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für HaCaT-Zellen eine k_{on} von $1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermitteln (Abbildung 18, Tabelle 2).

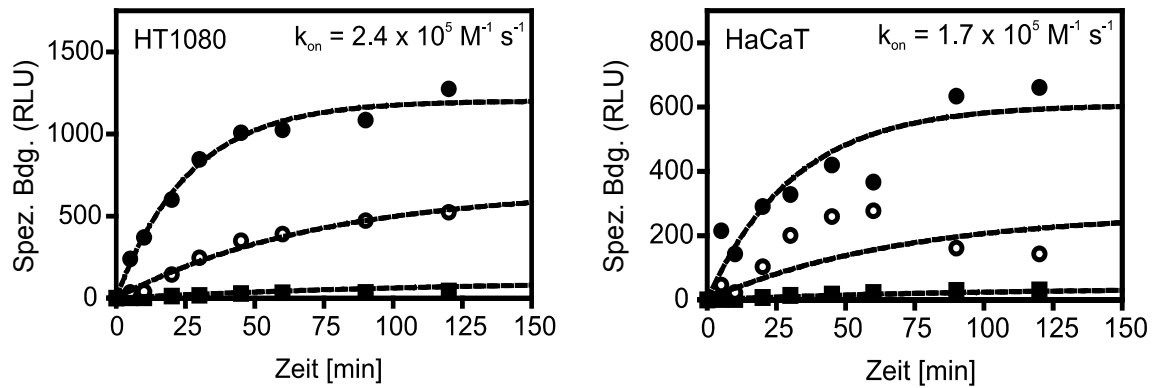


Abbildung 18: Bestimmung der Assoziationsratenkonstante von GpL-Flag-CD95L

HT1080- und HaCaT-Zellen wurden in 24-Well Platten (2×10^5 Zellen pro Well) kultiviert und am nächsten Tag wurde jeweils die Hälfte der Zellen mit $2 \mu\text{g/ml}$ Flag-CD95L für 30 Minuten geblockt. Danach wurden die Zellen mit 250 (schwarze Kreise), 50 (weiße Kreise) oder 5 ng/ml (Quadrate) GpL-Flag-CD95L für die angegebenen Zeitwerte stimuliert. Die spezifische Bindung spiegelt die Differenz zwischen geblockten und ungeblockten Gruppen wieder. Es wurde die GraphPad Prism 5.0 Software verwendet, um die Assoziationskinetik zu fitten und die Assoziationsratenkonstante zu berechnen.

Tabelle 2: Kinetische Parameter der Interaktion von löslichem CD95L und zellulärem CD95

Zelllinie	K_D von GpL-Flag-CD95L (pM) ^a	Bindungsstellen pro Zelle	K_D von Flag-CD95L (pM) ^b	k_{off} (s ⁻¹) ^c	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^d	$K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (pM)
HT1080	2000 ± 720	23000 ± 7900	840 ± 90	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^5$	3450
HaCaT	2600 ± 1500	4600 ± 2600	934 ± 119	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^5$	8740

a: n = 3 Experimente; b: n = 3 Experimente; c: n = 3-5 Experimente; d: n = 3-4 Experimente

Anhand der experimentell ermittelten k_{off} - und k_{on} -Werte der GpL-Flag-CD95L-CD95-Interaktion, konnte mittels der Formel $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ die Dissoziationskonstante berechnet werden, welche gut mit den K_D -Werten übereinstimmt, die in den Gleichgewichtsbindungsstudien bzw. den homologen Konkurrenzexperimenten experimentell bestimmt wurden (Tabelle 2).

4.2.5 Analyse der „Lipid Raft“-Translokation von CD95 mit Hilfe von GpL-CD95L-Fusionsproteinen

Wie bereits unter Punkt 4.1.2 gezeigt wurde, ist die Oligomerisierung von löslichen CD95L-Molekülen nötig, um die Translokation von CD95 in detergenezunlösliche „Lipid Rafts“ zu induzieren (Abbildung 9). Nun sollten Zellen mit GpL-CD95L-Fusionsproteinen behandelt und die Verteilung der GpL-CD95L-CD95-Komplexe nach Sucroседichtegradientenzentrifugation untersucht werden. Zellen wurden dafür mit GpL-Flag-CD95L, anti-Flag (M2) oligomerisiertem GpL-Flag-CD95L und hexamerem GpL-Fc-Flag-CD95L stimuliert und nichtgebundene Liganden vor der Zellyse abgewaschen. Danach wurden die Triton X-100-Lysate mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. In GpL-Flag-CD95L-stimulierten Zellen fand sich nur ein kleiner Anteil des GpL-Liganden in der „Lipid Raft“-Fraktion und der Großteil befand sich in der löslichen Fraktion. In Zellen hingegen, welche mit oligomerisiertem GpL-Flag-CD95L oder GpL-Fc-Flag-CD95L stimuliert wurden, zeigte sich ein signifikanter Anstieg an GpL-Aktivität in der unlöslichen Fraktion (Abbildung 19). Reziprok hierzu zeigte sich in den letzten beiden Gruppen eine Reduktion der GpL-Aktivität in der löslichen Fraktion. Demzufolge zeigen auch diese Experimente, in welchen GpL-Flag-CD95L und GpL-Fc-Flag-CD95L als „Tracer“ für CD95 verwendet wurden, dass die Rezeptorbindung von löslichem, wenig aktivem CD95L nicht ausreichend ist, um die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“ auszulösen.

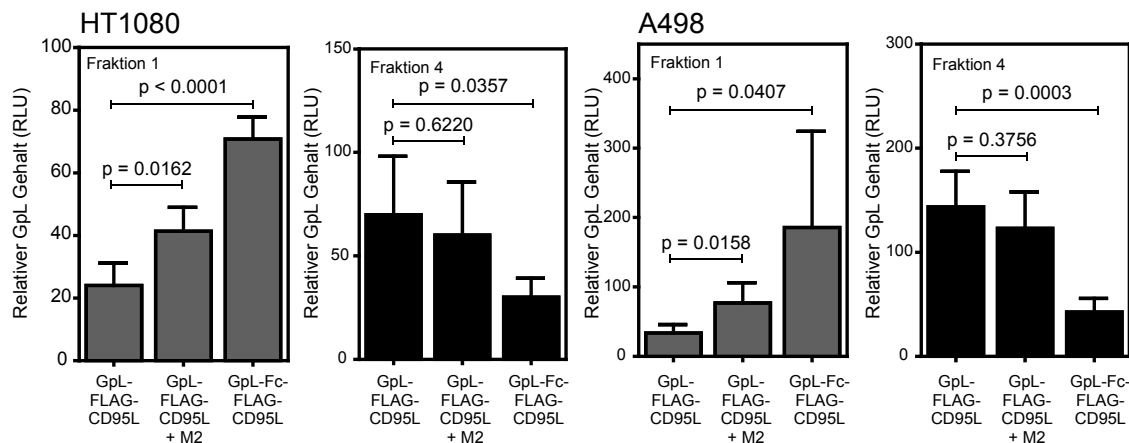


Abbildung 19: Oligomerisierte lösliche GpL-Flag-CD95L-Trimere induzieren die Translokation von CD95 in „Lipid Rafts“

HT1080- und A498-Zellen wurden mit den angegebenen GpL-CD95L-Varianten stimuliert und über Sucroседichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf die Verteilung der verschiedenen GpL-Flag-CD95L-Fusionsproteine hin untersucht. Dafür wurde ein Standard-Luziferaseassay verwendet. Die Luziferaseaktivitäten in den Fraktionen 1 bis 4 sind als Absolutwerte angegeben. Zu beachten ist der Umstand, dass hohe Sucrosekonzentrationen und Triton X-100 die Luziferaseaktivität hemmen, deswegen können die gemessenen GpL-Aktivitäten der verschiedenen Fraktionen nicht direkt miteinander verglichen werden. Es sind die Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.3 Bindungsstudien mit monomeren und trimeren Varianten von löslichem CD95-Flag-GpL

4.3.1 Gleichgewichtsbindungsstudien mit monomerem und trimerem CD95-Flag-GpL

Liganden der TNF-Familie liegen trimer vor und erlauben die Bindung von bis zu drei Rezeptoren. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass monomere CD95-Moleküle nicht in der Lage sind, an CD95L zu binden, wohingegen rekombinante dimere und trimere Rezeptoren inhibierend auf CD95L wirken und folglich eine Interaktion zwischen CD95L und dimeren bzw. trimeren CD95-Rezeptoren stattfindet (Holler et al., 2000). Nun sollte das Bindungsverhalten von CD95-Flag-GpL-Varianten an membranständigen CD95L untersucht werden. Hierfür wurden zunächst monomere und trimere GpL-Fusionsproteine mit der extrazellulären Domäne des CD95 konstruiert (Abbildung 20).

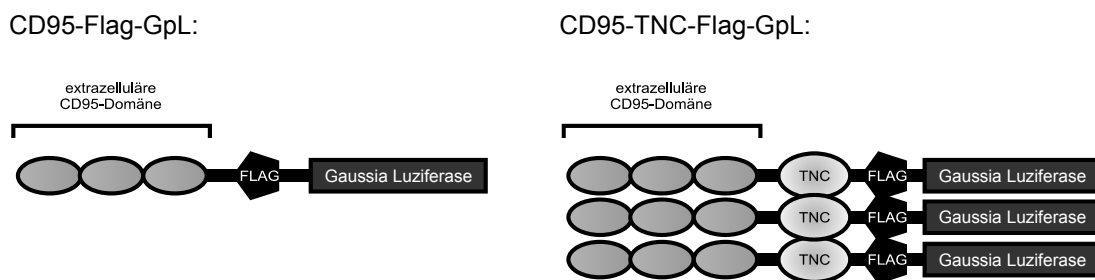


Abbildung 20: Domänenstruktur löslicher CD95-GpL-Rezeptorvarianten

Monomeres CD95-Flag-GpL ist folgendermaßen aufgebaut: C-terminal ist ein Flag-Epitop an die extrazelluläre Domäne des CD95 gekoppelt, worauf die *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) folgt. Um eine Trimerisierung zu erreichen, wurde in der trimeren Variante, GpL-TNC-Flag-CD95, zwischen der extrazellulären Domäne des CD95 und dem Flag-Epitop die Tenascin-C (TNC) Trimerisierungsdomäne zwischengeschaltet.

Im nächsten Schritt wurden mit den monomeren und trimeren CD95-GpL-Varianten Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. Dafür wurden HEK293-Zellen transient mit membranständigem CD95L transfiziert und mit CD95-Flag-GpL bzw. CD95-TNC-Flag-GpL behandelt. Diese Bindungsstudien ergaben, dass löslicher trimerer CD95 hochaffin an membranständigen CD95L bindet, monomere CD95-Rezeptoren jedoch sehr viel schlechter (Abbildung 21).

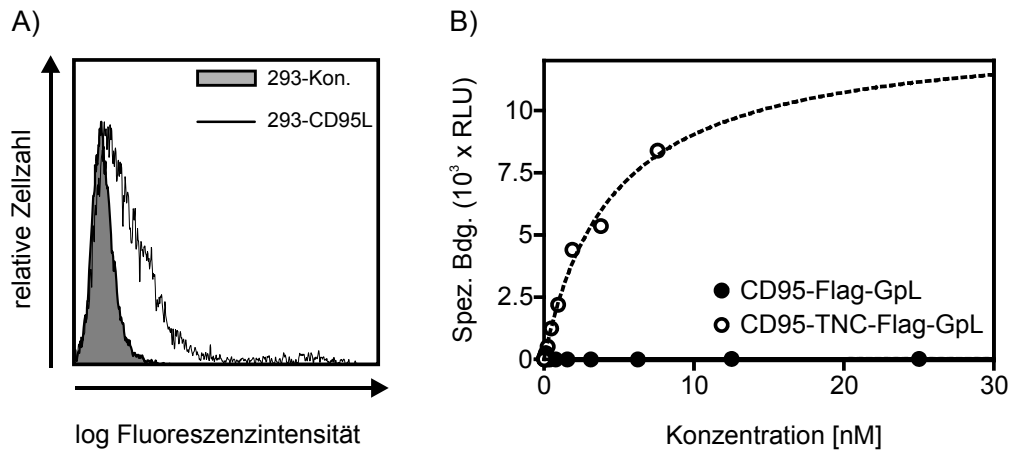


Abbildung 21: Gleichgewichtsbindungsstudien mit monomeren und trimeren CD95-Flag-GpL-Rezeptorvarianten

A) HEK293-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für CD95L-YFP oder einem Kontrollplasmid transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen im FACS auf die Oberflächenexpression von CD95L-YFP hin untersucht.

B) HEK293-Zellen, welche mit CD95L-YFP transfiziert waren, und entsprechende Kontrollzellen, wurden für 2 h bei 37 °C mit den angegebenen Konzentrationen der CD95-Flag-GpL-Fusionsproteine inkubiert. Anschließend wurde die spezifische Bindung mittels Luziferaseassay bestimmt und die Bindungsdaten durch nichtlineare Regression analysiert.

4.3.2 Neutralisationsstudien mit monomerem und trimerem CD95-Flag-GpL

Eine weitere Methode, um die Interaktion von löslichen CD95-Rezeptoren mit CD95L zu untersuchen, sind Neutralisationsassays. Hierfür wurde löslicher Fc-Flag-CD95L mit monomerem CD95-Flag-GpL bzw. trimerem CD95-TNC-Flag-GpL vorinkubiert und der Mix anschließend auf CD95L-sensitive Zellen gegeben. Binden nun lösliche CD95-Rezeptoren an Fc-Flag-CD95L, so ist immer weniger freier CD95L verfügbar, der an zellständigen CD95 binden könnte. Folglich werden in derart behandelten Zellen CD95L-induzierte Signalwege inhibiert. Die Ergebnisse der Neutralisationsexperimente bestätigten, dass trimerer CD95-TNC-Flag-GpL in der Lage ist, löslichen Fc-Flag-CD95L zu binden und eine inhibitorische Wirkung auf ihn auszuüben, nicht jedoch monomerer CD95-Flag-GpL (Abbildung 22). Die mit CD95-TNC-Flag-GpL und Fc-Flag-CD95L stimulierten Gruppen zeigten, abhängig vom Verhältnis der Konzentrationen an Rezeptor und Ligand, im Vergleich zu Fc-Flag-CD95L-behandelten Gruppen, reduzierte Apoptose. Bei Zellen hingegen, welche mit monomerem CD95-Flag-GpL und Fc-Flag-CD95L behandelt wurden, zeigte sich keine inhibierende Wirkung von CD95-Flag-GpL auf die Fc-Flag-CD95L-induzierte Apoptose (Abbildung 22), was wiederum darauf hindeutet, dass CD95-Flag-GpL nicht in der Lage ist, effizient mit Fc-Flag-CD95L zu interagieren.

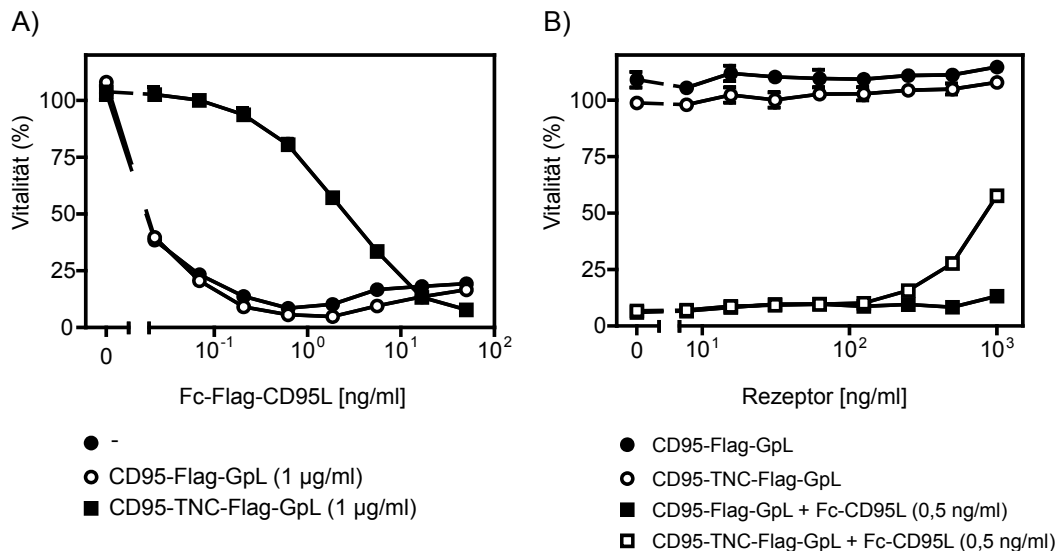


Abbildung 22: Neutralisationsassays mit Fc-Flag-CD95L und monomeren bzw. trimeren löslichen CD95-Rezeptorvarianten

HT1080-Zellen wurden ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well, 96-Well Platte) und am nächsten Tag mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CHX für die Apoptoseinduktion sensitiviert. Dann wurden die angegebenen Konzentrationen von Fc-Flag-CD95L entweder mit jeweils konstant 1 $\mu\text{g/ml}$ monomeren bzw. trimerem CD95-Flag-GpL bei 37 °C für 1 h vorinkubiert oder wurden alleine zu den Zellen gegeben (A). In B) erfolgte die Vorinkubation mit konstant 0,5 ng/ml Fc-Flag-CD95L mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an CD95-Flag-GpL bzw. CD95-TNC-Flag-GpL für 1 h bei 37 °C. Dann wurde entweder dieser Mix oder die entsprechenden CD95-Flag-GpL-Rezeptoren alleine auf die Zellen gegeben. Nach 18 h wurde der Prozentsatz überlebender Zellen mittels Kristallviolettffärbung bestimmt.

4.4 Die Aktivierung eines kleinen Teils an endogenem CD95 kann ausreichend sein, um effizient Zelltod zu induzieren

In einigen der bisher beschriebenen Experimente wurden die verwendeten Zelllinien gegenüber CD95-vermittelter Apoptose durch Stimulation mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) sensitiviert. Die CHX-Sensitivierung beruht, wie bereits erwähnt, darauf, dass cFLIP kurzlebig ist und dessen zellulärer Level folglich schnell abnimmt, wenn die Proteinsynthese blockiert ist. Immunpräzipitationsexperimente zeigten, dass nach CHX-Vorbehandlung die Menge an cFLIP in CD95-Signalkomplexen deutlich reduziert ist (Abbildung 23).

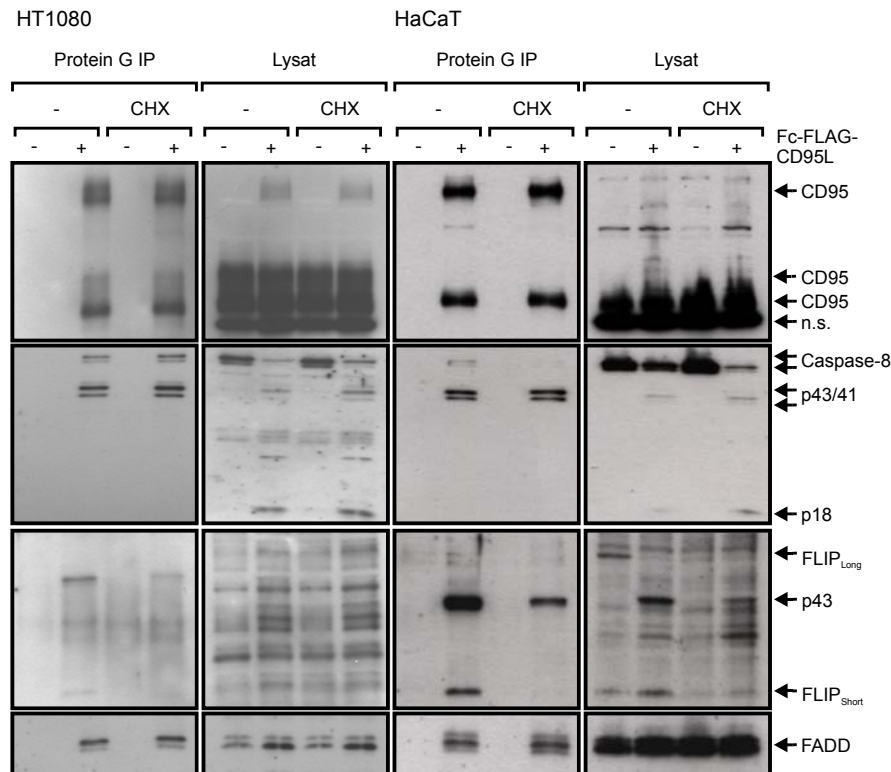


Abbildung 23: Analyse des CD95-Signalkomplexes nach CHX-Vorbehandlung

HT1080- und HaCaT-Zellen wurden mit 2,5 µg/ml CHX vorstimuliert oder blieben unbehandelt. Danach erfolgte eine Stimulation mit 1 µg/ml Fc-Flag-CD95L für weitere 1,5 h. Fc-Flag-CD95L-assoziierte Proteine wurden über Nacht mittels Protein G Agarose präzipitiert. Als Kontrolle wurden Lysate von Fc-Flag-CD95L-unstimulierten Zellen (in An- und Abwesenheit von CHX) mit 10 ng Fc-Flag-CD95L versetzt und ebenfalls präzipitiert. Die Immunkomplexe und entsprechenden Lysate wurden am nächsten Tag im Western Blot auf die angegebenen Proteine hin untersucht.

FLIP-Proteine interagieren mit der CD95-assoziierten Aktivierung der Procaspase-8 (Abschnitt 1.3.2.1) (Fulda et al., 2000; Imanishi et al., 2000; Kreuz et al., 2001; Siegmund et al., 2002). Um einen eventuellen Effekt einer CHX-Behandlung auf die Interaktion von CD95 mit CD95L ausschließen zu können, wurden in dieser Arbeit Bindungsstudien mit GpL-Fc-Flag-CD95L in An- und Abwesenheit von CHX durchgeführt (Abbildung 24).

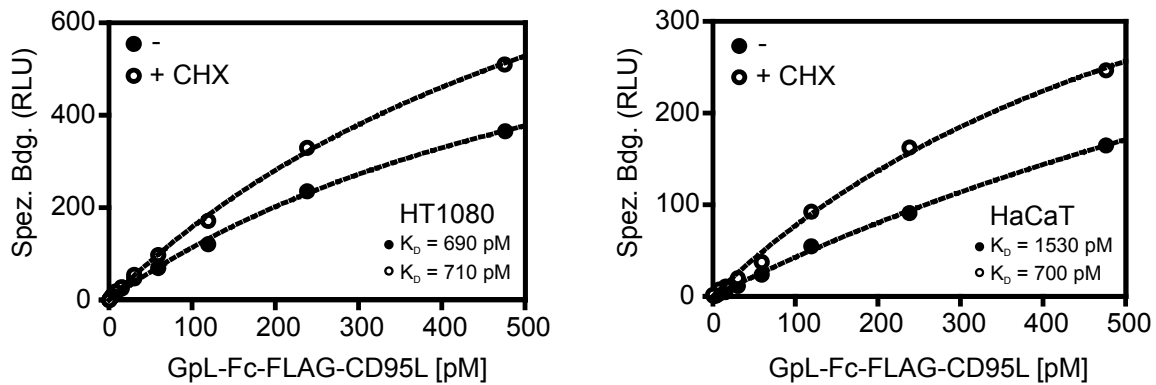


Abbildung 24: Die Behandlung mit CHX hat keinen Einfluss auf die Interaktion von CD95L-CD95

HT1080- und HaCaT-Zellen (24-Well Platte, 2×10^5 Zellen pro Well) wurden für 3 h mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CHX inkubiert oder blieben unbehandelt. Dann wurden Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL-Fc-Flag-CD95L durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen für 1 h inkubiert und danach die zellassoziierte Luziferaseaktivität gemessen.

Die Resultate zeigten, dass es keine bedeutenden Unterschiede in der CD95L-CD95-Interaktion zwischen CHX-vorbehandelten und -unbehandelten Zellen gibt (Abbildung 24). Dies weist darauf hin, dass der sensitivierende Effekt von CHX auf die CD95-vermittelte Apoptose in der Tat nur auf intrazelluläre Prozesse beschränkt ist. Bemerkenswerterweise zeigen auch Zelllinien, welche basal schon sehr sensitiv gegenüber Fc-Flag-CD95L-vermitteltem Zelltod sind, nach CHX-Behandlung eine drastische Abnahme hinsichtlich des ED_{50} -Werts der Apoptoseinduktion. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivierung einer unter Umständen sehr kleinen Subfraktion endogener CD95-Rezeptoren völlig ausreichend sein muss, um in Zellen Apoptose zu induzieren. Um die minimale Zahl an CD95-Rezeptorkomplexen zu bestimmen, welche für die Induktion des Zelltods nötig sind, wurde die Ligandenbelegung von CD95 mit GpL-Fc-Flag-CD95L direkt mit der Apoptoseinduktion korreliert (Abbildung 25).

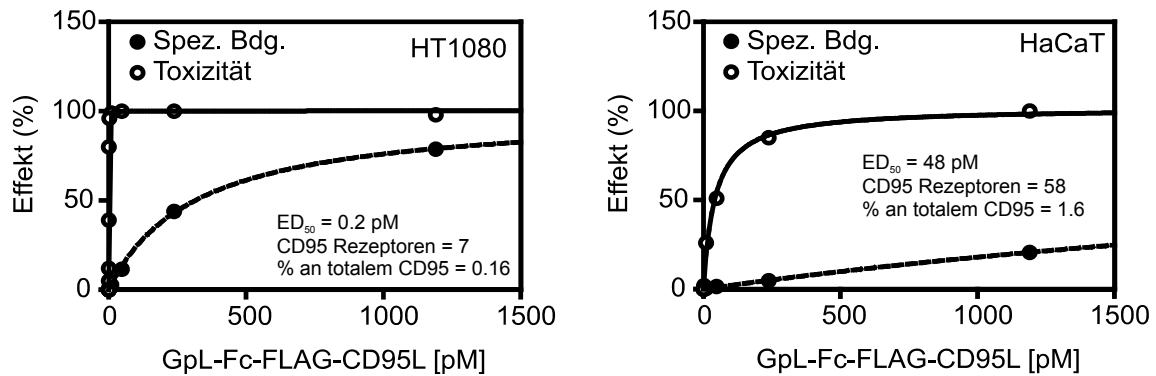


Abbildung 25: Korrelation der Apoptoseinduktion mit der CD95L-Belegung

Die angegebenen Zelllinien wurden in 96-Well Platten (2×10^4 Zellen pro Well) ausgesät und am nächsten Tag für 3 h mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CHX für die Apoptoseinduktion sensitiviert. Dann wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen an GpL-Fc-Flag-CD95L für 18 h stimuliert und das Zellüberleben mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Parallel wurden Zellen, welche in 24-Well Platten kultiviert wurden (2×10^5 Zellen pro Well), auf die gleiche Weise stimuliert, allerdings mit dem Unterschied, dass sie vor Apoptoseinduktion geschützt wurden, indem 20 μM des Caspaseinhibitors zVAD zugegeben wurde. Die zellspezifische Bindung wurde mittels Luziferaseaktivitätsmessung bestimmt. Die Bindung von GpL-Fc-Flag-CD95L wurde in Prozent der maximalen Bindung angegeben und die Toxizität wurde anhand einer Todkontrolle normiert.

In CHX-sensitivierten HT1080- und HaCaT-Zellen war im Mittel ein Anteil von nur 0,1 bis 2,5 % an GpL-Fc-Flag-CD95L belegtem endogenem CD95 ausreichend, um in 50 % der untersuchten Zellen effizient Apoptose zu induzieren. Dies entspricht im Mittel nur 4 bis 40 aktivierten CD95-Rezeptoren pro Zelle.

4.5 Charakterisierung chimärer CD40-CD95-Rezeptoren

4.5.1 Herstellung stabiler CD40-CD95-Transfektanten

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass ein Auto-Amplifikationsloop der CD95-induzierten Caspase-8-Aktivierung und der CD95-Translokation in „Lipid Rafts“ zu einer Umverteilung der CD95-Moleküle in dieses unlösliche Membrankompartiment führt (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Nichtsdestotrotz ist bisher unklar, ob dieser Effekt darauf zurück zu führen ist, dass Caspase-8-aktivierende CD95L-CD95-FADD-Komplexe in „Lipid Rafts“ zurückgehalten werden, oder ob dieser Effekt die Caspase-8-getriebene Rekrutierung von inaktiven CD95-Molekülen in „Lipid Rafts“ widerspiegelt. Um diese Frage beantworten zu können, war ein System nötig, in welchem zwischen aktivierten CD95-Signalkomplexen und inaktiven unstimulierten CD95-Molekülen unterschieden werden kann. Dafür wurde ein chimärer Rezeptor in HaCaT- und HT1080-Zellen exprimiert, bei welchem die extrazelluläre Domäne von CD95 durch den entsprechenden extrazellulären Teil von CD40 ersetzt worden ist (Abbildung 26, Abbildung 27).

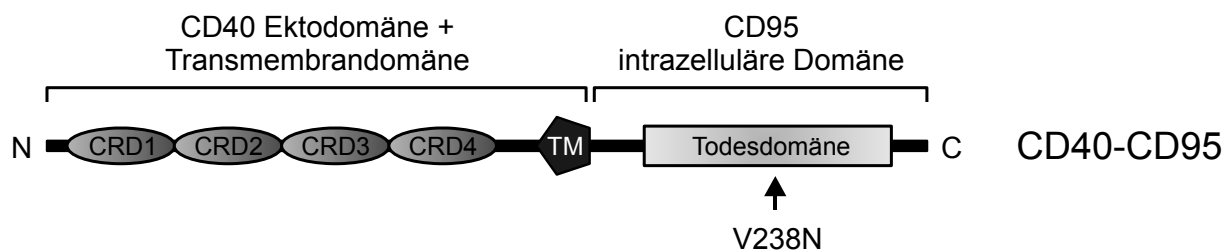


Abbildung 26: Struktur chimärer CD40-CD95-Rezeptoren

CRD: cysteinreiche Domäne; TM: Transmembrandomäne; Pfeil: Punktmutation V238N, welche der murinen *lpr^{cg}*-Mutation entspricht.

Darüber hinaus wurde eine Variante des chimären Rezeptors exprimiert, welche in der intrazellulären CD95-Todesdomäne eine Mutation aufweist (V238N). Diese V238N-Mutation entspricht der murinen *lpr^{cg}* Mutation und verhindert, dass CD95 einen Caspase-8-aktivierenden Komplex mit FADD und Caspase-8 bildet (Martin et al., 1999). CD40L interagiert nicht mit CD95 und CD95L ist *vice versa* nicht in der Lage, an CD40 zu binden (Bossen et al., 2006). Deshalb ist es möglich CD95 und CD40-CD95, und somit CD95-assoziierte Signalwege, unabhängig voneinander mit Fc-Flag-CD95L und Fc-Flag-CD40L zu stimulieren.

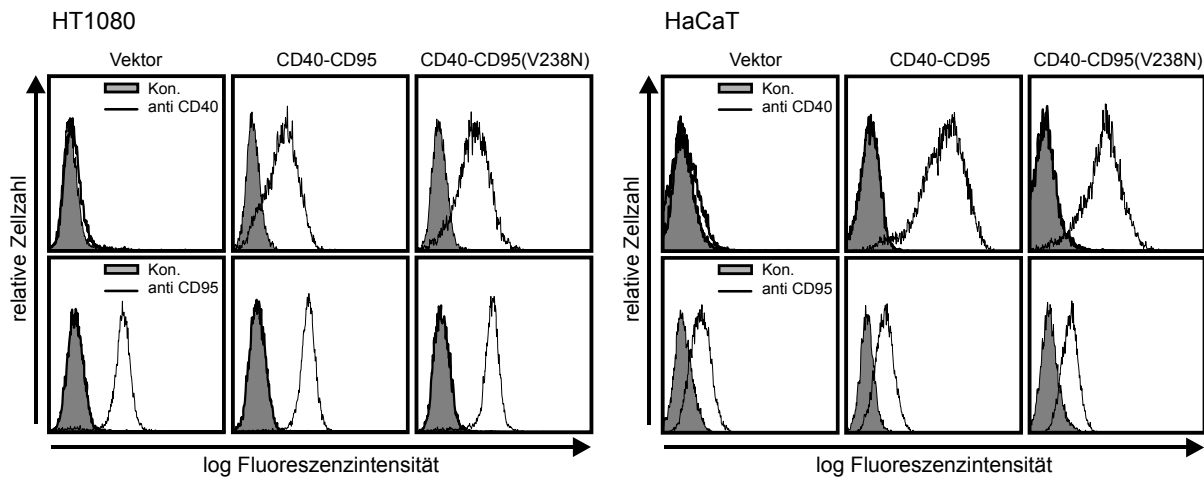


Abbildung 27: Oberflächenexpression von endogenem CD95 und chimärem CD40-CD95 in HT1080- und HaCaT-Transfektanten

Die angegebenen Zelllinien wurden mit CD95- und CD40-spezifischen FITC- und PE-Antikörpern markiert bzw. mit isotypspezifischen Kontrollantikörpern inkubiert. Die Oberflächenexpression wurde dann mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die transfizierten Zellen die chimären CD40-CD95-Rezeptoren in vergleichbarer Menge auf der Oberfläche exprimieren. Auch die Expression von endogenem CD95 war auf den Kontrollzellen und CD40-CD95-Transfektanten vergleichbar (Abbildung 27).

4.5.2 Funktionsanalyse chimärer CD40-CD95-Rezeptoren

Im nächsten Schritt sollte nun die Funktionalität der chimären CD40-CD95-Rezeptoren untersucht werden, d.h. die Fähigkeit dieser Moleküle CD95-assoziierte Signalwege zu aktivieren. Dazu wurden zunächst Zytotoxizitätsassays durchgeführt (Abbildung 28).

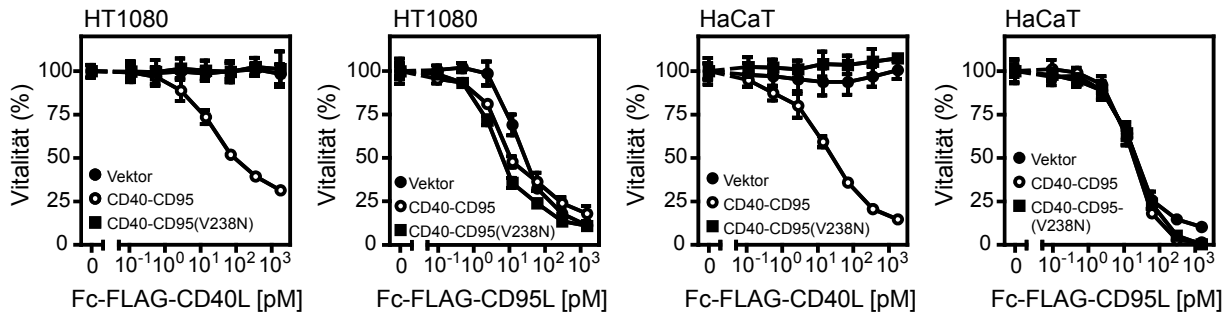


Abbildung 28: Apoptoseinduktion durch chimäre CD40-CD95-Rezeptoren

Die verschiedenen Transfektanten wurden über Nacht in 96-Well Platten kultiviert (2×10^4 Zellen pro Well). Am nächsten Tag wurden die Zellen in Dreifachwerten mit ansteigenden Konzentrationen Fc-Flag-CD95L bzw. Fc-Flag-CD40L behandelt. Nach 24 h wurde der Anteil überlebender Zellen mittels Kristallviolett färbung bestimmt.

Die Vitalitätsassays ergaben, dass Fc-Flag-CD95L in jeder untersuchten Zellgruppe (Kontrollvektor, CD40-CD95 und CD40-CD95_(V238N)) mit vergleichbarer Effizienz Zelltod induziert. Dahingegen konnte durch Fc-Flag-CD40L nur Apoptose in Zellen induziert werden, welche den chimären CD40-CD95-Rezeptor exprimieren. Fc-Flag-CD40L zeigte jedoch erwartungsgemäß keinen apoptotischen Effekt in Kontroll- und CD40-CD95_(V238N)-exprimierenden Zellen (Abbildung 28). Dementsprechend konnte auch mittels Western Blot gezeigt werden, dass Fc-Flag-CD95L in allen Transfektanten Caspaseprozessierung vermittelt, wohingegen die Behandlung mit Fc-Flag-CD40L wiederum nur in CD40-CD95-exprimierenden Zellen die Aktivierung von Caspasen induzieren konnte (Abbildung 29).

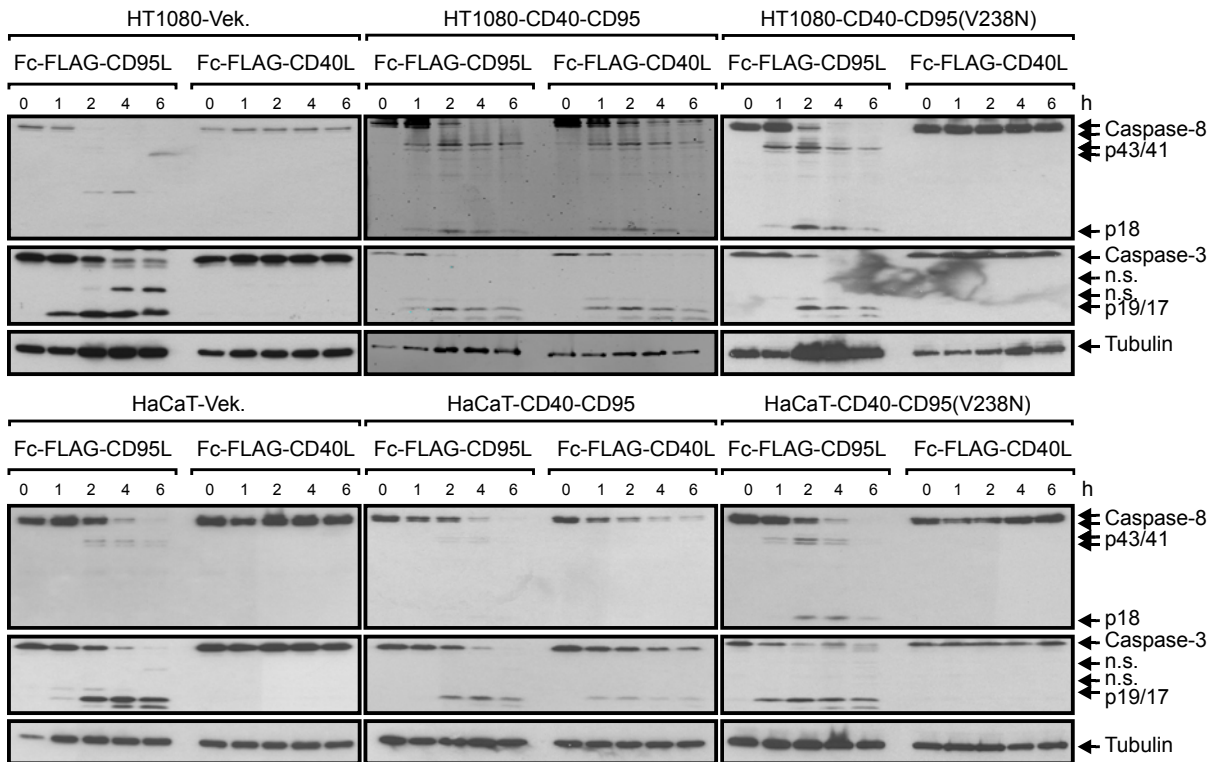


Abbildung 29: Die Stimulation von CD40-CD95 mit Fc-Flag-CD40L resultiert in der Aktivierung von Caspasen

Die verschiedenen Zelllinien wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit jeweils 200 ng/ml Fc-Flag-CD40L bzw. Fc-Flag-CD95L stimuliert. Die Zelllysate wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Prozessierung der Caspasen im Western Blot untersucht.

4.6 Aktivierte CD95-Rezeptoren triggern die Caspase-8-vermittelte Translokation von inaktiven CD95-Molekülen in „Lipid Rafts“

4.6.1 Die Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen induziert die Translokation von ligandenfreien CD40-CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“

Die Funktionalität der chimären CD40-CD95-Rezeptoren wurde im vorigen Abschnitt aufgezeigt. Nun sollte analysiert werden, wie sich diese Rezeptoren bezüglich der „Lipid Raft“-Translokation verhalten, und ob die V238N-Mutation, d.h. eine intakte Todesdomäne, dabei eine Rolle spielt. Die Stimulation von CD40-CD95 mit Fc-Flag-CD40L resultierte in einer signifikanten Anreicherung des chimären Moleküls in der „Lipid Raft“-Fraktion (Fraktion 1, Abbildung 30, Abbildung 31), was auch in vorherigen Experimenten für endogenen CD95 nach Stimulation mit Fc-Flag-CD95L gezeigt werden konnte (Abbildung 9).

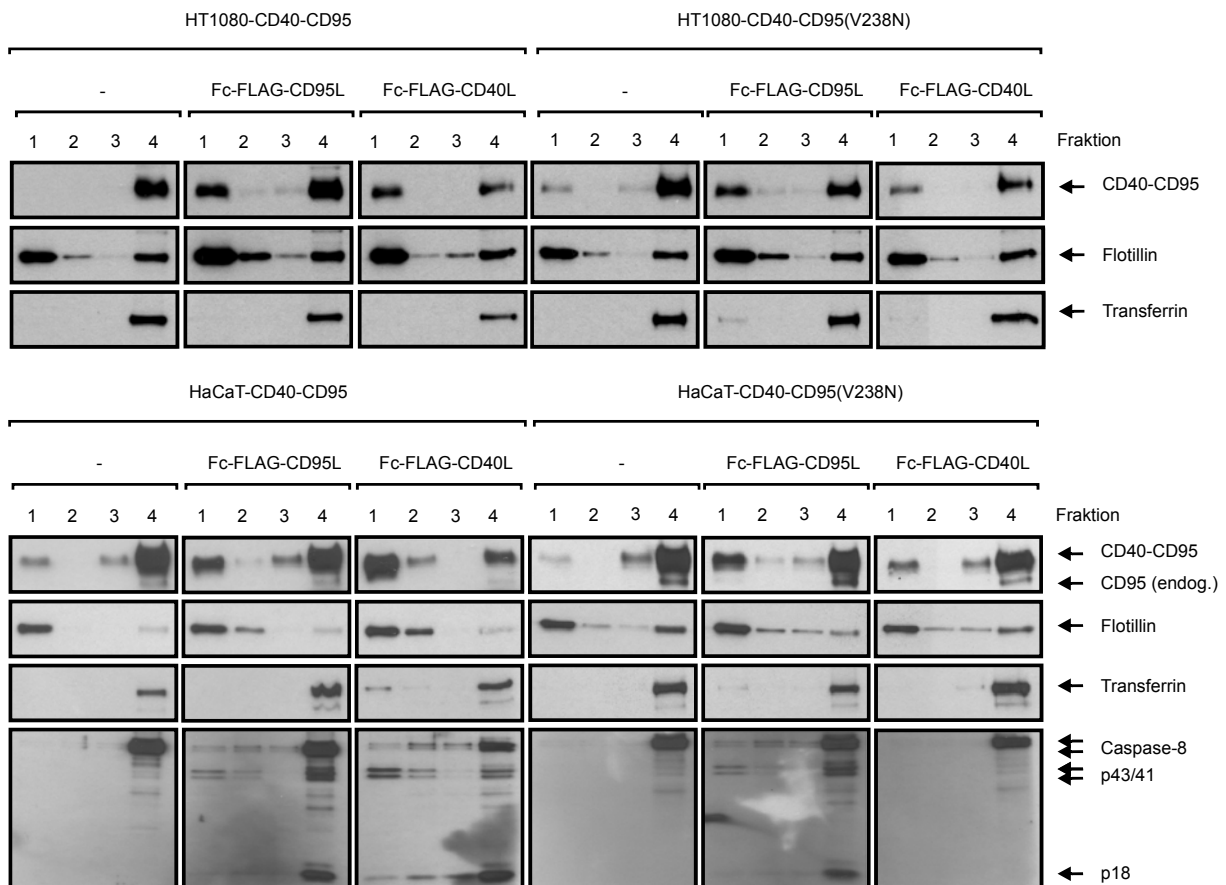


Abbildung 30: Analyse der CD95-induzierten „Lipid Raft“-Translokation von chimären CD40-CD95-Rezeptoren

Die angegebenen Zelllinien wurden mit Fc-Flag-CD95L bzw. Fc-Flag-CD40L (jeweils 200 ng/ml) stimuliert oder blieben unbehandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und mittels Triton X-100-Lyse fraktioniert. Die Lysate wurden im Anschluss mit Hilfe einer Sucroседichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot auf die angegebenen Proteine hin untersucht. Transferrin diente hierbei als Marker für die lösliche und Flotillin als Marker für die „Lipid Raft“-Fraktion.

Ein weiterer Punkt, der dafür spricht, dass die Aktivität von CD95 und folglich auch die CD95-induzierte Signaltransduktion nötig ist, um die „Lipid Raft“-Translokation des Rezeptors zu vermitteln, ist der Befund, dass nach Stimulation mit Fc-Flag-CD40L nur ein kleiner deutlich reduzierter Anteil des mutierten CD40-CD95_(V238N)-Rezeptors in „Lipid Rafts“ transloziert. Ferner konnte auch keine Aktivierung von Caspase-8 detektiert werden (Abbildung 30). Die Stimulation des endogenen CD95 mit Fc-Flag-CD95L und die daraus resultierende Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen führte zur signifikanten Umverteilung des ligandenfreien inaktiven chimären CD40-CD95-Rezeptors in die „Lipid Raft“-Fraktion (Abbildung 31). Dies lässt vermuten, dass aktivierte CD95-Moleküle die Assoziation von ligandenfreien inaktiven Rezeptoren mit der detergenzunlöslichen Membranfraktion vermitteln. Ferner deutet der Befund, dass in CD40-CD95_(V238N)-Transfektanten die Ko-Translokation von inaktiven Rezeptoren vermindert ist, darauf hin, dass dabei Caspase-8 eine wichtige Rolle spielt.

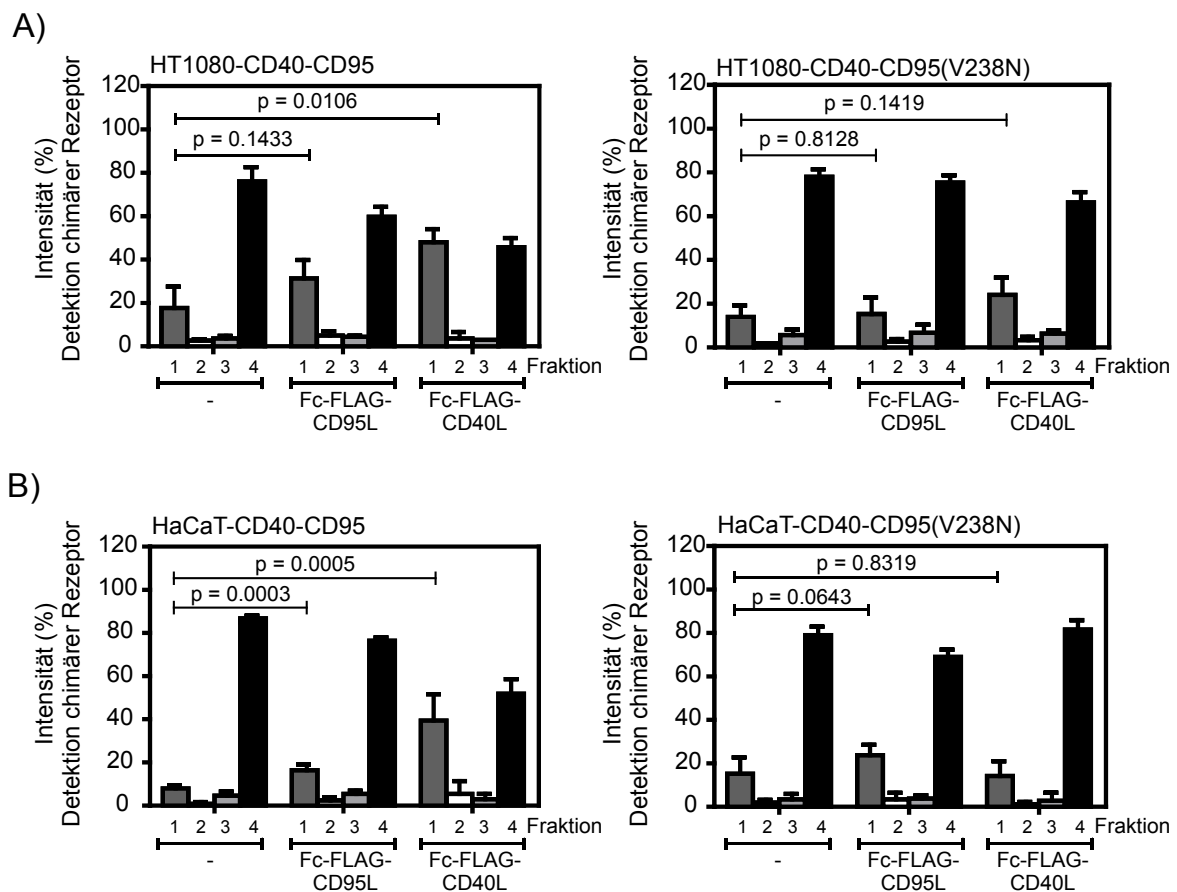


Abbildung 31: Die Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen vermittelt die Translokation von ligandenfreien inaktiven CD40-CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“

HT1080- (A) und HaCaT-Transfektanten (B) wurden wie in Abbildung 30 beschrieben behandelt und im Western Blot untersucht. Die Bandenintensität des Signals von CD40-CD95 bzw. CD40-CD95_(V238N) jeder Fraktion wurde quantifiziert und gegen die totale Intensität von CD40-CD95 bzw. CD40-CD95_(V238N) des jeweiligen Gradienten normalisiert. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte aus 3 (A) bzw. 5 (B) unabhängigen Experimenten.

Der Befund, dass aktive Caspase-8 eine Rolle bei der „Lipid Raft“-Translokation von CD95 spielt, sollte nun auch in Caspase-8 Knockdown-Experimenten überprüft werden. Dafür wurden HaCaT-Zellen verwendet, welche den chimären CD40-CD95-Rezeptor exprimieren.

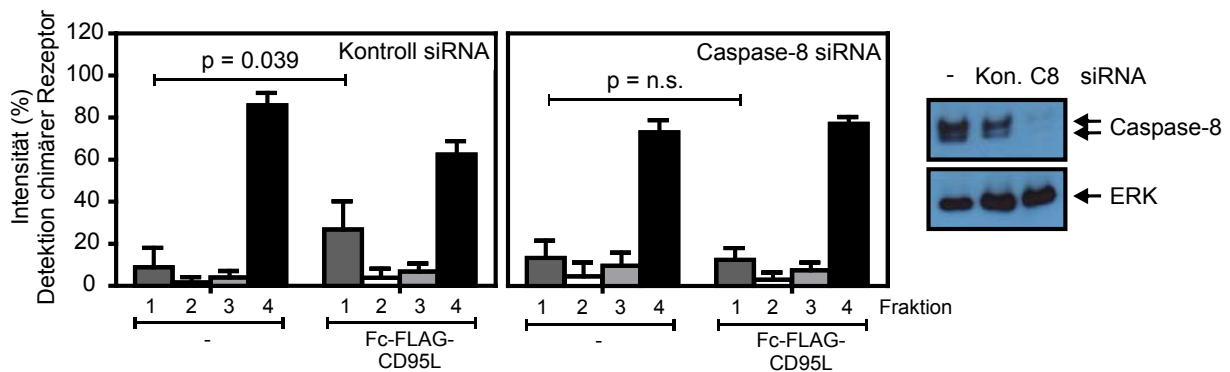


Abbildung 32: Ein Caspase-8 Knockdown verhindert die Ko-Translokation von inaktivem CD40-CD95 in „Lipid Rafts“

HaCaT-CD40-CD95-Zellen wurden entweder mit Kontroll siRNA oder Caspase-8 siRNA transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 2 h mit 200 ng/ml Fc-Flag-CD95L stimuliert und mittels Sucroedichtegradientenzentrifugation und Western Blot bezüglich der Verteilung der CD40-CD95-Moleküle untersucht. Es sind die quantifizierten Mittelwerte der Bandenintensität der CD40-CD95-Signale von 5 unabhängigen Experimenten mittels LI-COR und die Knockdown-Kontrolle eines Einzelexperiments dargestellt.

Die Resultate der Caspase-8 Knockdown-Experimente zeigten, dass die Ko-Translokation von ligandenfreien chimären CD40-CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“ in Caspase-8 Knockdown-Zellen nach Stimulation von endogenem CD95 mit Fc-Flag-CD95L deutlich inhibiert ist (Abbildung 32). Dies unterstreicht die wichtige Rolle von aktivierter Caspase-8 bei der Umverteilung von inaktiven CD95-Molekülen bzw. den chimären CD40-CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“.

4.6.2 CD95-assoziierte Signalwege vermitteln die Translokation von ligandenfreien endogenen CD95-Molekülen in „Lipid Rafts“

Um weiter zu analysieren, ob auch inaktiver endogener CD95 wie CD40-CD95 in „Lipid Rafts“ ko-transloziert, wurde in den folgenden Experimenten GpL-Flag-CD95L als „Tracer“ für inaktiven CD95 verwendet. Dies ist möglich, da GpL-Flag-CD95L-Trimere CD95 zwar binden, ihn aber nicht aktivieren und folglich auch keine Translokation in „Lipid Rafts“ induzieren (Vgl. Abbildung 9). Aus diesem Grund wurden Zellen, welche den chimären Rezeptor CD40-CD95 exprimieren mit GpL-Flag-CD95L „markiert“ und daraufhin die Verteilung der

inaktiven GpL-Flag-CD95L-Rezeptorkomplexe in Sucroседichtegradienten von Zellen verglichen, welche nicht mehr behandelt oder für weitere 2 h mit Fc-Flag-CD40L stimuliert wurden. Die Experimente zeigten eine signifikante Zunahme der GpL-Aktivität in der „Lipid Raft“-Fraktion nach Stimulation der Zellen mit Fc-Flag-CD40L. Dies zeigt, dass inaktive Komplexe aus GpL-Flag-CD95L und CD95 unter diesen Bedingungen in „Lipid Rafts“ ko-translozieren (Abbildung 33A).

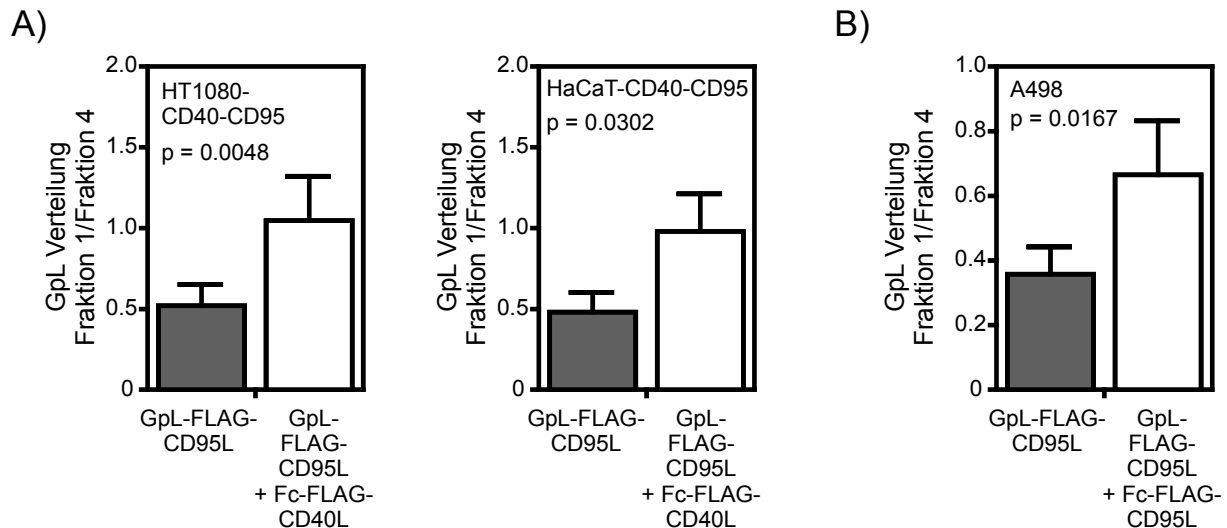


Abbildung 33: Endogener inaktiver CD95 ko-transloziert nach Aktivierung CD95-assoziierter Signalwege in „Lipid Rafts“

A) HT1080-CD40-CD95- und HaCaT-CD40-CD95-Transfektanten wurden für 30 min mit 25 ng/ml GpL-Flag-CD95L inkubiert, um einen Teil des endogenen CD95 zu „markieren“, ohne dabei eine Aktivierung von CD95-assozierten Signalwegen zu induzieren. Dann blieben die Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit 200 ng/ml Fc-Flag-CD40L für weitere 2 h stimuliert. Ungebundener Ligand wurde im Anschluss gewegewaschen und die Zellen mittels Triton X-100 lysiert. Die Proben wurden dann mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die Verteilung von GpL-Flag-CD95L durch einen Standard-Luziferaseassay ermittelt. Angegeben sind die gemittelten Verhältnisse der relativen Lichteinheiten von Fraktion 1 und Fraktion 4. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Experimenten.

B) Eine Fraktion von inaktiven endogenen CD95-Molekülen wurde mittels Inkubation mit 25 ng/ml GpL-Flag-CD95L für 30 Minuten „markiert“. Die restlichen freien CD95-Rezeptoren wurden im Anschluss für weitere 2 h mit 200 ng/ml Fc-Flag-CD95L stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Verteilung von GpL-Flag-CD95L zwischen Fraktion 1 und 4 in Fc-Flag-CD95L-behandelten und unbehandelten Zellen wurde wie in A) beschrieben untersucht. Gezeigt ist der Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Umverteilung von inaktiven Komplexen aus GpL-Flag-CD95L und CD95 auch durch aktivierten endogenen CD95 induziert wird. A498-Zellen wurden hierbei mit einer geringen Konzentration GpL-Flag-CD95L „markiert“ und im Anschluss die übrigen ligandenfreien endogenen CD95-Moleküle mit Fc-Flag-CD95L aktiviert (Abbildung 33B). Auch hier zeigte sich eine signifikante Zunahme des GpL-Signals in der „Lipid Raft“-Fraktion.

5 Diskussion

5.1 Die Interaktion zwischen CD95L und CD95

Definiert man den Todesrezeptor CD95 als aktiv, wenn er sich in einem Zustand befindet, in dem er intrazelluläre Signalwege stimuliert, dann ist die Aktivierung von CD95 nicht unmittelbar eine Konsequenz der Bindung seines Liganden CD95L. Es gibt Hinweise darauf, dass eine ganze Sequenz von Ereignissen stattfinden muss, um inaktive CD95L-CD95-Komplexe dazu zu bringen, Signalwege anzuschalten. Die Literatur allerdings ist sehr widersprüchlich, was die funktionelle Relevanz verschiedener Einzelaspekte der CD95-Aktivierung betrifft und wie die verschiedenen Schritte zusammenspielen. Man kann mindestens 5 Schritte unterscheiden: 1) Die Bindung von CD95L an vorgeformte prä-assemblierte CD95-Moleküle. 2) Die Bildung von SDS-stabilen CD95-Mikroaggregaten. 3) Die Caspase-unabhängige Assemblierung so genannter SPOTS („signaling protein oligomerization transduction structures“). 4) Die Assoziation von CD95 mit detergenezunlöslichen „Lipid Rafts“. 5) Die Formierung supramolekularer Cluster und die Interaktion mit dem Cytoskelett mit folgender CD95-Internalisierung (Papoff et al., 1999; Schütze et al., 2008; Siegel et al., 2000). Zusammengefasst weisen die Mechanismen, welche man mit der Aktivierung von CD95 in Verbindung bringt, darauf hin, dass die sekundäre Aggregation von sich initial bildenden CD95L-CD95-Komplexen ein Schlüsselereignis in der CD95-Aktivierung darstellt. Die gut dokumentierte Beobachtung, dass die Oligomerisierung von löslichen CD95L-Trimeren und das Quervernetzen von CD95-spezifischen Antikörpern diesen Reagenzien eine erhöhte Fähigkeit verleiht, CD95-induzierte Signalwege anzuschalten, könnte die Notwendigkeit einer sekundären Clusterbildung von CD95L-CD95-Komplexen widerspiegeln. Die gesteigerte Aktivität oligomerer CD95-Liganden könnte aber auch einfach auf einen Aviditäts-vermittelten Anstieg der apparenten Affinität hinweisen, was bei gleichen eingesetzten Konzentrationen an löslichem Ligand wiederum eine erhöhte Rezeptorbelegung durch die Ligandenoligomere bedeuten würde (Kischkel et al., 1995; Schneider et al., 1998).

Obwohl durch qualitative Studien eindeutig geklärt ist, dass lösliche CD95L-Trimere prinzipiell in der Lage sind, mit zellulärem CD95 zu interagieren, wurde dieser elementare Sachverhalt bis jetzt nicht wirklich quantitativ untersucht, d.h. anhand der Beziehung zwischen Ligandenbelegung von CD95 und daraus resultierender CD95-Aktivierung. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Markierung von CD95L einige Schwierigkeiten aufweist. Das „Labeln“ von CD95L mit herkömmlichen biochemischen Methoden, wie z.B. Iodiniierung oder Biotinylierung, ist nicht ohne den Verlust der Bioaktivität möglich, und zudem erhält man oft eine Molekülmischung, welche sich im Grad der Markierung und den Markierungspositionen im Molekül unterscheidet. Um diese Problematik zu umgehen, war das Ziel CD95L gentech-

nisch N-terminal mit einer Reporterdomäne zu versehen. Diese wiederum sollte das Kriterium erfüllen, an löslichen CD95L gekoppelt werden zu können, ohne die Fähigkeit des Liganden zu beeinflussen, mit seinem Rezeptor CD95 zu interagieren. Es wurden zunächst verschiedene Reporterproteine bzw. Reporterpeptide mit CD95L fusioniert (z.B. YFP oder *Metridia longa* Luziferase), welche allerdings zur Aggregation der entsprechenden Fusionsproteine führte oder deren Sensitivität für die geplanten Bindungsstudien zu gering war (Lang et al., 2012). Es stellte sich heraus, dass die sekretierbare monomere Luziferase des Ruderfußkrebses (*Gaussia princeps*, GpL) eine perfekte Reporterdomäne für CD95L und andere TNF-Liganden darstellt. Die genetische Fusion der GpL an den N-Terminus von löslichem Flag-CD95L oder hexamerem Fc-Flag-CD95L zeigte keinen Einfluss auf die Funktionalität dieser Moleküle. Weder die spezifische Aktivität der Fusionsproteine, noch die benötigte Oligomerisierung von löslichem trimerem CD95L mittels anti-Flag Antikörper zur effizienten CD95-Aktivierung wurden beeinflusst (Abbildung 12). Die GpL-CD95L-Fusionsproteine zeigten überdies eine hervorragende Nachweisbarkeit, welche die Detektion einer spezifischen CD95L-Bindung auch noch bei Konzentrationen im sub-pM Bereich und mit weniger als 10^6 Zellen pro Ansatz erlaubte (Abbildung 11, Abbildung 14).

Mit Hilfe der GpL-CD95L-Fusionsproteine war es möglich, die Folgen der CD95-Stimulation (z.B. Zelltod) direkt als Funktion der Rezeptorbelegung zu bestimmen. Während anti-Flag-oligomerisierte lösliche GpL-Flag-CD95L- und hexamere GpL-Fc-Flag-CD95L-Moleküle im Vergleich zu trimerem GpL-Flag-CD95L wie erwartet relativ niedrige ED_{50} -Werte bezüglich CD95-vermittelter Signalwege zeigten, wurden für die CD95-Bindung dieser Liganden K_D -Werte ermittelt, welche sehr nah an denen für löslichen trimeren GpL-Flag-CD95L lagen (1200 pM und 2600 pM verglichen mit 2000 pM in HT1080-Zellen; Abbildung 14, Tabelle 1). Obwohl die oligomerisierten CD95L-Varianten also eine über 100fach höhere spezifische Aktivität bezüglich der Apoptose- und IL8-Induktion zeigten als trimerer CD95L (Abbildungen 6, 7 und 12), binden sie nicht besser an CD95. Es ist derzeit nicht möglich zu entscheiden, ob die beobachtbare schwache CD95-stimulierende Aktivität der CD95L-Trimere daher rührt, dass sich Aggregatspuren in Proben von trimeren CD95L-Varianten befinden, oder daran, dass CD95 eine schwache intrinsische Fähigkeit besitzt sich als Antwort auf eine Bindung von löslichen CD95L-Trimern bereits in Clustern anzuordnen. Auf jeden Fall belegen obige Daten klar, dass die Fähigkeit von CD95, als Antwort auf die Bindung von löslichen CD95L-Trimern, apoptotische und inflammatorische Signalwege anzuschalten, stark durch eine exogen erzwungene Multimerisierung von CD95L-CD95-Komplexen verstärkt wird. Dies stimmt gut mit der Tatsache überein, dass beide Signalwege, Apoptoseinduktion und NF κ B-vermittelte IL8-Produktion, FADD- und Caspase-8-abhängig sind und dass die DDs von FADD und CD95 einen oligomeren Komplex bilden, welcher 10-12 DDs enthält (Esposito et al., 2010; Wang et al., 2010). Bemerkenswerterweise werden die Hinweise immer deutlicher,

dass löslicher trimerer CD95L allein schon ausreichend ist, um nicht-apoptotische Antworten auszulösen. Jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen schlecht verstanden, vor allem im Hinblick auf die Oligomerisierung von CD95 (O'Reilly et al., 2009; Tauzin et al., 2011). Auf der einen Seite scheint es möglich, dass die Aktivierung FADD-unabhängiger Signalwege durch CD95 bereits durch trimere CD95L-CD95-Komplexe möglich ist. In der Tat wurde in unserer Arbeitsgruppe eine differentielle Notwendigkeit der Oligomerisierung des TNF-Liganden TWEAK für die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege beobachtet, welche aber alle durch den TNF-Rezeptor Fn14 vermittelt werden (Roos et al., 2010). Auf der anderen Seite gibt es aber auch Hinweise darauf, dass löslicher CD95L auf natürliche Weise sekundär aktiviert werden kann, indem eine Bindung an die extrazelluläre Matrix oder eine Aggregation aufgrund eines oxidativen Mikromilieus stattfindet (Aoki et al., 2001; Herrero et al., 2011).

Die beobachteten K_D -Werte für die Interaktion von CD95 mit verschiedenen CD95L-Varianten sind relativ hoch, verglichen z.B. mit dem verwandten Ligand-Rezeptorpaar TNF-TNFR1, für welches K_D -Werte zwischen 20-200 pM beschrieben wurden (Aggarwal et al., 1985; Baglioni et al., 1985; Grell et al., 1998; Smith & Baglioni, 1987). Die hohen K_D -Werte der CD95L-CD95-Interaktion sind auf eine langsamere CD95L-Assoziation zurück zu führen, welche durchschnittlich 8-12 Minuten braucht, um bei Konzentrationen zwischen 5 und 250 ng/ml 50 % der entsprechenden Gleichgewichtsbindung zu erreichen (Abbildung 18). Die vergleichbar langsame Assoziation stimmt gut mit der Kinetik der Signalkomplexbildung und der CD95-vermittelten I κ B α -Degradation überein, welche typischerweise 15-60 Minuten nach der Zugabe von Fc-Flag-CD95L erfolgt (Daten nicht gezeigt, Abbildung 8). Die vergleichsweise „verzögerte“ Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen spiegelt daher wohl vor allem die Zeit wider, welche für die anfängliche Bindung von CD95L an CD95 benötigt wird, obwohl die darauffolgenden Schritte, welche zur Anschaltung intrazellulärer Signalwege führen, eher schnell ablaufen. Die Anzahl an Apoptose-aktivierten CD95-Molekülen ist folglich durch eine Mindestkonzentration an CD95L und den zellulären Anteil an inhibitorischen cFLIP-Proteinen festgelegt (Bentele et al., 2004; Lavrik et al., 2007). Dementsprechend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in CHX-sensitivierten Zellen, d.h. unter Bedingungen in denen der Anteil an cFLIP-Proteinen stark reduziert ist (Abbildung 23), eine sehr geringe Anzahl an CD95L-belegten CD95-Molekülen ausreichend ist, um halbmaximalen Zelltod herbeizuführen (Abbildung 25).

Die Auswertung der Bindungsstudien mittels klassischer Scatchard-Analyse ergab eine Interaktion von CD95L mit mindestens zwei qualitativ unterschiedlichen zellulären Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität (Abbildung 15). Dabei zeigten sich eine starke Dominanz an niederaffinen Bindungsstellen und nur ein kleiner Anteil hochaffiner Bindungsstellen, der nur etwa 0,5 % betrug. Daher konnte in der nichtlinearen Regression auch eine hohe Signifikanz

für die Annäherung an eine Qualität von Bindungsstelle erreicht werden, obwohl zwei Qualitäten von Bindungsstellen existieren (Abbildung 15). Die Detektion zweier Qualitäten von Bindungsstellen war nur aufgrund der hohen Sensitivität des *Gaussia princeps*-Luziferaseassays möglich.

Die Interaktion von CD95L mit CD95 wurde in dieser Arbeit auch mit Hilfe von löslichen GpL-CD95-Rezeptorvarianten untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass eine lösliche trimere GpL-CD95-Variante hochaffin an membranständigen trimeren CD95L bindet, wohingegen monomerer GpL-CD95 dazu nicht in der Lage war (Abbildung 21). Man kann sich somit gut vorstellen, dass CD95 *in vivo* als monomerer Rezeptor und als PLAD-assoziierte di- oder trimere Rezeptorspezies vorkommt. Der Befund, dass trimerer löslicher CD95 einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf löslichen CD95L ausübt, monomerer CD95 jedoch nicht, unterstützt diese Annahme (Abbildung 22, Holler et al., 2000).

Es ergibt sich daher folgendes Modell der CD95-Rezeptoraktivierung (Abbildung 34). In unbehandelten Zellen befinden sich die CD95-Moleküle im Gleichgewicht aus niederaffinen monomeren Rezeptoren und hochaffinen di- bzw. trimeren Rezeptorspezies. Dabei liegt das Gleichgewicht eindeutig auf der Seite der monomeren Rezeptoren. CD95L wiederum bindet vornehmlich an hochaffine trimere Rezeptoren. Nach Bindung von trimerem CD95L an trimeren CD95 werden diese CD95-Trimere stabilisiert und dem Gleichgewicht mit den monomeren Rezeptoren entzogen. Demzufolge kommt es zur Netto-Neuformation von trimerem CD95. Im nächsten Schritt lagern sich die inaktiven Ligand-Rezeptor-Komplexe zu supramolekularen Clustern zusammen. Im Fall von CD95 wird diese Aggregation sekundär durch membranständigen CD95L oder die Oligomerisierung von löslichen CD95L-Trimeren erreicht (Abbildung 34).

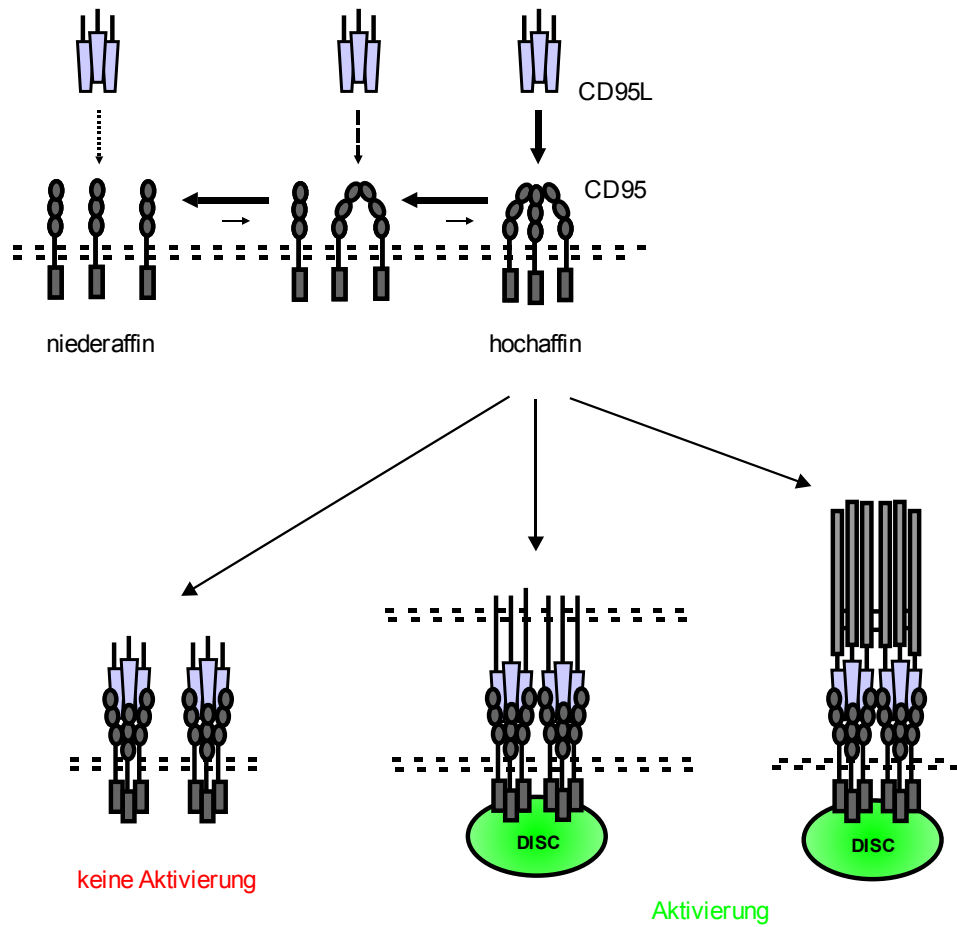


Abbildung 34: Modell der initialen CD95-Aktivierung

Die Abbildung zeigt schematisch die initialen Schritte der CD95-Aktivierung. CD95L bindet an hochaffine trimere CD95-Rezeptoren und diese CD95L-CD95-Komplexe lagern sich in einem zweiten Schritt zu supramolekularen Clustern zusammen. Im Falle von CD95 wird hierfür membranständiger CD95L oder exogen oligomerisierter CD95L benötigt.

5.2 Mechanismen der CD95-„Lipid Raft“-Translokation

Ein Reihe von Studien haben sich bereits intensiv mit der Assoziation von CD95 und detergentunlöslichen Membrankompartimenten beschäftigt, welche u.a. die so genannten „Lipid Rafts“ enthalten (Algeciras-Schimmich et al., 2002; Mollinedo & Gajate, 2006; Rossin et al., 2010). Typischerweise zeigt sich eine schwache basale Retention von CD95-Molekülen in dieses Kompartiment. Allerdings wird die „Lipid Raft“-Assoziation des CD95 als Antwort auf eine CD95-Aktivierung erhöht. Abhängig vom Zelltyp und den verwendeten Stimulanzien (agonistische Antikörper, oligomerisierter löslicher CD95L, Membran-CD95L-exprimierende Zellen) ist die „Lipid Raft“-Assoziation von CD95 von unterschiedlicher Relevanz für eine effektive Apoptoseinduktion. Vor allem wurde herausgefunden, dass sich die Caspase-8-Aktivierung und die CD95-Assoziation in „Lipid Rafts“ wechselseitig verstärken (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Im Einklang mit diesem Befund, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass lösliche CD95L-Trimere, welche die Aktivierung der Caspase-8 und daraus resultierende Apoptose nicht oder nur sehr schwach stimulieren, nicht in der Lage sind, die „Lipid Raft“-Assoziation von CD95 zu erhöhen (Abbildung 9, Abbildung 19). Die molekularen Mechanismen, welche dem selbstverstärkenden Prozess der Caspase-8-Aktivierung bei der CD95-Umverteilung in „Lipid Rafts“ zugrunde liegen, sind völlig unklar. Bisher war es nämlich nicht möglich aktive und inaktive CD95-Spezies parallel in einem einzelnen Versuchsansatz zu beeinflussen und zu detektieren. In dieser Arbeit wurden diese Limitationen mit Hilfe zweier neuer experimenteller Verfahren umgangen: 1) Der Stimulation mit Mischungen von Fc-Flag-CD95L und GpL-Flag-CD95L. Diese erlaubt die Detektion von inaktiven GpL-Flag-CD95L-CD95-Komplexen in der Anwesenheit von Fc-Flag-CD95L-aktivierten CD95-Molekülen (Abbildung 33B). 2) Der Expression und Analyse von chimären CD40-CD95-Rezeptoren. In Studien mit CD40-CD95-Transfektanten ist es möglich CD95-assoziierte Signalwege mit Fc-Flag-CD40L zu stimulieren und gleichzeitig inaktive endogene CD95-Moleküle zu untersuchen. Mit diesen neuen Verfahren konnte deutlich gemacht werden, dass signalkompetente aktive CD95-Spezies die Ko-Assoziation von inaktiven CD95-Molekülen mit dem „Lipid Raft“-Kompartiment in Abhängigkeit von Caspase-8 vermitteln (Abbildung 32). Desweiteren wurde deutlich, dass die Fähigkeit der zytoplasmatischen Todesdomäne von CD95, das Adapterprotein FADD zu rekrutieren, für die Translokation von CD95-Molekülen in „Lipid Rafts“ hilfreich oder sogar notwendig ist (Abbildung 30, Abbildung 31). Im Hinblick auf die oligomere Struktur des Komplexes aus den DDs von CD95 und FADD und der Tatsache, dass FADD-assoziierte Procaspase-8 Homodimere bildet oder mit FADD-gebundenem cFLIP heterodimerisiert, kann man vermuten, dass signalkompetente aktive und inaktive CD95-Spezies in „Lipid Rafts“ durch FADD und Caspase-8 verknüpft werden (Abbildung 35).

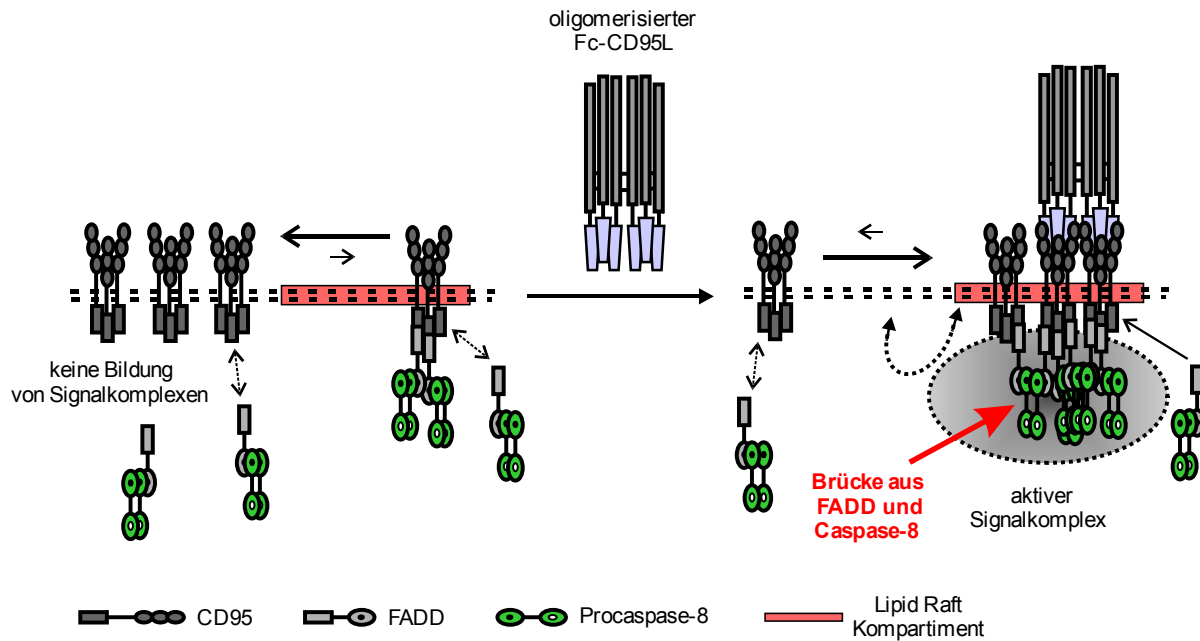


Abbildung 35: Modell der Ko-Translokation von inaktiven CD95-Spezies in „Lipid Raft“-Kompartimente in Anwesenheit von aktiven CD95-Signalkomplexen

Entsprechend dieser Spekulation liegt in unstimulierten Zellen ein Gleichgewicht aus sehr geringen Mengen von instabilen CD95-FADD-Caspase-8-Komplexen, welche eine intrinsische Affinität zum „Lipid Raft“-Membrankompartiment haben, und den korrespondierenden freien Molekülen vor. Die Bindung von oligomerisierten CD95L-Trimeren könnte diese Komplexe stabilisieren, was in aktivierten Signalwegen und erhöhter „Lipid Raft“-Assoziation der Komplexe resultiert. Dies wiederum könnte einen Kondensationskeim für die verbesserte Rekrutierung von zusätzlichen CD95-, FADD- und Caspase-8-Molekülen darstellen. Es liegen frühere Befunde vor, die zeigen, dass CD95L weniger stabile Komplexe mit CD95-Varianten bildet, welche ihrerseits nicht in der Lage sind, FADD zu rekrutieren (Henkler et al., 2005; Siegel et al., 2004). Dies stimmt gut mit dem oben aufgestellten Modell überein. Ferner passt das Modell auch zu verschiedenen Studien, die eine CD95L-unabhängige CD95-vermittelte Apoptose in Situationen von Membranstress postulieren (Faubion et al., 1999; Fumarola et al., 2001; Gajate et al., 2000; Micheau et al., 1999).

6 Zusammenfassung

Die Stimulation des CD95-Todesrezeptors durch seinen natürlichen membranständigen Liganden CD95L führt zur kontextabhängigen Aktivierung von sowohl apoptotischen als auch nicht-apoptotischen Signalwegen. Durch Proteolyse wird aus dem membranständigen CD95L löslicher trimerer CD95L freigesetzt. Die Bindung von löslichem trimerem CD95L an CD95 ist nicht ausreichend, um die CD95-Signaltransduktion effizient zu stimulieren. Die Fähigkeit von löslichen CD95L-Trimeren CD95-vermittelte Signalwege robust zu aktivieren kann jedoch durch Oligomerisierung und artifizielle Immobilisierung an eine Oberfläche drastisch gesteigert werden.

In dieser Arbeit wurde zunächst bestätigt, dass nur oligomere CD95L-Varianten, die z.B. durch Antikörpervernetzung von N-terminal getaggtten rekombinanten CD95L-Varianten oder durch eine gentechnisch erzwungene Hexamerisierung von CD95L-Molekülen erhalten wurden, in der Lage sind, effizient apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege zu aktivieren. Ferner zeigte sich dann, dass die Bindung von löslichen CD95L-Trimeren nicht ausreichend ist, um die Translokation von CD95-Molekülen in detergentenzunlösliche „Lipid Raft“-Membrandomänen zu stimulieren. Die „Lipid Raft“-Translokation ist ein zentrales Ereignis bei der CD95-Aktivierung und vor allem für die Induktion der Apoptose bedeutsam. Dabei ist ein selbstverstärkender Prozess aus Caspase-8-Aktivierung und „Lipid Raft“-Assoziation des CD95 von Bedeutung.

Um die Interaktion von CD95 und CD95L mit Hilfe von hoch sensitiven zellulären Bindungsstudien analysieren zu können, wurden in dieser Arbeit desweiteren CD95L-Fusionsproteine entwickelt und hergestellt, an welche N-terminal eine *Gaussia princeps* Luziferase (GpL)-Reporterdomäne gekoppelt ist. So konnte mit den GpL-CD95L-Fusionsproteinen gezeigt werden, dass die Oligomerisierung von CD95L-Trimeren keinen Effekt auf die Ligandenbelegung des CD95 hat. Dies spricht dafür, dass die höhere spezifische Aktivität von oligomeren CD95L-Trimeren nicht auf einer Aviditäts-vermittelten Zunahme der apparenten Affinität beruht, sondern dies deutet darauf hin, dass die sekundäre Aggregation von sich initial bildenden trimeren CD95L-CD95-Komplexen eine entscheidende Rolle in der CD95-Aktivierung spielt. Durch Scatchard-Analysen zeigte sich ferner, dass trimerer CD95L mit mindestens zwei zellulären Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität interagiert. Bindungsstudien mit löslichen monomeren und trimeren GpL-CD95-Rezeptoren an membranständigen CD95L, als auch Inhibitionsstudien ergaben, dass trimerer CD95 weitaus besser an CD95L bindet. Dies legt nahe, dass es sich bei den zuvor beobachteten hoch- und niederaffinen Bindungsstellen für CD95L um monomere bzw. prä-assemblierte CD95-Moleküle handelt. Die GpL-CD95L-Fusionsproteine wurden auch genutzt, um die CD95-Translokation in „Lipid Rafts“ zu analysieren. So wurde trimerer GpL-CD95L als „Tracer“ zur Markierung von

inaktiven CD95-Molekülen eingesetzt. Nach Aktivierung der übrigen freien CD95-Moleküle mit hoch aktivem hexameren Fc-CD95L konnte eine Zunahme der inaktiven GpL-CD95L-markierten Rezeptoren in „Lipid Rafts“ beobachtet werden. Offensichtlich stimulieren also aktivierte CD95-Moleküle in „trans“ die Ko-Translokation inaktiver CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“.

Dies bestätigte sich auch in Experimenten mit Transfektanten, die einen chimären CD40-CD95-Rezeptor exprimieren. Letzterer ist nach Stimulation mit CD40L in der Lage, intrazelluläre CD95-vermittelte Signalwege zu aktivieren. Die Aktivierung von CD95-assoziierten Signalwegen durch Stimulation von endogenem CD95 in CD40-CD95-Transfektanten resultierte nun in der Ko-Translokation von unstimulierten CD40-CD95-Rezeptoren in „Lipid Rafts“. *Vice versa* zeigte sich die Ko-Translokation von endogenem CD95 nach spezifischer Aktivierung des chimären CD40-CD95-Rezeptors. Schlussendlich erwiesen sich eine funktionsfähige Todesdomäne und die Aktivierung der Caspase-8 als essentiell für die „Lipid Raft“-Assoziation von aktivierten CD95-Molekülen und auch für die durch diese Rezeptorspezies induzierte Ko-Translokation von inaktiven Rezeptoren in „Lipid Rafts“.

7 Summary

Membrane-bound CD95L activates the CD95 death receptor to induce context-dependent apoptotic and non-apoptotic signaling pathways. In contrast, soluble trimeric CD95L, which is released by proteolysis, is not sufficient to stimulate CD95-induced signaling. However, the ability of soluble CD95L trimers to activate robust CD95 mediated signaling pathways can be increased drastically by oligomerization and artificial immobilization on the cell surface.

In this work, it has been confirmed that only the oligomeric CD95L-variants, produced by antibody crosslinking of N-terminal tagged recombinant CD95L-variants or by genetic engineering-enforced formation of hexamers, are able to efficiently activate both apoptotic and non-apoptotic signaling pathways. Moreover, it has been shown that binding of soluble trimeric CD95L is not sufficient to stimulate translocation of CD95 molecules to the “lipid raft”-containing compartment of the cell membrane. This translocation of CD95 to “lipid rafts” is a pivotal event in CD95 activation and mainly meaningful, especially for induction of apoptosis. Thereby an auto-amplification-loop of caspase-8 activation and association of CD95 with “lipid rafts” is of importance.

To analyze CD95-CD95L interactions, highly sensitive cellular binding studies using CD95L fusion proteins linked to the N-terminal *Gaussia princeps* luciferase (GpL) have been performed. With GpL-CD95L fusion proteins it has been demonstrated that oligomerization of CD95L trimers has no major effect on CD95 occupancy. Therefore higher specific activity of oligomerized CD95L trimers is not related to an avidity-driven increase in apparent affinity. This suggests that a process of secondary aggregation of the initially formed trimeric CD95L-CD95 complexes is crucial for CD95 activation. Furthermore, the data obtained from scatchard analysis showed that trimeric CD95L interacts with at least two binding sites of different affinity. This was further examined by performing binding studies of soluble monomeric and trimeric GpL-CD95 receptors to membrane-bound CD95L and neutralization assays. It was observed that trimeric CD95 receptor can bind to CD95L much better. These results suggest that the high and low affinity binding sites concern to monomeric or rather pre-assembled CD95 molecules. Moreover, GpL-CD95L fusion proteins have been employed to analyze translocation of CD95 to “lipid rafts”. In these experiments, GpL-CD95L trimers were applied to “mark” inactive CD95 molecules. Upon activation of the remaining free CD95 molecules using highly active Fc-CD95L, an increased association of these inactive receptors with “lipid rafts” was observed. Apparently activated CD95 molecules stimulate in “trans” the co-translocation of inactive CD95 receptors to “lipid rafts”.

This has also been confirmed in experiments with transfectants expressing chimeric CD40-CD95 receptors. These chimeric receptors are able to activate CD95-mediated signaling pathways after stimulation with CD40L. After stimulation of endogenous CD95 in CD40-

CD95 transfectants the unstimulated chimeric CD40-CD95 receptors co-translocated to “lipid rafts”. Conversely, activation of CD95-associated pathways by specific stimulation of chimeric CD40-CD95 receptors resulted in co-translocation of the endogenous CD95. In conclusion, it has been shown that a functional death domain and caspase-8 activation turned out to be essential for both “lipid raft” association of signaling-active CD95 molecules and co-translocation of inactive CD95 receptors induced by active receptor species.

8 Literaturverzeichnis

Adachi K., Osaki M., Kase S., Takeda A., Ito H. (2003) Anti-Fas antibody-induced apoptosis and its signal transduction in human gastric carcinoma cell lines. *Int J Oncol* **23**: 713-719

Adachi M., Suematsu S., Kondo T., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N., Nagata S. (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* **11**: 294-300

Aggarwal B. B., Eessalu T. E., Hass P. E. (1985) Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* **318**: 665-667

Ahn J. H., Park S. M., Cho H. S., Lee M. S., Yoon J. B., Vilcek J., Lee T. H. (2001) Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* **276**: 47100-47106

Alderson M. R., Armitage R. J., Maraskovsky E., Tough T. W., Roux E., Schooley K., Ramsdell F., Lynch D. H. (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **178**: 2231-2235

Algeciras-Schimmich A., Shen L., Barnhart B. C., Murmann A. E., Burkhardt J. K., Peter M. E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* **22**: 207-220

Aoki K., Kurooka M., Chen J. J., Petryniak J., Nabel E. G., Nabel G. J. (2001) Extracellular matrix interacts with soluble CD95L: retention and enhancement of cytotoxicity. *Nat Immunol* **2**: 333-337

Assohou-Luty C., Gerspach J., Siegmund D., Muller N., Huard B., Tiegs G., Pfizenmaier K., Wajant H. (2006) A CD40-CD95L fusion protein interferes with CD40L-induced prosurvival signaling and allows membrane CD40L-restricted activation of CD95. *J Mol Med (Berl)* **84**: 785-797

Badorff C., Ruetten H., Mueller S., Stahmer M., Gehring D., Jung F., Ihling C., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2002) Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest* **109**: 373-381

Baglioni C., McCandless S., Tavernier J., Fiers W. (1985) Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J Biol Chem* **260**: 13395-13397

Barnhart B. C., Alappat E. C., Peter M. E. (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* **15**: 185-193

Bennett M. W., O'Connell J., O'Sullivan G. C., Brady C., Roche D., Collins J. K., Shanahan F. (1998) The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *Journal of immunology* **160**: 5669-5675

Bentele M., Lavrik I., Ulrich M., Stosser S., Heermann D. W., Kalthoff H., Krammer P. H., Eils R. (2004) Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *J Cell Biol* **166**: 839-851

Bodmer J. L., Schneider P., Tschopp J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* **27**: 19-26

- Bossen C., Ingold K., Tardivel A., Bodmer J. L., Gaide O., Hertig S., Ambrose C., Tschopp J., Schneider P. (2006) Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* **281**: 13964-13971
- Bremer E., Samplonius D., Kroesen B. J., van Genne L., de Leij L., Helfrich W. (2004) Exceptionally potent anti-tumor bystander activity of an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for EGP2 toward target antigen-negative tumor cells. *Neoplasia* **6**: 636-645
- Chakrabandhu K., Herincs Z., Huault S., Dost B., Peng L., Conchonaud F., Marguet D., He H. T., Hueber A. O. (2007) Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J* **26**: 209-220
- Chan F. K., Chun H. J., Zheng L., Siegel R. M., Bui K. L., Lenardo M. J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**: 2351-2354
- Chen L., Park S. M., Tumanov A. V., Hau A., Sawada K., Feig C., Turner J. R., Fu Y. X., Romero I. L., Lengyel E., Peter M. E. (2010) CD95 promotes tumour growth. *Nature* **465**: 492-496
- Cheng J., Liu C., Koopman W. J., Mountz J. D. (1995) Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promoter region. *Journal of immunology* **154**: 1239-1245
- Cheng J., Zhou T., Liu C., Shapiro J. P., Brauer M. J., Kiefer M. C., Barr P. J., Mountz J. D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**: 1759-1762
- Chipuk J. E., Green D. R. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **18**: 157-164
- Cohen P. L., Eisenberg R. A. (1991) Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* **9**: 243-269
- Davis R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-252
- Desbarats J., Newell M. K. (2000) Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med* **6**: 920-923
- Deveraux Q. L., Leo E., Stennicke H. R., Welsh K., Salvesen G. S., Reed J. C. (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* **18**: 5242-5251
- Eckelman B. P., Salvesen G. S., Scott F. L. (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**: 988-994
- Eramo A., Sargiacomo M., Ricci-Vitiani L., Todaro M., Stassi G., Messina C. G., Parolini I., Lotti F., Sette G., Peschle C., De Maria R. (2004) CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur J Immunol* **34**: 1930-1940
- Esposito D., Sankar A., Morgner N., Robinson C. V., Rittinger K., Driscoll P. C. (2010) Solution NMR investigation of the CD95/FADD homotypic death domain complex suggests lack of engagement of the CD95 C terminus. *Structure* **18**: 1378-1390

- Faubion W. A., Guicciardi M. E., Miyoshi H., Bronk S. F., Roberts P. J., Svingen P. A., Kaufmann S. H., Gores G. J. (1999) Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* **103**: 137-145
- Feig C., Tchikov V., Schutze S., Peter M. E. (2007) Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J* **26**: 221-231
- Fesik S. W. (2000) Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**: 273-282
- Fisher G. H., Rosenberg F. J., Straus S. E., Dale J. K., Middleton L. A., Lin A. Y., Strober W., Lenardo M. J., Puck J. M. (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**: 935-946
- Fulda S., Meyer E., Debatin K. M. (2000) Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res* **60**: 3947-3956
- Fumarola C., Zerbini A., Guidotti G. G. (2001) Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. *Cell Death Differ* **8**: 1004-1013
- Gajate C., Fonteriz R. I., Cabaner C., Alvarez-Noves G., Alvarez-Rodriguez Y., Modolell M., Mollinedo F. (2000) Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* **85**: 674-682
- Gajate C., Mollinedo F. (2007) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **109**: 711-719
- Galban S., Duckett C. S. (2010) XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* **17**: 54-60
- Golks A., Brenner D., Fritsch C., Krammer P. H., Lavrik I. N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**: 14507-14513
- Grassme H., Jekle A., Riehle A., Schwarz H., Berger J., Sandhoff K., Kolesnick R., Gulbins E. (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **276**: 20589-20596
- Grell M., Douni E., Wajant H., Lohden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K., Scheurich P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**: 793-802
- Grell M., Wajant H., Zimmermann G., Scheurich P. (1998) The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 570-575
- Gruss H. J., Dower S. K. (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* **85**: 3378-3404
- Haake A. R., Polakowska R. R. (1995) UV-induced apoptosis in skin equivalents: inhibition by phorbol ester and Bcl-2 overexpression. *Cell Death Differ* **2**: 183-193

- Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L. E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**: 1363-1366
- Ham Y. M., Choi J. S., Chun K. H., Joo S. H., Lee S. K. (2003) The c-Jun N-terminal kinase 1 activity is differentially regulated by specific mechanisms during apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 50330-50337
- Hao Z., Mak T. W. (2010) Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *J Mol Cell Biol* **2**: 63-64
- Henkler F., Behrle E., Dennehy K. M., Wicovsky A., Peters N., Warnke C., Pfizenmaier K., Wajant H. (2005) The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol* **168**: 1087-1098
- Herrero R., Kajikawa O., Matute-Bello G., Wang Y., Hagimoto N., Mongovin S., Wong V., Park D. R., Brot N., Heinecke J. W., Rosen H., Goodman R. B., Fu X., Martin T. R. (2011) The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest* **121**: 1174-1190
- Hinds M. G., Norton R. S., Vaux D. L., Day C. L. (1999) Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* **6**: 648-651
- Holler N., Kataoka T., Bodmer J. L., Romero P., Romero J., Deperthes D., Engel J., Tschopp J., Schneider P. (2000) Development of improved soluble inhibitors of FasL and CD40L based on oligomerized receptors. *J Immunol Methods* **237**: 159-173
- Holler N., Tardivel A., Kovacovics-Bankowski M., Hertig S., Gaide O., Martinon F., Tinel A., Deperthes D., Calderara S., Schulthess T., Engel J., Schneider P., Tschopp J. (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol* **23**: 1428-1440
- Hu W. H., Johnson H., Shu H. B. (2000) Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem* **275**: 10838-10844
- Huang D. C., Strasser A. (2000) BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**: 839-842
- Imanishi T., Hano T., Nishio I., Liles W. C., Schwartz S. M., Han D. K. (2000) Transition of apoptotic resistant vascular smooth muscle cells to troptotic sensitive state is correlated with downregulation of c-FLIP. *J Vasc Res* **37**: 523-531
- Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J. L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L. E., Tschopp J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195
- Itoh N., Nagata S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *The Journal of biological chemistry* **268**: 10932-10937
- Jost P. J., Grabow S., Gray D., McKenzie M. D., Nachbur U., Huang D. C., Bouillet P., Thomas H. E., Borner C., Silke J., Strasser A., Kaufmann T. (2009) XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**: 1035-1039

- Kataoka T., Budd R. C., Holler N., Thome M., Martinon F., Irmeler M., Burns K., Hahne M., Kennedy N., Kovacsovics M., Tschopp J. (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* **10**: 640-648
- Kaufmann T., Strasser A., Jost P. J. (2012) Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ* **19**: 1035-1039
- Kayagaki N., Kawasaki A., Ebata T., Ohmoto H., Ikeda S., Inoue S., Yoshino K., Okumura K., Yagita H. (1995) Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *The Journal of experimental medicine* **182**: 1777-1783
- Kennedy N. J., Kataoka T., Tschopp J., Budd R. C. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* **190**: 1891-1896
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579-5588
- Kleber S., Sancho-Martinez I., Wiestler B., Beisel A., Gieffers C., Hill O., Thiemann M., Mueller W., Sykora J., Kuhn A., Schreglmann N., Letellier E., Zuliani C., Klussmann S., Teodorczyk M., Grone H. J., Ganten T. M., Sultmann H., Tuttentberg J., von Deimling A., Regnier-Vigouroux A., Herold-Mende C., Martin-Villalba A. (2008) Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* **13**: 235-248
- Kreuz S., Siegmund D., Rumpf J. J., Samel D., Leverkus M., Janssen O., Hacker G., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Scheurich P., Wajant H. (2004) NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* **166**: 369-380
- Kreuz S., Siegmund D., Scheurich P., Wajant H. (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* **21**: 3964-3973
- Krueger A., Baumann S., Krammer P. H., Kirchhoff S. (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **21**: 8247-8254
- Kurasawa K., Hashimoto Y., Kasai M., Iwamoto I. (2000) The fas antigen is involved in thymic T-cell development as a costimulatory molecule, but not in the deletion of neglected thymocytes. *J Allergy Clin Immunol* **106**: S19-31
- Lambert C., Landau A. M., Desbarats J. (2003) Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* **8**: 551-562
- Lang I., Fick A., Schaefer V., Giner T., Siegmund D., Wajant H. (2012) Signaling active CD95 molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts. *J Biol Chem* 2012 May 29. [Epub ahead of print]
- Lavrik I. N., Golks A., Riess D., Bentele M., Eils R., Krammer P. H. (2007) Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling. *J Biol Chem* **282**: 13664-13671
- Lavrik I. N., Krammer P. H. (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ* **19**: 36-41
- Lee K. H., Feig C., Tchikov V., Schickel R., Hallas C., Schutze S., Peter M. E., Chan A. C. (2006) The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* **25**: 1009-1023

- Legembre P., Barnhart B. C., Peter M. E. (2004) The relevance of NF-kappaB for CD95 signaling in tumor cells. *Cell Cycle* **3**: 1235-1239
- Leon-Bollotte L., Subramaniam S., Cauvard O., Plenchette-Colas S., Paul C., Godard C., Martinez-Ruiz A., Legembre P., Jeannin J. F., Bettaieb A. (2011) S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* **140**: 2009-2018, 2018 e2001-2004
- Lingwood D., Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**: 46-50
- Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501
- Lucas R., Holmgren L., Garcia I., Jimenez B., Mandriota S. J., Borlat F., Sim B. K., Wu Z., Grau G. E., Shing Y., Soff G. A., Bouck N., Pepper M. S. (1998) Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* **92**: 4730-4741
- Mandal M., Maggirwar S. B., Sharma N., Kaufmann S. H., Sun S. C., Kumar R. (1996) Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem* **271**: 30354-30359
- Martin D. A., Zheng L., Siegel R. M., Huang B., Fisher G. H., Wang J., Jackson C. E., Puck J. M., Dale J., Straus S. E., Peter M. E., Krammer P. H., Fesik S., Lenardo M. J. (1999) Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4552-4557
- Maxfield F. R. (2002) Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 483-487
- Micheau O., Solary E., Hammann A., Dimanche-Boitrel M. T. (1999) Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem* **274**: 7987-7992
- Mollinedo F., Gajate C. (2006) Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* **9**: 51-73
- Müller N., Wyzgol A., Munkel S., Pfizenmaier K., Wajant H. (2008) Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *The FEBS journal* **275**: 2296-2304
- Muzio M., Chinnaiyan A. M., Kischkel F. C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J. D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P. H., Peter M. E., Dixit V. M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**: 817-827
- Naismith J. H., Sprang S. R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends in biochemical sciences* **23**: 74-79
- O'Reilly L. A., Tai L., Lee L., Kruse E. A., Grabow S., Fairlie W. D., Haynes N. M., Tarlinton D. M., Zhang J. G., Belz G. T., Smyth M. J., Bouillet P., Robb L., Strasser A. (2009) Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**: 659-663
- Orlinick J. R., Elkon K. B., Chao M. V. (1997a) Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *The Journal of biological chemistry* **272**: 32221-32229

- Orlinick J. R., Vaishnav A., Elkon K. B., Chao M. V. (1997b) Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *The Journal of biological chemistry* **272**: 28889-28894
- Ottonello L., Tortolina G., Amelotti M., Dallegri F. (1999) Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Journal of immunology* **162**: 3601-3606
- Papoff G., Cascino I., Eramo A., Starace G., Lynch D. H., Ruberti G. (1996) An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *Journal of immunology* **156**: 4622-4630
- Papoff G., Hausler P., Eramo A., Pagano M. G., Di Leve G., Signore A., Ruberti G. (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* **274**: 38241-38250
- Park C., Sakamaki K., Tachibana O., Yamashita T., Yamashita J., Yonehara S. (1998) Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 623-628
- Parlato S., Giammarioli A. M., Logozzi M., Lozupone F., Matarrese P., Luciani F., Falchi M., Malorni W., Fais S. (2000) CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J* **19**: 5123-5134
- Reed J. C. (2006) Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* **13**: 1378-1386
- Riedl S. J., Renatus M., Schwarzenbacher R., Zhou Q., Sun C., Fesik S. W., Liddington R. C., Salvesen G. S. (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**: 791-800
- Rieux-Laucat F., Le Deist F., Hivroz C., Roberts I. A., Debatin K. M., Fischer A., de Villartay J. P. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**: 1347-1349
- Roos C., Wicovsky A., Müller N., Salzmann S., Rosenthal T., Kalthoff H., Trauzold A., Seher A., Henkler F., Kneitz C., Wajant H. (2010) Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-kappa B pathway. *J Immunol* **185**: 1593-1605
- Rossin A., Kral R., Lounnas N., Chakrabandhu K., Mailfert S., Marguet D., Hueber A. O. (2010) Identification of a lysine-rich region of Fas as a raft nanodomain targeting signal necessary for Fas-mediated cell death. *Exp Cell Res* **316**: 1513-1522
- Schneider P., Holler N., Bodmer J. L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. (1998) Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *The Journal of experimental medicine* **187**: 1205-1213
- Schütze S., Tchikov V., Schneider-Brachert W. (2008) Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 655-662
- Segui B., Legembre P. (2010) Redistribution of CD95 into the lipid rafts to treat cancer cells? *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **5**: 22-28

- Seino K., Iwabuchi K., Kayagaki N., Miyata R., Nagaoka I., Matsuzawa A., Fukao K., Yagita H., Okumura K. (1998) Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *Journal of immunology* **161**: 4484-4488
- Shin D. H., Lee E., Kim H. J., Kim S., Cho S. S., Chang K. Y., Lee W. J. (2002) Fas ligand mRNA expression in the mouse central nervous system. *J Neuroimmunol* **123**: 50-57
- Siegel R. M., Frederiksen J. K., Zacharias D. A., Chan F. K., Johnson M., Lynch D., Tsien R. Y., Lenardo M. J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**: 2354-2357
- Siegel R. M., Muppidi J. R., Sarker M., Lobito A., Jen M., Martin D., Straus S. E., Lenardo M. J. (2004) SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol* **167**: 735-744
- Siegmund D., Hadwiger P., Pfizenmaier K., Vornlocher H. P., Wajant H. (2002) Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med* **8**: 725-732
- Siegmund D., Wicovsky A., Schmitz I., Schulze-Osthoff K., Kreuz S., Leverkus M., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Wajant H. (2005) Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol Cell Biol* **25**: 6363-6379
- Simons K., Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39
- Smith C. A., Farrah T., Goodwin R. G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**: 959-962
- Smith R. A., Baglioni C. (1987) The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* **262**: 6951-6954
- Srinivasula S. M., Ashwell J. D. (2008) IAPs: what's in a name? *Mol Cell* **30**: 123-135
- Stahnke K., Hecker S., Kohne E., Debatin K. M. (1998) CD95 (APO-1/FAS)-mediated apoptosis in cytokine-activated hematopoietic cells. *Experimental hematology* **26**: 844-850
- Starling G. C., Bajorath J., Emswiler J., Ledbetter J. A., Aruffo A., Kiener P. A. (1997) Identification of amino acid residues important for ligand binding to Fas. *The Journal of experimental medicine* **185**: 1487-1492
- Stel A. J., Ten Cate B., Jacobs S., Kok J. W., Spierings D. C., Dondorff M., Helfrich W., Kluin-Nelemans H. C., de Leij L. F., Withoff S., Kroesen B. J. (2007) Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *Journal of immunology* **178**: 2287-2295
- Straus S. E., Jaffe E. S., Puck J. M., Dale J. K., Elkon K. B., Rosen-Wolff A., Peters A. M., Sneller M. C., Hallahan C. W., Wang J., Fischer R. E., Jackson C. M., Lin A. Y., Baumler C., Siegert E., Marx A., Vaishnav A. K., Grodzicky T., Fleisher T. A., Lenardo M. J. (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* **98**: 194-200

- Suda T., Hashimoto H., Tanaka M., Ochi T., Nagata S. (1997) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* **186**: 2045-2050
- Sun C., Cai M., Gunasekera A. H., Meadows R. P., Wang H., Chen J., Zhang H., Wu W., Xu N., Ng S. C., Fesik S. W. (1999) NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* **401**: 818-822
- Takahashi T., Tanaka M., Brannan C. I., Jenkins N. A., Copeland N. G., Suda T., Nagata S. (1994a) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**: 969-976
- Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S. (1994b) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *International immunology* **6**: 1567-1574
- Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* **4**: 31-36
- Tannous B. A., Kim D. E., Fernandez J. L., Weissleder R., Breakefield X. O. (2005) Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* **11**: 435-443
- Tauzin S., Chaigne-Delalande B., Selva E., Khadra N., Daburon S., Contin-Bordes C., Blanco P., Le Seyec J., Ducret T., Counillon L., Moreau J. F., Hofman P., Vacher P., Legembre P. (2011) The Naturally Processed CD95L Elicits a c-Yes/Calcium/PI3K-Driven Cell Migration Pathway. *PLoS Biol* **9**: e1001090
- Tauzin S., Debure L., Moreau J. F., Legembre P. (2012) CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell Mol Life Sci* **69**: 1261-1277
- Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinl E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J. L., Schroter M., Scaffidi C., Krammer P. H., Peter M. E., Tschopp J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517-521
- Tschopp J., Irmeler M., Thome M. (1998) Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* **10**: 552-558
- Wajant H. (2006) CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat Res* **130**: 141-165
- Wajant H., Haas E., Schwenzer R., Muhlenbeck F., Kreuz S., Schubert G., Grell M., Smith C., Scheurich P. (2000) Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem* **275**: 24357-24366
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003) Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**: 53-66
- Wang L., Yang J. K., Kabaleeswaran V., Rice A. J., Cruz A. C., Park A. Y., Yin Q., Damko E., Jang S. B., Raunser S., Robinson C. V., Siegel R. M., Walz T., Wu H. (2010) The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1324-1329

Watanabe-Fukunaga R., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Nagata S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**: 314-317

Wyzgol A., Müller N., Fick A., Munkel S., Grigoleit G. U., Pfizenmaier K., Wajant H. (2009) Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *Journal of immunology* **183**: 1851-1861

Youle R. J., Strasser A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 47-59

9 Anhang

9.1 Sequenzen

9.1.1 GpL-Flag-CD95L

GpL: NT 1-555 AS 1-185
Flag: NT 571-594 AS 191-198
CD95L: NT 604-1035 AS 202-345

```

1   atg ggc gtc aaa gtc ctg ttt gcc ctc atc tgt att gct gtc gct gag gct aaa
1   M G V K V L F A L I C I A V A E A K

55  cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct
19  P T E N N E D F N I V A V A S N F A

109 acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg
37  T T D L D A D R G K L P G K K L P L

163 gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga
55  E V L K E M E A N A R K A G C T R G

217 tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc
73  C L I C L S H I K C T P K M K K F I

271 cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc
91  P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I

325 gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct
109 G E A I V D I P E I P G F K D L E P

379 atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc
127 M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C

433 ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc
145 L K G L A N V Q C S D L L K K W L P

487 cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa
163 Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K

541 ggc gct gga gga gac tct gga gct gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa
181 G A G G D S G A G S D Y K D D D D K

595 gaa ttc ccc ccc gaa aaa aag gag ctg agg aaa gtg gcc cat tta aca ggc aag
199 E F P P E K K E L R K V A H L T G K

649 tcc aac tca agg tcc atg cct ctg gaa tgg gaa gac acc tat gga att gtc ctg
217 S N S R S M P L E W E D T Y G I V L

703 ctt tct gga gtg aag tat aag aag ggt ggc ctg gtg atc aat gaa act ggg ctg
235 L S G V K Y K K G G L V I N E T G L

757 tac ttt gta tat tcc aaa gta tac ttc cgg ggt caa tct tgc aac aac ctg ccc
253 Y F V Y S K V Y F R G Q S C N N L P

811 ctg agc cac aag gtc tac atg agg aac tct aag tat ccc cag gat ctg gtg atg
271 L S H K V Y M R N S K Y P Q D L V M

865 atg gag ggg aag atg atg agc tac tgc act act ggg cag atg tgg gcc cgc agc
289 M E G K M M S Y C T T G Q M W A R S

```

919 *agc tac ctg ggg gca gtg ttc aat ctt acc agt gct gat cat tta tat gtc aac*
 307 S Y L G A V F N L T S A D H L Y V N

973 *gta tct gag ctc tct ctg gtc aat ttt gag gaa tct cag acg ttt ttc ggc tta*
 325 V S E L S L V N F E E S Q T F F G L

1027 *tat aag ctc taa*
 343 Y K L -

9.1.2 GpL-Fc-Flag-CD95L

GpL: NT 1-555 AS 1-185
Fc: NT 571-1248 AS 191-416
Flag: NT 1255-1278 AS 419-426
CD95L: NT 1318-1749 AS 440-583

1 *atg ggc gtc aaa gtc ctg ttt gcc ctc atc tgt att gct gtc gct gag gct aaa*
 1 M G V K V L F A L I C I A V A E A K

55 *cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt gct*
 19 P T E N N E D F N I V A V A S N F A

109 *acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg*
 37 T T D L D A D R G K L P G K K L P L

163 *gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga gga*
 55 E V L K E M E A N A R K A G C T R G

217 *tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc atc*
 73 C L I C L S H I K C T P K M K K F I

271 *cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga atc*
 91 P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I

325 *gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag cct*
 109 G E A I V D I P E I P G F K D L E P

379 *atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc tgc*
 127 M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C

433 *ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc*
 145 L K G L A N V Q C S D L L K K W L P

487 *cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc aaa*
 163 Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K

541 *ggc gct gga gga gac tct gga gct gga tcc aaa act cac aca tgc cca ccg tgc*
 181 G A G G D S G A G S K T H T C P P C

595 *cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc*
 199 P A P E L L G G P S V F L F P P K P

649 *aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac*
 217 K D T L M I S R T P E V T C V V V D

703 *gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag*
 235 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E

757 *gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt*
 253 V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R

811 **gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac**
 271 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y

 865 **aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc**
 289 K C K V S N K A L P A P I E K T I S

 919 **aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg**
 307 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R

 973 **gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat**
 325 D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y

 1027 **ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac**
 343 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y

 1081 **aag acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag**
 361 K T T P P V L D S D G S F F L Y S K

 1135 **ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg**
 379 L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V

 1189 **atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg**
 397 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P

 1243 **ggt aaa aga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc ggc cgg ggc gac**
 415 G K R S D Y K D D D D K E F G R G D

 1297 **tca ccc ggc cgg ggc gac tca ccc gaa aaa aag gag ctg agg aaa gtg gcc cat**
 433 S P G R G D S P E K K E L R K V A H

 1351 **tta aca ggc aag tcc aac tca agg tcc atg cct ctg gaa tgg gaa gac acc tat**
 451 L T G K S N S R S M P L E W E D T Y

 1405 **gga att gtc ctg ctt tct gga gtg aag tat aag aag ggt ggc ctg gtg atc aat**
 469 G I V L L S G V K Y K K G G L V I N

 1459 **gaa act ggg ctg tac ttt gta tat tcc aaa gta tac ttc cgg ggt caa tct tgc**
 487 E T G L Y F V Y S K V Y F R G Q S C

 1513 **aac aac ctg ccc ctg agc cac aag gtc tac atg agg aac tct aag tat ccc cag**
 505 N N L P L S H K V Y M R N S K Y P Q

 1567 **gat ctg gtg atg atg gag ggg aag atg atg agc tac tgc act act ggg cag atg**
 523 D L V M M E G K M M S Y C T T G Q M

 1621 **tgg gcc cgc agc agc tac ctg ggg gca gtg ttc aat ctt acc agt gct gat cat**
 541 W A R S S Y L G A V F N L T S A D H

 1675 **tta tat gtc aac gta tct gag ctc tct ctg gtc aat ttt gag gaa tct cag acg**
 559 L Y V N V S E L S L V N F E E S Q T

 1729 **ttt ttc ggc tta tat aag ctc taa**
 577 F F G L Y K L -

9.1.3 CD95-Flag-GpL

Signalpeptid:	NT 1-60	AS 1-20
CD95:	NT 61-537	AS 21-179
Flag:	NT 544-567	AS 182-189
GpL:	NT 595-1098	AS 199-366

1 atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac
 1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H
 55 agc ctc gag gtt gct aga tta tcg tcc aaa agt gtt aat gcc caa gtg act gag
 19 L E V A R L S S K S V N A Q V T D I
 109 aac tcc aag gga ttg gaa ttg agg aag act gtt act aca gtt gag act cag aac
 37 N S K G L E L R K T V T T V E T Q N
 163 ttg gaa ggc ctg cat cat gat ggc caa ttc tgc cat aag ccc tgt cct cca ggt
 55 L E G L H H D G Q F C H K P C P P G
 217 gaa agg aaa gct agg gac tgc aca gtc aat ggg gat gaa cca gac tgc gtg ccc
 73 E R K A R D C T V N G D E P D C V P
 271 tgc caa gaa ggg aag gag tac aca gac aaa gcc cat ttt tct tcc aaa tgc aga
 91 C Q E G K E Y T D K A H F S S K C R
 325 aga tgt aga ttg tgt gat gaa gga cat ggc tta gaa gtg gaa ata aac tgc acc
 109 R C R L C D E G H G L E V E I N C T
 379 cgg acc cag aat acc aag tgc aga tgt aaa cca aac ttt ttt tgt aac tct act
 127 R T Q N T K C R C K P N F F C N S T
 433 gta tgt gaa cac tgt gac cct tgc acc aaa tgt gaa cat gga atc atc aag gaa
 145 V C E H C D P C T K C E H G I I K E
 487 tgc aca ctc acc agc aac acc aag tgc aaa gag gaa ggg tcc aga tcc aac gga
 163 C T L T S N T K C K E E G S R S N G
 541 tcc **gat tac aaa gac gat gac gat aaa** gaa ttc gcc ctt aaa ccg cgg ctc gag
 181 S D Y K D D D D K E F A L K P R L E
 595 aaa cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg gct gtg gca tcc aat ttt
 199 K P T E N N E D F N I V A V A S N F
 649 gct acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg cct ggc aaa aaa ctg ccc
 217 A T T D L D A D R G K L P G K K L P
 703 ctg gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga aaa gct ggc tgt act aga
 235 L E V L K E M E A N A R K A G C T R
 757 gga tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc cca aaa atg aaa aaa ttc
 253 G C L I C L S H I K C T P K M K K F
 811 atc cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag gaa tct gct cag ggc gga
 271 I P G R C H T Y E G D K E S A Q G G
 865 atc gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct gga ttc aag gac ctg gag
 289 I G E A I V D I P E I P G F K D L E
 919 cct atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt gtc gat tgt aca act ggc
 307 P M E Q F I A Q V D L C V D C T T G
 973 tgc ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac ctg ctg aaa aaa tgg ctg
 325 C L K G L A N V Q C S D L L K K W L
 1027 ccc cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag ggc cag gtc gac aaa atc
 343 P Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I
 1081 aaa ggc gct gga gga gac tct aga ggg ccc tat tct ata gtg tca cct aaa tgc
 361 K G A G G D S R G P Y S I V S P K C
 1135 tag
 379 -

9.1.4 CD95-TNC-Flag-GpL

Signalpeptid: NT 1-60 AS 1-20
 CD95: NT 61-537 AS 21-179
 TNC: NT 544-645 AS 182-215
Flag: NT 670-693 AS 224-231
GpL: NT 721-1224 AS 241-408

```

1   atg gac tgg acc tgg cgc gtg ttt tgc ctg ctc gcc gtg gct cct ggg gcc cac
1   M  D  W  T  W  R  V  F  C  L  L  A  V  A  P  G  A  H

55  agc ctc gag gtt gct aga tta tcg tcc aaa agt gtt aat gcc caa gtg act gac
19  L  E  V  A  R  L  S  S  K  S  V  N  A  Q  V  T  D  I

109 aac tcc aag gga ttg gaa ttg agg aag act gtt act aca gtt gag act cag aac
37  N  S  K  G  L  E  L  R  K  T  V  T  T  V  E  T  Q  N

163 ttg gaa ggc ctg cat cat gat ggc caa ttc tgc cat aag ccc tgt cct cca ggt
55  L  E  G  L  H  H  D  G  Q  F  C  H  K  P  C  P  P  G

217 gaa agg aaa gct agg gac tgc aca gtc aat ggg gat gaa cca gac tgc gtg ccc
73  E  R  K  A  R  D  C  T  V  N  G  D  E  P  D  C  V  P

271 tgc caa gaa ggg aag gag tac aca gac aaa gcc cat ttt tct tcc aaa tgc aga
91  C  Q  E  G  K  E  Y  T  D  K  A  H  F  S  S  K  C  R

325 aga tgt aga ttg tgt gat gaa gga cat ggc tta gaa gtg gaa ata aac tgc acc
109 R  C  R  L  C  D  E  G  H  G  L  E  V  E  I  N  C  T

379 cgg acc cag aat acc aag tgc aga tgt aaa cca aac ttt ttt tgt aac tct act
127 R  T  Q  N  T  K  C  R  C  K  P  N  F  F  C  N  S  T

433 gta tgt gaa cac tgt gac cct tgc acc aaa tgt gaa cat gga atc atc aag gaa
145 V  C  E  H  C  D  P  C  T  K  C  E  H  G  I  I  K  E

487 tgc aca ctc acc agc aac acc aag tgc aaa gag gaa ggg tcc aga tcc aac ccg
163 C  T  L  T  S  N  T  K  C  K  E  E  G  S  R  S  N  P

541 cgg gat atc gcc tgt ggc tgt gcg gct gcc cca gac atc aag gac ctg ctg agc
181 R  D  I  A  C  G  C  A  A  A  P  D  I  K  D  L  L  S

595 aga ctg gag gag ctg gag ggg ctg gta tcc tcc ctc cgg gag cag ggt acc gga
199 R  L  E  E  L  E  G  L  V  S  S  L  R  E  Q  G  T  G

649 ggt ggg tct ggc cgg gga tcc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gaa ttc gcc
217 G  G  S  G  R  G  S  D  Y  K  D  D  D  D  K  E  F  A

703 ctt aaa ccg cgg ctc gag aaa cca acc gag aat aat gag gat ttc aac atc gtg
235 L  K  P  R  L  E  K  P  T  E  N  N  E  D  F  N  I  V

757 gct gtg gca tcc aat ttt gct acc acc gac ctc gat gcc gat cgg gga aaa ctg
253 A  V  A  S  N  F  A  T  T  D  L  D  A  D  R  G  K  L

811 cct ggc aaa aaa ctg ccc ctg gaa gtg ctg aaa gag atg gag gcc aac gct aga
271 P  G  K  K  L  P  L  E  V  L  K  E  M  E  A  N  A  R

865 aaa gct ggc tgt act aga gga tgt ctc atc tgc ctg tcc cac atc aag tgt acc
289 K  A  G  C  T  R  G  C  L  I  C  L  S  H  I  K  C  T

919 cca aaa atg aaa aaa ttc atc cct ggc cgg tgt cac aca tac gag ggc gac aag
307 P  K  M  K  K  F  I  P  G  R  C  H  T  Y  E  G  D  K

```

973 gaa tct gct cag ggc gga atc gga gag gct att gtg gat att cct gaa att cct
 325 E S A Q G G I G E A I V D I P E I P

1027 gga ttc aag gac ctg gag cct atg gaa cag ttt atc gcc cag gtg gac ctc tgt
 343 G F K D L E P M E Q F I A Q V D L C

1081 gtc gat tgt aca act ggc tgc ctg aaa ggg ctg gcc aat gtc cag tgt agt gac
 361 V D C T T G C L K G L A N V Q C S D

1135 ctg ctg aaa aaa tgg ctg ccc cag aga tgt gcc act ttc gcc tct aaa att cag
 379 L L K K W L P Q R C A T F A S K I Q

1189 ggc cag gtc gac aaa atc aaa ggc gct gga gga gac tct aga ggg ccc tat tct
 397 G Q V D K I K G A G G D S R G P Y S

1243 ata gtg tca cct aaa tgc tag
 415 I V S P K C -

9.1.5 CD40-CD95

CD40: NT 1-642 AS 1-214
CD95: NT 649-1083 AS 217-361

1 atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc gct gtc
 1 M V R L P L Q C V L W G C L L T A V

55 cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta ata aac agt cag
 19 H P E P P T A C R E K Q Y L I N S Q

109 tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg agt gac tgc aca gag ttc
 37 C C S L C Q P G Q K L V S D C T E F

163 act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa agc gaa ttc cta gac acc tgg aac
 55 T E T E C L P C G E S E F L D T W N

217 aga gag aca cac tgc cac cag cac aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg
 73 R E T H C H Q H K Y C D P N L G L R

271 gtc cag cag aag ggc acc tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc
 91 V Q Q K G T S E T D T I C T C E E G

325 tgg cac tgt acg agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgc
 109 H C T S E A C E S C V L H R S C S P

379 ggc ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag ccc
 127 G F G V K Q I A T G V S D T I C E P

433 tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa tgt cac cct
 145 C P V G F F S N V S S A F E K C H P

487 tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag gca ggc aca aac aag
 163 W T S C E T K D L V V Q Q A G T N K

541 act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg aga gcc ctg gtg gtg atc ccc
 181 T D V V C G P Q D R L R A L V V I P

595 atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc ccg cgg
 199 I I F G I L F A I L L V L V F I P R

649 **aag aga aag gaa gta cag aaa aca tgc aga aag cac aga aag gaa aac caa ggt**
 217 K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G

703 tct cat gaa tct cca acc tta aat cct gaa aca gtg gca ata aat tta tct gat
 235 S H E S P T L N P E T V A I N L S D

757 gtt gac ttg agt aaa tat atc acc act att gct gga gtc atg aca cta agt caa
 253 V D L S K Y I T T I A G V M T L S Q

811 gtt aaa ggc ttt gtt cga aag aat ggt gtc aat gaa gcc aaa ata gat gag atc
 271 V K G F V R K N G V N E A K I D E I

865 aag aat gac aat gtc caa gac aca gca gaa cag aaa gtt caa ctg ctt cgt aat
 289 K N D N V Q D T A E Q K V Q L L R N

919 tgg cat caa ctt cat gga aag aaa gaa gcg tat gac aca ttg att aaa gat ctc
 307 W H Q L H G K K E A Y D T L I K D L

973 aaa aaa gcc aat ctt tgt act ctt gca gag aaa att cag act atc atc ctc aag
 325 K K A N L C T L A E K I Q T I I L K

1027 gac att act agt gac tca gaa aat tca aac ttc aga aat gaa atc caa agc ttg
 343 D I T S D S E N S N F R N E I Q S L

1081 gtc tag
 361 V -

9.1.6 CD40-CD95_(V238N)

CD40: NT 1-642 AS 1-214

CD95: NT 649-1083 AS 217-361

Die Mutation V238N ist **rot** (gtc → aac) gekennzeichnet.

1 atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc gct gtc
 1 M V R L P L Q C V L W G C L L T A V

55 cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta ata aac agt cag
 19 H P E P P T A C R E K Q Y L I N S Q

109 tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg agt gac tgc aca gag ttc
 37 C C S L C Q P G Q K L V S D C T E F

163 act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa agc gaa ttc cta gac acc tgg aac
 55 T E T E C L P C G E S E F L D T W N

217 aga gag aca cac tgc cac cag cac aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg
 73 R E T H C H Q H K Y C D P N L G L R

271 gtc cag cag aag ggc acc tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc
 91 V Q Q K G T S E T D T I C T C E E G

325 tgg cac tgt acg agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg
 109 H C T S E A C E S C V L H R S C S P

379 ggc ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag ccc
 127 G F G V K Q I A T G V S D T I C E P

433 tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa tgt cac cct
 145 C P V G F F S N V S S A F E K C H P

487 tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag gca ggc aca aac aag
 163 W T S C E T K D L V V Q Q A G T N K

541 *act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg aga gcc ctg gtg gtg atc ccc*
181 T D V V C G P Q D R L R A L V V I P

595 *atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc ccg cgg*
199 I I F G I L F A I L L V L V F I P R

649 **aag aga aag gaa gta cag aaa aca tgc aga aag cac aga aag gaa aac caa ggt**
217 K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G

703 **tct cat gaa tct cca acc tta aat cct gaa aca gtg gca ata aat tta tct gat**
235 S H E S P T L N P E T V A I N L S D

757 **gtt gac ttg agt aaa tat atc acc act att gct gga gtc atg aca cta agt caa**
253 V D L S K Y I T T I A G V M T L S Q

811 **gtt aaa ggc ttt gtt cga aag aat ggt aac aat gaa gcc aaa ata gat gag atc**
271 V K G F V R K N G **N** N E A K I D E I

865 **aag aat gac aat gtc caa gac aca gca gaa cag aaa gtt caa ctg ctt cgt aat**
289 K N D N V Q D T A E Q K V Q L L R N

919 **tgg cat caa ctt cat gga aag aaa gaa gcg tat gac aca ttg att aaa gat ctc**
307 W H Q L H G K K E A Y D T L I K D L

973 **aaa aaa gcc aat ctt tgt act ctt gca gag aaa att cag act atc atc ctc aag**
325 K K A N L C T L A E K I Q T I I L K

1027 **gac att act agt gac tca gaa aat tca aac ttc aga aat gaa atc caa agc ttg**
343 D I T S D S E N S N F R N E I Q S L

1081 **gtc tag**
361 V -

9.2 Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bak	Bcl2 agonist/killer
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl-w	Bcl2-like-2
Bcl-X _L	Bcl2-like protein
Bfl-1	Bcl2-regulated protein A1
BH	Bcl2 homology domain
Bid	Bcl2 homology domain 3-interacting domain
BIR	baculovirus IAP repeat
Bok	Bcl2-related ovarian killer
bp	Basenpaare
BRUCE	BIR containing ubiquitin conjugating enzyme
bzw.	beziehungsweise
CARD	caspase-recruitment domain
Caspase	cysteinylyl aspartat specific proteinase
CD40	TNFRSF5
CD40L	CD40 Ligand, CD154
CD95	Fas, TNFRSF6
CD95L	Fas Ligand
cFLIP	cellular FLICE inhibitory protein
CHX	Cycloheximid
clAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
CRD	cysteine-rich domain
d.h.	das heißt
DcR3	decoy receptor 3
DD	death domain, Todesdomäne
DED	death effector domain, Todeseffektordomäne
DISC	death inducing signaling complex

ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain
Fas	FS7-associated surface antigen
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE
Fn14	fibroblast growth factor-inducible 14
GpL	<i>Gaussia princeps</i> luciferase
h	Stunde(n)
HRP	horse radish peroxidase
IL	Interleukin
ILP2	inhibitor of apoptosis like protein 2
I κ B α	inhibitor of NF κ B α
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
m	milli (tausendster Teil; 10 ⁻³)
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukaemia sequence-1
min	Minute(n)
ML-IAP	melanoma inhibitor of apoptosis
MW	molecular weight
n	nano (milliardster Teil, 10 ⁻⁹)
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein
NF κ B	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NGFR	nerve growth factor receptor
NT	Nukleotid
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKG	Phosphoglycerate kinase
PLAD	pre-ligand assembly domain
RANK	receptor activator of NFκB
RING	really interesting new gene
RIP	receptor interacting protein
RLU	relative light unit
rpm	rounds/revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain variable fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEAP	secreted alkaline phosphatase
SMAC/Diablo	second mitochondria-derived activator of apoptosis/ direct IAP binding protein with low pI
SH3	Src homology 3
SPOTS	signaling protein oligomeric transduction structures
tBid	truncated Bid
TBS	Tris buffered Saline
TCR	T-cell receptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THD	TNF homology domain
TNC	Tenascin-C
TNF	Tumornekrosefaktor, TNFSF2
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNFR associated death domain
TRAF	TNFR associated factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
u.a.	unter anderem
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
z.B.	zum Beispiel
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-keton
μ mikro	(millionster Teil, 10 ⁻⁶)

9.3 Publikationen

Fick A., Lang I., Schaefer V., Seher A., Trebing J., Weisenberger D., Wajant H. (2012) Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J Biol Chem* **287**: 484-495

Lang I., Fick A., Schaefer V., Giner T., Siegmund D., Wajant H. (2012) Signaling active CD95 molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts. *J Biol Chem* 2012 May 29. [Epub ahead of print]

9.4 Lebenslauf