

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie,  
Venerologie und Allergologie  
der Universität Würzburg  
Direktorin: Prof. Dr.med. E.-B. Bröcker

# **Die Bedeutung von cFLIPL für die Todesrezeptor- abhängige Regulation der Apoptose in HaCaT- Keratinozyten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Dominikus Hausmann  
aus Eichstätt

Würzburg, August 2012

Referent: Prof. Dr.med. Martin Leverkus  
Leitender Oberarzt  
Leiter der Sektion Molekulare Dermatologie  
Klinik für Dermatologie, Venerologie, und Allergologie  
Universitätsklinikum Mannheim der Universität Heidelberg

Korreferent: Prof. Dr.med. Harald Wajant  
Leiter der Abteilung Molekulare Innere Medizin  
Medizinische Klinik und Poliklinik II  
Universitätsklinikum Würzburg

Dekan: Prof. Dr.med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2013

Der Promovend ist Arzt

Inhalt:

## **I.) EINLEITUNG**

- I.1 Apoptose
  - I.1.1 Regulationswege der Apoptose
  - I.1.2 Einfluss von Zytokinen auf die Apoptose-Empfindlichkeit
  
- I.2. cFLIP<sub>L</sub> in der Regulation TRAIL-vermittelter Apoptose in Keratinozyten
  - I.2.1 Bedeutung von TRAIL in Keratinozyten
  - I.2.2 cFLIP<sub>L</sub>- beeinflusste Apoptose-Signalwege
  - I.2.3 Bedeutung von NFκB für die TRAIL-vermittelte Apoptose
  
- I.3 Zielsetzung dieser Arbeit

## **II.) MATERIAL UND METHODEN**

- II.1 Material
  - II.1.1 Zellen
  - II.1.2 Verbrauchsgegenstände
  - II.1.3 Laborgeräte
  - II.1.4 Allgemeine Reagenzien
  - II.1.5 Spezielle Reagenzien
  
- II.2 Methoden
  - II.2.1 Zellkultur
  - II.2.2 Stimulation der Zellen
    - II.2.2.1 Behandlung mit IFN $\gamma$
    - II.2.2.2 Behandlung mit rekombinantem TNF
    - II.2.2.3 Behandlung mit rekombinantem TRAIL
  - II.2.3 FACS- Zytometrie
    - II.2.3.1 Membranrezeptorfärbung
    - II.2.3.2 Apoptose-Analyse nach Nicoletti

- II.2.4 Kristallviolett-Assay
- II.2.5 Western Blot-Analyse
  - II.2.5.1 Gewinnung von Zell-Lysaten
  - II.2.5.2 Herstellung der Protein-Proben
  - II.2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung und Blotting
  - II.2.5.4 Protein-Darstellung durch Antikörper-Bindung und -Detektion
- II.2.6 DISC-Analyse
- II.2.7 Transfektion und Subklonierung
- II.2.8 Interleukin-8-ELISA

### **III.) ERGEBNISSE**

- III.1. Abhängigkeit der Rezeptorexpression von Zelldichte und Kulturdauer
  
- III.2. Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf Todesrezeptor-Expression und Apoptose-Sensitivität
  - III.2.1 Der Einfluss von TNF
  - III.2.2 Der Einfluss von IFN $\gamma$
  
- III.3. cFLIP<sub>L</sub>- Überexpression schützt vor TRAIL- vermittelter Apoptose in HaCaT- Keratinozyten
  
- III.4. Blockierung der TRAIL-vermittelten NF $\kappa$ B-Aktivierung durch cFLIP<sub>L</sub>
  
- III.5. Blockierung der TRAIL-vermittelten IL-8-Induktion durch cFLIP<sub>L</sub>
  
- III.6. Modulation des TRAIL-DISC durch cFLIP<sub>L</sub>
  - III.6.1 Hemmung der Caspase-8-Prozessierung
  - III.6.2 Modulation des TRAIL-DISC
  - III.6.3 Veränderung der Rekrutierung von RIP zum DISC

**IV.) DISKUSSION**

**V.) LITERATURVERZEICHNIS**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## **I.) EINLEITUNG**

### I.1. Apoptose

Απόπτωση - im Griechischen das Wort für „Niedergang“, „Abwerfen“ und das „Herabfallen der Blätter“ im Herbst - mit diesem beinahe poetischen Ausdruck wird seit etwa 40 Jahren die aktive, programmierte Form des Zelltodes bezeichnet und vom passiven Zelltod, der Nekrose, abgegrenzt. Während die Nekrose einen pathologischen Vorgang nach Zellschädigung darstellt, handelt es sich bei der Apoptose um einen präzise regulierten physiologischen Prozess, der in jeder gesunden Körperzelle programmiert ist (Kerr et al. 1972; Formigli et al. 2004).

Die Apoptose dient der Anpassung des Organismus an sich wandelnde Bedingungen. So ist sie maßgeblich an der Embryonalentwicklung beteiligt, in der neben dem Aufbau auch dem Abbau von Geweben eine wichtige Rolle zukommt (z.B. das Absterben der Zellen der Interdigitalräume an Fingern und Zehen), und auch die Elimination von durch Virusbefall oder Neoplasie veränderten Zellen geschieht mittels Apoptose. Immunkompetente Zellen, ob autoaggressiv oder nach abgeklungener Infektionserkrankung, werden über den Weg der Apoptose aus dem Organismus entfernt (Strasser et al. 2000; Sen 1992).

Fehlregulationen des Apoptosemechanismus können unterschiedliche Krankheitsbilder wie die Entwicklung von Tumoren, autoimmune oder degenerative Erkrankungen verursachen (Siegel et al. 2003; Thompson 1995). Die Zerstörung der T-Helferzellen bei einer HIV-Infektion oder der Untergang der Inselzellen des Pankreas beim Diabetes mellitus Typ I beispielsweise erfolgt apoptotisch (Dockrell 2001; Hayashi et al. 2001), zur toxischen epidermalen Nekrolyse, dem Lyell-Syndrom kommt es durch eine gesteigerte fulminante Apoptose in Keratinozyten (Paquet et al. 2001). Viele neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder amyotrophe Lateralsklerose beruhen auf einer Apoptoseinduktion in spezifischen Neuronen (Offen et al. 2000).

Auch eine ungenügende Aktivierung der Apoptose kann Krankheiten verursachen. So können sich Zellen, die nicht auf Apoptosesignale reagieren, zu Tumoren entwickeln und autoaggressive Immunzellen, die nicht mit Hilfe der Apoptose vernichtet werden, können zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen (Reed 1999; Thompson 1995).

So konnte für die Melanomentstehung ein Defekt des Fas-gesteuerten Zelltodes in p53-mutierten Zellen nachgewiesen werden (Wehrli et al. 2000). Auch bei der Sklerodermie, der Alopezie und der Keloidbildung ist eine fehlregulierte Apoptose in Endothelzellen, Haarfollikelzellen bzw. in Fibroblasten ein pathogenetischer Mechanismus (Cece et al.1996; Appleton et al.1996; Sgonc et al.1996).

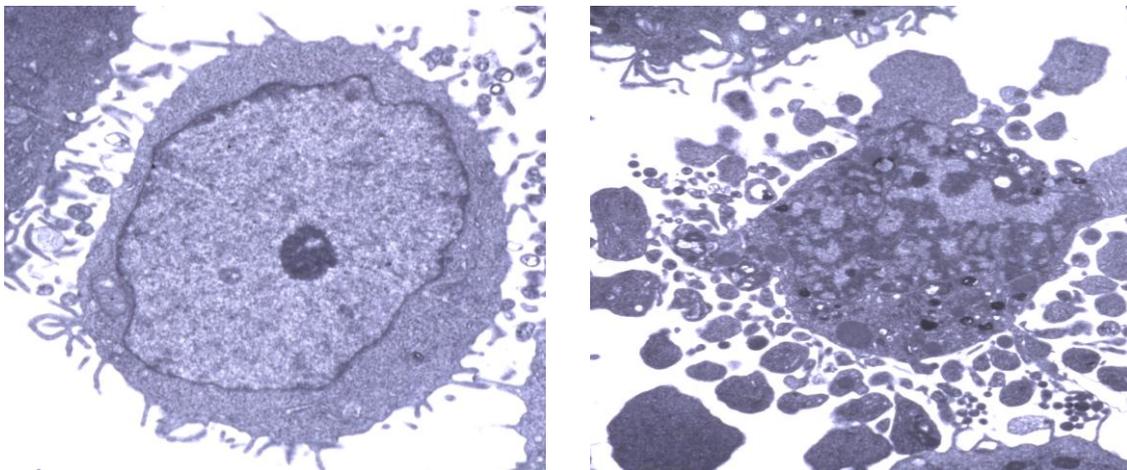


Abb.1: Intakte (links) und apoptotische Zelle (rechts) im Vergleich. (Quelle: Prof. M. Leverkus)

Der Vorgang der Apoptose dauert in verschiedenen Geweben unterschiedlich lange, in Lymphozyten z.B. nur ein bis drei Stunden, in Keratinozyten 48 bis zu 72 Stunden (Haake et al. 1993). Während nekrotische Zellen einerseits morphologisch ein Anschwellen der Organellen, Vakuolisierung und Lyse zeigen, kommt es durch Apoptose auf der anderen Seite zum Schrumpfen und Zerfall der betroffenen Zelle. Das Chromatin verdichtet sich und fragmentiert, der Zellkern löst sich auf (Karyorrhexis), durch Spaltung von zellulären Strukturproteinen kommt es zur Kondensation der Zelle und Veränderungen in der Zellmembranarchitektur. Die Plasmamembran entwickelt blasige Ausstülpungen (blebbing) und die Zelle löst sich in kompakte, membranumschlossene Fragmente, so genannte „apoptotic bodies“ auf, die

durch phagozytische Zellen eliminiert werden. Im Gegensatz zur Nekrose findet man bei der Apoptose daher keine oder nur minimale inflammatorische Reaktionen des umgebenden Gewebes (Gonzalez et al. 2002; Chan et al. 2001; Nicholson 1999; Sen 1992).

### I.1.1 Regulationswege der Apoptose

Die Apoptoseinduktion kann auf Mitochondrien-abhängigen (intrinsischen) und -unabhängigen (extrinsischen) Wegen erfolgen. Aktivierung membrangebundener Todesrezeptoren durch die jeweiligen Proteine der TNF-Familie führt zur Mitochondrien-unabhängigen Aktivierung von Caspasen, einer Enzymkaskade, die für den erfolgreichen Ablauf der Apoptose eine entscheidende Rolle spielt. Unabhängig von der Rezeptor-vermittelten Induktion können Strahlung, Ischämie oder Mangel an Wachstumsfaktoren über die mitochondriale Freisetzung von proapoptischen Mediatoren ebenfalls die Caspase-Kaskade aktivieren.

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren kann den Apoptosesignalweg in der Zelle auslösen. Zu diesen Todesrezeptoren gehören der CD95-Rezeptor (= Fas-R/APO1-R), der TNF-Rezeptor 1, TRAIL-Rezeptor 1 und 2 und der p75-NGF-Rezeptor. Sie zählen zur Familie der TNF-Rezeptoren und sind durch eine intrazelluläre Todesdomäne, FADD (**F**as **a**ssociated **d**eath **d**omain) gekennzeichnet. Die einzelnen Todesrezeptoren erfüllen auch nicht-apoptische Funktionen und sind gewebespezifisch differenziert exprimiert. So spielt der TRAIL-R1 etwa die Hauptrolle bei der Caspasen-Aktivierung in HaCaT-Zellen und vermittelt auch proinflammatorische Reaktionen durch vermehrte IL-8-Expression (Leverkus et al. 2003; Wajant 2003; Rossi et al. 2003; Schultz et al. 2003; Sartorius et al. 2001). CD95 (Fas) findet man auf den Zellen der meisten Gewebe, während die Expression des dazugehörigen Liganden CD95L weitgehend auf lymphatische Zellen, vornehmlich T-Lymphozyten beschränkt ist. In den Keratinozyten der Haut liegt CD95L intrazellulär vor (Viard-Leveugle et al. 2003). Zytotoxische T-Zellen nutzen CD95L unter anderem zur Elimination ihrer Zielzellen und gelegentlich wehren auch bestimmte Tumorzellen mit Hilfe einer CD95L-

Expression tumorspezifische T-Zellen ab (Siegel et al. 2003; Griffith et al. 1995). Zu den Liganden verschiedener Apoptoserezeptoren zählen neben dem CD95L auch TNF, Lymphotoxin und TRAIL (Rossi et al. 2003). Diese Liganden führen über eine Trimerisierung ihrer entsprechenden Rezeptoren zur Aktivierung der Caspase-Kaskade. Die intrazellulären Todesdomänen (FADD) rekrutieren Initiator-Procaspasen und bilden dadurch einen proapoptotischen Komplex, DISC (**d**eath **i**nducing **s**ignalling **c**omplex). Eine besondere Bedeutung hat hierbei die Caspase-8 (FLICE). Die Initiator-Procaspasen werden durch die Assoziation im DISC aktiviert und vermitteln nachfolgend die Spaltung der zytosolischen Procaspasen zu aktiven Effektor-Caspasen. (Schultz et al. 2003; Rossi et al. 2003; Kischkel et al. 2000; Medema et al. 1997).

Caspasen (**C**ysteiny**A**sparat-spezifische **P**rotein**A**sen) sind hoch spezialisierte proteolytische Enzyme und bewirken die Degradation von zellulären Strukturproteinen, Signalproteinen und DNA-Reparatur-Enzymen sowie die Fragmentierung der DNA zu Bruchstücken mit einer Größe von etwa 180 Basenpaaren. Dies geschieht durch Aktivierung der Caspase-aktivierten DNase (CAD). Vierzehn verschiedene Caspasen sind bislang bekannt. Während die Initiator-Caspasen (Caspase-1, -2, -8, -9, -10) das extrinsische Signal durch Aktivierung der Effektor-Caspasen intrazellulär weitervermitteln, bewirken die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) ihrerseits die Spaltung der diversen Zellproteine und des Chromatins (Nicholson et al. 1997; Schultz et al. 2003; Riedel et al. 2003; Crompton 2000).

Neben diesem Rezeptor-vermittelten Signalweg haben auch die Mitochondrien einen wichtigen Anteil an der Auslösung der Apoptose. Die äussere Mitochondrienmembran bildet eine Diffusionsbarriere für eine Vielzahl von Molekülen. Durch Protonenverschiebung in der Atmungskette entsteht ein Transmembranpotenzial an der Mitochondrienmembran. Wenn dieser transmembranöse Konzentrationsgradient unter dem Einfluss von proapoptotischen Proteinen, Strahlung oder dem Fehlen von Wachstumsfaktoren zusammenbricht, werden aus dem intermembranösen Raum Stoffe ins Zytosol freigesetzt, die die Apoptose der Zelle auslösen

können (Schultz et al. 2003; Gellerich et al. 2000; Zamzami et al. 1995). Zu den Apoptose-auslösenden Molekülen aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien zählen Cytochrom c, AIF (**A**poptosis **I**nducing **F**actor), Smac/ DIABLO (**S**econd **m**itochondria-derived **a**ctivator of **c**aspases bzw. **D**irect **I**AP **B**inding protein with **L**ow **p**I) Endonuclease G, HtrA2 und diverse Procaspasen (van Loo et al. 2002).

Das ins Plasma freigesetzte Cytochrom c bindet an das zytosolische Adaptorprotein Apaf-1 (**a**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor), das dann in der Lage ist, Procaspase-9 zu rekrutieren. Den so gebildeten Komplex bezeichnet man als Apoptosom. Die Procaspase-9 wird dort durch Spaltung in ihre aktivierte Form gebracht und initiiert ihrerseits die Aktivierung der Effektor-Caspasen (Rossi et al. 2003; Schultz et al. 2003; Zou et al. 1997). Für Zellen des malignen Melanoms konnte gezeigt werden, dass in ihnen das Apaf-1-Protein durch Methylierung des Gens herunter reguliert wird und sich die Melanomzellen auf diese Weise gegen die Mitochondrien-abhängige Apoptose schützen (Soengas et al. 2001).

Der AIF ist ein Flavoprotein, dessen Vorkommen im Normalfall auf die Mitochondrien beschränkt ist. Ins Zytosol freigesetzt, bewirkt es im Zellkern eine Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung der DNA in große, etwa 50 kbp lange Moleküle, den Zusammenbruch des Potenzials der äußeren Mitochondrienmembran und damit die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c und Procaspase-9. Außerdem induziert AIF den Einbau von Phosphatidylserin in die Zellmembran. Phosphatidylserin in der extrazellulären Seite der Plasmamembran wirkt als Phagozytoserezeptor für dendritische Zellen. Diese Effekte von AIF scheinen Caspasen-unabhängig abzulaufen, da sie im Versuch durch den Caspase-Inhibitor zVAD nicht blockiert werden können (Susin et al. 1999; Schultz et al. 2003; Ravagnan et al. 2002). Smac/ DIABLO und HtrA2 sind Proteine, die die IAP-vermittelte Blockierung der Caspasen aufheben, indem sie durch Bindung an IAP-Proteine deren Wirkung inhibieren. Im Unterschied zu Smac/ DIABLO kann eine Überexpression von HtrA2 auch Caspasen-unabhängig aufgrund seiner Serinprotease-Aktivität zum Zelltod führen, jedoch ohne die für die Apoptose typische Zeichen wie

Membran-blebbing und die Entstehung von Apoptotic bodies (Verhagen et al. 2000, 2001; Suzuki et al. 2001; Hedge et al. 2001). Die Endonuclease G ist ein mitochondriales Enzym, das nach seiner Freisetzung in den Zellkern transloziert und ähnlich der CAD die Fragmentation der DNA hervorruft. Es hat sich gezeigt, dass die Endonuclease G selbst unter dem Einfluss von Caspase-Inhibitoren uneingeschränkt arbeitet und somit völlig unabhängig vom extrinsischen Signalweg wirksam ist (Li et al. 2001).

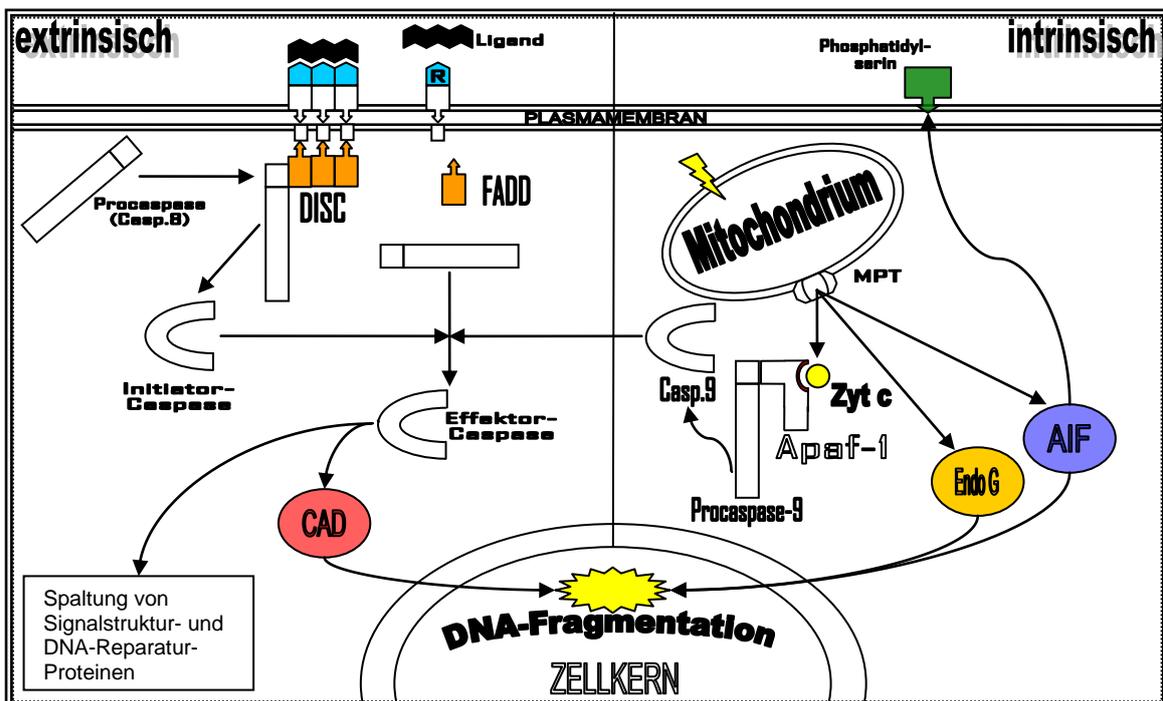


Abb.2: Schema des extrinsischen und intrinsischen Signalweges der Apoptose.

Sowohl der Rezeptor-vermittelte als auch der mitochondriale Signalweg der Apoptose unterliegen den aktivierenden und inhibierenden Einflüssen unterschiedlicher Regulatorproteine.

In der Zwischenzeit ist eine große Zahl solcher Proteine identifiziert worden. Man unterscheidet zwei große Gruppen von Apoptose-Modulatoren: zum einen die Mitglieder der Bcl-2-Familie, welche die Mitochondrienfunktion sowohl pro- als auch anti-apoptotisch modulieren können und zum anderen die Regulatorproteine der Caspasenaktivierung, zu denen IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) und c-FLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein) gezählt werden (Silke et al. 2005; Kataoka 2005; Chao et al. 1998). Die IAP-Proteine

sind spezifische Inhibitoren bzw. Regulatoren der Downstream-/ Effektor-Caspasen, sie sind aber nicht in der Lage, Initiator-Caspasen wie etwa die Caspase-8 zu blockieren (Suzuki et al. 2001). Während cIAP-1 und -2 die proteolytische Prozessierung der Caspase-3 und -7 hemmen, kann XIAP zusätzlich dazu auch die Caspase-9 sowohl in aktiver Form als auch als Procaspase durch Interaktion mit seiner BIR-3-Domäne inhibieren. Es konnte überdies gezeigt werden, dass unter XIAP-Einfluss die fehlende Aktivierung der Caspase-3 zu einer Herabregulierung von aktivem Bid und damit zu einer verminderten Zytochrom c-Freisetzung am Mitochondrium führt (Geserick et al. 2009; Shiozaki et al. 2003; Deveraux et al. 1998).

Auch das IAP Survivin blockiert spezifisch die Effektor-Procaspasen-3 und -7. Im Unterschied zu den anderen IAPs enthält Survivin nur eine einzelne BIR-Domäne und ist in den meisten gesunden Geweben nicht nachweisbar. Allerdings scheint Survivin in allen neoplastisch veränderten Zellen überexprimiert zu werden. Das legt den Schluss nahe, dass Survivin einen entscheidenden Anteil an der Entwicklung und Progression von Tumorgewebe hat. Besonders in Lymphomen, Karzinomen von Lunge, Colon, Pankreas, Prostata und Brustdrüse sowie in Melanomen konnten hohe Survivin-Spiegel gefunden werden (Ambrosini et al. 1997; Altieri 2003; Tamm et al. 1998). Die Korrelation zwischen dem Survivin-Gehalt der Tumorzellen und der Fünf-Jahres-Überlebensrate ist für das kolorektale Karzinom bewiesen (LaCasse et al. 1998).

Besonders interessant ist hierbei, dass Survivin in vivo einen IAP-IAP-Komplex mit XIAP bilden kann. Dadurch wird XIAP gegen Degradation und Inhibition durch Smac oder HtrA2 stabilisiert. Inwieweit diese Interaktion für die Entstehung von Tumoren von Bedeutung ist, muss allerdings noch geklärt werden (Dohi et al. 2004).

Aufgrund der onkologischen Bedeutung der IAPs werden die Möglichkeiten ihrer pharmakologischen Blockierung und ihre Eignung als diagnostische bzw. prognostische Marker für verschiedene Tumorarten derzeit intensiv erforscht (Vogler et al. 2008; Schimmer 2004; Altieri 2003).

Die quantitative Zusammensetzung der Regulatorproteine variiert innerhalb der unterschiedlichen Zellarten. So exprimieren etwa HaCaT-Zellen im Gegensatz zu anderen Zellen wenig Bcl-2 und weisen kein XIAP und nur wenig c-FLIP auf (Leverkus et al. 2003; Leverkus et al. 2000). Dagegen findet man in primären Keratinozyten aber einen hohen Gehalt an c-FLIP und XIAP (Diessenbacher et al. 2008; Bowen et al. 2003).

FLIP wirkt als Inhibitor der Initiator-Caspase-8 und ist in seiner Proteinstruktur in großen Abschnitten analog der Procaspase-8 aufgebaut. Wie diese besteht sein N-terminales Ende aus zwei DED-Domänen (**D**eath **E**ffector **D**omain), DED1 und DED2. Man unterscheidet zwei FLIP-Formen, c-FLIP<sub>L</sub> (long) und c-FLIP<sub>S</sub> (short). Während c-FLIP<sub>S</sub> nur einen ziemlich kurzen C-terminalen Anteil besitzt, ist die C-terminale Domäne von c-FLIP<sub>L</sub> der der Caspase-8 sehr ähnlich. Allerdings ist im Bereich des aktiven Zentrums der Caspase-8 im entsprechenden c-FLIP-Abschnitt ein Cysteinrest durch Tyrosin ausgetauscht, so dass hier keine katalytische Aktivität mehr besteht (Irmeler et al. 1997; Kischkel et al. 1995).

Das legt den Schluss nahe, dass FLIP als kompetitiver Inhibitor der Caspase-8 am DISC wirkt, der genaue Mechanismus der Blockade der Caspase-8-Aktivierung ist allerdings noch nicht vollständig ergründet (Rasper et al. 1998). Im Gegensatz zu c-FLIP<sub>S</sub>, welches die Proteolyse der Procaspase-8 am DISC verhindert, ist der c-FLIP<sub>L</sub>-Effekt dosisabhängig. Während bei geringer c-FLIP<sub>L</sub>-Expression die DISC-Aktivität verstärkt ist, blockiert eine mittlere bis hohe c-FLIP<sub>L</sub>-Expression die Caspase-8-Aktivierung am DISC (Chang et al. 2002). Es wird davon ausgegangen, dass die FLIP-Modulation im Immunsystem für die Lymphozyten-Prozessierung und eine erfolgreiche Freund-Feind-Diskriminierung notwendig ist (van Parijs et al. 1999; Thome et al. 2001). Neoplastisch veränderte Zellen mit hoher c-FLIP-Expression zeigen eine schnellere Progression als solche mit niedrigen Spiegeln, auch reagieren sie weniger sensibel auf T-Zell-vermittelte Apoptosereize. Insbesondere in Zellen des malignen Melanoms hat man eine starke Expression von c-FLIP feststellen können (Medema et al. 1999; Djerbi et al. 1999; Irmeler et al. 1997).

### I.1.2 Einfluss von Zytokinen auf die Apoptose-Empfindlichkeit

Zytokine sind lokal wirksame, niedrig molekulare Proteine und Glykoproteine mit einem Gewicht von weniger als 30 kDa, die von Leukozyten und auch anderen Körperzellen gebildet werden. Sie steuern die Intensität und Dauer von Immunreaktionen und haben biologische Effekte auf zelluläre Vorgänge wie die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung unterschiedlichster Zellen. Zu der großen Zahl der bislang beschriebenen Zytokine gehören Interleukin-1 bis -18, Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ , TGF- $\beta$  sowie TNF und Lymphotoxin. Sie bilden ein komplexes Netzwerk aus aktivierenden und inhibierenden Faktoren und haben immunmodulatorische, proinflammatorische, antivirale, pro- und antiproliferative sowie zytotoxische Eigenschaften. Ihre Wirkung vermitteln Zytokine über spezifische Rezeptoren, an die sie mit sehr hoher Affinität binden. Entsprechend ihrer Struktur und Liganden werden fünf Rezeptorklassen unterschieden, die Immunglobulin-Rezeptor-Superfamilie, die Chemokin-, TNF-, Klasse I (Hämatopoietin)- und Klasse II (Interferon)-Zytokin-Rezeptor-Familie. Die Über- oder Unterexpression von Zytokinen ist eine wichtige Einflussgröße bei diversen Krankheiten wie z.B. beim toxischen Schock, bei bestimmten Karzinomen wie Myelomen und Lymphomen und bei der Chagas-Krankheit. In zunehmendem Maße macht man sich heute die Wirkung von Zytokinen auch therapeutisch, besonders bei der Behandlung von Tumorerkrankungen zunutze (KUBY Immunology, Aufl.2000).

Für den Ablauf und die Induktion von Apoptose sind Zytokine eine wichtige Einflussgröße. So führt TNF durch Bindung an den TNF-R1 und -R2 zur intrazellulären Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B (Baud et al. 2001). In Keratinozyten bewirkt eine solitäre TNF-Stimulation jedoch keine Apoptose-Induktion, während IFN $\gamma$  allein - abhängig von der Dosierung und Zeitdauer der Behandlung - in Epithelien eine Störung der Barrierefunktion durch Dysregulation von parazellulären Transportwegen hervorruft (Bruewer et al. 2003) und auch die Apoptose einleiten kann. Diese IFN $\gamma$ -Wirkung wird jedoch durch parallele Einwirkung von TNF in synergistischer Weise verstärkt (Konur et al. 2004).

Außerdem sensitiviert niedrig dosiertes IFN $\gamma$  auch für die proapoptotische Wirkung von CD95L verstärkend. In Hepatozyten konnte nachgewiesen werden, dass IFN $\gamma$  einen Zellzyklus-Arrest hervorruft und proapoptotisch wirkt, indem es die intrazelluläre Ausschüttung von Stressproteinen aus dem endoplasmatischen Retikulum verursacht (Watanabe et al. 2003).

## I.2. cFLIP<sub>L</sub> in der Regulation TRAIL-vermittelter Apoptose in Keratinozyten

### I.2.1 Bedeutung von TRAIL in Keratinozyten

Der TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ist wie TNF oder CD95L Teil der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie.

TRAIL kann an vier verschiedenen membrangebundenen Rezeptoren binden, TR-1 bis TR-4. Durch Bindung von TRAIL an die Rezeptoren TR-1 und TR-2 kommt es zur intrazellulären Rekrutierung verschiedener Proteine am DISC, wie etwa den Initiator-Caspasen-8 und -10. Dies führt im Weiteren zur Aktivierung der Caspasenkaskade und damit zum Untergang der betroffenen Zelle (Sprick et al. 2004).

Die Rezeptoren TR-3 und TR-4 vermitteln keine Aktivierung der Caspasenkaskade. Während TR-3 über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) an die Zelloberfläche gebunden ist und über keine intrazelluläre Domäne verfügt, enthält TR-4 eine unvollständige Todesdomäne und kann somit ebenfalls kein Apoptosesignal generieren.

Die Bedeutung dieser beiden Rezeptoren für den Ablauf der TRAIL-vermittelten Apoptose ist noch nicht vollends geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass über TR-4 - wie das auch bei TR-1 und TR-2 der Fall ist - eine Aktivierung des zellulären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B erfolgt (MacFarlane 2003; Wajant 2004). Interessanterweise können zelluläre Stress-Signale in primären Endothelzellen den TR-4 stark induzieren (Schmidt et al. 2009).

### I.2.2 cFLIP<sub>L</sub>-beeinflusste Apoptose-Signalwege

cFLIP (cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (FLICE) Inhibitory Protein) ist von ähnlichem molekularem Aufbau wie die Initiator-Caspase-8, besitzt jedoch keine enzymatische Aktivität. Die lange

Form cFLIP<sub>L</sub> wird zum CD95 und TRAIL-DISC rekrutiert und verhindert dort die Spaltung und Freisetzung der aktiven Caspasen-8 und -10 (Thome et al. 2001; Krueger et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von cFLIP<sub>L</sub> Signalmoleküle wie RIP, RAF-1, TRAF-1 und TRAF-2 an den DISC rekrutiert werden, was erklären könnte, wie cFLIP<sub>L</sub> die MAPK (**Mitogen Activated Protein Kinase**)- und NF-κB-Signalwege aktiviert und so nicht nur einen Beitrag zur Apoptoseregulation leistet, sondern auch andere zelluläre Funktionen wie Inflammation und Proliferation beeinflusst (Kataoka et al. 2000).

### I.2.3 Bedeutung von NF-κB für die TRAIL-vermittelte Apoptose

Durch Aktivierung von NF-κB in der Zelle wird einerseits die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 reguliert, andererseits konnte die Steuerung von antiapoptotischen Zielgenen durch diesen Transkriptionsfaktor gezeigt werden. Durch Blockierung von NFκB kommt es zu einer gesteigerten Sensibilisierung der Zelle gegen proapoptotische Mediatoren, insbesondere TNF (Wajant 2004; Karin et al. 2002).

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass unter dem simultanen Einfluss von TRAIL und Caspase-Inhibitoren zwar die Apoptose in Keratinozyten komplett blockiert werden konnte, jedoch gleichzeitig eine erhöhte Aktivität von NF-κB sowie dem NF-κB-Zielgen IL-8 festzustellen war. Somit liegt der Schluss nahe, dass es sich hierbei um von der Apoptose unabhängige Transkriptionsinduktion über TRAIL-Rezeptoren auf Keratinozyten handelt (Leverkus et al. 2003).

### I.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Art der Expression von Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche wird über bislang unbekannte Mechanismen Zelltyp-spezifisch geregelt (Zhang et al. 2000).

Da die Initiierung und der Ablauf der Apoptose von der Expressionsdichte und Verteilung der verschiedenen membranständigen Rezeptoren abhängig ist, war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, Aufschlüsse darüber zu erlangen, inwieweit

die Wirkung von IFN $\gamma$  und TNF die Expression der Todesrezeptoren auf Keratinozyten und deren nachgeschaltete Caspase-Aktivierungswege beeinflusst und auf welche Weise sich die Sensitivität von Keratinozyten gegenüber TRAIL unter der Wirkung dieser beiden Zytokine verändert. In bestimmten Tumorstadien kann die erhöhte Apoptosesensitivität von Keratinozyten durch parakrine proinflammatorische Signale - beispielsweise Interferone - einen protektiven Effekt haben und eine weitere Tumorprogression verhindern (Leverkus et al. 2008).

Tumorprogression kann durch Aufregulation antiapoptotischer Faktoren oder durch Verlust oder Blockierung proapoptotischer Moleküle erfolgen. Eine Verschiebung der Balance zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Mediatoren in der Zelle kann die Progression von Tumorzellen fördern oder verhindern (Mueller et al. 2002). Es ist gezeigt worden, dass Tumorzellen mit einem erhöhten Anteil von cFLIP<sub>L</sub> aggressiver wachsen (Medema et al. 1999). Der cFLIP<sub>L</sub>-Spiegel in Melanomzellen ist höher als in gesunden Melanozyten und die Hemmung von cFLIP<sub>L</sub> in Melanomzellen sensibilisiert diese für die TRAIL-vermittelte Apoptose (Geserick et al. 2007). In Keratinozyten ist dies noch nicht untersucht worden.

Die Bedeutung von cFLIP<sub>L</sub> für den Ablauf der TRAIL-assoziierten Apoptose in Keratinozyten und die Interaktionen von cFLIP<sub>L</sub> in diesem Wege sollten daher insbesondere im Hinblick auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die Prozessierung der Caspase-8 im Zentrum unserer Arbeit hier stehen.

## II.) MATERIAL UND METHODEN

### II.1. Material

#### II.1.1 Zellen

Für die Versuche wurden HaCaT-Zelllinien verwendet, spontan immortalisierte humane Keratinozyten (Boukamp et al. 1988).

#### II.1.2 Verbrauchsgegenstände

Becton Dickinson:	
Falcon 3001	Gewebekulturschale 35x10 mm
Falcon 3003	Gewebekulturschale 100x20 mm
Falcon 3004	Gewebekulturschale 60x10 mm
Falcon 3014	Zellkulturflasche 25cm <sup>2</sup> / 50ml
Falcon 3024	Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup> / 250ml
Falcon 3047	Gewebekulturplatte 24 well
Falcon 3072	Gewebekulturplatte 96well
Falcon 2070	PP-Reagenzröhrchen 50ml
Falcon 2095	PS-Reagenzglas 15ml
Falcon 2096	PP-Reagenzglas 15ml
Fa. Hartenstein, Würzburg:	
RK1M	Reaktionsgefäß 1,5ml
RK07	Reaktionsgefäß 0,7ml
MT96	Mikrotiter- Röhrchen Pipettenspitzen
Amersham:	
RPN68D	Hybond ECL Nitrocellulose Membran
RPN3103K	Hyperfilm ECL

BioRad:	
1651779	GelAir Cellophane Support

### II.1.3 Laborgeräte

Sterile Werkbank	UniFlow UVUB 2200, BioFlow, Meckenheim
Zentrifuge	Megafuge 1,0 R Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL Typ 1002, Burgwedel
Inkubator	CO <sub>2</sub> - Auto- Zero Heraeus, Hanau
Thermostat	Test Tube Thermostat TCR 100, Roth
Mikroskop	Labovert Leitz, Bensheim
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Heiland, Hamburg
Pipett- Boy	Falcon Express Becton Dickinson
Waage	Scout SCA 210, Florham Park N.J.
FACScan-Gerät	Becton Dickinson, Hannover
Western-Blot-Elektrophorese- Kammern und Zubehör	BioRad, CA 94547 USA
Hypercassette	Amersham Buckinghamshire U.K.
Pipetten	Eppendorf 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl

#### II.1.4 Allgemeine Reagenzien

PAN Biotech GmbH, Aidenbach	
DMEM (4,5g/l Glucose, L-Glutamin, 3,7g/l NaHCO <sub>3</sub> , Pyruvat), Penicillin/ Streptomycin (10.000 U Pen/ 10mg Strep)	P04-03550 P06-07100
Amphotericin B 250µg/ml	P06-01050
Trypsin/ EDTA 10x (0,5/ 0,2%)	P10-024100
Gibco BRL, Paisley U.K.	
PBS Dulbecco's	14190-094
PAA Labs GmbH, Linz	
FCS (Inaktivierung bei 30min 56°C)	A15-043
ICN Biochemicals Inc., Aurora USA	
Geneticin G418 (1g/ 20ml H <sub>2</sub> O, Konzentration im Medium 400µg/ml)	158782
Hepes Buffer	1688449
Sigma, St.Louis USA	
Ponceau S Concentrate	P-7767
2-Mercapto-Ethanol	M-7522
Lauryl Sulfate (10% Lösung in H <sub>2</sub> O)	L-4509
Sodium Citrate	S-4641
APS (Ammonium Persulfate)	A-9164
0,1g/ ml H <sub>2</sub> O	
Sucrose	S-7903
Triton X-100	T-9284

Serva, Heidelberg	
EDTA (Ethylendiamine tetraacetic acid Na <sub>2</sub> -Salt) Konzentration 2mM in PBS	11280
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	
Essigsäure Rotipuran 100%	3738.1
TRIS Puffer	4855.2
Merck, Darmstadt	
Kristallviolett (0,5% in 20% Methanol)	1408
Phosphorsäure H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100573
Glycin p.a.	1.04201.1000
TWEEN 20	8.22184.0500
BioRad, Hercules USA	
30% Acrylamide/ Bis Solution 29:1	161-0156
Coomassie Brilliant Blue R-250	161-0400
Coomassie Brilliant Blue G-250	161-0406
TEMED (Tetra-Methyl-Ethylendiamine)	161-0800
Amersham Biotech, Buckinghamshire U.K.	
Rainbow Marker	RPN 755
ECL Western Blotting Detection Reagent	RPN 2106
Sigma-Aldrich, Dorset U.K.	
Glycerol A.C.S. Reagent	32.000-5

Pierce Biotechnology, Rockford USA	
Restore Western Blot Stripping Buffer	21059
Boehringer, Mannheim	
Complete Protease Inhibitor 20 Tbl. (1 Tbl./ 10ml H <sub>2</sub> O)	1 697 498
J.T. Baker, Deventer NL	
Methanol	8045
Saliter, Obergünzburg	
Magermilchpulver	

### II.1.5 Spezielle Reagenzien

HaCaT-Kulturmedium	500ml DMEM + 10% FCS (50ml) + 1% Pen/Strep (5ml) + 1% NaPyruvat (5ml)
HaCaT-Gefriermedium	60% FCS 30% DMEM 10% DMSO
Succrose/ Trypsin	0,1g Succrose 0,25g Trypsin 2ml EDTA (50mM) ad 100ml PBS
RIPA-Lyse-Puffer (10ml)	5ml NaCl (1,5M) 2,5ml TrisHCl pH 7,5 (1M) 2,5ml NaDOC (10% in H <sub>2</sub> O) 100µl Triton X-100 250µl MgCl <sub>2</sub> 400µl Complete Protease Inhibitor

20x Natrium/ Triton-Stammlösung	2g Natrium Citrate 2ml Triton X-100 98ml H <sub>2</sub> O
Nicoletti-Färbelösung	45ml H <sub>2</sub> O 2,5ml 20x Natrium/ Triton-Stammlösung 2,5ml 20x Propidiumjodid-Stammlösung (1mg/ml)
Kristallviolett-Lösung	0,5% Kristallviolett in 20% Methanol
Propidiumjodid (PI)	Sigma P-4170
Bradford-Lösung (2x)	50mg Coomassie Brilliant Blue G-250 25ml Ethanol (95%) 50ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 375ml H <sub>2</sub> O
4x Gelpuffer	16,95g Tris 90ml H <sub>2</sub> O 4ml Natrium dodecyl sulfate 10% pH auf 8,8 anpassen, auf 100ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
5x Gelpuffer	25ml 1M TrisHCl pH 6,8 13ml H <sub>2</sub> O 2ml Natrium dodecyl sulfate 10%
2x Ladepuffer	50 mM Tris/ HCl pH 6,8 12% Glycerin 4% SDS 2% β-Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau
Western Blot-Sammelgel	0,665ml 30% Acrylamid 1ml 4x Tris/ SDS-Puffer 3,3ml H <sub>2</sub> O 25µl 10% APS 5µl TEMED

Western Blot-Trenngel	4ml 30% Acrylamid 2,5ml 4x Tris/ SDS-Puffer 3,44ml H <sub>2</sub> O 75µl 10% APS 15µl TEMED
10x Laufpuffer	250 mM Tris/ HCl pH 8,3 1% SDS 1,87 M Glycerin
Transferpuffer	20 mM Tris/ HCl 0,05% SDS 150 mM Glycerin 20% Methanol
Coomassie-Blau	0,5g Coomassie Brilliant Blue R-250 200ml Methanol 50ml Essigsäure 250ml H <sub>2</sub> O
Gelwaschlösung	200ml Methanol 50ml Essigsäure 250ml H <sub>2</sub> O 4ml Glycerol
ELISA-Kit	R&D Biosystems, Minneapolis USA
LZ-TRAIL	(Walczak 1997) EMBO
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg
Interferon-γ	Pharmingen, Hamburg
TNF	Strathmann Biotech, Hannover
TRAIL-R1 IgG2a-Antikörper	Clone M271 Immunex Corp., Seattle USA
TRAIL-R2 IgG1-Antikörper	Clone M413 Immunex Corp., Seattle USA
TRAIL-R3 IgG1-Antikörper	Clone M430 Immunex Corp., Seattle USA

TRAIL-R4 IgG2a-Antikörper	Clone M444 Immunex Corp., Seattle USA
CD95 IgG3κ-Antikörper	(Trauth 1989)
Anti-Caspase2-MaH-Antikörper	Transduction laboratories Becton Dickinson175620
Anti-Caspase3/ CPP32-RaH-Antikörper	Nicholson, Merck Frosst Corp., Quebec CAN
Anti-Caspase8-MaH-Antikörper	(Medema 1997)
Anti-Caspase10-MaH-Antikörper	MBL M059-3, Nagoya JAP
Anti-BID-RaH-Antikörper	(Luo, Wang 1998)
Anti-βTubulin-Antikörper	Sigma T4026
Anti-cFLIP-Antikörper	Klon NF-16, Alexis, Grünberg
Anti-FADD-Antikörper	Transduction Laboratories San Diego USA
HRP-GaM-IgG1-Antikörper	Southern Biotechnology Ass. 1070-05 Birmingham U.K.
HRP-GaM-IgG2b-Antikörper	Southern Biotechnology Ass. 1090-05 Birmingham U.K.
HRP-DaR-Antikörper	Pharmingen, Hamburg 554020
ICAM-1 (CD54)-Antikörper	Pharmingen, Hamburg 550302

## II.2. Methoden

### II.2.1 Zellkultur

Für die Versuche zu dieser Arbeit verwendeten wir HaCaT-Zelllinien, dabei handelt es sich um spontan immortalisierte humane Keratinozyten. Die Abkürzung HaCaT bedeutet **H**uman **a**dult **k**eratinocytes, **Ca**<sup>2+</sup> (0,2mM), **T**emperature 38,5°C (Boukamp et al. 1988).

HaCaT-Zellen werden in einem Kulturmedium aus DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin (Pen/ Strep) und 1% Natrium-Pyruvat bei 37°C gehalten. Die tiefgefrorenen HaCaT-Zellen werden durch Auf- und Abpipettieren von 37°C warmem Kulturmedium im Kryoröhrchen zügig aufgetaut und für fünf Minuten bei 1300 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird daraufhin gründlich abgesaugt und verworfen. Anschließend werden die Zellen mit warmem Medium gewaschen und nochmals abzentrifugiert, um die Reste des für die Zellen toxischen Gefriermediums möglichst vollständig zu entfernen. Die HaCaT-Zellen werden dann relativ dicht in eine T75-Kulturflasche eingesetzt, das Medium wird nach 24 Stunden gewechselt. Nach fünf bis sieben Tagen sind die Zellen zu 100% konfluent. Zu diesem Zeitpunkt sollten sie passagiert werden.

Zur Passage der Zellen benötigt man PBS, EDTA 2mM, Trypsin/ EDTA und DMEM, alles auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Bei Zellkulturen in T75-Flaschen werden die Zellen zuerst zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen, anschließend werden sie nach Zugabe von 7 ml EDTA für zehn Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wird das EDTA abgesaugt und die Kulturen werden für weitere fünf Minuten unter 10 ml Trypsin/ EDTA inkubiert. Da das Trypsin die Zellen ansonsten schädigen würde, versucht man, die Inkubationszeit möglichst kurz zu halten, indem man zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden einige Male kräftig gegen diesen klopft und durch Auf- und Abpipettieren die Auflösung der Zellverbände beschleunigt. Die Zellsuspension gibt man im Anschluss in 10 ml DMEM und zentrifugiert sie für fünf Minuten bei 1000 rpm ab. Im Weiteren werden die Zellen, im Verhältnis 1:10 bis 1:100 verdünnt, in neue Kulturflaschen eingesetzt bzw. für Versuche mit vergleichbaren Zellzahlen zunächst in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Hierzu werden 40 µl Zellsuspension unter Zugabe von 10 µl Trypanblau in die Zählkammer gegeben. Die avitalen Zellen färben sich mit Trypanblau an, so dass nur die lebenden Zellen gezählt werden können. Es werden alle vier Quadranten der Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt, durch vier geteilt und mit dem Faktor 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro ml Suspension zu erhalten.

Sollen HaCaT-Zellen zur späteren Verwendung eingefroren werden, werden die mit 10 ml Trypsin/ EDTA abgelösten Zellen zuerst mit 4 ml FCS versetzt und fünf Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert.

Das Gefriermedium wird aus 60% FCS, 30% DMEM und 10% DMSO hergestellt und auf Eis kaltgestellt. Um eine ausreichende Zellzahl pro Kryoröhrchen zu erreichen, werden die abzentrifugierten Zellen einer 100% konfluenten T75-Flasche nach Verwerfen des Überstandes in etwa 10 ml Gefriermedium resuspendiert und zu jeweils 1,8 ml in die Kryoröhrchen aliquotiert. Im Anschluss daran müssen die Röhrchen so rasch als möglich bei minus 80°C eingefroren werden, bevor sie nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff gelagert werden können.

### II.2.2 Stimulation der Zellen

Für die nachfolgend erläuterten Versuche wurden die HaCaT-Zellen mit verschiedenen Dosen IFN $\gamma$ , TNF und rekombinantem TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) behandelt.

#### II.2.2.1 Behandlung mit IFN $\gamma$

In einer Verdünnungsreihe werden die entsprechend benötigten Mengen Zellkulturmedium mit IFN $\gamma$  in Konzentrationen von 0.025, 0.25, 2.5, 25, 250 und 1000 U/ml hergestellt. Die subkonfluent bewachsenen Zellkulturschalen werden mit erwärmtem PBS gespült, im Anschluss werden die Zellen mit dem IFN $\gamma$ -versetzten Medium zum einen und mit unbehandeltem Medium andererseits (als Kontrollpopulation) für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C belassen, bevor sie für die weiteren Untersuchungen aufbereitet werden können.

#### II.2.2.2 Behandlung mit rekombinatem TNF

Wie bei der Stimulation mit IFN $\gamma$  wird TNF in Kulturmedium zu Konzentrationen von 0.01, 0.1, 1.0, 10 und 100 ng/ml verdünnt. Die weitere Inkubation geschieht entsprechend der Behandlung mit IFN $\gamma$ .

#### II.2.2.3 Behandlung mit rekombinatem TRAIL

Da zur Induktion der Apoptose in HaCaT-Zellen niedrigere Konzentrationen an TRAIL benötigt werden als in primären Keratinozyten (Leverkus et al. 2000), werden Verdünnungen von TRAIL in Kulturmedium von 15, 31, 62, 125 und maximal 250 ng/ml verwendet. Die Zellen werden vor den jeweiligen Analysen für 24 Stunden bei 37°C mit diesen TRAIL-Konzentrationen behandelt.

#### II.2.3 FACS-Zytometrie

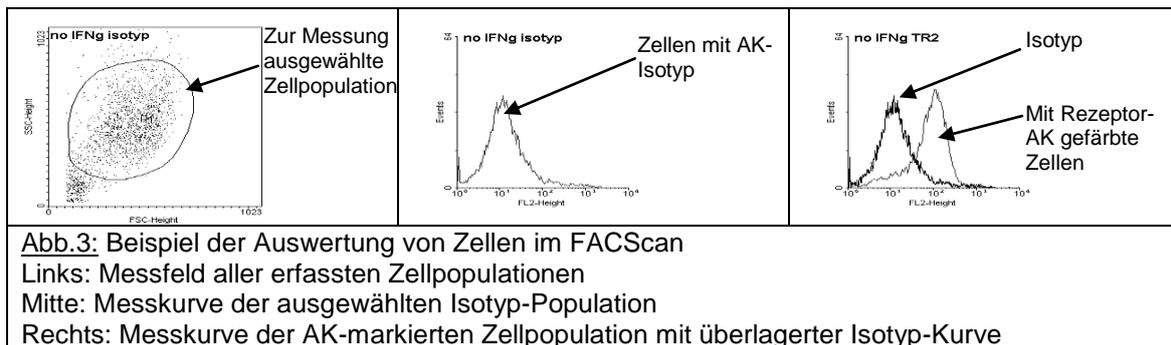
Der **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orter (FACS) dient der qualitativen und quantitativen Untersuchung bestimmter Zellmerkmale innerhalb einer Zellpopulation. Mittels eines Argon-Lasers von 488 nm Wellenlänge und eines nachgeschalteten optischen Systems kann das Gerät die untersuchten Zellen nach Zellgröße (FSC), Granularität (SSC) und Fluoreszenz in verschiedenen Spektren (FL1-3) differenzieren. Dabei entspricht der Kanal FL1 einer Wellenlänge von 530 nm (grün), FL2 585 nm (orange) und FL3 >650 nm (rot). Zur Färbung unserer Zellen benutzen wir hier Propidiumjodid und Streptavidin PE (Phytoerythrocin).

##### II.2.3.1 Membranrezeptorfärbung

Zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Verteilung der membranständigen Todesrezeptoren auf den behandelten Zellen wurden diese mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und im FACScan ausgewertet (Leverkus et al. 2000).

Dazu werden entsprechend dem Vorgehen in der Zellkultur die Zellen zunächst aus ihren Kulturschalen gelöst, ausgezählt und in eisgekühltem PBS mit 1% BSA resuspendiert. Jeweils 100.000 Zellen werden in Mikrotiterröhrchen überführt und mit je 5  $\mu$ g/ml monoklonalem Primärantikörper (Anti-TRAIL R1-

R4 bzw. Anti-CD95) für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit 2 ml PBS pro Röhrcchen und 5 Minuten Zentrifugieren. Der Überstand wird sorgfältig abpipettiert, danach werden die Zellen mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper wiederum für 30 Minuten im Kühlschrank gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Inkubation der Zellen mit Streptavidin-PE vorgenommen. Nachdem die Zellen dann abzentrifugiert sind, werden sie in je 200 µl PBS mit 5% PI resuspendiert und im FACScan im Kanal FL2 gemessen (Abb.3).



### II.2.3.2 Apoptose-Analyse nach Nicoletti

Mit der Methode nach Nicoletti (Nicoletti et al. 1991) können apoptotische Zellen durch Anfärben des Chromatins und den Nachweis hypodiploider DNA bestimmt werden. Zum Anfärben werden die Zellen zunächst mit EDTA und Trypsin aus der Kulturschale gelöst, dabei muss darauf geachtet werden, dass möglichst alle Zellverbände abgelöst werden. Daher werden alle Schalen mit PBS nachgespült. Die so gewonnene Suspension wird abzentrifugiert, mit PBS gewaschen (um den Indikatorfarbstoff des DMEM zu eliminieren) und nochmals zentrifugiert. Die Nicoletti-Färbelösung wird frisch auf Eis und unter Lichtschutz angesetzt. Für die Kontrollzellen wird eine gleich große Menge der Lösung ohne Zugabe von Propidiumjodid (PI) hergestellt.

Die in verschiedene Reagenzröhrcchen verteilten Zellen werden nun vorsichtig mit jeweils 1,5 ml Färbelösung bzw. Kontrolllösung resuspendiert und bei 4°C für 20 Stunden im Dunkeln aufbewahrt. In dieser Zeit werden die Zellen durch die Sodium/ Tri-Lösung lysiert und die Zellkerne werden durch das PI angefärbt. Von jeder Probe werden 200 µl in ein Mikrotiter-Röhrcchen auf Eis überführt und im FACS im Kanal FL3 analysiert. Vitale Zellen zeigen in der Auswertung

jeweils einen Signal-Gipfel für Zellkerne mit diploider DNA und einen Gipfel für Kerne mit tetraploider DNA (vierfacher Chromosomensatz bei Zellen kurz vor der Teilung).

Die bei der Apoptose typischerweise entstehenden DNA-Fragmente können durch die Kernporen ausgeschwemmt werden. Daher enthalten Zellkerne apoptotischer Zellen hypodiploide DNA. In der FACS-Analyse zeigen sie sich als Gipfel unterhalb der di- und tetraploiden Zellen (Abb.4).

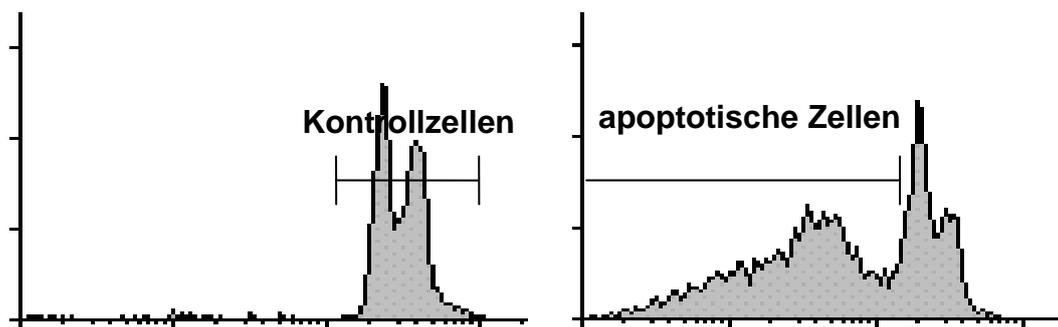


Abb.4: Nicoletti-Färbemuster bei intakten und apoptotischen Zellen

#### II.2.4 Kristallviolett-Assay

Parallel zu den FACS-Untersuchungen wurden zur Analyse mittels Kristallviolett-Assay Zellen in 96-Well-Platten eingesetzt und entsprechend behandelt. Bei dieser Methode werden alle Zellen, die in den Kulturschalen adhären sind, gefärbt, während die abgestorbenen Zellen sich aus dem Zellverband lösen und entfernt werden, so dass ausschließlich vitale Zellen angefärbt werden.

Es muss darauf geachtet werden, dass möglichst exakt die gleiche Zellzahl in jedes Well gegeben wird, in ein Well werden für den Leerwert keine Zellen eingesetzt, in anderen werden die Zellen für den 100%-Wert unbehandelt belassen. Sind die Platten gleichmäßig subkonfluent bis konfluent bewachsen, werden die Zellen nach jeweiliger Inkubation mit TRAIL stimuliert. Nach 24 Stunden werden die Platten gründlich mit PBS gespült, um alle abgestorbenen Zellen zu entfernen. Im Anschluss wird in alle Schälchen die gleiche Menge Kristallviolett-Lösung eingebracht, im Falle der 96-Well-Platten 50 µl pro Well. Nach 20 Minuten werden die Platten dreimal gründlich mit H<sub>2</sub>O ausgespült und

an der Luft getrocknet. Beim Spülen der Platten muss stets darauf geachtet werden, dass der PBS- oder H<sub>2</sub>O-Strahl nicht direkt auf den Grund der einzelnen Wells, sondern gegen deren Seitenwand gerichtet wird.

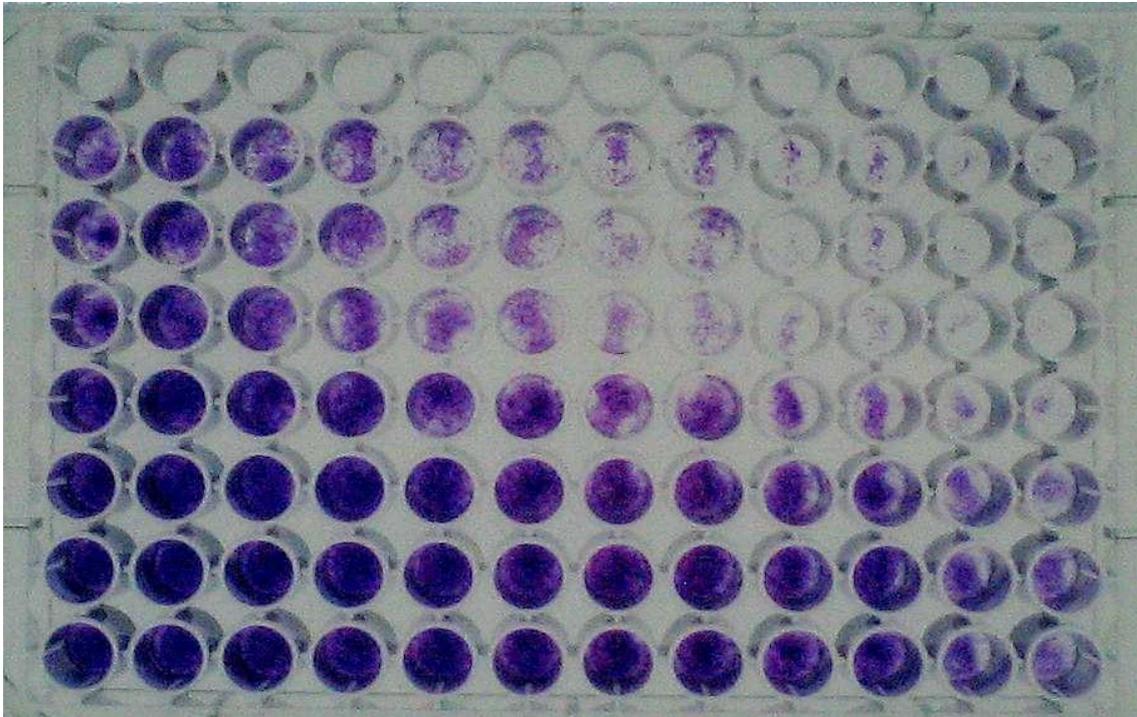


Abb.5: Kristallviolett-Assay nach Anfärben der adhärenenten Zellen und vor dem Auswaschen. In diesem Fall wurden die Zellen von links nach rechts mit steigenden Konzentrationen TRAIL, von unten nach oben mit steigenden Konzentrationen IFN $\gamma$  behandelt. In die oberste Reihe Wells wurden zur Bestimmung des Nullwertes keine Zellen (nur Kulturmedium) eingebracht.

Zur Quantifizierung des Ergebnisses kann der Farbstoff aus den Platten mit reinem Methanol ausgewaschen werden und die Extinktion im Photometer bei 570 nm bestimmt werden. Der Leerwert dient dabei zur Bestimmung des 0%-Wertes der Vitalität (keine überlebenden Zellen), die unbehandelten Wells zur 100%-Wert-Festlegung (keine abgestorbenen Zellen).

#### II.2.5 Western-Blot-Analyse

Mit der Western-Blot-Technik lassen sich Proteingemische entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch auftrennen und im Anschluss auf eine proteinbindende Nitrocellulose-Membran übertragen. Die so aufgetrennten und gebundenen Proteine können dann mittels spezifischer Antikörper-gestützter Nachweismethoden qualitativ und quantitativ dargestellt werden.

#### II.2.5.1 Gewinnung von Zell-Lysaten

Der RIPA-Lysepuffer wird immer frisch und auf Eis angesetzt. Für eine p60-Kulturschale werden jeweils 300 µl Puffer benötigt. Von den Schalen wird der Überstand abgenommen und zentrifugiert. Die Schalen werden zweimalig vorsichtig mit PBS gespült und auf Eis gestellt. Für den Fall, dass die apoptotischen Zellen mit untersucht werden sollen, werden diese in RIPA-Lysepuffer resuspendiert und mit diesem auf die zugehörigen Kulturschalen gegeben. Falls nur adhärenente Zellen in den Versuch gelangen sollen, wird der Puffer pur auf die Schalen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten werden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber sorgfältig vom Schalenboden abgestreift, mehrmals auf- und abpipettiert und in einem Eppendorf-Röhrchen auf Eis gestellt. Die festen Zellbestandteile müssen nun für 30 Minuten bei 20.000 rpm in der gekühlten Zentrifuge von der flüssigen Protein-Fraktion abgetrennt werden. Daraufhin werden die Überstände abgenommen und auf Eis gestellt, die Pellets werden verworfen. Die Lysate können jetzt bei -80°C eingefroren werden oder gleich verwendet werden.

#### II.2.5.2 Herstellung der Protein-Proben

Um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen, müssen die untersuchten Proben möglichst exakt die gleiche Proteinmenge, in unserem Fall je 50 µg, enthalten. Mit der Analyse nach Bradford kann der Proteingehalt photometrisch bestimmt werden. Dabei kommt es zu einer Farbänderung der Bradford-Lösung, wenn das darin enthaltene Coomassie Blue an Peptide bindet. Zunächst wird die 2fach Bradford-Lösung in einem lichtdichten Gefäß auf Eis im Verhältnis 1:1 mit H<sub>2</sub>O gemischt. Als Vergleichslösung wird eine BSA-Verdünnungsreihe hergestellt, indem 0,0, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 15 und 25 µl BSA mit H<sub>2</sub>O auf jeweils 100 µl Volumen gebracht werden. Zu diesen Referenzlösungen werden je 900 µl Bradford-Lösung in Küvetten gegeben und die Exstinktion im Photometer bei 595 nm gemessen. Die so erstellte Eichkurve dient zur Bestimmung der Proteinkonzentration der vorher gewonnenen Proteinextrakte. Von diesen gibt man je 1 µl Protein mit 99 µl H<sub>2</sub>O (bei sehr niedrigen

Proteinkonzentrationen 2 µl zu 98 µl oder 10 µl zu 90 µl) und 900 µl Bradford-Lösung in Photometrie-Küvetten und misst die Extinktion bei 595 nm wie gehabt. Als Nullwert dient eine Küvette mit 100 µl H<sub>2</sub>O und 900 µl Bradford-Lösung. Durch rechnerischen Abgleich mit der Eichkurve kann jetzt für jedes Lysat die Proteinkonzentration berechnet werden, entsprechend der dann für die Analyse das Volumen für 50 µl Protein je Probe bestimmt wird. Nach dieser Konzentrationsbestimmung werden die Proteinproben mit Ladepuffer + β-Mercaptoethanol (90% 5x Ladepuffer + 10% β-Mercaptoethanol) im Verhältnis 4:1 gemischt.

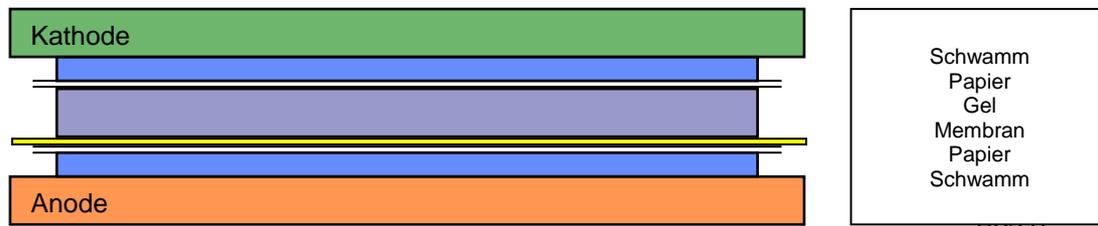
#### II.2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung und Blotting

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. SDS denaturiert Proteine, indem es an die kationischen Proteinreste bindet und den einzelnen Proteinen eine starke Negativladung proportional der jeweiligen Proteinelänge verleiht. Überdies werden die Aminosäureketten so in eine lineare Formation gezwungen, die eine gleichmässige Auftrennung der einzelnen Proteine des Gemisches im Gel entlang eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode unabhängig von der jeweiligen Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur möglich macht.

Zuerst wird das Trenngel in die Western-Blot-Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine möglichst glatte obere Abschlussfläche zu erhalten. Das obere Drittel der Kammer bleibt dabei für das nachfolgende Sammelgel frei. Nach der Polymerisation des Trenngeles, die etwa 30 Minuten in Anspruch nimmt, wird das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel kann in das freie Volumen der Gelkammer gegeben werden. In das Sammelgel wird ein Kamm eingesetzt, der die einzelnen Taschen für das Einbringen der Proben bildet. Bei allen Arbeitsschritten ist darauf zu achten, dass Lufteinschlüsse vermieden werden. Nach der Polymerisation des Sammelgeles wird die Gelkammer in den mit Laufpuffer gefüllten Blotting-Tank eingespannt, der Kamm kann nun entfernt werden.

Die Proben werden bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht und im Anschluss sofort auf Eis gegeben und in die Taschen des Sammelgeles eingebracht.

Mindestens eine Tasche des Geles wird mit Rainbow-Größenmarker befüllt. Als Elektrophorese-Laufspannung wählten wir 60V. Sobald das  $\beta$ -Mercaptoethanol vollständig aus dem Trenngel geflossen ist, kann man die elektrophoretische Auftrennung stoppen und den Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran vornehmen. Das Trenngel wird vorsichtig vom Sammelgel getrennt und auf dem Kunststoffeinsatz der Blottingkammer in das „Blotting-Sandwich“ eingebaut. Dieses ist folgendermaßen aufgebaut: (Kathode) – Schwamm – Whatmanpapier – Trenngel – Nitrozellulosemembran – Whatmanpapier – Schwamm – (Anode).



Blotting-Sandwich

Lufteinschlüsse zwischen Gel und Membran müssen hierbei vermieden werden. Im eisgekühlten Transferpuffer erfolgt nun der Proteintransfer auf die Membran bei 100V für 90 Minuten in der Blottingkammer. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Nitrozellulose werden die Proteine an die Membran gebunden. Zum Testen des erfolgreichen Transfers färbt man die Membran mit Ponceaurot, das im Anschluss mit 0,1% TWEEN 20-PBS ausgespült wird.

#### II.2.5.4 Protein-Darstellung mittels Antikörper-Bindung und -Detektion

Nachdem die Proteine auf die Nitrozellulose übertragen worden sind, müssen zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich die Antikörper sonst auch unspezifisch an diese binden würden. Dazu wird die Membran über Nacht mit einer Lösung aus 5% Milch und 3% BSA in 0,05% TWEEN 20-PBS inkubiert.

Danach wird die Membran dreimal für zehn Minuten in 0,1% TPBS gewaschen und mit dem jeweiligen Primärantikörper in dem für den Antikörper optimalen Zeitraum in der Kühlkammer inkubiert. Darauf folgt ein erneuter dreimaliger

Waschgang mit 0,1% TPBS für zehn Minuten und ein 60-minütiger Inkubationsschritt mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Membran wird erneut nach folgendem Schema gewaschen:

10 min. mit 0,3% TPBS, 10 min. mit 0,1% TPBS und 1 h mit 0,05% TPBS. Zum Abschluss wird 1 ml der ECL- Lösung 1 mit 1 ml ECL- Lösung 2 gemischt und danach auf die Membran gegeben. In der Dunkelkammer können nun Filme auf die Membran aufgelegt und je nach Antikörper und Proteinmenge für 1 sec bis 1 h belichtet und entwickelt werden.

Falls die gleiche Membran mit weiteren Antikörpern inkubiert werden soll, müssen die gebundenen Antikörper zunächst entfernt werden. Dazu wird die Membran mit Pierce Stripping Solution für 25 Minuten und für eine Stunde mit 0,1% TPBS gewaschen. Die anschließende Inkubation erfolgt wieder wie oben beschrieben.

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Ladung des Geles verwendeten wir  $\beta$ -Tubulin-Antikörper (1:4000 in 0,05% TPBS). Tubulin ist ein Zytoskelett-Protein und in allen Zellen in etwa gleicher Menge vorhanden, daher sollte es bei gleichmäßiger Ladung auch in allen Proteinproben in gleicher Konzentration vorhanden sein.

Die Elektrophoresegele werden nach dem Transfer in der Blottingkammer für eine Stunde in Coomassie Blue-Lösung eingefärbt und über Nacht mit der Gel-Waschlösung gewaschen. Die so eingefärbten Gele können zwischen Zellophan-Folien getrocknet werden und dienen ebenfalls zur Dokumentation der gleichmäßigen Proteinladung.

#### II.2.6 DISC-Analyse

Die TRAIL-DISC-Präzipitation wurde von MTA Frau Evi Horn durchgeführt. Hierfür benutzten wir  $5 \times 10^6$  HaCaT-Keratinocyten je Ansatz, die nach dem Abwaschen mit 37°C-RPMI-Medium für 15 Minuten mit 1  $\mu\text{g/ml}$  FLAG-TRAIL im Komplex mit 2  $\mu\text{g/ml}$  anti-FLAG-M2-Antikörpern inkubiert wurden. Für die nicht stimulierten Kontrollzellen wurde derselbe Ansatz ohne FLAG-TRAIL benutzt. Durch zweimaliges Waschen der Zellen mit egekühltem Phosphatpuffer wurde

die DISC-Formation gestoppt. Anschliessend wurden die Zellen auf Eis mit je 1ml Lysepuffer lysiert und nach 15 Minuten Lysezeit zentrifugiert. Die DISC-Präzipitation der Lysate erfolgte durch Zugabe von je 20µl Protein-G-Beads für je 12 Stunden bei 4°C. Zur Präzipitation nicht-stimulierter Rezeptoren wurden den Lysaten der nicht-stimulierten Zellen 200ng FLAG-TRAIL mit 400ng anti-FLAG-M2 zugegeben.

Bevor die Proteinkomplexe aus den Beads mit je 15µl 2x-Reduktionspuffer gelöst werden konnten, mussten die Präzipitate fünfmal mit Lysepuffer gespült werden. Die anschliessende Protein-Auftrennung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf 8-16% Tris-HCL-Gradientengel. Die so aufgetrennten DISC-Komponenten wurden dann der Western-Blot-Analyse zugeführt.

#### II.2.7 Transfektion und Subklonierung

Zur Herstellung cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierender HaCaT-Zellklone verwendeten wir einen retroviralen PINCO-Vektor (Grignani et al. 1998), in den die cFLIP<sub>L</sub>-cDNA einkloniert wurde (Stassi et al. 2000).

Dieser Vektor enthält neben der cDNA für cFLIP<sub>L</sub> auch GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein) sowie die Resistenz gegen Puromycin. Die Transfektion der Producer-Zelllinie φNX erfolgte mit je 10 µg des retroviralen Vektors. Im Anschluss an diesen Schritt erfolgte die Selektionierung der Producerzellen, indem deren Kulturmedium mit Puromycin in einer Konzentration von 2,5 µg/ml für 14 Tage versetzt wurde. Damit erhielten wir >95% GFP-positiv selektionierte Zellen. Die Producer-Zellen wurden nun mit HaCaT-Medium über Nacht im Inkubator gehalten und dann abfiltriert. Das so gewonnene Medium mit den darin enthaltenen Viruspartikeln wurde auf HaCaT-Zellkulturen gegeben, welche zuvor 24h lang in 6-Well-Platten mit 1 µg/ml Polybrene gewachsen waren. Die HaCaT wurden dann über drei Stunden bei 21°C zentrifugiert, das Medium im Folgenden durch frisches DMEM mit 10% FCS ersetzt. Nachdem sich die Zellen über 10-12 Tage ohne weitere Behandlung in der Zellkultur erholen konnten, wurden sie aus den Platten gelöst und subkloniert, indem sie einzeln in 96-well-Platten eingesetzt wurden. Unter Zuhilfenahme eines inversen

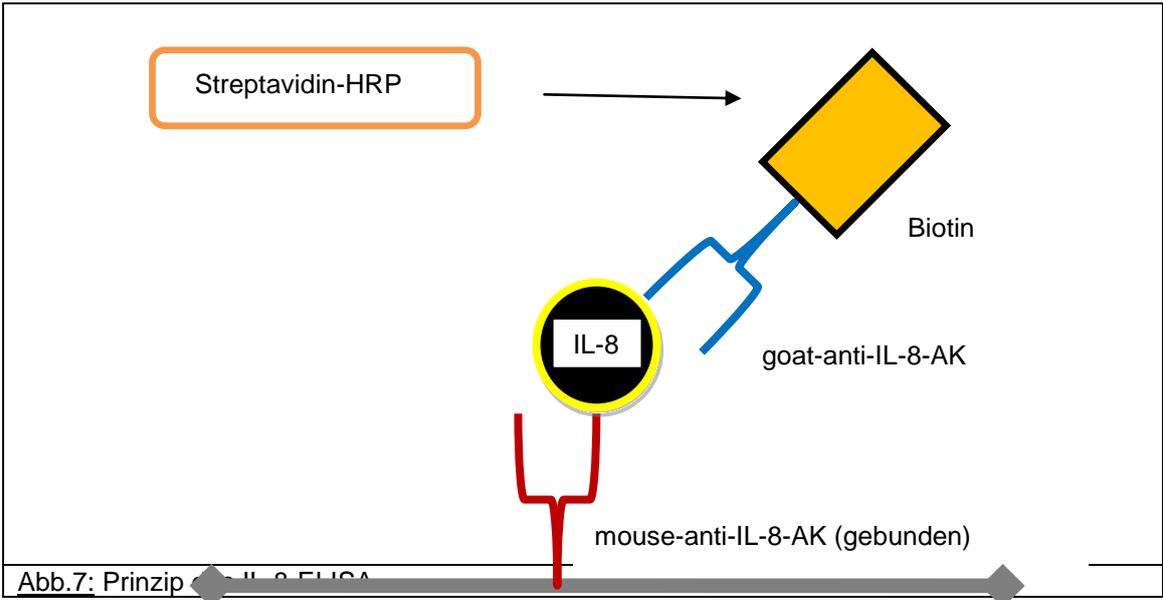
Fluoreszenzmikroskopes konnten GFP-exprimierende Zellen detektiert werden. Da unterschiedlich stark cFLIP<sub>L</sub>-exprimierende monoklonale Zelllinien herangezogen werden sollten, wurden die 96-Well-Platten nach GFP-positiven Einzelzellen durchsucht, die im Anschluss in der Zellkultur weiter expandiert wurden. Die cFLIP<sub>L</sub>-Expression der einzelnen Klone wurde dann später im Western-Blot, wie zuvor von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, untersucht (Leverkus et al. 2003).

#### II.2.8 Interleukin-8 (IL-8)-ELISA

Da die zelluläre IL-8-Produktion NF-κB-abhängig gesteuert wird, kann man die Analyse der IL-8-Sekretion als Parameter zur Beurteilung der NF-κB-Aktivierung nutzen. Mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wurde das von den verschiedenen Zellklonen gebildete IL-8 quantifiziert. Wir verwendeten einen ELISA-Kit der Firma R&D Biosystems (Minneapolis, USA). Dieser Assay bietet eine hohe Sensitivität zur quantitativen Proteinanalyse aus Zellkultur-Überstand.

Das Interleukin-8 geht eine Antigen-Antikörper-Komplexbildung mit mouse-anti-IL-8-Antikörper (4 µg/ml in PBS) ein, der sich stationär über hydrophobe Wechselwirkungen auf der Oberfläche einer 96-well-Mikrotiterplatte als feste Phase bindet.

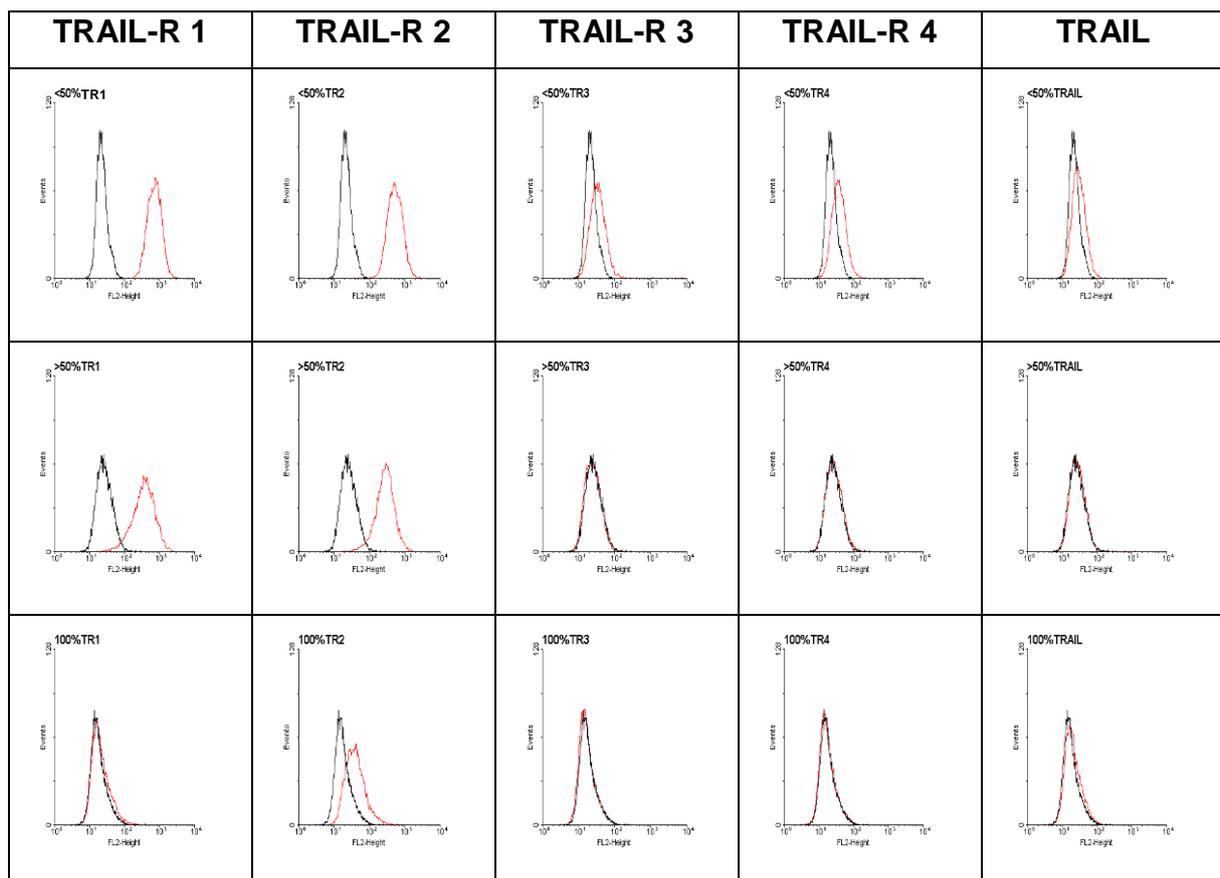
Ungebundenes freies Antigen wird mit 0,05%-TWEEN 20-PBS abgewaschen, unspezifische freie Proteinbindungsstellen werden mit einer Lösung aus 1% BSA, 5% Succrose und 0,05% NaN<sub>3</sub> in PBS blockiert, um eine nicht spezifische Adsorption von Sekundär-Antikörpern zu vermeiden. Bei den verwendeten Sekundär-Antikörpern zur Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes handelt es sich um goat-anti-IL-8-Biotin-Antikörper (175 ng/ml in PBS mit 1% BSA). Das zugegebene Streptavidin-HRP (Horse reddish Peroxidase) bindet hochaffin an Biotin, nach Zusatz der entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ TMB-Substratlösung (Reagenz A und B im Verhältnis 1:1) wird die Intensität der Farbreaktion im ELISA-Reader bestimmt. Sie ist direkt proportional der Menge an IL-8 im Zellkultur-Medium (Leverkus et al. 2003).



### III.) ERGEBNISSE

#### III.1. Abhängigkeit der Rezeptorexpression von Zelldichte und Kulturdauer

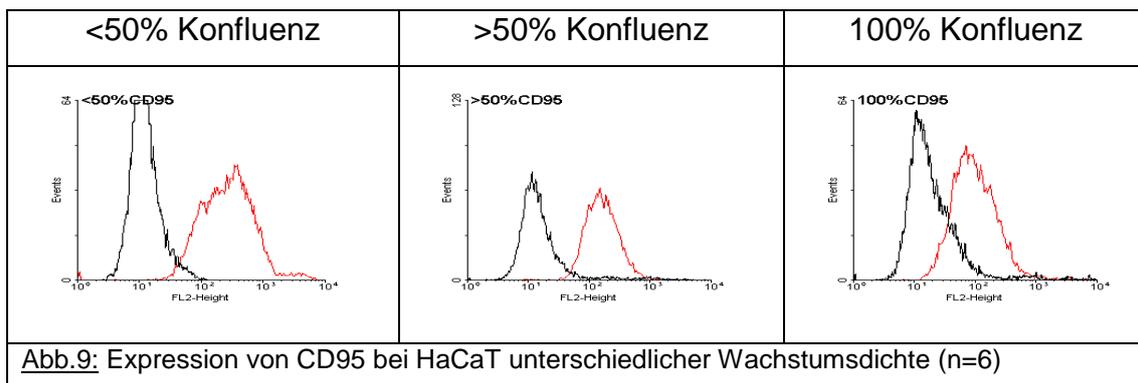
Im Vorfeld der Versuchsreihen mit IFN $\gamma$  und TNF sollte bestimmt werden, ob unterschiedliche Konfluenz der HaCaT-Zellen in den Zellkulturschalen einen relevanten Einfluss auf die Expression der diversen „Apoptoserezeptoren“ hat. Es wurden HaCaT-Zellen des gleichen Zellklones in Mengen von 100.000, 500.000, 1x10<sup>6</sup> und 3x10<sup>6</sup> in p100-Zellkulturschalen eingebracht, bei 37°C inkubiert, nach 24h mit frischem Zellkultur-Medium versorgt und am dritten Tag abgelöst und zur FACScan-Analyse der Rezeptoren an der Zelloberfläche überführt. Die Zellen hatten dabei am dritten Tag im Kulturmedium jeweils eine Wachstumsdichte von etwa 40%, 70%, knapp 100% und mehr als 100% erreicht.



**Abb.8:** Expression der TRAIL-Rezeptoren bei HaCaT in Abhängigkeit von der Konfluenz der Zellen. Die schwarzen Kurven zeigen die Isotypen, die roten Kurven zeigen die mit den entsprechenden Antikörpern gefärbten Zellpopulationen bei jeweils <50%, >50% und 100% Konfluenz (n=6)

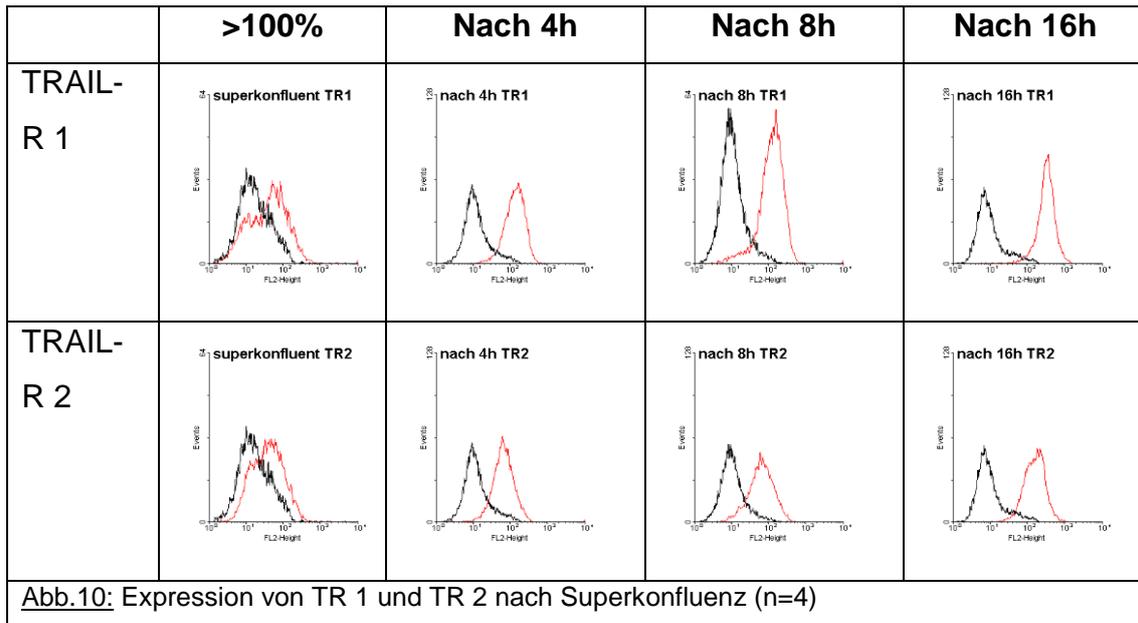
Die FACScan-Auswertung der membranständigen Rezeptoren TR 1 bis TR 4, CD95 und TRAIL an der Oberfläche der HaCaT-Zellreihen erbrachte als Ergebnis ein umgekehrt proportionales Verhältnis der Rezeptordichte zur Wachstumsdichte in der Zellkultur (Abb.8)

In allen Versuchen zeigten die Zellen mit zunehmender Konfluenz eine deutliche Hemmung der Oberflächenexpression der untersuchten TRAIL-Rezeptoren, mit Ausnahme des CD95-Rezeptors, bei dem nur bei 100% Konfluenz ein leichter Rückgang der Expression messbar war (Abb.9)



Die superkonfluent gewachsenen Zellen, die in der optischen Auswertung der Kulturschalen eine Wachstumsdichte von mehr als 100% erreicht hatten, d.h. nicht mehr einlagig, sondern zum Teil schon übereinander hinweg gewachsen waren und keine Verhornungen zeigten, wurden ebenfalls aus den Medienschalen abgelöst, ein erstes Kontingent wurde sofort der Analyse überführt, von den restlichen Zellen wurden je 100.000 Zellen in frisches Medium gegeben und nach 2h, 4h, 8h, 16h und 24h zur Rezeptorfärbung weiterverarbeitet.

Hierbei liess sich ein Anstieg der membranständigen Rezeptordichte bereits vier Stunden nach Lösung aus dem kompakten Zellverband im FACScan diagnostizieren, im Weiteren dann stellten wir eine Zunahme der Expression fest, die nach spätestens 16 Stunden sistierte und ein stabiles Niveau erreichte (Abb.10)



Diese Ergebnisse legen nahe, dass es vermutlich infolge der zunehmenden Zell-Zell-Kontakte zu einer Verminderung der Zahl der Todesrezeptoren an der Oberfläche der Zellmembranen kommt. Das zügige Wiederauftauchen derselben nach der Ablösung aus dem Zellverband und somit dem Verlust der engen Interaktion zwischen den Zellen legt den Schluss nahe, dass es bei zunehmender Wachstumsdichte der Zellen zur Internalisierung der membranständigen Rezeptoren kommt, welche dann nach dem Verlust der engen Zellkontakte wieder schnell auf die Zelloberfläche gebracht werden. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurden alle nachfolgenden Versuche an HaCaT-Zellverbänden vorgenommen, die eine Wachstumsdichte von 40% bis 50% Konfluenz aufzeigten. Damit sollte zum einen eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreicht werden und zum anderen sichergestellt werden, dass zur Färbung der Zelloberflächen die Versuchszellen eine möglichst hohe Rezeptorendichte aufweisen.

### III.2. Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf Todesrezeptor-Expression und Apoptose-Sensitivität

#### III.2.1 Der Einfluss von TNF

Zur Stimulation der HaCaT-Zellen mit TNF wurden diese wie oben beschrieben für 24h in Zellkulturschalen bzw. in 96-well-Platten mit TNF-Konzentrationen

von 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml inkubiert. Zur Messung der Oberflächenrezeptoren wurden die Zellen zur FACScan-Analyse aus den Zellkulturschalen gelöst und entsprechend eingefärbt. Die in den 96-well-Platten behandelten Zellen dienten zur Bestimmung der Überlebensrate mittels Kristallviolett-Zytotoxizitäts-Assay. Hier wurden die HaCaT-Zellen TNF und TRAIL – in Konzentrationen von 15 ng/ml bis 250 ng/ml – ausgesetzt.

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung der TNF-behandelten Zellen zeigte sich, dass dieses Zytokin keinerlei Einfluss auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren und CD95 auf der Membranoberfläche der HaCaT-Zellen hat (Abb.11).

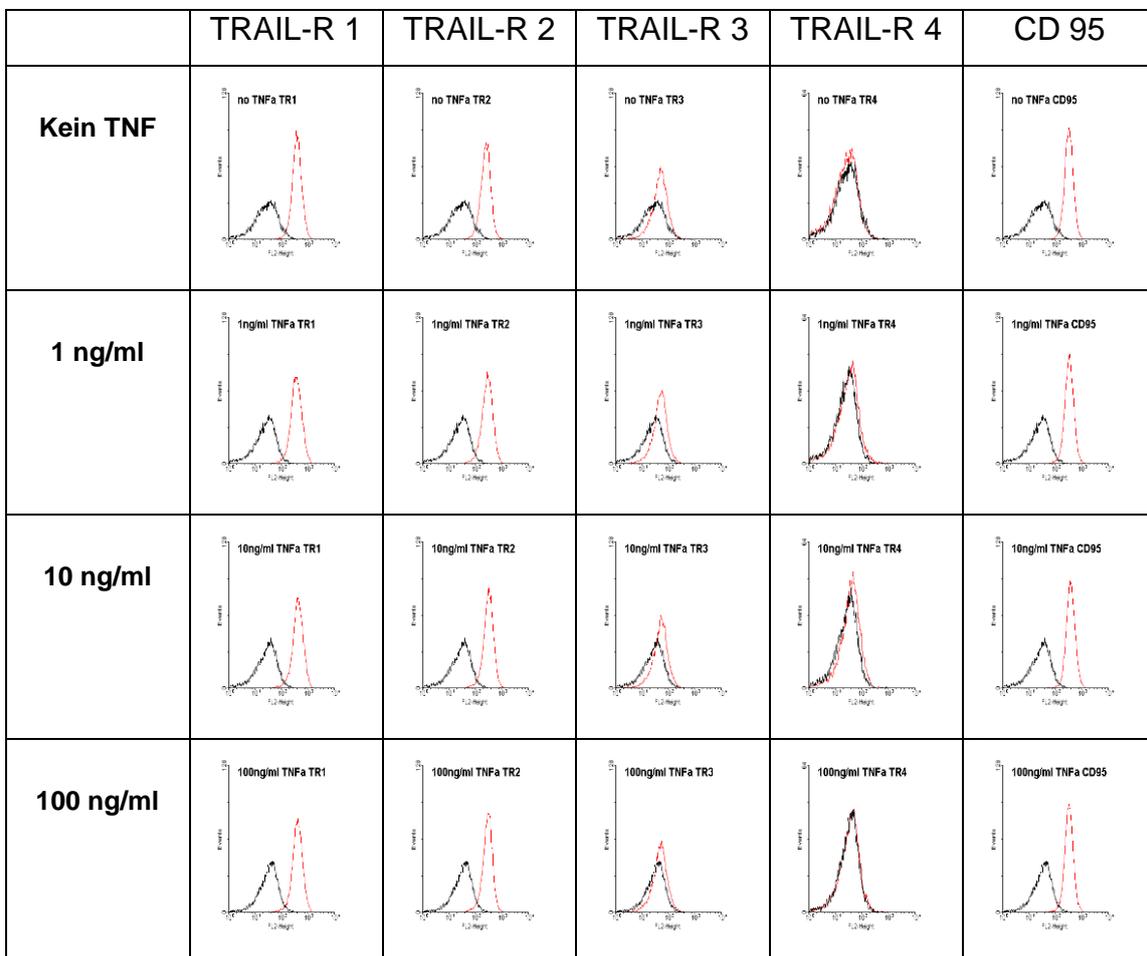
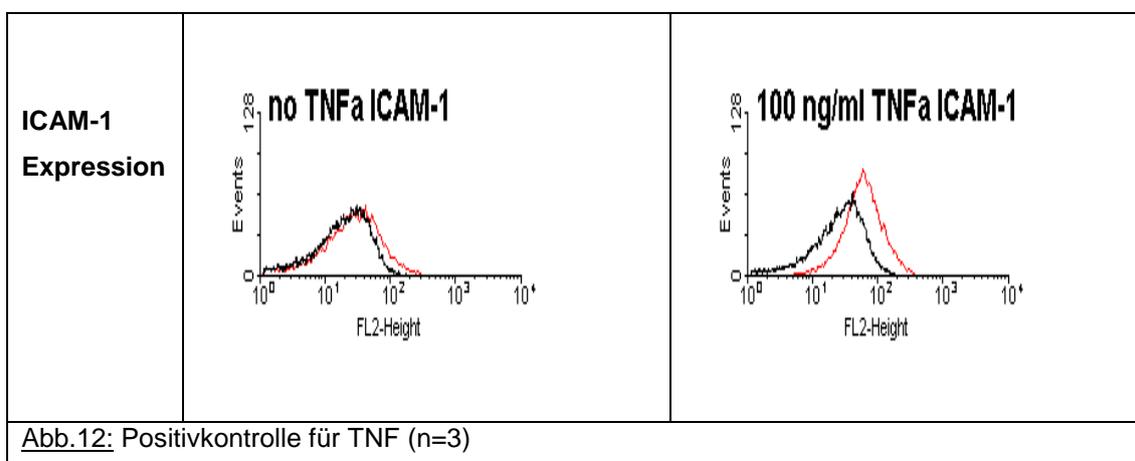


Abb.11: Expression der TRAIL-Rezeptoren und CD95 auf HaCaT mit TNF (n=3)

Zur Sicherung dieses Ergebnisses, d.h. zur Positivkontrolle der Wirksamkeit des verwendeten TNF wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1

(Intercellular adhesion molecule 1) in gleicher Weise wie für die Oberflächenrezeptoren beschrieben im FACScan bestimmt.

Die Expression von ICAM-1 auf der Zellmembran wird unter dem Einfluss von TNF und Interferonen rasch aufreguliert (Winiski et al. 1992). Aufgrund dieser Tatsache kann durch die Bestimmung der ICAM-1-Dichte auf der Zelloberfläche der behandelten HaCaT-Zellen die Aktivität des verwendeten Zytokines getestet werden. Wir konnten für das von uns benutzte TNF eine eindeutige Steigerung des ICAM-1-Proteins auf den entsprechend behandelten HaCaT feststellen und so dessen Aktivität bestätigen (Abb.12).



Beim Ansatz der Kristallviolett-Assays zur Bestimmung der Apoptose-Sensibilität wurde zunächst die direkte TNF-vermittelte Apoptose bestimmt, indem die Zellen in den Mikrotiterplatten für unterschiedlich lange Zeit (zwei bis 24 Stunden) mit TNF in einer Konzentration von 100 ng/ml inkubiert wurden. Bei der photometrischen Auswertung der Assays zeigte sich, dass TNF zu einem kontinuierlich zunehmenden Absterben der HaCaT-Zellen führt und nach 24h bei etwa 50% der angesetzten Zellen die Apoptose eingeleitet wurde (53.7% Überlebensrate) (Abb.13).

Die Zellen, die parallel mit TRAIL behandelt wurden, zeigten ein leicht verschobenes Bild hinsichtlich des TNF-vermittelten Zelltodes.

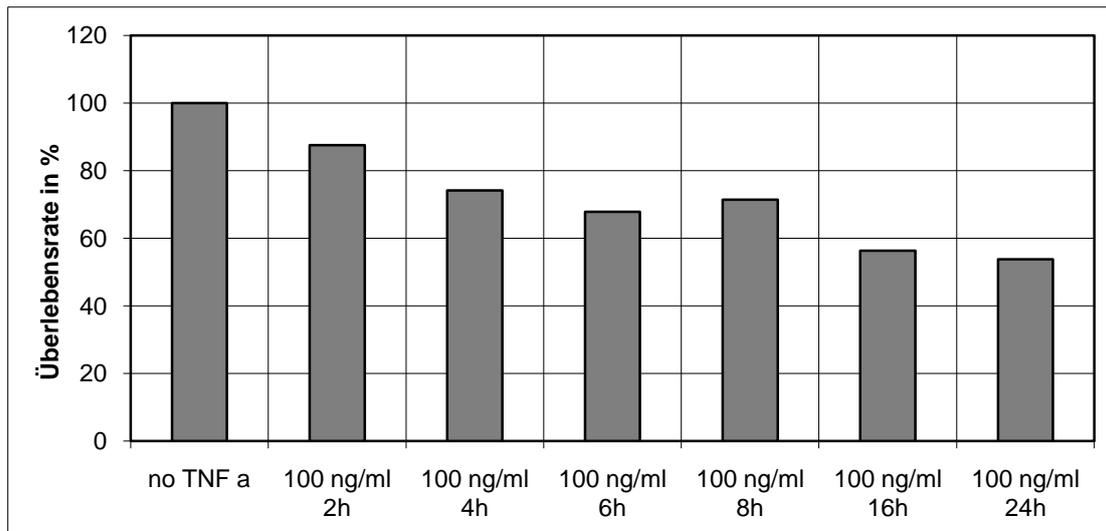


Abb.13: Wirkung von TNF auf HaCaT im Zeitverlauf (n=3)

(sämtliche Diagramme samt Berechnung der Mittelwerte wurden mit Microsoft Excel erstellt)

Sie wurden über Nacht – 12 Stunden – im Inkubator bei 37°C inkubiert, die HaCaT in 100 ng/ml TNF waren in der anschliessenden Analyse – anders als bei den vorangegangenen Ergebnissen – jedoch nur zu 11% abgestorben (89% Überlebensrate). Trotzdem konnte mithilfe dieser Versuche nachgewiesen werden, dass es unter dem Einfluss von TNF zu einer signifikanten Steigerung der Sensitivität der Zellen gegenüber einer Apoptoseinduktion durch TRAIL kommt (Abb.14).

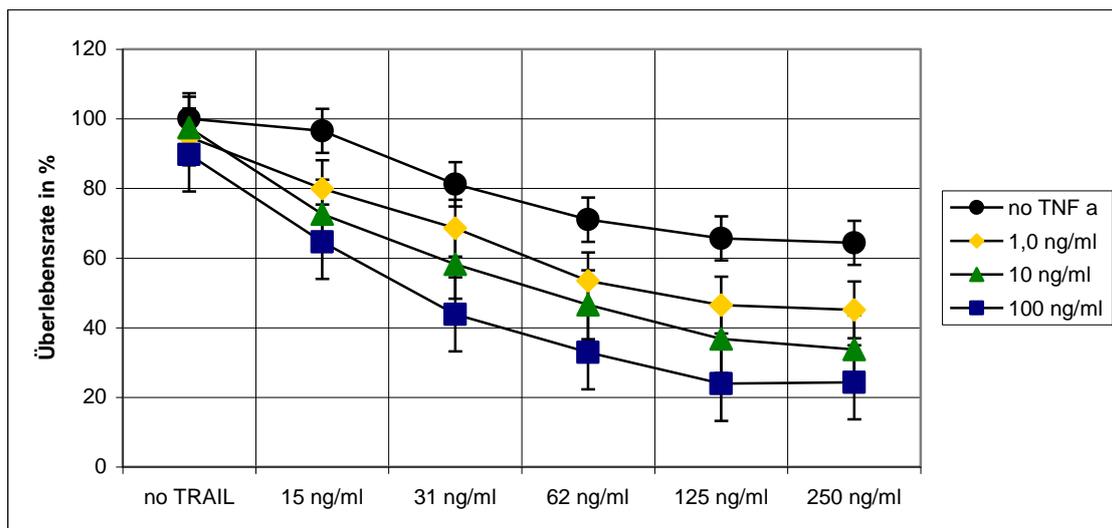
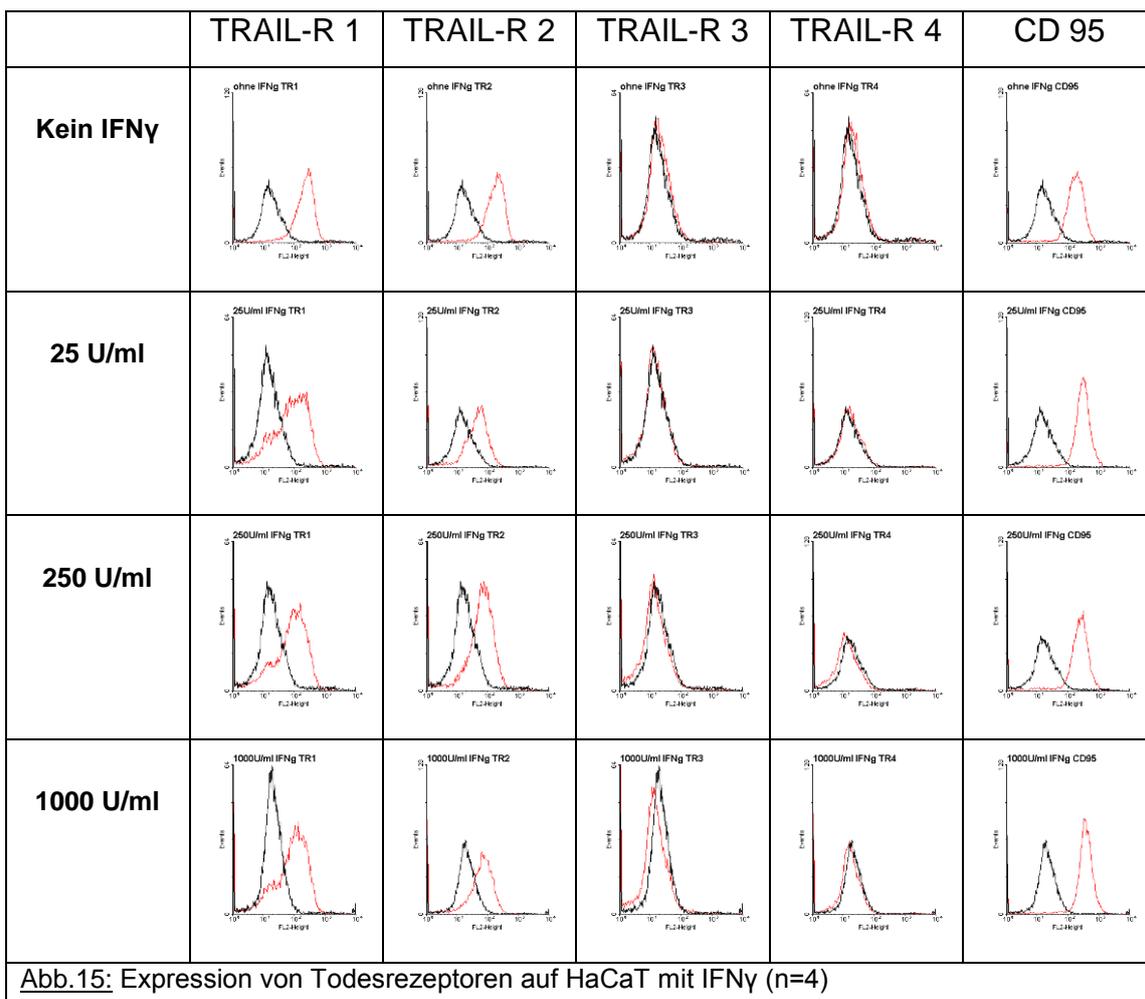


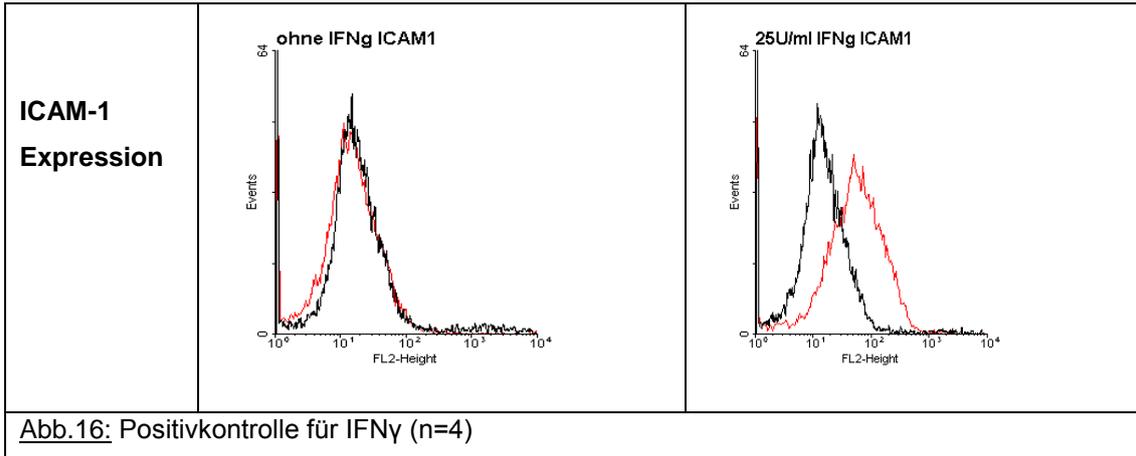
Abb.14: TNF und TRAIL auf HaCaT (n=5)

### III.2.2 Der Einfluss von IFN $\gamma$

Analog zum oben beschriebenen Versuchsansatz wurden HaCaT-Zellen bei den Versuchsreihen zur Inkubation mit IFN $\gamma$  für 24h in 96-well-plates mit Konzentrationen von 0.25, 2.5, 25, 250 und 1000 U/ml IFN $\gamma$  behandelt und anschliessend nach Antikörper-Färbung der membrangebundenen Apoptoserezeptoren der FACScan-Analyse zugeführt.

Zur Untersuchung der IFN $\gamma$ -vermittelten Apoptoseinduktion und Sensibilisierung gegen TRAIL wurden Kristallviolett-Assays und die Färbemethode nach Nicoletti herangezogen. Anders als unter dem Einfluss von TNF zeigte sich bei diesem Ansatz, dass unter zunehmenden Konzentrationen von IFN $\gamma$  die Expression der Todesrezeptoren TR1 und TR2 kontinuierlich abnimmt, während für die TR3- und TR4-Rezeptordichte keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Der CD95-Rezeptor wird eher in geringem Masse verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb.15).





Die Positivkontrolle für unser verwendetes Zytokin wurde auch bei diesem Experiment mit dem ICAM1-Protein durchgeführt (Abb.16).

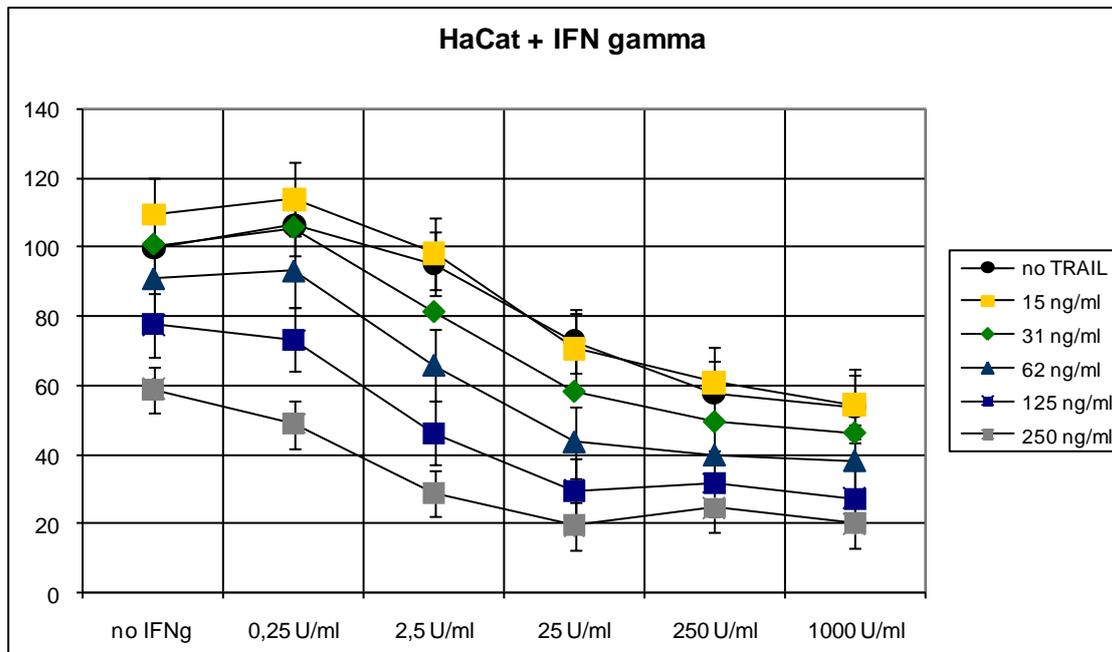
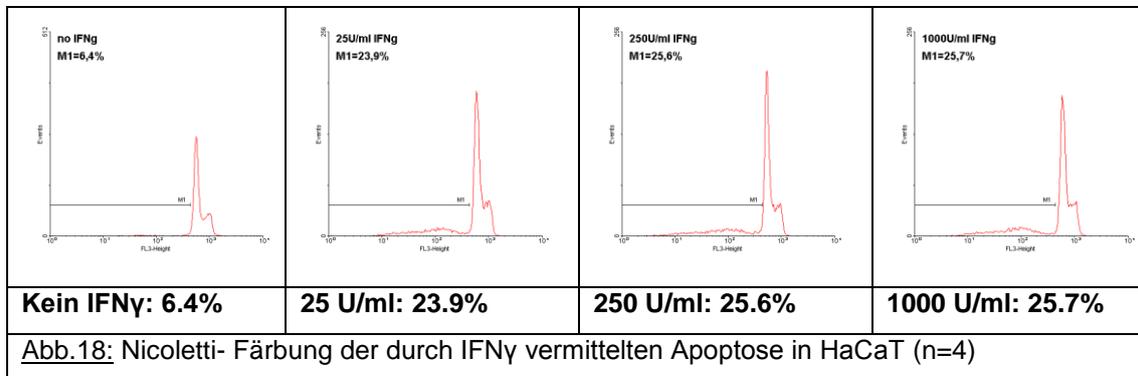


Abb.17: IFN $\gamma$  und TRAIL auf HaCaT (n=4)

Die %-Werte entsprechen den im Kristallviolett-Assay gemessenen Extinktionsrelationen. Die einzelnen Kurven entsprechen Zellpopulationen, welche mit unterschiedlichen TRAIL-Konzentrationen behandelt wurden. Die IFN $\gamma$ -Konzentration ist im Diagramm von links nach rechts aufsteigend angeordnet.

In der Auswertung der Kristallviolett-Assays konnte gezeigt werden, dass IFN $\gamma$  sowohl direkt zum Absterben von HaCaT-Zellen führt als auch eine deutliche Sensibilisierung der Zellen für TRAIL verursacht (Abb.17).

In den daraufhin durchgeführten Nicoletti-Färbungen der mit IFN $\gamma$  behandelten HaCaT-Zellen stellten wir eine IFN $\gamma$ -abhängige Apoptoserate von etwa 20% fest (Abb.18).



Im nächsten Ansatz verwendeten wir den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk zur weitergehenden Abklärung des Signalweges der festgestellten IFN $\gamma$ -abhängigen Apoptose. zVAD-fmk (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon) ist ein synthetisches Peptid, das durch unspezifische Bindung im aktiven Zentrum aller bekannten Caspasen als universeller Caspaseninhibitor Verwendung findet (Garcia-Calvo et al., 1998).

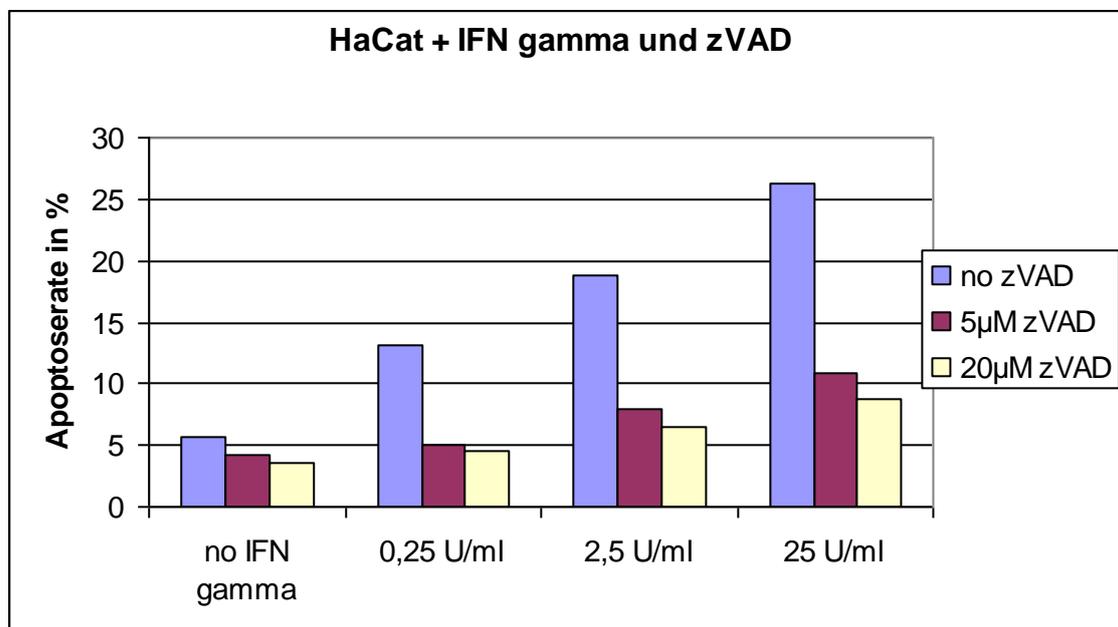
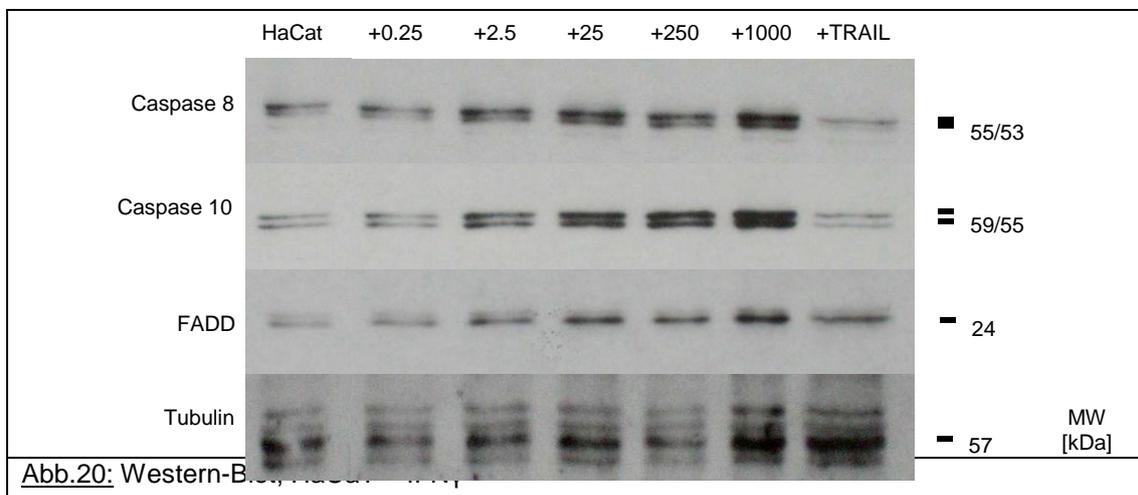


Abb.19: Hemmung der IFN $\gamma$ -vermittelten Apoptose durch zVAD (n=4)

Wieder wurden Kristallviolett-Assays als Methode gewählt. Während die HaCaT, die in Abwesenheit von zVAD-fmk kultiviert wurden, eine zur IFN $\gamma$ -

Konzentration direkt proportionale, progrediente Apoptose aufwies, konnte diese durch Zugabe von zVAD-fmk signifikant gehemmt werden (Abb.19). Ein durch Caspasen vermittelter Apoptose-Signalweg konnte also als direkte Ursache für den Effekt des IFN $\gamma$  auf HaCaT angenommen werden. Aus diesem Grunde wurden Zell-Lysate von mit IFN $\gamma$  behandelten HaCaT-Zellen hergestellt und mittels Western-Blot-Analyse die Expression von Caspase-8, -10 und FADD studiert.

Sowohl für die Initiator-Caspasen-8 und -10 als auch für das Adapter-Protein FADD konnte nach Inkubation mit IFN $\gamma$  eine intrazelluläre Aufregulation in HaCaT nachgewiesen werden (Abb.20).

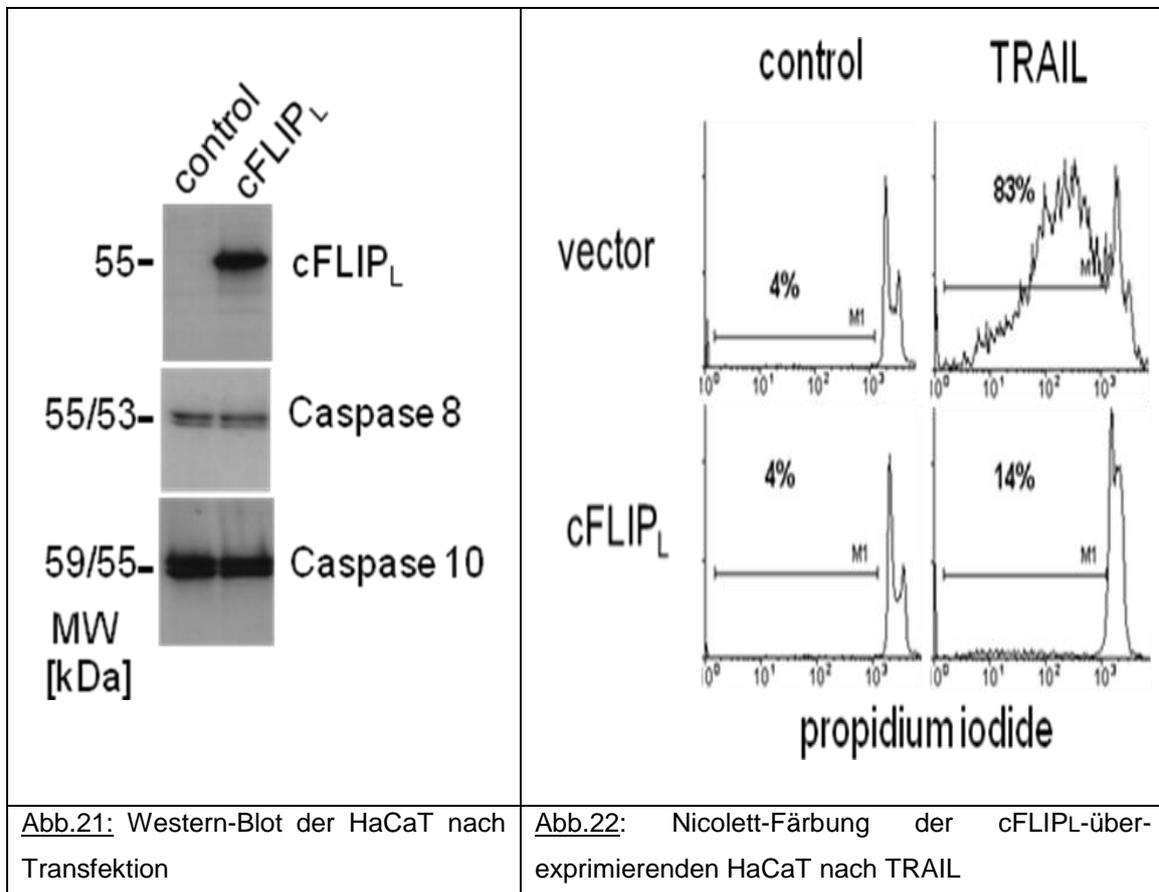


Zu diesem Zeitpunkt in unserer Arbeit entschlossen wir uns aufgrund vielfältiger – in unterschiedliche Richtung weisende – Ergebnisse, die Zielsetzung unserer Arbeit zu fokussieren. Wir lenkten daher unser Hauptaugenmerk auf die intrazelluläre Interaktion zwischen den Initiator-Caspasen-8/ -10 und cFLIP<sub>L</sub> sowie die Rolle von cFLIP<sub>L</sub> am DISC und bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.

### III.3. cFLIP<sub>L</sub>-Überexpression schützt vor TRAIL-vermittelter Apoptose in HaCaT-Keratinocyten

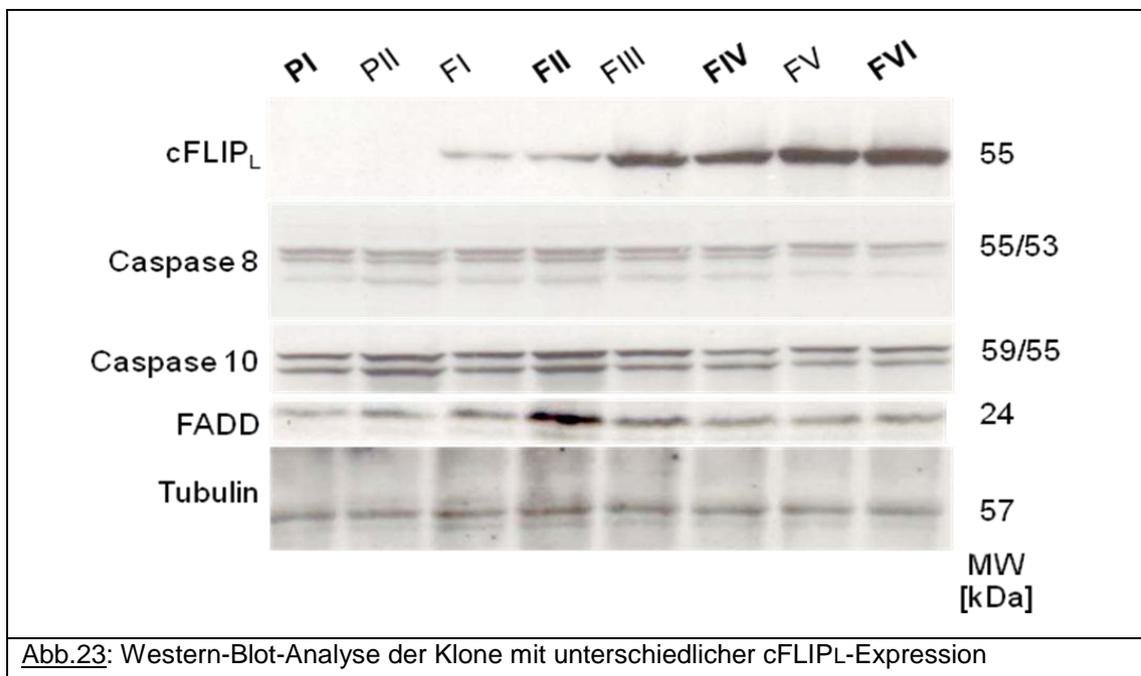
cFLIP<sub>L</sub> blockiert die über Todesrezeptoren vermittelte Apoptose und wird im Vergleich mit primären humanen Keratinocyten in transformierten HaCaT-Keratinocyten in wesentlich geringerem Umfang exprimiert (Leverkus et al. 2000). TRAIL fungiert nicht ausschließlich als Apoptose-

Aktivator, sondern initiiert nachweislich auch Apoptose-unabhängige Signale wie beispielsweise die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Bei pharmakologischer Hemmung der Caspasenkaskade kommt es zur Steigerung der NF- $\kappa$ B-Aktivität, womit nahe liegt, dass die NF- $\kappa$ B-Induktion hierbei nicht nur eine Begleiterscheinung der Apoptoseaktivierung ist (Leverkus et al. 2003; Harper et al. 2001; Wajant et al. 2000). Um den Einfluss der Caspasen-Inhibition auf die diversen Signalwege besser zu verstehen, untersuchten wir die Rolle, die cFLIP<sub>L</sub> in diesem System spielt. Dafür wurden zunächst mittels eines retroviralen Transduktions-Assays cFLIP<sub>L</sub>-exprimierende HaCaT-Zellen hergestellt (Abb.21).



Im Vergleich mit einer HaCaT-Kontrollpopulation zeigten sich die polyklonalen cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Populationen hochresistent gegen TRAIL-induzierte Apoptose, wie wir in der Hypodiploidie-Analyse nach 3 Stunden der Inkubation mit 1 $\mu$ g/ml TRAIL zeigen konnten. Während in den Kontrollpopulationen ohne TRAIL-Behandlung nur 4% apoptotische Zellen waren, stieg der Anteil

apoptotischer HaCaT-Keratinocyten hier nach Behandlung mit TRAIL auf 83%. In den cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen stieg der Anteil apoptotischer Zellen unter TRAIL dagegen nur von 4% auf 14% an (Abb.22). Die Überexpression von cFLIP<sub>L</sub> schützt HaCaT-Keratinocyten also vor TRAIL-vermittelter Apoptose. Entsprechend der These, dass das Verhältnis von cFLIP<sub>L</sub> zu Caspase-8 die Sensitivität der Zelle gegen Todesrezeptor-vermittelte Apoptose bestimmt (Thome et al. 2001; Krueger et al. 2001), wurden aus den polyklonalen HaCaT-Populationen monoklonale Zellpopulationen isoliert. Zwei Kontrolllinien und sechs monoklonale HaCaT-Linien mit unterschiedlich ausgeprägter cFLIP<sub>L</sub>-Expression wurden mittels Western-Blot-Analyse definiert (Abb.23).

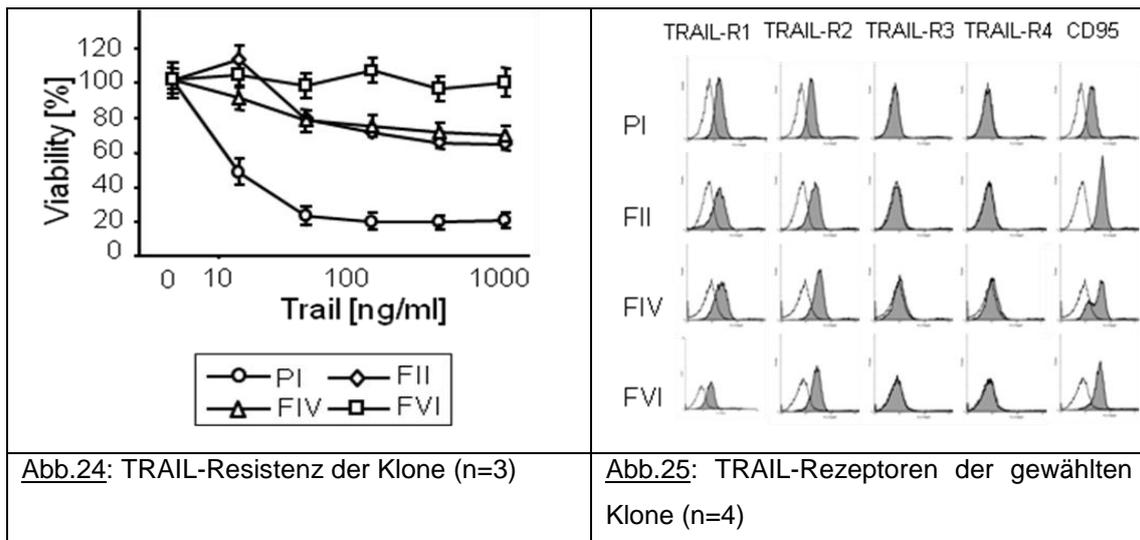


Eine Kontroll-Population (PI), zwei mäßig cFLIP<sub>L</sub>-exprimierende Linien (FII und FIV, FLIP<sub>low</sub>) und eine stark cFLIP<sub>L</sub>-exprimierende Linie (FVI, FLIP<sub>high</sub>) wurden zur Durchführung der weiteren Versuche ausgewählt.

Die unterschiedlichen Zellklone in 96-Well-Platten wurden für 16-24 Stunden mit 12-1000ng/ml TRAIL inkubiert und die Apoptose-Sensitivität anschließend mittels Kristallviolett-Assays ausgemessen. Die FLIP<sub>low</sub>-HaCaT waren im Vergleich zur Kontrollpopulation etwas resistenter gegen den Einfluss von TRAIL, die FLIP<sub>high</sub>-Zellen jedoch zeigten sich vollständig resistent gegen den

Versuch der Apoptoseinduktion selbst in den Versuchen mit der höchsten verwendeten TRAIL-Konzentration von 1 µg/ml (Abb.24).

Eventuell vorstellbare klonale Unterschiede in der Expression von Komponenten der intrazellulären Apoptosewege können diese Unterschiede in der TRAIL-Sensitivität nicht erklären (Abb.23). Ebenso war eine Abweichung der Expression von TRAIL-Rezeptoren im Vergleich der untersuchten Zelllinien untereinander in der Oberflächenfärbung nicht zu verzeichnen (Abb.25).



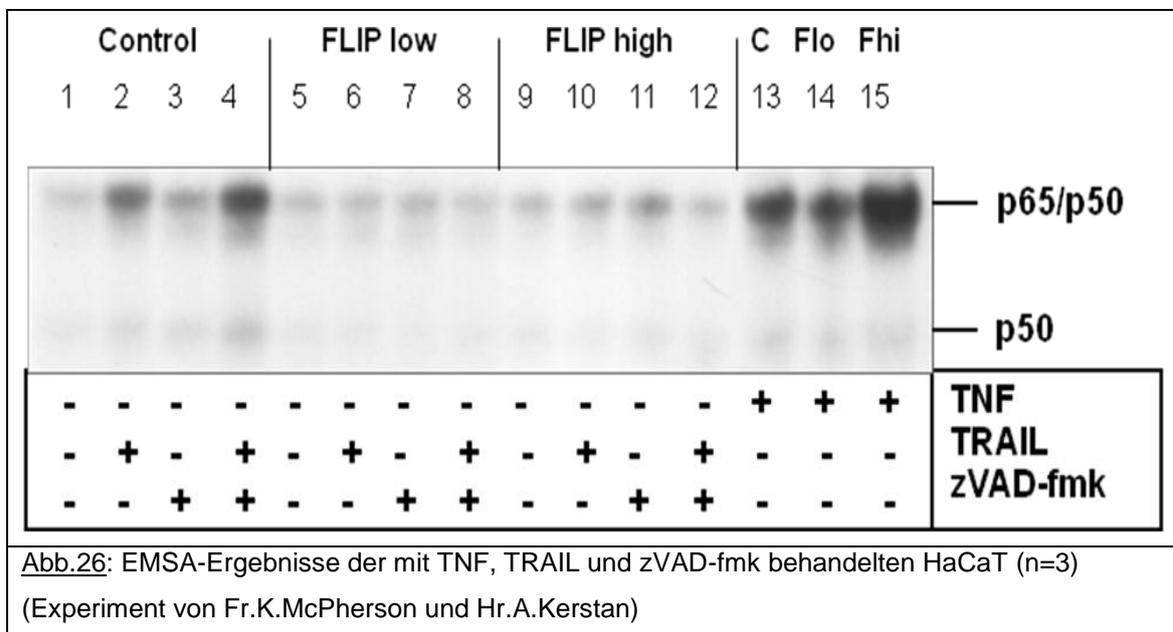
Es konnte somit gezeigt werden, dass das Verhältnis von cFLIP<sub>L</sub> zu Caspase-8 mit der Resistenz der untersuchten Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptoseinduktion direkt korreliert.

#### III.4. Blockierung der TRAIL-vermittelten NF-κB-Aktivierung durch cFLIP<sub>L</sub>

Die Hemmung von Caspasen durch pharmakologische Inhibitoren verhindert die TRAIL-induzierte Apoptose, jedoch nicht die Aktivierung von NF-κB (Leverkus et al. 2000). Da cFLIP<sub>L</sub> die durch TRAIL eingeleitete Apoptose genauso effektiv blockiert wie Caspaseinhibitoren, war es unsere Annahme, dass die NF-κB-Aktivierung durch TRAIL in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen ähnlich gesteigert sein sollte wie in mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk vor Apoptose geschützten und mit TRAIL stimulierten Kontrollzellen.

In EMSA-Versuchen (electrophoretic mobility shift assay) wollten wir die NF-κB-spezifische DNA-Bindungsaktivität nach TRAIL-Stimulation bestimmen. Diese Experimente wurden von Frau Kirsty McPherson und Herrn Andreas Kerstan

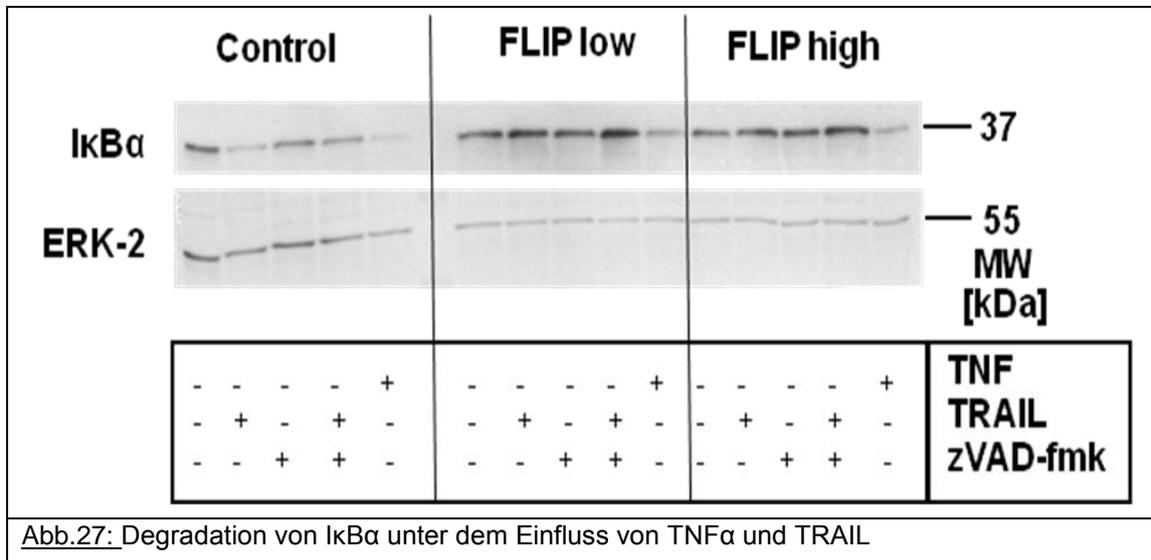
durchgeführt. Dazu wurden Kontrollzellen und HaCaT mit geringem und hohem cFLIP<sub>L</sub>-Level mit und ohne 40µM zVAD-fmk eine Stunde inkubiert und anschließend für eine Stunde mit TRAIL (1µg/ml) oder für 30 Minuten mit TNF (1000U/ml) behandelt. Die Kernlysate wurden anschließend im EMSA auf κB-spezifische DNA-Bindungen (p65/p50-Heterodimere und p50-Homodimere) untersucht. Wir mussten feststellen, dass es in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Keratinozyten keine NF-κB-Aktivierung unter dem Einfluss von TRAIL gab (Abb.26, Reihen 5-12). In den Kontrollzellen kam es nach Stimulation mit TRAIL zu einer Aktivierung von NF-κB, die unter gleichzeitiger Behandlung mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk noch verstärkt wurde (Abb.26, Reihen 1-4).



Interessanterweise war dieser Effekt TRAIL-spezifisch. In allen untersuchten HaCaT-Keratinozyten kam es unter Stimulation mit TNF zu einer deutlichen Steigerung der NF-κB-Aktivität, unabhängig von der Höhe der cFLIP<sub>L</sub>-Expression (Abb.26, Reihen 13-15).

Die NF-κB-Aktivierung durch TRAIL und TNF ist abhängig von der Degradation von IκBα (Karin et al. 2002). Um nun festzustellen, an welchem Punkt der TRAIL-vermittelten NF-κB-Aktivierung cFLIP<sub>L</sub> inhibitorisch wirksam wird, analysierten wir die zytoplasmatische Degradation von IκBα nach Inkubation der Zellen mit TRAIL (1µg/ml für 1h) und TNF (1000U/ml für 30min) mittels Western-Blot-Analyse. ERK-2 diente uns als Kontrolle für eine gleichmäßige

Proteinladung der Assays. In cFLIPL-überexprimierenden Keratinozyten kam es zu keiner TRAIL-vermittelten Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ , während die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation in TNF-stimulierten Zellen keine Änderung in Abhängigkeit der unterschiedlichen cFLIPL-Expression zeigte (Abb.27).



cFLIPL kann also spezifisch den durch TRAIL verursachten Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und damit die NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindern, während die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF von cFLIPL unbeeinflusst bleibt.

### III.5. Blockierung der TRAIL-vermittelten IL-8-Induktion durch cFLIPL

TRAIL induziert die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des proinflammatorischen Zytokines Interleukin-8 (Leverkus et al. 2003).

Wie gezeigt wurde, hemmt cFLIPL die TRAIL-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Wir wollten als nächstes nun sehen, ob durch cFLIPL eine Modulation der NF- $\kappa$ B-induzierten Zielgene festzustellen ist. In unseren unterschiedlichen Zellklonen ließen wir also die Höhe der IL-8-Expression nach TRAIL-Stimulation mittels RPA (RNase protection assay) messen. Die Fragmente von MCP-1-mRNA und IL-8-mRNA und Kontroll-mRNA (L32) wurden angefärbt. Die relative IL-8-mRNA-Expression wurde densitometrisch gegen L32 abgeglichen und wie unten aufgeführt in relativen Einheiten dargestellt. Während in den verwendeten Kontrollzellen eine kräftige Induktion der IL-8-mRNA durch TRAIL

nachzuweisen war, fehlte diese in den stark cFLIPL-überexprimierenden Zellen völlig (Abb.28).

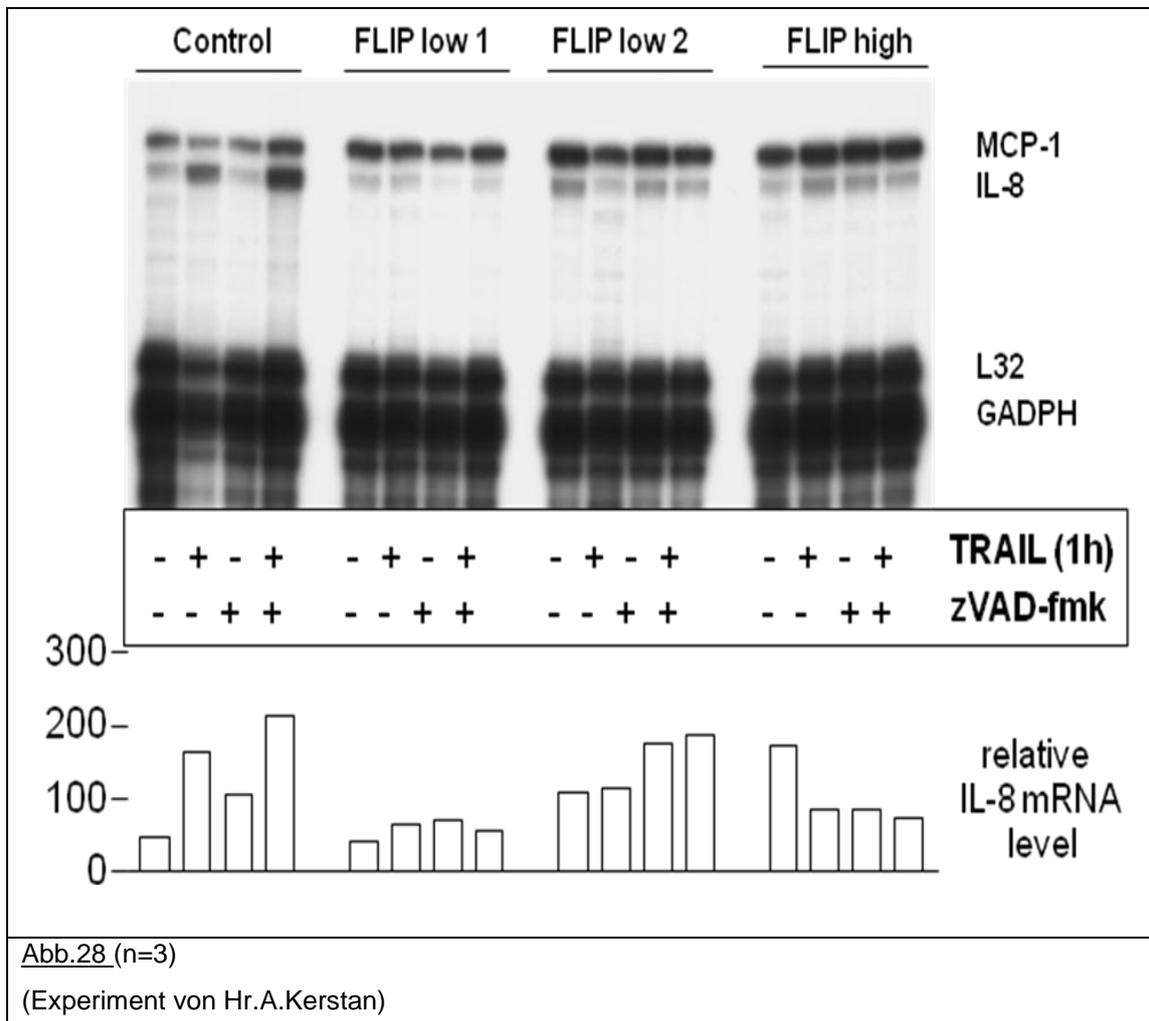
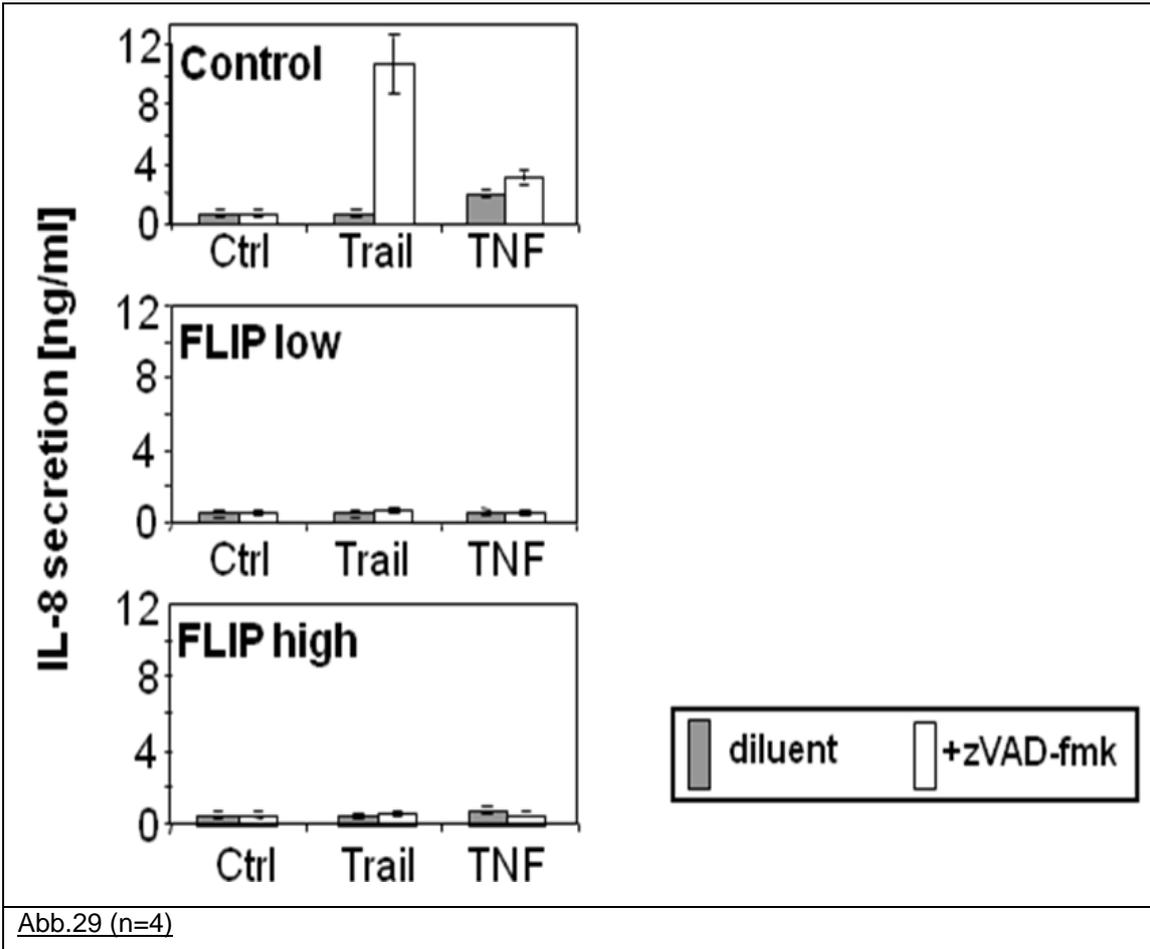


Abb.28 (n=3)

(Experiment von Hr.A.Kerstan)

Wir bestimmten weiterhin die IL-8-Sekretion in cFLIPL-überexprimierenden HaCaT. Hierzu wurden Kontrollzellen und cFLIPL-überexprimierende Keratinozyten entweder mit unbehandelter Nährlösung (graue Säulen) oder mit 40µgM zVAD-fmk (weiße Säulen) für eine Stunde vorbehandelt und im Weiteren mit 1µg/ml TRAIL oder 1000U/ml TNF für 24 Stunden inkubiert. Die Überstände der Zellkulturschalen wurden dann mit IL-8-ELISA ausgewertet. In Kontrollzellen, die mit zVAD-fmk behandelt wurden, fand sich ein starker Anstieg von IL-8-Protein nach Stimulation mit TRAIL oder TNF (Abb.29).



In cFLIPL-exprimierenden Zellen ist die IL-8-Produktion dagegen deutlich reduziert. Aber auch die TNF-induzierte Steigerung von IL-8 wurde zum Teil inhibiert, was vermuten lässt, dass neben der NF- $\kappa$ B-Aktivierung noch andere Signalwege existieren, die für eine erfolgreiche TNF-stimulierte Sekretion von IL-8 nötig sind. Zusammenfassend konnten wir hier zeigen, dass cFLIPL die durch TRAIL induzierte IL-8-Protein-Produktion über eine Störung der TRAIL-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung spezifisch blockieren kann.

### III.6. Modulation des TRAIL-DISC durch cFLIP<sub>L</sub>

#### III.6.1 Hemmung der Caspase-8-Prozessierung

Auf der Ebene des DISC blockiert cFLIP<sub>L</sub> die Caspase-8-Aktivierung, indem es die vollständige Spaltung der Procaspase verhindert. Um den Mechanismus der cFLIP<sub>L</sub>-vermittelten Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu verstehen, untersuchten wir im Western-Blot die Aktivität der Initiator-Caspasen in Zell-Lysaten, die aus TRAIL-behandelten cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Keratinozyten gewonnen wurden. Die verschiedentlich stark cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Zellen wurden dafür in Lösungen ohne TRAIL und mit 0,1  $\mu$ g/ml und 1  $\mu$ g/ml TRAIL für drei Stunden behandelt. In den verwendeten HaCaT-Kontrollzellen fand sich nach TRAIL-Stimulation Prozessierung von Caspasen-8 und -10 (Abb.30, Reihen 1-3), während in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen eine von der Höhe der cFLIP<sub>L</sub>-Expression abhängige reduzierte Initiator-Caspase-Aktivierung festzustellen war.

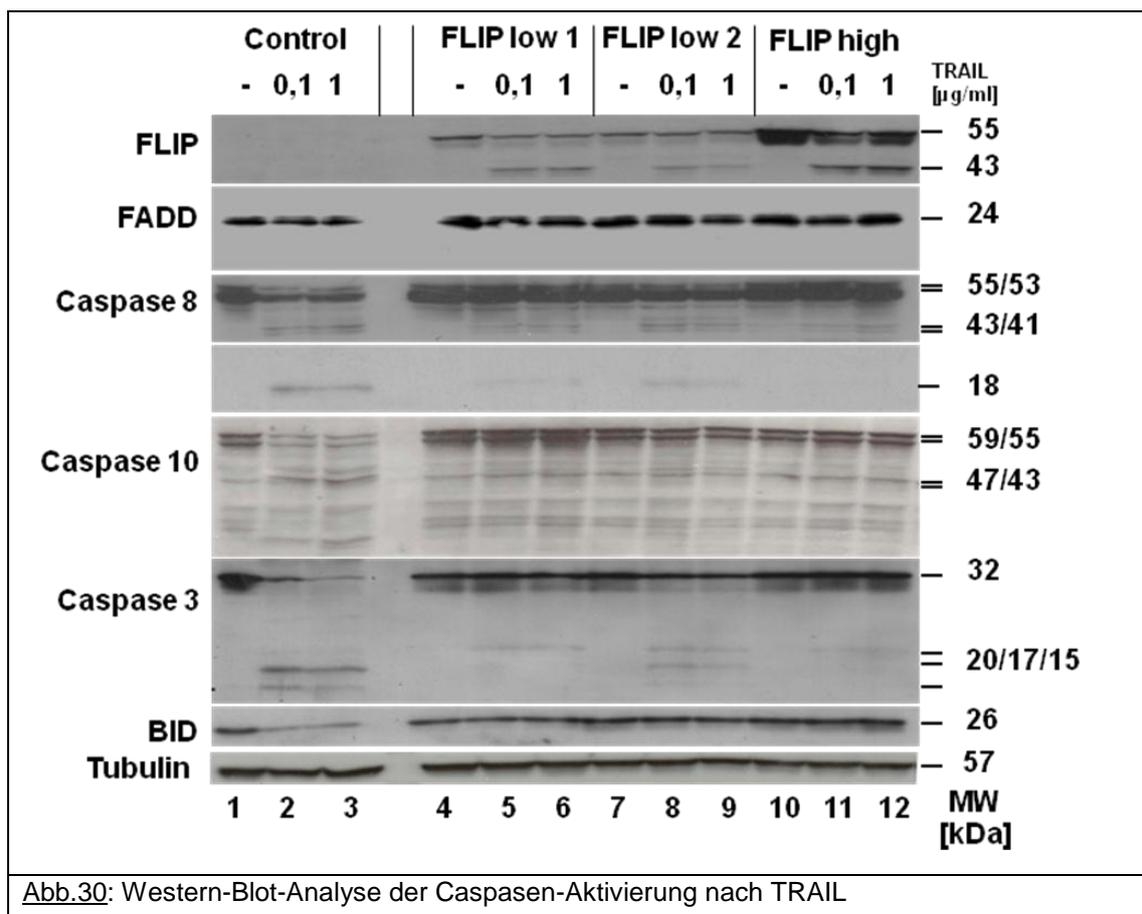


Abb.30: Western-Blot-Analyse der Caspasen-Aktivierung nach TRAIL

In cFLIP<sub>L</sub>-HaCaT-Keratinocyten fand sich ein deutlich reduzierter Anteil vollständig prozessierter Caspase-8 (Abb.30, Reihen 4-9), in cFLIP<sub>high</sub>-Zellen waren vollständig gespaltene Caspase-8-Proteine (p18) nicht mehr zu finden (Abb.30, Reihen 10-12).

In allen cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen fanden wir nach TRAIL-Stimulation das cFLIP<sub>L</sub>-Fragment p43 sowie teilprozessierte Caspase-8. Substrate der Caspase-8 wie Bid und Caspase-3 wurden in gespaltener Form nur in den Kontroll-Zellen sowie – in geringerem Umfang – in cFLIP<sub>L</sub>-HaCaT-Keratinocyten (cFLIP<sub>low1</sub>, cFLIP<sub>low2</sub>) gefunden. In cFLIP<sub>high</sub>-HaCaT waren sie nicht mehr nachzuweisen (Abb.30, Reihen 10-12). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Annahme, dass die TRAIL-abhängige Aktivierung der Caspase-8 durch cFLIP<sub>L</sub> inhibiert und moduliert wird, ähnlich wie das schon für den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk gezeigt werden konnte (Leverkus et al. 2000). Abgesehen davon konnte im Zytosol der TRAIL-behandelten cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen hinsichtlich der Caspase- und Bid-Aktivierung keine Veränderung festgestellt werden. Dies kann erklären, warum cFLIP<sub>L</sub>, anders als zVAD-fmk die durch TRAIL induzierte NF-κB-Aktivierung hemmt. Die gezeigten Daten legen den Schluss nahe, dass cFLIP<sub>L</sub> direkt auf Höhe des DISC mit dort generierten Signalen zur NF-κB- Aktivierung interferiert.

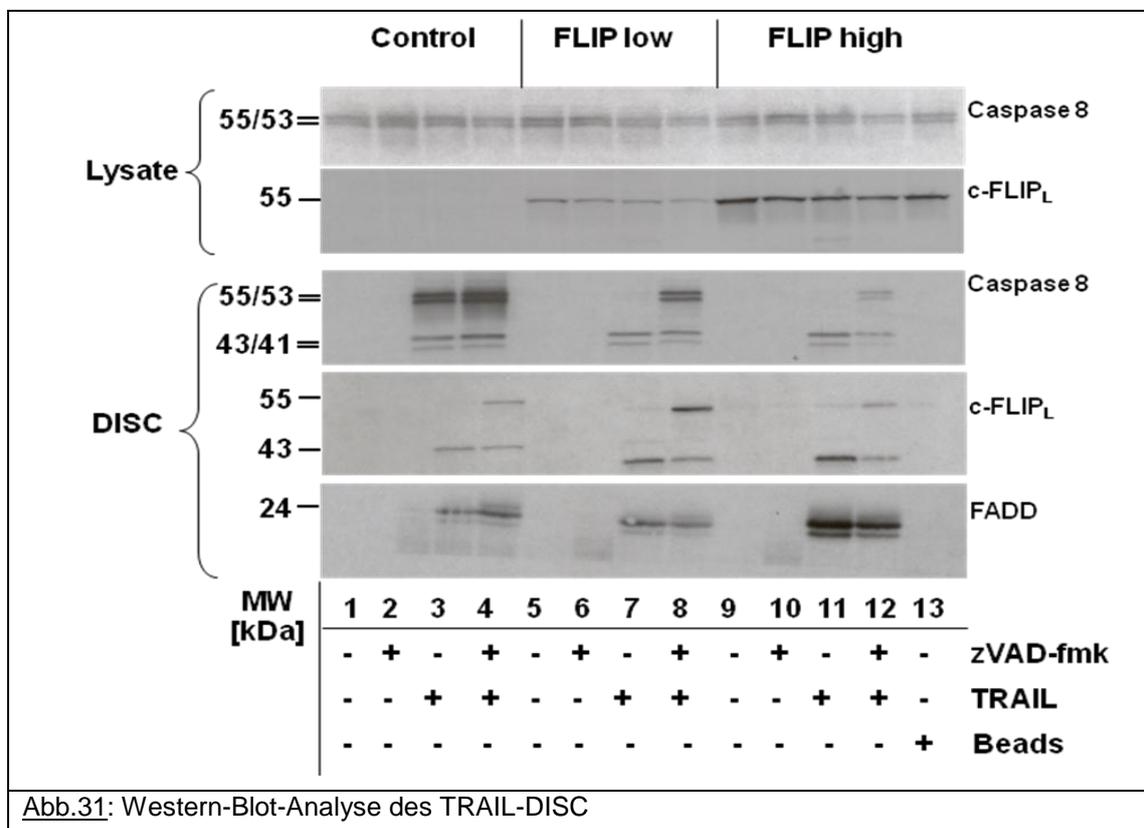
### III.6.2 Modulation des TRAIL-DISC

Um die Mechanismen zu verstehen, die zur Inhibierung der NF-κB-Aktivierung durch cFLIP<sub>L</sub> in HaCaT-Keratinocyten führen, haben wir in einem weiteren Versuch die Zusammenstellung des TRAIL-DISC in unseren Zellen untersucht. In Versuchen mit MEF-Zellen (mouse embryonic fibroblasts) wurden bereits die jeweiligen Moleküle beschrieben, welche Anteil an der NF-κB-Aktivierung durch TNF oder TRAIL haben, der genaue molekulare Mechanismus an der Zellmembran, der zur NF-κB-Aktivierung führt, ist jedoch für die TRAIL-Rezeptoren noch nicht geklärt (Lin et al. 2000; Liu et al. 1996). Für die Aufarbeitung unserer Keratinocytenlinien zur DISC-Analyse nahmen wir jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen mit oder ohne Behandlung mit zVAD-fmk (40µM für 1h)

und anschließender TRAIL-Exposition (1µg/ml für 3h) zur Gewinnung von Lysaten für den Western-Blot.

Die in der Grafik oben aufgeführten beiden Blots zeigen die Caspase-8- und cFLIP<sub>L</sub>-Expression in kompletten Zelllysaten, die unteren drei Blots die DISC-Analyse. Lysate von nicht stimulierten Zellen und von Zellen, die nur mit Protein-G-beads präzipitiert wurden, dienten als Kontrollen für die spezifischen Präzipitate.

Es zeigte sich, dass die Rekrutierung von FADD zum DISC im Vergleich der unterschiedlichen Klone nicht signifikant unterschiedlich war, gleichwohl ein leicht höherer FADD-Anteil im DISC der FLIP<sub>high</sub>-HaCaT gemessen wurde (Abb.31, Reihe 11-12).



Im TRAIL-DISC der verwendeten Kontrollzellen fanden wir die Caspase-8-Proteine p55/53, während im DISC der cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden HaCaT vorwiegend die prozessierten p43/41-Fragmente der Caspase-8 gefunden wurden. Die Menge der Caspase-8, die zum DISC rekrutiert war, korrelierte direkt mit der Sensitivität der Zell-Linien für TRAIL.

Anders als in den Zell-Lysaten (Abb.31, zwei obere Blots), war eine Rekrutierung der p43-Fragmente von cFLIP<sub>L</sub> auch in den Kontrollzellen nachzuweisen, wobei die FLIP<sub>high</sub>-HaCaT- Zellen einen deutlich höheren Anteil von p43-Fragmenten am DISC hatten. Dies legt den Schluss nahe, dass auch sehr geringe Mengen von FLIP<sub>L</sub> mit hoher Affinität am DISC binden. Wir haben somit gezeigt, dass der Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden HaCaT keinen Einfluss auf die durch TRAIL induzierte NF-κB-Aktivierung hatte. In den Kontrollzellen fand sich hier eine erhöhte Aktivität nach TRAIL-Stimulation (Abb.26).

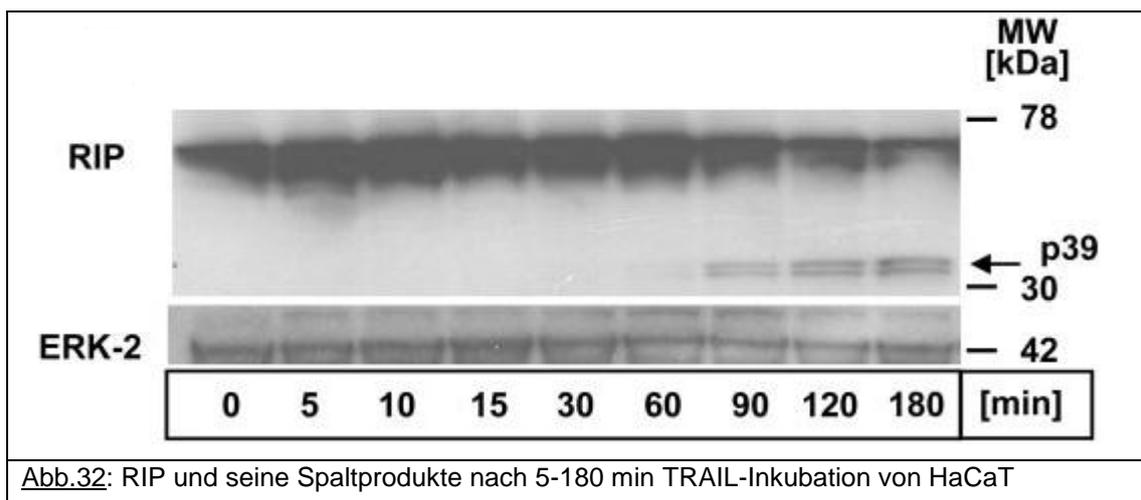
Also haben wir die Unterschiede am DISC zwischen TRAIL-behandelten Kontrollzellen und TRAIL-behandelten cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Zellen unter zVAD-fmk-Einfluss verglichen. Bei der DISC-Analyse fanden wir hierbei im DISC aller HaCaT-Keratinocyten sowohl cFLIP<sub>L</sub> in volle Länge (p55) als auch das Spaltfragment p43 (Abb.31, Reihen 4,8,12). Wir konnten nach Präinkubation mit zVAD-fmk keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Zellen finden. Die Spaltung von cFLIP<sub>L</sub> am DISC liefert demnach keine Erklärung für die Unterschiede in der NF-κB-Aktivierung. Wir verglichen weiterhin die Caspase-8-Spaltprodukte am DISC in unseren verschiedenen Zellklonen. Während wir in cFLIP<sub>high</sub>-Zellen hauptsächlich die Caspase-8-Spaltproteine p43/41 fanden, enthielt der DISC in diesen Zellen unter dem Einfluss von zVAD-fmk im Vergleich größere Anteile der Procaspase-Formen p55/53. In den Kontrollzellen veränderte die Wirkung von zVAD-fmk das Verhältnis der Proformen und Spaltprodukte der Caspase-8 am DISC jedoch nicht signifikant.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Spaltung der Caspase-8 am DISC in cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Zellen blockiert werden kann, während in den Kontrollzellen unter zVAD-fmk weiter Procaspase-8 rekrutiert werden kann.

### III.6.3 Veränderung der Rekrutierung von RIP zum DISC

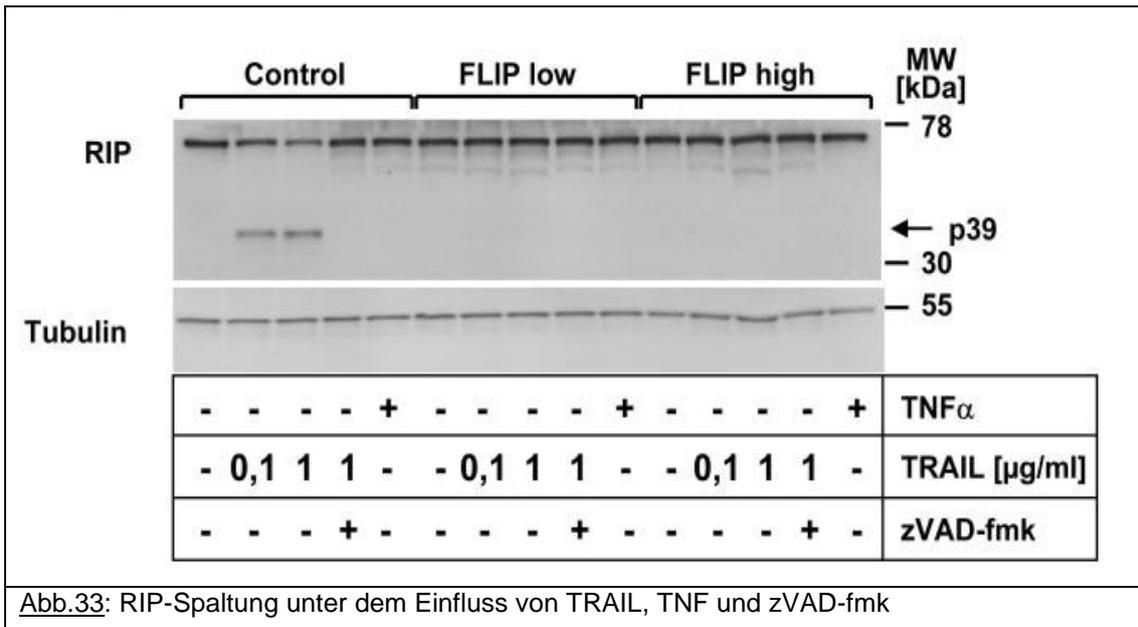
RIP (**R**eceptor **I**nteracting **P**rotein) ist ein bekanntes Substrat der Caspase-8. Es spielt eine wichtige Rolle bei der NF-κB-Aktivierung durch TRAIL und TNF (Lin et al. 2000). RIP wird durch die Caspase-8 gespalten. Hierbei entsteht ein

Fragment, das die sogenannte RIP-Todesdomäne enthält (Lin et al. 1999; Martinon et al. 2000). Überdies fand sich RIP sowohl im TRAIL-DISC von HeLa- und HEK293-Zellen als auch an membranständigen TNF-induzierten Signalkomplexen (Harper et al. 2001; Zhang et al. 2000; Harper et al. 2003). Wir wollten nun untersuchen, welchen Effekt cFLIP<sub>L</sub> auf die Spaltung von RIP am DISC nach TRAIL-Stimulation hat. Hierzu wurden HaCaT-Kontrollzellen mit 1 µg/ml TRAIL inkubiert, zeitversetzt nach 5-180 min lysiert und im Western-Blot getestet. Danach wurden die verschiedenen HaCaT-Linien mit oder ohne zVAD-Vorbehandlung für drei Stunden mit TRAIL und TNF vorinkubiert, bevor ihre Lysate analysiert wurden. Analog zur TRAIL-abhängigen Caspase-8-Aktivierung fanden wir das RIP-Spaltprodukt (p39) nach etwa 60 bis 90 Minuten nach Beginn der TRAIL-Inkubation der Kontrollzellen, während es in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Abb.32 + 33).



Die Spaltung von RIP war direkt abhängig von der Caspase-Aktivität. Wenn die Zellen mit zVAD-fmk vorbehandelt wurden, konnten wir kein gespaltenes RIP mehr finden (Abb.33).

Trotzdem konnten wir hierdurch nicht erklären, warum in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen keine TRAIL-vermittelte NF-κB-Aktivierung festzustellen ist, während in mit dem Caspase-Inhibitor behandelten Kontrollzellen die NF-κB-Aktivierung sogar gesteigert wird.



Um also die Zusammenhänge zwischen cFLIP<sub>L</sub> und TRAIL bei der Signalvermittlung zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu verstehen, untersuchten wir das Ausmaß der Rekrutierung von RIP zum TRAIL-DISC unserer Zellen. Die Exposition der unterschiedlichen HaCaT erfolgte simultan zu den vorangegangenen Versuchsansätzen, die DISC-Analyse wurde mit jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen durchgeführt.

Zunächst betrachteten wir den Anteil der Rekrutierung von Caspase-8, FADD und RIP und verglichen ihn mit dem freien zellulären Anteil dieser Proteine. Die Anreicherung von RIP am DISC war unter Kontrollbedingungen eher mäßig, während für FADD und Caspase-8 eine deutliche Anreicherung festgestellt werden konnte. Nur im TRAIL-DISC der mit zVAD-fmk vorbehandelten Kontrollzellen fanden wir eine starke Stimulations-abhängige Rekrutierung von RIP, während der Anteil von FADD und Caspase-8 unverändert blieb (Abb.34). Der TRAIL-DISC unserer Kontrollzellen enthielt überdies das RIP-Spaltfragment, das am DISC von zVAD-fmk-behandelten Zellen nicht gefunden wurde. Der TRAIL-DISC von cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen enthielt im Vergleich mit der langen, ungespaltenen RIP-Form einen höheren Anteil an gespaltenem RIP.

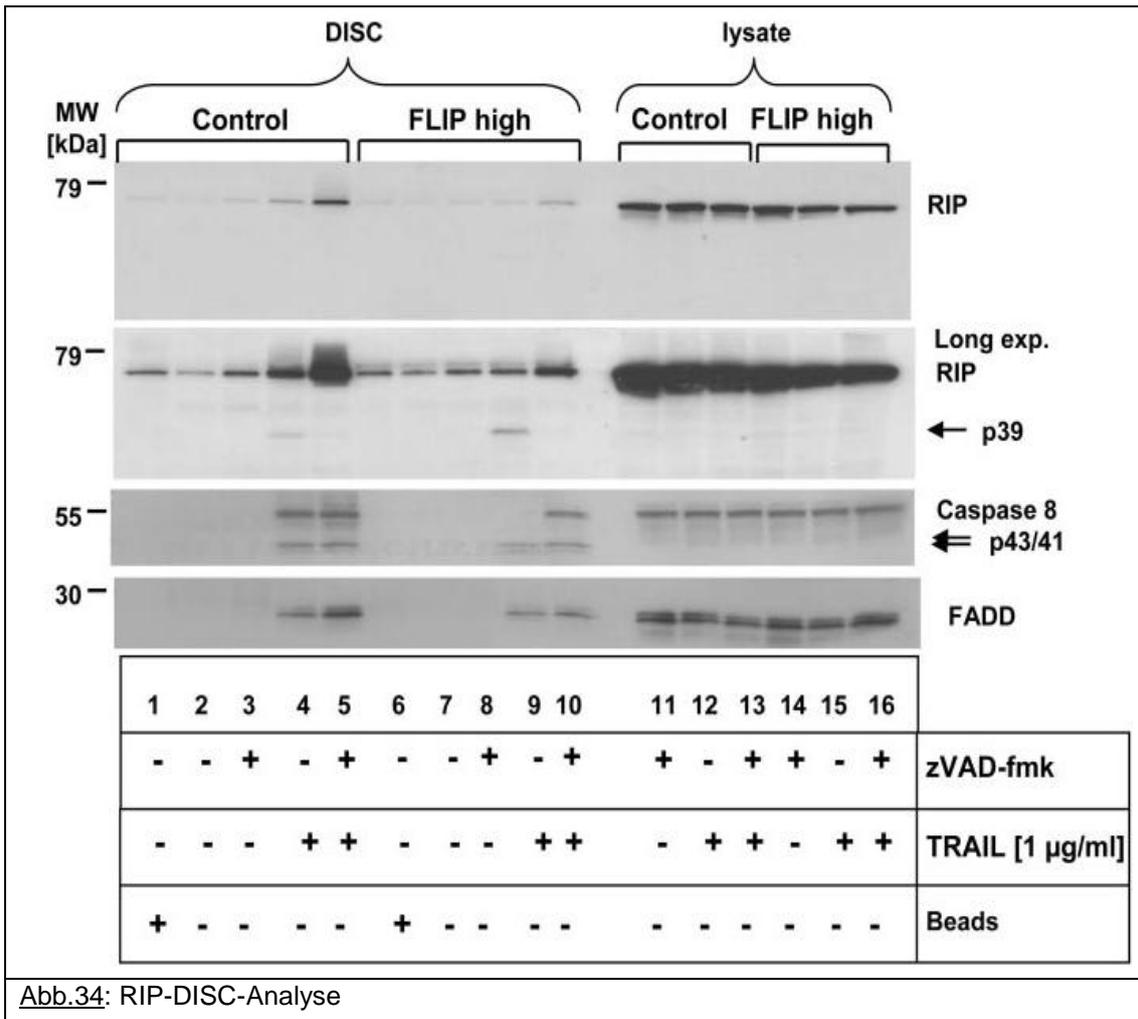


Abb.34: RIP-DISC-Analyse

Dies legt den Schluss nahe, dass RIP in cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Keratinozyten zwar spezifisch an den TRAIL-DISC bindet, jedoch rasch gespalten wird und im Komplex verbleibt. Der starke Anstieg des ungespaltenen RIP des Molekulargewichtes von 74kDa, der im DISC von zVAD-fmk-behandelten Kontrollzellen gefunden wurde, war in den cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen weitgehend reduziert (Abb.34, Reihen 6-10). Zusammenfassend lässt sich anhand unserer Ergebnisse feststellen, dass die Rekrutierung von RIP zum DISC unter dem Einfluss von cFLIP<sub>L</sub> reduziert ist, während die Proteinspaltung am DISC durch cFLIP<sub>L</sub> gesteigert wird. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, wie die TRAIL-vermittelte Aktivierung von NF-κB unter cFLIP<sub>L</sub>-Einfluss blockiert wird, aber die enzymatische Aktivität am TRAIL-DISC durch cFLIP<sub>L</sub> nicht gehemmt wird.

#### IV.) DISKUSSION

Bei zahlreichen Erkrankungen der Haut spielt eine fehlregulierte Apoptose eine wichtige Rolle. Die Aktivierung von Todesrezeptoren wie CD95, TNF- und TRAIL-Rezeptoren kann dabei eine bedeutende Rolle spielen, obwohl bislang Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung dieser Rezeptoren in der Haut fehlen (Wehrli et al. 2000). Klarheit über Zusammenhänge der Signalwege und Regulationsmechanismen der Apoptose zu erlangen, ist daher eine grundlegende Voraussetzung für das feinere Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge in der Haut.

Unsere ersten Experimente im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass IFN $\gamma$  die Expression von TRAIL-R1 und -R2 sowie CD95 auf der Zelloberfläche von HaCaT beeinflusst. Weiterhin fanden wir eine deutliche IFN $\gamma$ -abhängige Sensibilisierung der Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose. Aufgrund der Möglichkeit der Hemmung dieser Wirkung durch zVAD-fmk muss von einem sensibilisierenden Einfluss von IFN $\gamma$  auf den Caspase-Signalweg ausgegangen werden.

IFN $\gamma$  ist ein inflammatorisches Zytokin und spielt für die Entstehung verschiedener entzündlicher Hauterkrankungen bei der Zell-Zell-Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Keratinozyten eine wichtige Rolle. Die IFN $\gamma$ -Sekretion durch CD45-positive T-Zellen ist in diesem Zusammenhang der stärkste Aktivierungsreiz für Keratinozyten, der in diesen zur Aufregulation von Oberflächenproteinen, Chemokinen und Zytokinen führt. Inwieweit IFN $\gamma$  die verschiedenen Regulator-Moleküle des Apoptose-Signalweges beeinflusst, ist noch nicht bekannt und bedarf weiterer Forschung (Kerstan et al. 2009).

In verschiedenen Studien hat sich für TRAIL gezeigt, dass es nicht nur proapoptotische Wirkung besitzt, sondern auch zellspezifische nicht-apoptotische Signale vermittelt, wie beispielsweise die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Leverkus et al. 2003; Harper et al. 2001; Wajant 2003).

Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Moleküle am Rezeptor-Komplex nach TRAIL-Stimulation und die ineinander greifenden und sich gegenseitig beeinflussenden Signalwege sind bislang noch nicht vollständig geklärt und stehen im Zentrum vieler unterschiedlicher wissenschaftlicher Arbeiten.

Wir haben in dieser Promotionsarbeit die Wirkung der cFLIP<sub>L</sub>-Expression besonders auf nicht-apoptotische Signale nach Todesrezeptor-Aktivierung untersucht. Es hat sich gezeigt, dass cFLIP<sub>L</sub> neben der Inhibition von Caspase-8 auch aktivierende Wirkung auf diese Caspase hat (Shu et al. 1997; Srinivasula et al. 1997; Micheau et al. 2002). Das differenzierte Verhältnis zwischen cFLIP<sub>L</sub> und Caspase-8 scheint daher den Ausschlag zu geben, ob cFLIP<sub>L</sub> einen aktivierenden oder hemmenden Einfluss hat. Wir haben gezeigt, dass die Expression von cFLIP<sub>L</sub> in Keratinozyten diese gegen die TRAIL-vermittelte Apoptose resistent macht und einen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität hat, die durch TRAIL induziert wird. Da der Einfluss von cFLIP<sub>L</sub> in unseren Zellen mit steigenden Dosierungen von TRAIL überwunden werden konnte und die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dem Apoptosereiz von der cFLIP<sub>L</sub>-Expression abhängig war, scheinen sich die cFLIP<sub>L</sub>-Konzentrationen unserer Keratinozyten in physiologisch relevanten Dimensionen zu bewegen und einen Vergleich mit primären humanen Keratinozyten zu erlauben.

Obwohl die Rekrutierung der Caspase-8 zum TRAIL-DISC durch cFLIP<sub>L</sub> modifiziert wurde, konnte cFLIP<sub>L</sub> nicht die Rekrutierung der Caspase-8 zum DISC verhindern. Vielmehr änderte sich unter dem Einfluss von cFLIP<sub>L</sub> das Verhältnis der gespaltenen und ungespaltenen Caspase-8 zueinander. Die von uns gewonnenen Daten bestätigen, dass die Steuerung der Prozessierung von Caspase-8 am DISC eine wichtige Funktion von cFLIP<sub>L</sub> darstellt. cFLIP<sub>L</sub> senkt so die Konzentration aktiver Caspase-8 im Zytoplasma.

Die proapoptotischen Signale, die an TRAIL-Rezeptoren generiert werden, wurden bisher intensiv erforscht, während die nicht-apoptotischen Funktionen

weit weniger untersucht worden sind. Ältere Studien konnten nachweisen, dass die Apoptose-Aktivierung durch TRAIL auch zur Genexpression führt. Die Verwendung von Caspase-Inhibitoren wie zVAD-fmk führt entweder zur gesteigerten Aktivierung von Ziel-Genen oder zur TRAIL-abhängigen Transkription (Leverkus et al. 2003; Harper et al. 2001; Chaudhary et al. 2000). Für den natürlichen Caspase-8-Inhibitor cFLIP<sub>L</sub> konnten wir zeigen, dass cFLIP<sub>L</sub> proinflammatorische Ziel-Gene von TRAIL wie IL-8 effektiv blockieren kann. Die Wirkung von cFLIP<sub>L</sub> auf TRAIL-Rezeptor-induzierte Signale unterscheidet sich somit klar von den Effekten von zVAD-fmk. Das Verständnis für diese Unterschiede ist von einiger Bedeutung für den klinischen Einsatz von z.B. Caspase-Inhibitoren in vivo, da deren Verwendung die proinflammatorischen Signalwege durch Todesrezeptoren aktivieren kann, wenn die Apoptose-Induktion blockiert wird (Cauwels et al. 2003).

Der Einfluss von cFLIP<sub>L</sub> auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB ist bislang noch nicht endgültig geklärt. Wir haben untersucht, wie cFLIP<sub>L</sub> die TRAIL-vermittelte Gen-Induktion in Keratinozyten verändert. Frühere Arbeiten liessen eine aktivierende Wirkung von cFLIP<sub>L</sub> auf NF-κB durch Bindung von TRAF-2 an die Caspase-ähnliche Domäne von cFLIP<sub>L</sub> vermuten (Kataoka et al. 2000), die wir aber nicht nachvollziehen konnten. Es wurde angenommen, dass Heterodimere des p43-cFLIP<sub>L</sub>-Fragmentes und die p43/41-Fragmente der Caspase-8 am DISC gebildet werden und dabei NF-κB aktivieren (Kataoka et al. 2004). Diese Studie untersuchte jedoch die direkte Wirkung von p43-cFLIP<sub>L</sub> und ließ den Einfluss der Todesrezeptor-Induktion von NF-κB außen vor. Im Gegensatz dazu legte eine andere Studie die Vermutung nahe, dass die Todesrezeptor-vermittelte NF-κB-Aktivierung durch cFLIP<sub>L</sub> blockiert wird (Wajant et al. 2000).

In unseren Untersuchungen konnten wir keine Unterschiede in der DNA-Bindung von NF-κB innerhalb der verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlicher cFLIP<sub>L</sub>-Expression finden und konnten insgesamt mit mehreren unterschiedlichen Methoden einen hemmenden Einfluss von cFLIP<sub>L</sub> auf die Todesrezeptor-vermittelte NF-κB-Aktivierung zeigen. Wir konnten hier auch

nachweisen, dass nur die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TRAIL, jedoch nicht die durch TNF durch cFLIP<sub>L</sub> beeinflusst wird. Diesen Unterschied zeigt auch die unterschiedliche Liganden-vermittelte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation. Was mag den Unterschied in der NF- $\kappa$ B-Aktivierung mittels TRAIL und TNF ausmachen? Wir fanden NF- $\kappa$ B-Aktivität und I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation innerhalb von 15 bis 30 Minuten nach Stimulation mit TNF, so dass die NF $\kappa$ B-Aktivierung über TNF-Rezeptor 2 durch membrangebundenes TNF unwahrscheinlich ist. Vielmehr legen unsere Ergebnisse nahe, dass NF- $\kappa$ B direkt am TNF-Rezeptor 1 aktiviert wird. Vielleicht könnte die unterschiedliche Aktivierungsplattform von Caspase-8 beim Vergleich von TNF und TRAIL von Bedeutung sein (Diessenbacher et al. 2008; Micheau et al. 2003).

Weiter zeigen unsere Daten, dass die proapoptotischen und Gen-induzierenden Signalwege von TRAIL und TNF nicht identisch sind, ähnlich zu Untersuchungen zum CD95-Rezeptor (Kreuz et al. 2004).

Worin bestehen nun die Unterschiede der nicht-apoptotischen Signalwege von TRAIL im Vergleich von cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen und Kontroll-Keratinocyten unter dem Einfluss eines Caspase-Inhibitors? Wir konnten keinen signifikanten Unterschied bei der Caspasen-Aktivierung im Zytoplasma der Zellen finden, der die TRAIL-vermittelte Gen-Induktion erklären könnte, die wir gefunden haben. Daher untersuchten wir die Vorgänge am DISC. Hier zeigte sich, dass am TRAIL-DISC der gegen Apoptose resistenten cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Keratinocyten hauptsächlich p43/41-Fragmente der Caspase-8 gebunden waren, wogegen bei der DISC-Analyse der sensiblen Zellen, in denen NF- $\kappa$ B-Aktivierung gefunden wurde, große Mengen der langen Form der Caspase-8 gefunden wurden.

Diese Ergebnisse scheinen zu bestätigen, dass cFLIP<sub>L</sub> die Spaltung der Caspase-8 am TRAIL-DISC fördert, dieser Schritt jedoch weder zur Apoptoseauslösung noch zur Geninduktion führt. Eine Erklärung hierfür mag sein, dass die Caspase-8, die im cFLIP<sub>L</sub>/Caspase-8-Komplex gebunden ist, sich nicht von DISC lösen kann und somit nur DISC-assoziierte Proteine spalten kann (Krueger et al. 2001; Chang et al. 2002).

Um mehr Aufschluss über die enzymatischen Fähigkeiten des TRAIL-DISC zu gewinnen, wurde in auf diese Promotionsarbeit aufbauenden Untersuchungen die Fähigkeit der DISC-assoziierten Caspasen untersucht, das Substrat-Protein Bid zu spalten. Wenn die Affinität des kompletten Caspase-8-Spaltfragmentes p18 untersucht wurde, fanden wir unabhängig vom cFLIP<sub>L</sub> vergleichbare Mengen p18 in den unterschiedlichen Zelllinien. Ähnlich wie das zuvor für den CD95-DISC gezeigt werden konnte, scheinen die komplett gespaltenen Spaltprodukte der Caspase-8 am DISC unabhängig von cFLIP<sub>L</sub> gebildet zu werden (Lavrik et al. 2003).

cFLIP<sub>L</sub> scheint die Aktivität der DISC-gebundenen Caspasen nicht nennenswert zu verändern, die Spaltung von Caspase-8 und RIP am DISC geschieht ebenso in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Zellen. Die enzymatische Aktivität des Membrankomplexes scheint also nicht über die TRAIL-induzierte NF-κB-Aktivierung zu entscheiden.

Die cFLIP<sub>L</sub>/Caspase-8-Heterodimere am DISC sind also enzymatisch aktiv, hemmen allerdings die Freisetzung der aktiven Form der Caspase-8 ins Zytoplasma. Dass unter cFLIP<sub>L</sub>-Einfluss der Umsatz von Proteinen am DISC reduziert ist, könnte zu einer Reduzierung der Spaltung und Modifikation von Caspasen und anderen Proteinen am DISC führen.

Warum verzeichnet man unter dem Einfluss des Caspasen-Inhibitors zVAD-fmk aber einen Anstieg der Gen-Induktion? Da dies in verschiedenen Zellarten nachgewiesen werden konnte, wurde postuliert, dass durch die Fähigkeit von zVAD-fmk, die Caspase-Aktivität zu blockieren, ebenfalls die Degradation von NF-κB-aktivierenden Molekülen gehemmt wird (Karin et al. 2002). Unsere Daten zeigen hingegen, dass die Aktivität der Caspase-8 am DISC durch zVAD-fmk nicht so effektiv gehemmt wird wie die der freien zytoplasmatischen Caspase. Möglicherweise stabilisiert zVAD-fmk die kompletten, ungespaltenen Homo- und Heterodimere der Caspase-8 und cFLIP<sub>L</sub>, und dies wird als Auslöser nicht-apoptotischer Signale am DISC benötigt. Weitere aufwändige biochemische Untersuchungen, die den Rahmen dieser Promotion sprengen, werden in Zukunft diesen Aspekt im Detail untersuchen.

Wichtige Einflussfaktoren für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sind das Adaptermolekül TRAF-2 sowie das Receptor-interacting protein RIP (Liu et al. 1996). RIP könnte also eine Erklärung dafür bieten, wie cFLIP<sub>L</sub> die TRAIL-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung beeinflusst. Obwohl die Membrankomplexe des TNF-Rezeptor 1 große Mengen RIP enthalten (Diessenbacher et al. 2008; Micheau et al. 2003; Harper et al. 2003), haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass nur gemeinsam mit Caspase-Inhibitoren eine grosse Rekrutierung von RIP am TRAIL-DISC nachzuweisen ist. Als Zeichen für die schnelle Inaktivierung von RIP durch aktive Caspasen am DISC, wurde – wie auch in unseren Experimenten – gespaltenes RIP am TRAIL-DISC gefunden (Harper et al. 2001). Auch in cFLIP<sub>L</sub>-überexprimierenden Keratinozyten wird RIP am DISC gespalten und war in seiner gespaltenen Form in höherem Masse nachweisbar als die ungespaltene Form von RIP. Diese Daten sprechen gegen die cFLIP<sub>L</sub> zugeschriebene Rolle als Aktivator von NF- $\kappa$ B am DISC (Kataoka et al. 2000), stützen jedoch die These einer durch verschiedene cFLIP-Formen blockierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Kreuz et al. 2004). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass cFLIP<sub>L</sub> die Prozessierung und den Umsatz verschiedener Proteine am DISC blockieren kann, eine Spaltung von RIP wurde nur in den verwendeten Kontrollzellen gefunden. Falls die DISC-assoziierte Spaltung von RIP nicht direkt mit der Induktion von Genen einhergeht, welches DISC-abhängige Signal ist dann hierfür wichtig? Andere Forschungsergebnisse belegen, dass RIP nach der Rekrutierung an den TNF-R1, TRAIL-R1 und -R2 vielfältige Veränderungen (wie z.B. eine Ubiquitinierung) durchläuft (Harper et al. 2001; Micheau et al. 2003). Die Anwesenheit von RIP am TNF-Rezeptorkomplex korreliert interessanterweise direkt mit der TNF-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Wertz et al. 2004). Wir fanden in den cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Zellen eine verminderte Bindung von komplettem und gespaltenem RIP im TRAIL-DISC. cFLIP<sub>L</sub>/Caspase-8-Heterodimere scheinen daher die Rekrutierung und Modifikation von RIP ungünstig zu beeinflussen. Die hier gezeigten Daten bieten eine Erklärung dafür, warum in cFLIP<sub>L</sub>-exprimierenden Keratinozyten fehlende NF- $\kappa$ B-Aktivierung gefunden wird. Ähnlich wie schon für TNF gezeigt

(Micheau et al. 2003), ist die Prozessierung von RIP und die Freisetzung der dabei entstehenden Formen ein wichtiger Baustein der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Wir konnten demnach feststellen, dass cFLIP<sub>L</sub> nicht nur die TRAIL-vermittelte Apoptose hemmt, sondern auch bereits auf der Ebene des DISC die NF- $\kappa$ B-Aktivierung blockiert.

Die Expression von cFLIP<sub>L</sub> in Tumorzellen scheint sowohl das Tumorwachstum als auch die Resistenz der Tumorzellen gegen immunologische Kontrolle zu befördern (Krueger et al. 2001; Medema et al. 1999; Djerbi et al. 1999). Neuere Untersuchungen zeigen, dass CD95L-vermittelte nicht-apoptotische Signalwege wichtig für die Motilität und Invasivität von Tumorzellen sind, falls diese gegen CD95L resistent sind (Barnhart et al. 2004).

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Apoptoseresistenz ein grundlegender Mechanismus bei der Entstehung und Progredienz von Tumorerkrankungen der Haut und ein Problem für deren Therapie darstellt. Beim Basalzellkarzinom fand man eine Aufregulation von Bcl-2-Proteinen sowie eine Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren (Gli-Proteine), durch welche antiapoptotische Moleküle wie cFLIP aufreguliert werden. Unter anderem wurden beim malignen Melanom eine Blockade der Apoptose-Signalwege durch Verlust von BH3-Molekülen (wie z.B. Bid und Bad) sowie eine starke Expression von cFLIP gefunden. Der Regulationsgrad für die Proteine der Bcl-2-Familie konnte beim malignen Melanom als ein entscheidender prognostischer Faktor identifiziert werden. Beim Plattenepithelkarzinom der Haut zeigte sich, dass die Mutation des Tumorsuppressor-Proteins p53 die Apoptoseresistenz während der Tumorprogression aufrecht erhält. Von Therapieoptionen, die auf der Reaktivierung der p53-Funktion oder der Antagonisierung von Bcl-2- oder IAP-Molekülen beruhen, erhofft man sich daher Erfolg bei der Behandlung kutaner Neoplasien (Leverkus 2008; Leverkus et al. 2008).

Unsere Daten demonstrieren, dass die Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B wie auch von chemotaktischen Signalen wichtig für das Verständnis von

Tumorwachstum ist. Modulationen durch cFLIP<sub>L</sub> oder Verwendung von Caspase-Inhibitoren können vielleicht neue Aspekte zur Krebstherapie beitragen, nicht nur durch Reaktivierung von Apoptose-Signalwegen, sondern auch durch Todesrezeptor-vermittelten Geninduktionen, die z.B. neutrophile Zellen anziehen können (Siegmond et al. 2002).

Von besonderer Bedeutung könnte die Blockierung von Signalen in der Apoptose-Signalkette durch Modulation der inhibitor-of-apoptosis-proteins (IAP) wie XIAP sein. Eine Hemmung des intrinsischen Apoptose-Signalweges durch Bcl-2 steigert andererseits die CD95-vermittelte Geninduktion (Kreuz et al. 2004). Ob die Caspase-Aktivierung am DISC und die Freisetzung aktivierter Caspase-8 notwendig für eine Geninduktion sind und wie Schutzmechanismen vor Apoptose durch Moleküle der IAP- und Bcl-2-Familie diese Geninduktion beeinflussen, wird durch weitere zukünftige Studien zu bestimmen sein. Die Expression von cFLIP<sub>L</sub> verhindert Apoptose durch TRAIL und die Aktivierung von NF-κB, scheint jedoch auch andere Signalwege aktivieren zu können, wie das bereits auch schon für Todesrezeptor-initiierte Mitogen-activated-protein(MAP)-Kinasen angenommen wurde (Fang et al. 2004).

Wir konnten zeigen, dass TRAIL-abhängige Apoptose und NF-κB-Signalwege durch cFLIP<sub>L</sub> gehemmt werden. Dennoch ist noch weitere Forschung notwendig, um die Bedeutung der alternativen Todesrezeptor-generierten Signalwege in der Haut sowie auch in anderen Geweben im Detail zu verstehen.

## V.) LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. M. & S. Cory (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-6.
- Altieri, D. C. (2003) Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 3, 46-54.
- Ambrosini, G., C. Adida & D. C. Altieri (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 3, 917-21.
- Appleton, I., N. J. Brown & D. A. Willoughby (1996) Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids. *Am J Pathol*, 149, 1441-7.
- Barnhart, B. C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubici, G. Franzoso & M. E. Peter (2004) CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J*, 23, 3175-85.
- Baud, V. & M. Karin (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11, 372-7.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham & N. E. Fusenig (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106, 761-71.
- Bowen, A. R., A. N. Hanks, S. M. Allen, A. Alexander, M. J. Diedrich & D. Grossman (2003) Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol*, 120, 48-55.
- Bruewer, M., A. Luegering, T. Kucharzik, C. A. Parkos, J. L. Madara, A. M. Hopkins & A. Nusrat (2003) Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 171, 6164-72.
- Cauwels, A., B. Janssen, A. Waeytens, C. Cuvelier & P. Brouckaert (2003) Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol*, 4, 387-93.
- Cece, R., S. Cazzaniga, D. Morelli, L. Sfondrini, M. Bignotto, S. Menard, M. I. Colnaghi & A. Balsari (1996) Apoptosis of hair follicle cells during doxorubicin-induced alopecia in rats. *Lab Invest*, 75, 601-9.
- Chan, A., T. Magnus & R. Gold (2001) Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia*, 33, 87-95.
- Chang, D. W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B. C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M. E. Peter & X. Yang (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J*, 21, 3704-14.
- Chao, D. T. & S. J. Korsmeyer (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, 16, 395-419.
- Chaudhary, P. M., M. T. Eby, A. Jasmin, A. Kumar, L. Liu & L. Hood (2000) Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene*, 19, 4451-60.
- Crompton, M. (2000) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol*, 529 Pt 1, 11-21.

- Crook, N. E., R. J. Clem & L. K. Miller (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67, 2168-74.
- Datta, R., E. Oki, K. Endo, V. Biedermann, J. Ren & D. Kufe (2000) XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem*, 275, 31733-8.
- Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen & J. C. Reed (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, 17, 2215-23.
- Diessenbacher, P., M. Hupe, M. R. Sprick, A. Kerstan, P. Geserick, T. L. Haas, T. Wachter, M. Neumann, H. Walczak, J. Silke & M. Leverkus (2008) NF-kappaB inhibition reveals differential mechanisms of TNF versus TRAIL-induced apoptosis upstream or at the level of caspase-8 activation independent of cIAP2. *J Invest Dermatol*, 128, 1134-47.
- Djerbi, M., V. Screpanti, A. I. Catrina, B. Bogen, P. Biberfeld & A. Grandien (1999) The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med*, 190, 1025-32.
- Dockrell, D. H. (2001) Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infect*, 42, 227-34.
- Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. E. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. S. Salvesen, J. C. Reed & D. C. Altieri (2004) An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 34087-90.
- Fang, L. W., T. S. Tai, W. N. Yu, F. Liao & M. Z. Lai (2004) Phosphatidylinositide 3-kinase priming couples c-FLIP to T cell activation. *J Biol Chem*, 279, 13-8.
- Formigli, L., A. Conti & D. Lippi (2004) "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med*, 95, 159-64.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson & N. A. Thornberry (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*, 273, 32608-13.
- Gellerich, F. N., S. Trumbeckaite, J. R. Opalka, E. Seppet, H. N. Rasmussen, C. Neuhoff & S. Zierz (2000) Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. *Biochem Soc Trans*, 28, 164-9.
- Geserick, P., C. Drewniok, M. Hupe, T. L. Haas, P. Diessenbacher, M. R. Sprick, M. P. Schon, F. Henkler, H. Gollnick, H. Walczak & M. Leverkus (2008) Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene*, 27, 3211-20.
- Geserick, P., M. Hupe, M. Moulin, W. W. Wong, M. Feoktistova, B. Kellert, H. Gollnick, J. Silke & M. Leverkus (2009) Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J Cell Biol*, 187, 1037-54.
- Goldsby, R. A. (2000) KUBY Immunology. W H Freeman and Company, 4. Aufl. ISBN: 978-0716133317.
- Griffith, T. S., T. Brunner, S. M. Fletcher, D. R. Green & T. A. Ferguson (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270, 1189-92.

- Grignani, F., T. Kinsella, A. Mencarelli, M. Valtieri, D. Riganelli, L. Lanfrancone, C. Peschle, G. P. Nolan & P. G. Pelicci (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res*, 58, 14-9.
- Gulbins, E., S. Dreschers & J. Bock (2003) Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol*, 88, 85-90.
- Haake, A. R. & R. R. Polakowska (1993) Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J Invest Dermatol*, 101, 107-12.
- Harada, H. & S. Grant (2003) Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol*, 7, 117-38.
- Harper, N., S. N. Farrow, A. Kaptein, G. M. Cohen & M. MacFarlane (2001) Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem*, 276, 34743-52.
- Harper, N., M. Hughes, M. MacFarlane & G. M. Cohen (2003) Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 278, 25534-41.
- Hayashi, T. & D. L. Faustman (2001) Implications of altered apoptosis in diabetes mellitus and autoimmune disease. *Apoptosis*, 6, 31-45.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri & E. S. Alnemri (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*, 277, 432-8.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French & J. Tschopp (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-5.
- Karin, M. & A. Lin (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 3, 221-7.
- Kataoka, T. (2005) The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol*, 25, 31-58.
- Kataoka, T., R. C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmeler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacsovics & J. Tschopp (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*, 10, 640-8.
- Kataoka, T. & J. Tschopp (2004) N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 24, 2627-36.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie & A. R. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Kerstan, A., M. Leverkus & A. Trautmann (2009) Effector pathways during eczematous dermatitis: where inflammation meets cell death. *Exp Dermatol*, 18, 893-9.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Kramer & M. E. Peter (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14, 5579-88.
- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim & A. Ashkenazi (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12, 611-20.

- Konur, A., U. Schulz, G. Eissner, R. Andreesen & E. Holler (2005) Interferon (IFN)-gamma is a main mediator of keratinocyte (HaCaT) apoptosis and contributes to autocrine IFN-gamma and tumour necrosis factor-alpha production. *Br J Dermatol*, 152, 1134-42.
- Kreuz, S., D. Siegmund, J. J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich & H. Wajant (2004) NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol*, 166, 369-80.
- Krueger, A., S. Baumann, P. H. Krammer & S. Kirchhoff (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, 21, 8247-54.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer & S. Kirchhoff (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 276, 20633-40.
- LaCasse, E. C., S. Baird, R. G. Korneluk & A. E. MacKenzie (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17, 3247-59.
- Lavrik, I., A. Krueger, I. Schmitz, S. Baumann, H. Weyd, P. H. Krammer & S. Kirchhoff (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ*, 10, 144-5.
- Leverkus, M. (2008) Apoptose-Mechanismen in der Onkogenese von Hauttumoren. *Akt Dermatol*, 34, 313-8.
- Leverkus, M., P. Diessenbacher & P. Geserick (2008) FLIP ing the coin? Death receptor-mediated signals during skin tumorigenesis. *Exp Dermatol*, 17, 614-22.
- Leverkus, M., M. Neumann, T. Mengling, C. T. Rauch, E. B. Brocker, P. H. Krammer & H. Walczak (2000) Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res*, 60, 553-9.
- Leverkus, M., M. R. Sprick, T. Wachter, A. Denk, E. B. Brocker, H. Walczak & M. Neumann (2003) TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. *J Invest Dermatol*, 121, 149-55.
- Leverkus, M., M. R. Sprick, T. Wachter, T. Mengling, B. Baumann, E. Serfling, E. B. Brocker, M. Goebeler, M. Neumann & H. Walczak (2003) Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol*, 23, 777-90.
- Li, L. Y., X. Luo & X. Wang (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- Lin, Y., A. Devin, A. Cook, M. M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz & Z. G. Liu (2000) The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol*, 20, 6638-45.
- Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez & Z. G. Liu (1999) Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev*, 13, 2514-26.
- Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel & M. Karin (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87, 565-76.
- Luo, W. & S. H. Lin (1997) Generation of moderate amounts of polyclonal antibodies in mice. *Biotechniques*, 23, 630-2.

- MacFarlane, M. (2003) TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*, 139, 89-97.
- Marienfeld, R., F. Berberich-Siebelt, I. Berberich, A. Denk, E. Serfling & M. Neumann (2001) Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF-kappaB control. *Oncogene*, 20, 8142-7.
- Martinon, F., N. Holler, C. Richard & J. Tschopp (2000) Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett*, 468, 134-6.
- Medema, J. P., J. de Jong, T. van Hall, C. J. Melief & R. Offringa (1999) Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med*, 190, 1033-8.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer & M. E. Peter (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 16, 2794-804.
- Medema, J. P., R. E. Toes, C. Scaffidi, T. S. Zheng, R. A. Flavell, C. J. Melief, M. E. Peter, R. Offringa & P. H. Krammer (1997) Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol*, 27, 3492-8.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand & M. G. Grutter (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 277, 45162-71.
- Micheau, O. & J. Tschopp (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114, 181-90.
- Mueller, M. M. & N. E. Fusenig (2002) Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation*, 70, 486-97.
- Nicholson, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- Nicholson, D. W. & N. A. Thornberry (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22, 299-306.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani & C. Riccardi (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139, 271-9.
- Offen, D., H. Elkon & E. Melamed (2000) Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm Suppl*, 153-66.
- Paquet, P., E. Jacob, P. Damas & G. E. Pierard (2001) Treatment of drug-induced toxic epidermal necrolysis (Lyell's syndrome) with intravenous human immunoglobulins. *Burns*, 27, 652-5.
- Rasper, D. M., J. P. Vaillancourt, S. Hadano, V. M. Houtzager, I. Seiden, S. L. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B. F. Koop, E. P. Peterson, N. A. Thornberry, J. Huang, D. P. MacPherson, S. C. Black, F. Hornung, M. J. Lenardo, M. R. Hayden, S. Roy & D. W. Nicholson (1998) Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, 5, 271-88.
- Ravagnan, L., T. Roumier & G. Kroemer (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*, 192, 131-7.

- Reed, J. C. (1999) Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*, 11, 68-75.
- Rossi, D. & G. Gaidano (2003) Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*, 88, 212-8.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen & J. C. Reed (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*, 16, 6914-25.
- Sartorius, U., I. Schmitz & P. H. Krammer (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*, 2, 20-9.
- Schimmer, A. D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, 64, 7183-90.
- Schmidt, M., M. Hupe, N. Endres, B. Raghavan, S. Kavuri, P. Geserick, M. Goebeler & M. Leverkus (2010) The contact allergen nickel sensitizes primary human endothelial cells and keratinocytes to TRAIL-mediated apoptosis. *J Cell Mol Med*, 14, 1760-76.
- Schultz, D. R. & W. J. Harrington, Jr. (2003) Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*, 32, 345-69.
- Sen, S. (1992) Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 67, 287-319.
- Sgonc, R., M. S. Gruschwitz, H. Dietrich, H. Recheis, M. E. Gershwin & G. Wick (1996) Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest*, 98, 785-92.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman & Y. Shi (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, 11, 519-27.
- Shu, H. B., D. R. Halpin & D. V. Goeddel (1997) Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, 6, 751-63.
- Siegel, R. M., J. Muppidi, M. Roberts, M. Porter & Z. Wu (2003) Death receptor signaling and autoimmunity. *Immunol Res*, 27, 499-512.
- Siegmund, D., P. Hadwiger, K. Pfizenmaier, H. P. Vornlocher & H. Wajant (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, 725-32.
- Silke, J., T. Kratina, D. Chu, P. G. Ekert, C. L. Day, M. Pakusch, D. C. Huang & D. L. Vaux (2005) Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16182-7.
- Soengas, M. S., P. Capodiceci, D. Polsky, J. Mora, M. Esteller, X. Opitz-Araya, R. McCombie, J. G. Herman, W. L. Gerald, Y. A. Lazebnik, C. Cordon-Cardo & S. W. Lowe (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409, 207-11.
- Soria Gonzalez, J. E. & M. Orea Solano (2002) [Apoptosis]. *Rev Alerg Mex*, 49, 121-8.
- Sprick, M. R. & H. Walczak (2004) The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1644, 125-32.

- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, S. Otilie, F. Bullrich, S. Banks, Y. Wang, T. Fernandes-Alnemri, C. M. Croce, G. Litwack, K. J. Tomaselli, R. C. Armstrong & E. S. Alnemri (1997) FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 272, 18542-5.
- Stassi, G., D. Di Liberto, M. Todaro, A. Zeuner, L. Ricci-Vitiani, A. Stoppacciaro, L. Ruco, F. Farina, G. Zummo & R. De Maria (2000) Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nat Immunol*, 1, 483-8.
- Strasser, A., L. O'Connor & V. M. Dixit (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69, 217-45.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger & G. Kroemer (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-6.
- Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio & R. Takahashi (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, 8, 613-21.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, K. Nakata, J. C. Reed & R. Takahashi (2001) X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*, 276, 27058-63.
- Tamm, I., Y. Wang, E. Sausville, D. A. Scudiero, N. Vigna, T. Oltersdorf & J. C. Reed (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 58, 5315-20.
- Thome, M. & J. Tschopp (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*, 1, 50-8.
- Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.
- Trauth, B. C., C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K. M. Debatin & P. H. Krammer (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245, 301-5.
- Tsujimoto, Y., J. Gorham, J. Cossman, E. Jaffe & C. M. Croce (1985) The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229, 1390-3.
- van Loo, G., X. Saelens, M. van Gorp, M. MacFarlane, S. J. Martin & P. Vandenabeele (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*, 9, 1031-42.
- Van Parijs, L., Y. Refaeli, A. K. Abbas & D. Baltimore (1999) Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity*, 11, 763-70.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson & D. L. Vaux (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43-53.

- Verhagen, A. M., J. Silke, P. G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L. M. Connolly, C. L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R. L. Moritz, R. J. Simpson & D. L. Vaux (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*, 277, 445-54.
- Viard-Leveugle, I., R. R. Bullani, P. Meda, O. Micheau, A. Limat, J. H. Saurat, J. Tschopp & L. E. French (2003) Intracellular localization of keratinocyte Fas ligand explains lack of cytolytic activity under physiological conditions. *J Biol Chem*, 278, 16183-8.
- Vogler, M., H. Walczak, D. Stadel, T. L. Haas, F. Genze, M. Jovanovic, J. E. Gschwend, T. Simmet, K. M. Debatin & S. Fulda (2008) Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 68, 7956-65.
- Wajant, H. (2003) Death receptors. *Essays Biochem*, 39, 53-71.--- (2004) TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm*, 67, 101-32.
- Wajant, H., E. Haas, R. Schwenzler, F. Muhlenbeck, S. Kreuz, G. Schubert, M. Grell, C. Smith & P. Scheurich (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, 24357-66.
- Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin & C. T. Rauch (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*, 16, 5386-97.
- Watanabe, Y., O. Suzuki, T. Haruyama & T. Akaike (2003) Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem*, 89, 244-53.
- Wehrli, P., I. Viard, R. Bullani, J. Tschopp & L. E. French (2000) Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol*, 115, 141-8.
- Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D. L. Boone, A. Ma, E. V. Koonin & V. M. Dixit (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430, 694-9.
- Winiski, A. P. & C. A. Foster (1992) ICAM-1 expression in a spontaneously transformed human keratinocyte cell line: characterization by a simple cell-ELISA assay. *J Invest Dermatol*, 99, 48-52.
- Yang, Y. L. & X. M. Li (2000) The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res*, 10, 169-77.
- Zamzami, N. & G. Kroemer (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 67-71.
- Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, P. X. Petit & G. Kroemer (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*, 181, 1661-72.
- Zhang, S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella & D. Wallach (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*, 12, 301-11.

Zhang, X. D., A. V. Franco, T. Nguyen, C. P. Gray & P. Hersey (2000) Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol*, 164, 3961-70.

Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg & X. Wang (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90, 405-13.

## Danksagung

*“Aller Anfang ist leicht.*

*Erst die Vollendung ist schwer”*

(C.M. v. Cammerloher)

In diesem Sinne danke ich all jenen, die mich in der Vergangenheit im Ringen um die Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt hier vor allem meinem Doktorvater Professor Martin Leverkus, der mir mit unerschütterlicher Geduld stets ein verlässlicher Ansprechpartner war. Hervorheben möchte ich auch Frau Dr. Tina Giner (ehemals Wachter), die nach einem schönen Sommer im Zellkulturlabor der Dermatologie Würzburg auch in den darauf folgenden Wintern die Hoffnung nie verlor und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Den Mitarbeitern in den Laboren der Hautklinik und der Frauenklinik danke ich für die allzeit freundliche Hilfe bei der Laborarbeit, mein besonderer Dank richtet sich hier an Frau Evi Horn und Frau Kirsty McPherson.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden und meiner geliebten Frau Nicole danke ich sehr für die vielen aufmunternden und aufbauenden Worte, die helfenden Hände und dafür, dass ihr den Glauben an mich nie verloren habt. Ich danke euch allen!

## Lebenslauf

Name

**Dominikus Hausmann**

Geburtsdatum/ -ort

08. April 1977 in Eichstätt

### Studium

1998- 2005

Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

06/ 2005

3.Staatsexamen

03/ 2004

2.Saatsexamen

08/ 2001

1.Staatsexamen

09/ 2000

Physikum