

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION DES
ADENOVIRALEN PROTEINS E3-14.7K UND DER
INITIATORCASPASE-8**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janina Podolsky
2012

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INTERAKTION DES
ADENOVIRALEN PROTEINS E3-14.7K UND DER
INITIATORCASPASE-8**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janina Podolsky
2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: PD Dr. Wulf Schneider
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hehlsgans
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 2013

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2009 bis April 2012 unter der Anleitung von PD Dr. Wulf Schneider am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg.

Für meine Eltern und Sebastian

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Apoptose.....	1
1.2 Die Induktion der Apoptose.....	2
1.2.1 Der intrinsische Apoptoseweg	2
1.2.2 Der extrinsische Apoptoseweg	3
1.3 Caspase und ihre Signalkaskaden	6
1.3.1 Caspase-8.....	8
1.4 TNF und die TNF-Rezeptoren 1 und 2.....	9
1.4.1 TNF-Signaltransduktion durch den TNFR1.....	10
1.5 Viren und Apoptose	13
1.5.1 Strategien der viralen Apoptoseinhibition	13
1.6 Adenoviren.....	16
1.6.1 Das adenovirale Genom und seine E3-Region.....	17
1.6.2 E3-14.7K.....	18
2. Ziel der Arbeit.....	20
3. Material und Methoden.....	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	21
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	22
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4 Geräte	23
3.1.5 Kits.....	24
3.1.6 Enzyme	24
3.1.7 Zelllinien/ Bakterienstämme	25
3.1.8 Primer	25
3.1.9 Plasmide	26
3.1.10 Sequenzierung.....	26
3.2 Methoden	27

3.2.1 Molekularbiologie	27
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
3.2.1.2 Kinasierung	28
3.2.1.3 Klonierung	29
3.2.1.4 Transformation in kompetente Zellen	30
3.2.1.7 DNA-Restriktion.....	31
3.2.2 Zellkultur	32
3.2.2.1 Kultivierung der Zellen.....	32
3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	33
3.2.2.3 Transfektion	33
3.2.2.4 Caspase-8-Inhibition.....	35
3.2.2.5 Transfektionskontrolle	35
3.2.2.6 Zytotoxizitätsassay	35
3.2.2.7 Mammalian Two-Hybrid Assay	36
3.2.2.8 Herstellung von Proteinlysaten	39
3.2.2.9 Quantitative Proteinbestimmung.....	40
3.2.2.10 Immunpräzipitation	41
3.2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
3.2.2.12 Western-Blot.....	43
3.2.2.13 Antikörper	44
4. Ergebnisse.....	45
4.1 Darstellung der 14.7K-medierten TNF-Resistenz im Zytotoxizitätsassay	45
4.2 Hemmung der Apoptose in H1299/14.7K durch Blockade der Caspase-8-Kaskade	46
4.3 Inhibition der Apoptose durch 14.7K nach Caspase-8- Überexpression	49
4.4 Untersuchung der Interaktion von 14.7K und Caspase-8 mit Hilfe des Mammalian Two-Hybrid Assays	51
4.5 Expressionsnachweis der Caspase-8-Konstrukte	59
4.5.1 Detektierte Fusionsproteine.....	60

4.5.2 Nicht-detektierte Fusionsproteine	61
5. Diskussion.....	69
5.1 Mammalian Two-Hybrid Assay.....	70
5.1.1 Caspase-8 in pCMV-AD	71
5.1.2 Caspase-8 in pCMV-BD	72
5.1.3 Bindung der Caspase-8-DEDs untereinander	73
5.1.4 Caspase-8 und FADD	74
5.1.5 Caspase-8 und CrmA.....	74
5.2 Western-Blot-Analysen	75
6. Zusammenfassung	77
7. Anhang.....	80
7.1 Abkürzungen	80
7.2 Abbildungsverzeichnis	82
7.3 Tabellenverzeichnis	82
8. Literaturverzeichnis.....	84
9. Danksagung	94

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Bereits seit dem 19. Jahrhundert beschäftigt sich die Wissenschaft mit dem Phänomen des regulierten Zelltodes. Wurde er damals noch allgemein als natürlicher Zelltod beschrieben (Clarke and Clarke 1995), so etablierte die Arbeitsgruppe um Kerr in den 70er Jahren den Begriff der Apoptose (Kerr, Wyllie, and Currie 1972). Dieser ist abgeleitet aus dem Griechischen (*apo*: von, weg und *ptosis*: Fall) und bezeichnet frei übersetzt das Herabfallen der Blätter im Herbst. Kerr hatte ein Jahr zuvor bereits einen Prozess beschrieben, den er „*shrinking necrosis*“ nannte, weil hier die Zellen nicht platzen, sondern im Gegenteil schrumpften (Kerr, 1971). In ihrer Arbeit definierten Kerr, Wyllie und Currie weitere morphologische Merkmale der Apoptose wie die Fragmentierung des Zellkerns, die Ausstülpung der Zellmembran (*membrane blebbing*) sowie die Abschnürung apoptotischer Körperchen (*apoptotic bodies*). Mittlerweile zählen auch der Abbau der nukleären DNA zu definierten Fragmenten (*DNA laddering*) und die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche zu den Charakteristika der Apoptose (Cohen et al. 1994; Martin et al. 1995). Eine andere Form des Zelltods ist die Nekrose (gr.: *nékrōsis*: Absterben). Während die Apoptose als physiologischer Zelltod aktiv unter Energieaufwand abläuft, wird bei der Nekrose keine Energie verbraucht. Zunächst kommt es durch mechanische, thermische oder chemische Reize zur Beschädigung der Zellmembran oder einer Änderung ihrer Permeabilität. Daraufhin strömt ungehindert Wasser ins Zellinnere, die Zelle platzt und ihr Inhalt ergießt sich in das umliegende Gewebe. Dadurch entwickeln sich, anders als bei der Apoptose, Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe.

Beide Formen des Zelltods lassen sich zwar morphologisch leicht voneinander abgrenzen, weisen jedoch auf biochemischer Ebene oft Gemeinsamkeiten auf. So können bei nekrotischen Vorgängen auch apoptotische Merkmale vorkommen und umgekehrt (Collins et al. 1992).

Merkmale aus beiden Vorgängen können auch in anderen Formen des regulierten Zelltods erkannt werden. Hierzu gehören die Paraptose, Nekroptose, Onkose sowie

die Autophagozytose (Fadeel and Orrenius 2005). Physiologisch spielen apoptotische Mechanismen nicht nur bei der Ontogenese eine Rolle, sondern schützen den Organismus vor Autoimmunität und sorgen zudem für die Eliminierung entarteter und virusinfizierter Zellen (Ishizuya-Oka and Shimozawa 1992; Krammer 2000). Ein verändertes Maß an Apoptose oder ihr Fehlen kann eine Vielzahl an Krankheiten zur Folge haben. So tritt beispielsweise Morbus Alzheimer als Folge einer neuronalen Degeneration im zentralen Nervensystem auf (Nikolaev et al. 2009).

1.2 Die Induktion der Apoptose

Um in einer Zelle Apoptose zu induzieren, bedarf es definierter Stimuli. Je nach Art des Reizes werden zwei verschiedene Mechanismen unterschieden: der intrinsische und der extrinsische Apoptoseweg (Fadeel and Orrenius 2005). Am Anfang des intrinsischen Weges steht stets die Störung der normalen Zellfunktion, z.B. durch DNA-Schädigung, ionisierende Strahlung oder Hypoxie (Danial and Korsmeyer 2004). Es kommt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, welcher den Zellzyklus stoppt, um die Reparatur der DNA zu ermöglichen. Schlägt dies fehl, so induziert er durch die Expression von proapoptotischen Proteinen und Todesrezeptoren wie z.B. CD95/Fas, TNFR1 oder TRAIL (Liu and Chen 2006) Apoptose. Die Zelle wird nun auch für den extrinsischen Apoptoseweg sensibel, an dessen Anfang die Bindung des entsprechenden Liganden an seinen Todesrezeptor steht (Owen-Schaub et al. 1995).

1.2.1 Der intrinsische Apoptoseweg

Maßgeblich für den Ablauf des intrinsischen Apoptosewegs ist die nach dem Stimulus einsetzende Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, welches im Cytosol mit dATP an das Adapterprotein Apaf-1 bindet. Hieran wird schließlich Procaspsase-9 rekrutiert, wobei die aktive Form der Caspase-9 als makromolekularer Komplex entsteht (Cain et al. 2000; Rodriguez and Lazebnik 1999). Dieser Schritt entspricht der Bildung des Apoptosoms (P. Li et al. 1997; Acehan et al. 2002).

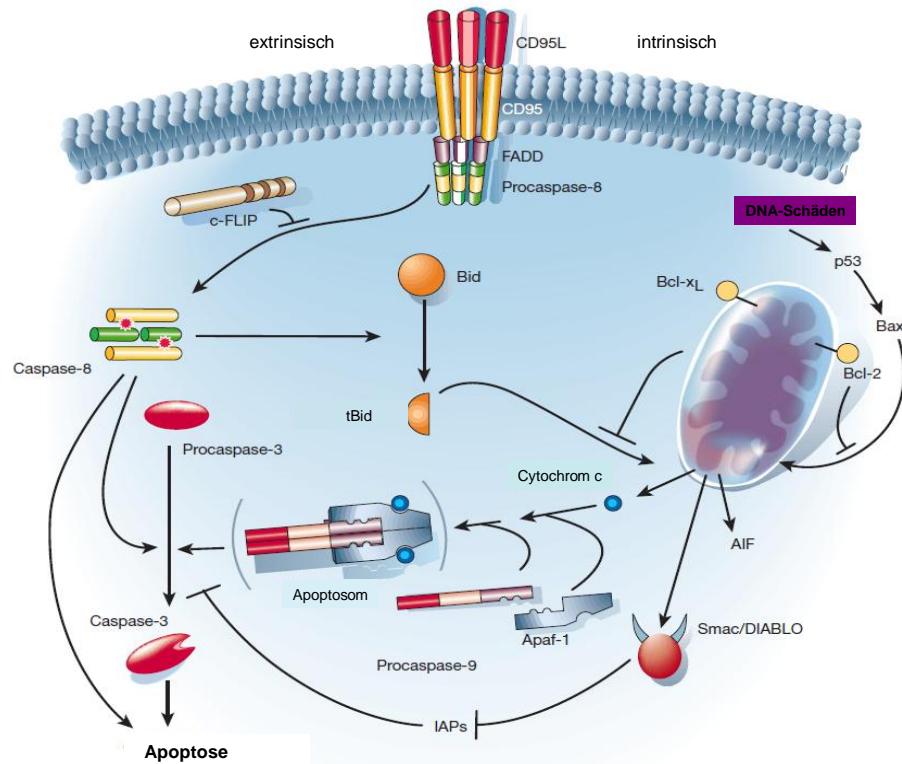
Anschließend kommt es zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -7 und -6, welche verschiedene, proapoptotisch wirkende Proteine aktivieren und damit letztlich für die charakteristische apoptotische Morphologie der Zelle sorgen. Die Aktivierung der Effektorcaspasen markiert den Beginn der gemeinsamen Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem Apoptoseweg. Neben Cytochrom c kommt es außerdem zur Ausschüttung weiterer Proteine aus den Mitochondrien wie AIF, einem Flavoprotein, und Smac/DIABLO. Diese sind Caspase-unabhängig am apoptotischen Prozess beteiligt (C. Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000). Ob es überhaupt zur Ausschüttung dieser mitochondrialen apoptotischen Proteine kommt, wird durch Proteine der Bcl-2-Familie, zu der sowohl pro- als auch antiapoptotische Vertreter zählen, bestimmt. Letztendlich entscheidet das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Proteinen über das Schicksal der Zellen (Zamzami and Kroemer 2001). Auch als Verbindungsstelle zwischen beiden Apoptosewegen fungiert ein Mitglied der Bcl-2-Familie, das proapoptotische Protein Bid. Dieses kann durch die extrinsisch aktivierte Caspase-8 zu tBid gespalten werden, transloziert in die äußere Mitochondrienmembran und bewirkt dort die Freisetzung von Cytochrom c. Grundsätzlich ist dieser "Crosstalk" aber gering ausgeprägt, beide Wege laufen größtenteils unabhängig voneinander ab (Gross et al. 1999; Hengartner 2000).

1.2.2 Der extrinsische Apoptoseweg

Am Anfang des extrinsischen Weges steht stets eine Interaktion zwischen einem zellmembranständigen Rezeptor und seinem Liganden. Bis heute sind 6 dieser sogenannten Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie bekannt: TNFR1, CD95/Fas, DR3, TRAILR1, TRAILR2 und DR6 (Gonzalvez and Ashkenazi 2010). Zu ihren Liganden gehören unter anderem TNF, FasL und TRAIL, welche größtenteils von Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet und ausgeschüttet werden (Sayers 2011). Unerlässlich für die Signalübermittlung durch den aktivierte Rezeptor ist der Besitz einer intrazellulären Todesdomäne (DD, death domain), die je nach Rezeptor aus 65-80 Aminosäuren besteht (Idriss and Naismith 2000). Die Todesdomäne dient als Plattform für die Rekrutierung von Adapterproteinen, die gemeinsam den DISC

(death-inducing signaling complex) zur Apoptoseinduktion bilden. Die Zusammensetzung am DISC kann sich jedoch zwischen den Todesrezeptoren unterscheiden (Gonzalvez and Ashkenazi 2010). So binden TRAILR1 und 2 als Adapterproteine zunächst FADD (fas-associated death domain). FADD besitzt zusätzlich zu seiner DD eine weitere Protein-Interaktionsdomäne am N-Terminus, die sogenannte DED (death effector domain), über welche nun Caspase-8 rekrutiert wird. So kommt es zur Bildung des DISC.

TNFR1 sowie DR3 rekrutieren zur Bildung des DISC zunächst TRADD (TNF-receptor-associated death domain) an ihre DD. An TRADD bindet FADD und daran schließlich Caspase-8. So kommt es auch hier zur Ausbildung des DISC. Der molekulare Mechanismus von DR6 zur Apoptoseinduktion ist noch unbekannt (Algeciras-Schimnich et al. 2003; I. Lavrik, Golks, and Krammer 2005; N. S. Wilson, Dixit, and Ashkenazi 2009; Peter and Krammer 2003). Weitere Ergebnisse zeigen, dass auch Caspase-10 an FADD in den DISC rekrutiert wird. Ob ihr eine spezielle oder nur unterstützende Aufgabe in der Apoptoseinduktion zukommt, ist nicht geklärt (Wang et al. 2001; Kischkel et al. 2001). Durch die Rekrutierung der Caspase-8 wird ihre Proform durch autokatalytische Spaltung in die aktive Form überführt und dissoziiert aus dem DISC (Muzio et al. 1996). Caspase-8 aktiviert nun die Caspase-3-Signalkaskade als gemeinsame Endstrecke der beiden Apoptosewege.

**Abbildung 1: Apoptosewege**

Als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie z.B. Schäden an der DNA erfolgt die Apoptoseinduktion auf dem intrinsischen Weg. Über eine Veränderung der Membranpermeabilität der Mitochondrien kommt es mit Hilfe von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen zur Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol. Dieses bildet dort mit Apaf-1 und ProCaspase-9 einen Komplex, welcher als Apoptosom bezeichnet wird und zur Aktivierung der Caspase-9 führt. Über die Spaltung der ProCaspase-3 in ihre aktive Form kommt es schließlich zur Apoptose. Die über den extrinsischen Weg vermittelte Apoptose wird über Rezeptoren der TNFR-Superfamilie gesteuert. Nach Bindung eines Liganden werden an die Todesdomäne des Rezeptors die Adapterproteine FADD und Caspase-8, im Falle des TNFR1 zusätzlich TRADD rekrutiert, welche zusammen den DISC (death-inducing signaling complex) bilden. Über die Aktivierung der Caspase-8 kommt es schließlich erneut zum Ablauf der Caspasekaskade als gemeinsame Endstrecke beider Apoptosewege. Über das Protein Bid, welches durch Caspase-8 zu tBid gespalten wird, kommt es zu einem gering ausgeprägten „Crosstalk“ zwischen beiden Wegen. Eine Gegenregulation der Apoptose ist u. a. über zelleigene IAPs (inhibitors-of-apoptosis protein) und c-FLIPs (cellular FLICE-like inhibitory protein) möglich.

Verändert nach Hengartner, 2000.

1.3 Caspasen und ihre Signalkaskaden

Der Mehrzahl der bis heute 15 bekannten Caspasen in Säugetieren kommt im Apoptosemechanismus der Zelle eine Schlüsselrolle zu. Caspasen (cysteine-aspartate specific protease) sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate C-terminal nach Aspartatresten schneiden (Alnemri et al. 1996). Sie gehören zur Familie der Interleukin-1 β -Konvertasen und können in zwei große Subfamilien eingeteilt werden, die inflammatorischen und apoptotischen Caspasen. Die apoptotischen Caspasen wiederum lassen sich in zwei Untergruppen gliedern, die Initiator- und Effektorcaspasen (Chowdhury, Tharakan, and Bhat 2008).

Alle Caspasen liegen in der Zelle zunächst als inaktive Proformen (Zymogene) vor und haben eine Größe von 30-50 kDa (Earnshaw, Martins, and Kaufmann 1999). Sie bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne gefolgt von je einer großen und einer kleinen Untereinheit mit jeweils etwa 20 (p20) beziehungsweise 10 kDa (p10), wobei bei einigen Caspasen die Untereinheiten durch eine Zwischensequenz getrennt werden (Thornberry and Lazebnik 1998). Die drei verschiedenen Caspasegruppen unterscheiden sich in ihrer Prodomäne.

Zu den inflammatorischen Proteasen gehören Caspase-1, -4, -5, -12, -13 und -14, auf sie soll in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Die zu den apoptotischen Caspasen gehörige Gruppe der Initiatorcaspasen besitzt eine lange Prodomäne mit mehr als 90 Aminosäuren, in welcher sich bei Caspase-8 und -10 zwei Tandem-DEDs (death effector domain) und bei Caspase-2 und -9 eine CARD (caspase-recruitment domain) befinden (Muzio et al. 1996; Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Die DED- und CARD-Regionen sind entscheidend für die Rekrutierung der Caspasen an Adaptermoleküle bei proapoptotischen Signalkomplexen, z.B. Bindung von Caspase-8 an FADD bei der rezeptorvermittelten Apoptose. Die Gruppe der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 schließlich besitzt lediglich eine kurze Prodomäne mit etwa 30 Aminosäuren ohne DED oder CARD. Diese Caspasen werden durch Initiatorcaspasen aktiviert und führen zur Zerstörung der Zelle, z.B. durch Abbau von Laminin oder Aktin und Aktivierung sekundärer Zielproteine (I. N. Lavrik, Golks, and Krammer 2005). Bei allen Caspasen kommt es durch selektive proteolytische Spaltung zur Ausbildung

der aktiven Form. Nach Abspaltung der Prodomäne ist sie definiert als Heterotetramer mit zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten [$p20_2-p10_2$] (Chowdhury, Tharakan, and Bhat 2008). Jede aktivierte Caspase besitzt als Heterotetramer demnach zwei aktive Zentren, welche sich an gegenüberliegender Position befinden. An der Bildung der aktiven Zentren sind die Aminosäuren Cystein und Histidin beteiligt, welche in der p20-Untereinheit lokalisiert sind (K. P. Wilson et al. 1994).

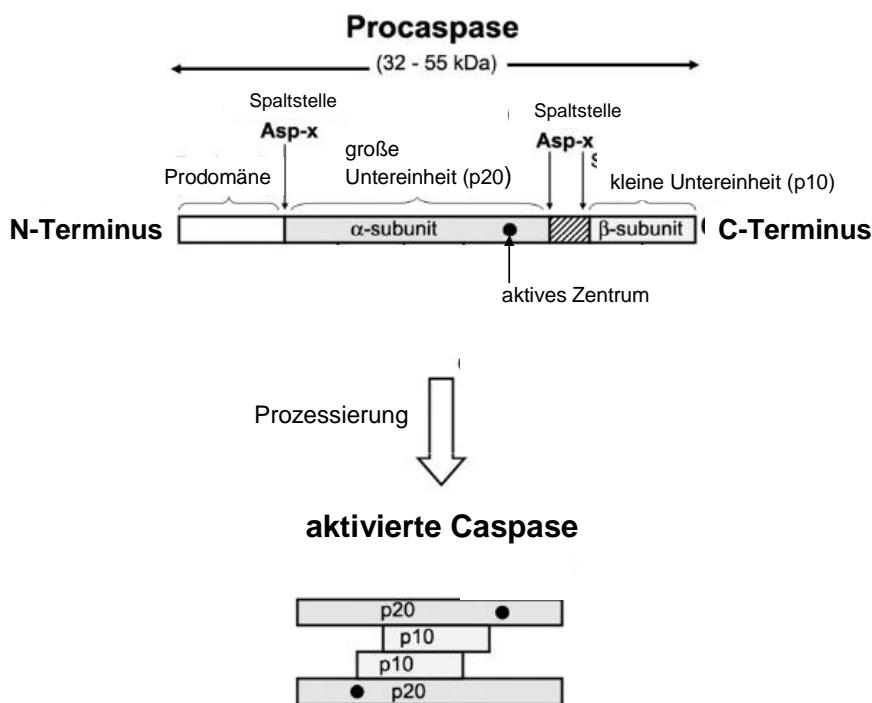


Abbildung 2: Struktureller Aufbau von Caspases

Procaspasen bestehen aus einer Prodomäne sowie je einer großen und kleinen Untereinheit. Über selektive proteolytische Spaltungen an Aspartatresten werden Untereinheiten generiert, die ein Heterotetramer als aktive Form der Caspase bilden. Die beiden aktiven Zentren sind jeweils in der großen Untereinheit lokalisiert. In dieser Abbildung ist die große Untereinheit als p20 und die kleine Untereinheit als p10 bezeichnet. Diese Größen können innerhalb der Caspases, wie bei Caspase-8 angegeben als [$p18_2-p10_2$], variieren.
Verändert nach Chowdhury et al., 2008.

1.3.1 Caspase-8

Da sich diese Arbeit vorwiegend mit der Rolle der Caspase-8 in der TNF-induzierten Apoptose beschäftigt, soll diese nun ausführlicher beschrieben werden. Caspase-8 wird als lineares, einkettiges Zymogen, genannt Procaspsase-8, synthetisiert. Die Prodomäne beinhaltet zwei DEDs, die Untereinheiten werden als p18- und p10-Domänen bezeichnet. Das Zymogen wird nach Rekrutierung an den DISC über die Tandem-DEDs an FADD durch autokatalytische Spaltung an den Positionen Asp 126, Asp 216, Asp 374 und Asp 384 aktiviert (Kumar 2007; Pop et al. 2007). Wieso es zur autokatalytischen Spaltung kommt, ist noch immer nicht vollständig geklärt, es gibt jedoch verschiedene Theorien:

Zunächst wurde das Modell der „Induced Proximity“ beschrieben, wonach es allein durch die große Nähe der rekrutierten Procaspsasen zueinander am DISC zu ihrer Aktivierung kommen soll (Salvesen and Dixit 1999).

Studien an der Aktivierung von Caspase-9 zeigten, dass wohl nicht die Spaltung der Proform allein die Aktivierung ausmacht, sondern dass die Assoziation zum Apoptosom entscheidend sein könnte (Rodriguez and Lazebnik 1999; Stennicke et al. 1999). Dieses ließe sich wohl auf alle Initiatorcaspsasen und ihre Aktivierungsorte übertragen, was zu einer Abwandlung des oben genannten Modells führte:

Die räumliche Nähe der Procaspsasen am DISC erlaubt eine Dimerisierung. Die Dimere sind nun katalytisch potenter als die lineare Form der Procaspsase und könnten einander spalten, sodass die aktive Form der Caspase-8 entsteht. Dieses Modell wird als „proximity driven model“ bezeichnet.

Um die aktive Caspase-8 zu erhalten, muss sie nach der Dimerisierung zweimal gespalten werden. Zunächst wird die Linker-Region zwischen p18 und p10 durchtrennt, dann werden die DEDs abgespalten. Die Caspase-8 ist nun als Heterotetramer funktionstüchtig (Keller et al. 2009).

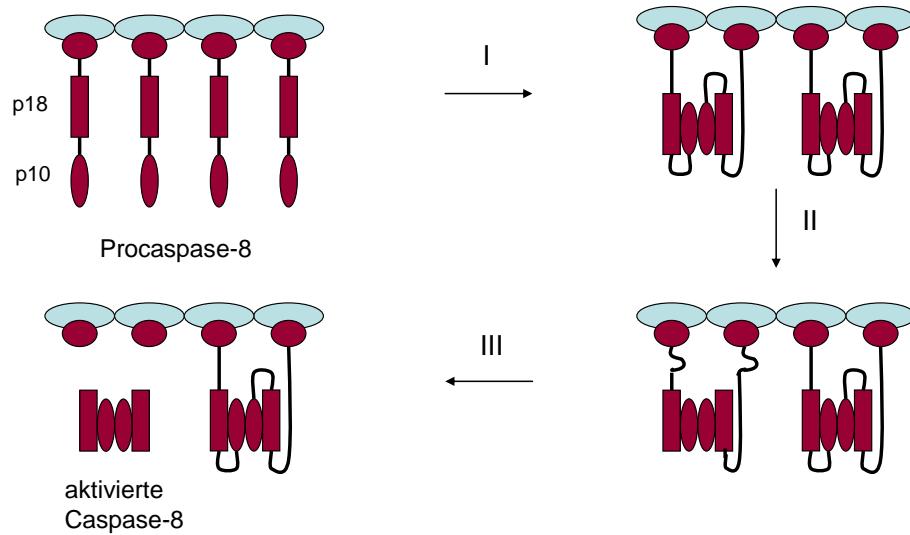


Abbildung 3: Modell zur Prozessierung von Caspase-8

Zur Aktivierung muss die Procaspsase-8 nach ihrer Dimerisierung (I) zweimal gespalten werden. Die erste Schnittstelle befindet sich in der Linker-Region zwischen p18 und p10 (II). Konformationsänderungen erlauben nun die Spaltung zwischen den Prodomänen und der p18-Untereinheit (III). Es entsteht die aktive Caspase-8.

Verändert nach Zhao et al., 2010.

1.4 TNF und die TNF-Rezeptoren 1 und 2

Die beiden membranständigen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 1 und 2) gehören mit einer Größe von 55 bzw. 75 kDa zur TNF-Rezeptor-Superfamilie. Die beiden TNF-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer intrazellulären Beschaffenheit und ihrem Vorhandensein auf Körperzellen. So ist nur der TNFR1 im Besitz einer intrazellulären Todesdomäne, wird auf fast allen Körperzellen gleichermaßen exprimiert und ist deshalb der Hauptvermittler der TNF-induzierten Apoptose. Die Expression des TNFR2 beschränkt sich fast ausschließlich auf Zellen des Immunsystems (Aggarwal 2003; Wajant, Pfizenmaier, and Scheurich 2003).

Beide TNF-Rezeptoren werden durch den Liganden TNF (tumor necrosis factor) aktiviert. TNF ist ein Zytokin der TNF-Superfamilie, welches hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Monozyten, Lymphozyten und anderen Zellen produziert wird (Baud and Karin 2001). Es ist ein zellmembranständiges, homotrimeres Protein, welches aber durch die Metalloprotease TACE (TNF-alpha converting enzyme) als Trimer von der Zelloberfläche abgespalten werden kann. Beide Formen sind biologisch aktiv, allerdings kann TNFR2 nur durch das membranständige TNF vollständig aktiviert werden, wogegen TNFR1 am stärksten durch lösliches TNF aktiviert wird (Grell et al. 1995; Grell et al. 1998). TNF kann über verschiedene TNFR1-Signalwege sowohl Proliferation als auch Inflammation und Apoptose auslösen (Hehlgans and Pfeffer 2005).

1.4.1 TNF-Signaltransduktion durch den TNFR1

Der TNFR1 ist ein Typ I-Transmembranprotein. Er besitzt in seinem extrazellulären Anteil eine sogenannte pre-ligand assembly domain (PLAD), über die es zu seiner Trimerisierung kommt (Chan et al. 2000). Zwischen extra- und intrazellulärem Anteil liegt die Transmembrandomäne. An sie schließt in Richtung des Zellinneren zunächst die Internalisierungsdomäne TRID (TNF-receptor internalization domain) an. Diese Domäne ist essenziell für die Internalisierung des Rezeptors und die Bildung des DISC, wie an TRID-deletierten Mutanten gezeigt werden konnte (Schneider-Brachert et al. 2004). Weiter Richtung C-Terminus befinden sich die NSD (neutral sphingomyelinase domain) sowie die Todesdomäne (DD, death domain) (Adam et al. 1996; Wajant, Pfizenmaier, and Scheurich 2003).

Die TNFR1-Signalkaskade beginnt mit der Bindung von TNF an den Rezeptor, wodurch es zunächst zu einer intrazellulären Konformationsänderung kommt, welche die Rekrutierung der Adapterproteine ermöglicht (G. Chen and Goeddel 2002). Als erstes wird TRADD als zentrales Adapterprotein für verschiedene Signalwege an die Todesdomäne des TNFR1 rekrutiert (Hsu, Xiong, and Goeddel 1995). Mit TRADD als Plattform können nun verschiedene Signalwege in Gang gesetzt werden: durch die Bindung von TRAF-2 (TNF-receptor-associated factor-2)

und RIP-1 (receptor-interacting protein-1) kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B. Dieser leitet nach Translokation in den Zellkern die Produktion verschiedener Proteine ein, die antiapoptotisch wirken und das Überleben der Zelle fördern (Hsu, Huang, et al. 1996; Perkins 2000). Zusätzlich kann es über RIP-1 und TRAF-2 zu einer Aktivierung sogenannter MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinase) kommen, welche ebenfalls zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Diese beiden Wege führen zur Expression proinflammatorischer, proliferativer und antiapoptotischer Proteine. TRADD fungiert jedoch durch Bindung von FADD auch als Vermittler der Apoptose. Es folgt die Rekrutierung von Caspase-8 über ihre Tandem-DEDs an die DED von FADD (Hsu, Shu, et al. 1996). Der entstandene Komplex aus TRADD, FADD und Caspase-8 wird hier als DISC bezeichnet (Kischkel et al. 1995; Muzio et al. 1996).

Die Bildung des DISC und die Internalisierung des Rezeptors sind zwei für die Apoptoseinduktion untrennbare Prozesse (Schneider-Brachert et al. 2004). Die Clathrin-vermittelte Internalisierung des aktiven Rezeptors führt zur Bildung früher endosomaler Kompartimente, den sog. Rezeptosomen. Durch die Verschmelzung mit trans-Golgi-Vesikeln entwickeln sich daraus multivesikuläre Strukturen, die letztendlich zu lysosomalen Vesikeln prozessiert werden.

Die aktivierte Caspase-8 kann hier zudem die in den lysosomalen Kompartimenten befindliche saure Sphingomyelinase (A-SMase) aktivieren (Schütze et al. 1999), welche die Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramiden und Phosphatidylcholin katalysiert (Wiegmann et al. 1994). Das entstandene Ceramid aktiviert Cathepsin D, welches aus dem Kompartiment ins Cytoplasma transloziert und hier, genau wie Caspase-8 beim "Crosstalk" zwischen extrinsischem und intrinsischem Apoptoseweg, Bid zu tBid spalten und so das apoptotische Signal verstärken kann (Rodman et al. 1990; Heinrich et al. 1999; Heinrich et al. 2004). Anders als bei der Apoptoseinduktion über den DISC können jedoch die Signalwege über NF κ B und MAP-Kinasen von der Internalisierung unabhängig am membranständigen Rezeptor aktiviert werden (Micheau and Tschopp 2003; Schneider-Brachert et al. 2004).

Durch TNF können also somit sowohl anti- wie auch proapoptotische Signalwege aktiviert werden, was das breite Wirkungsspektrum des Zytokins aufzeigt.

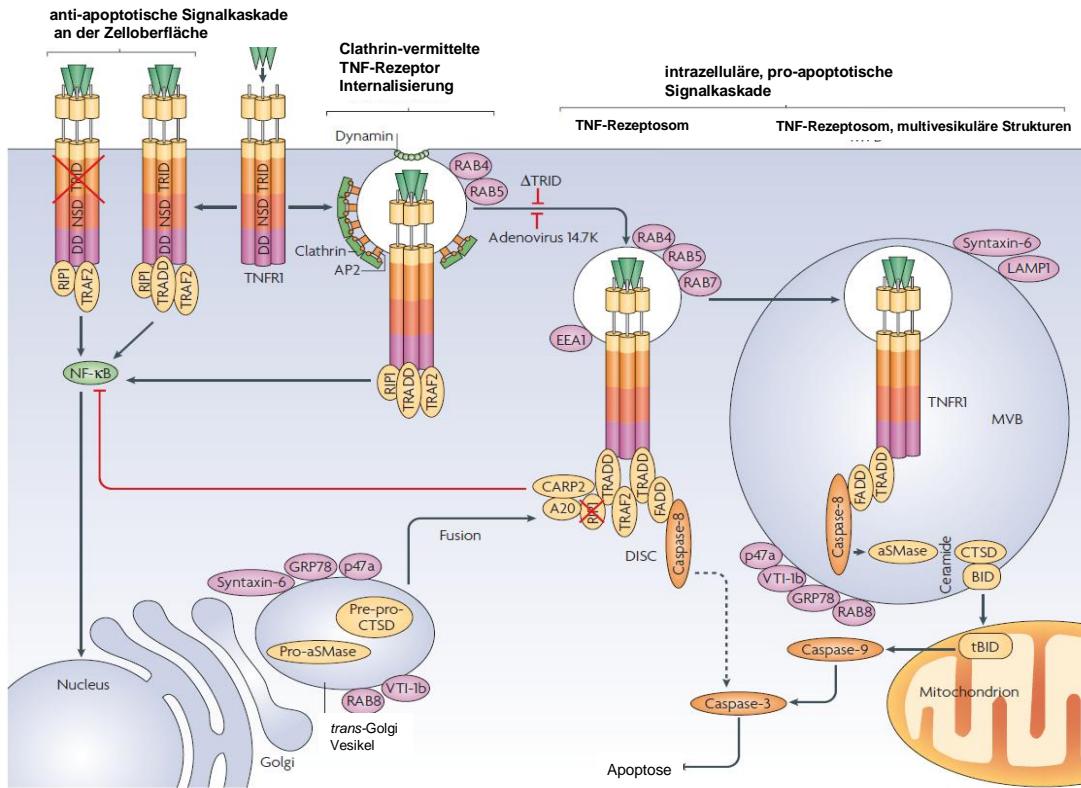


Abbildung 4: TNF-TNFR1-Signalkaskade

Bei einer Bindung von TNF an seinen zellmembranständigen Rezeptor kommen zwei unterschiedliche Mechanismen in Gang: entweder bewirkt die Rekrutierung von RIP-1 und TRAF-2 an TRADD eine Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade, welche das Überleben der Zelle fördert, oder es kommt es über eine Clathrin-vermittelten Rezeptorinternalisierung und die Rekrutierung des DISCs (death-inducing signaling complex) an die Todesdomäne (DD) zur Apoptose. Nach der Internalisierung reifen die Rezeptosomen durch Fusion mit trans-Golgi-Vesikeln zu multivesikulären Strukturen (MVB, multivesicular bodies) und lysosomalen Kompartimenten. Eine Deletion der Internalisierungsdomäne TRID, eine adenovirale Infektion oder die alleinige Expression des adenoviralen Proteins 14.7K kann die Rezeptorinternalisierung sowie die Bildung des DISC verhindern.

Verändert nach Schütze und Schneider-Brachert, 2008.

1.5 Viren und Apoptose

Viren sind definitionsgemäß Partikel, die in der Lage sind, in eine Wirtszelle einzudringen und sich in ihr zu vermehren. Sie bestehen mindestens aus Nukleinsäuren und Proteinen, wobei je Viruspartikel ausschließlich eine Art von Nukleinsäure, DNA oder RNA, vorhanden ist. Außerdem besitzen Viren keinen eigenen Stoffwechsel, sondern nutzen die Organellen und Strukturen der Wirtszelle für ihre Replikation. Aus diesem Grund werden sie in der Literatur meist nicht den Lebewesen zugeordnet (Hof 2005).

Der Befall eines Organismus bleibt in der Regel nicht unentdeckt, sondern löst verschiedene Abwehrreaktionen aus. Können die Viren im Blut noch durch Antikörper detektiert und dann vernichtet werden, so führt eine Infektion der Wirtszelle unter anderem über die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen sowie die Ausschüttung von Zytokinen, z. B. TNF, zur Viruselimination durch Apoptose der infizierten Zelle. Um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, haben Viren vielfältige Strategien zur Apoptoseinhibition entwickelt (Benedict, Norris, and Ware 2002).

1.5.1 Strategien der viralen Apoptoseinhibition

a) Abschirmung des Signals an der Zelloberfläche

Viren können über ihre Proteine die Internalisierung und Degradation von Todesrezeptoren bewirken oder, wie beispielsweise das humane Cytomegalievirus, über die Expression von viralen TNF-Rezeptor-Homologen ausgeschüttete Zytokine abfangen (Tollefson et al. 1998; Benedict et al. 1999; Benedict, Norris, and Ware 2002).

b) Blockierung des Signals auf Höhe der Mitochondrien

Um eine Apoptose zu verhindern, setzen viele virale Proteine am Mitochondrium an. Sie binden Apoptose-modulierende Proteine wie Bid und Bax oder imitieren, wie das Epstein-Barr-Virus mit seinem Protein BHRF1, antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, um die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und die folgende

Freisetzung von Cytochrom c zu verhindern (Henderson et al. 1993; Boya et al. 2004).

c) Caspasehemmung

Eine weitere, vielschichtige Möglichkeit der Apoptoseinhibition ist die direkte oder indirekte Caspasehemmung. Sie kann entweder über eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum oder als kompetitive Hemmung von Signalmolekülen der Caspaseaktivierung stattfinden. Es sind vier Klassen dieser viralen Inhibitoren bekannt: vIAPs, vFLIPs, die p35- und die Serpin-Familie (Best 2008).

vIAPs (viral inhibitor of apoptosis protein) sind virale Proteine, deren Struktur analog der zelleigenen IAPs, den cIAPs, aufgebaut ist. Einige cIAPs binden direkt an die Caspasen -3, -7 und -9 und hemmen über verschiedene Wege ihre Aktivierung (Tenev et al. 2005). Die Aktivität dieser cIAPs wird über sogenannte IAP-Antagonisten reguliert, welche an sie binden und dadurch die Caspasehemmung aufheben. Ihr größter Vertreter ist Smac/DIABLO (C. Du et al. 2000). vIAPs verhalten sich, entgegen jeder Vermutung, nicht wie cIAPs, sondern agieren als „Fänger“ von IAP-Antagonisten und bewirken deren Degradation. So können diese nun keine cIAPs mehr binden und die Caspasehemmung bleibt bestehen (Best 2008).

vFLIPs (viral FLICE-like inhibitory protein) sind virale Proteine, die den zellulären FLIPs, den cFLIPs, ähnlich sind. Beide besitzen DEDs, mit welchen sie am DISC mit Caspase-8 und -10 um eine Bindung an FADD konkurrieren und so deren Dimerisierung und Aktivierung verhindern (Krueger et al. 2001). Zusätzlich gibt es über die Bindung an Proteine wie RIP-1 und TRAF-2 eine Verbindung zum NF κ B-Weg der Zelle (Kataoka and Tschopp 2004).

Das virale Protein **p35**, isoliert aus Baculoviren, war der erste Vertreter der p35-Familie und ist ein Breitband-Caspase-Inhibitor (Clem, Fechheimer, and Miller 1991). Ein weiteres Mitglied aus der Reihe der Baculoviren ist p49, aus anderen Viren wurde als Homolog zu p35 das Protein p33 isoliert (Q. Du et al. 1999; Means,

Penabaz, and Clem 2007). Alle Vertreter der p35-Familien hemmen Caspasen durch irreversible Bindung an ihr aktives Zentrum.

CrmA (Cytokine response modifier A) ist das bekannteste virale Protein der Serpin (serine protease inhibitor)-Superfamilie und wird durch das Kuhpockenvirus codiert. Obwohl Serpine normalerweise die Aktivität von Serinproteasen unterdrücken, zeigt CrmA eine Wirkung auf Cysteinproteasen (Renatus et al. 2000; Simonovic, Gettins PGW, and Volz 2000). Es unterdrückt vornehmlich die Aktivität der Caspasen-8 und -10, kann aber in geringe Maße auch auf andere Caspasen wirken (Garcia-Calvo et al. 1998; Zhou et al. 1997). Bei Caspase-8 bewirkt CrmA eine Dissoziation des Heterotetramers durch folgenden Mechanismus:

CrmA bindet an das aktive Zentrum der Caspase und bildet mit ihr einen vorübergehenden Komplex. Spaltungs- und Bindungsprozesse führen zur Zerstörung der p18-p10- und p10-p10-Formation (vgl. Abb. 5 und 1.3.1). Übrig bleibt ein vorwiegend irreversibler Komplex aus CrmA und der p18-Untereinheit. Der p10-Anteil geht verloren (Dobó et al. 2006). Letztlich kann ein geringer Teil an CrmA wieder abgespalten werden und diffundiert ab. Durch den Verlust der p10-Untereinheit kann es trotzdem zu keiner neuen Heterotramer-Bildung mehr kommen (Komiyama et al. 1994; Patston et al. 1991). Ein weiteres Serpin ist SERP-2 aus Leporipoxviren. Es zeigt die gleiche Wirkung wie CrmA sowie einen teilweise identischen Aufbau (MacNeill, Turner, and Moyer 2006).

Ebenfalls an das aktive Zentrum bindet der in dieser Arbeit verwendete, chemische Caspaseinhitor z-VAD(OMe)-FMK (Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone), kurz z-VAD. Er zählt zu den zellpermeablen Breitspektrum-Caspaseinhibitoren und bindet als Pseudosubstrat an das aktive Zentrum. Diese Caspaseinhibitoren sind in der Regel synthetische Peptide oder non-Peptide, die sich in ihren chemischen Gruppen unterscheiden. Durch diese wird auch die Art der Hemmung bestimmt: so sind beispielsweise Peptide mit Aldehydgruppen reversible Hemmstoffe, Methylketongruppen wie in z-VAD dagegen bewirken eine irreversible Caspasehemmung (Callus and Vaux 2007).

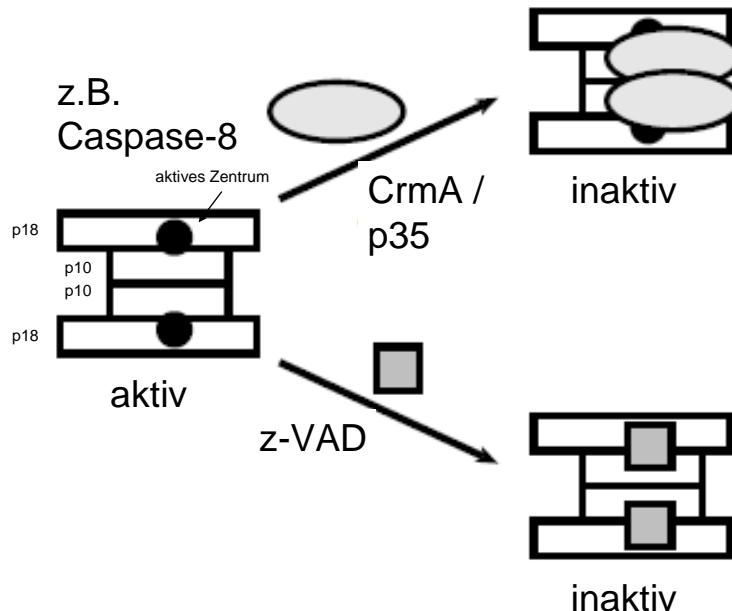


Abbildung 5: Caspasehemmung durch CrmA und z-VAD

Die viralen Inhibitoren CrmA und p35 sowie der chemische Caspaseinhibitor z-VAD binden als Pseudosubstrat an das aktive Zentrum der Zielcaspase und verhindern so deren katalytische Aktivität.

Verändert nach Callus und Vaux, 2007.

1.6 Adenoviren

1953 isolierte Rowe erstmals ein Virus aus Tonsillen und Adenoidgewebe und benannte es nach seinem Entdeckungsort (ROWE et al. 1953). Das unbehüllte Adenovirus (Ad) besitzt eine linearisierte, doppelsträngige DNA und hat eine ikosaedrische Form. Von den über 80 bekannten Adenovirustypen sind 51 für den Menschen pathogen. Eine Infektion betrifft meist Kinder und Jugendliche, kann aber für immunsupprimierte Patienten gefährlich werden. Die 51 Ad-Serotypen gliedern sich in 6 Untergruppen (A-F), innerhalb welcher die Sequenzen über 50% identisch sind. Hauptmanifestationsorte für adenovirale Infektionen sind insbesondere Augen, Pharynx, Respirations- und Intestinaltrakt, so dass es unter anderem zum klinischen Erscheinungsbild einer Keratokonjunktivitis, Pharyngitis, Pneumonie oder Säuglingsenteritis kommen kann (Hof 2005; Horwitz 2004). Eine antivirale Therapie

einer Ad-Infektion bleibt bis heute unbefriedigend, obwohl die Behandlung von Patienten mit Cidofovir teilweise erfolgreich war. Sinnvoll erscheint lediglich eine Verhinderung bakterieller Superinfektionen durch Antibiotikatherapie. Das Adenovirus kann teilweise noch Jahre nach einer Erstinfektion in den Tonsillen persistent sein (Horwitz 2004; Hof 2005; Yusuf et al. 2006).

1.6.1 Das adenovirale Genom und seine E3-Region

Während der Replikation des Virus folgt die Expression seines Genoms einem festgelegten Schema und kann in eine frühe und späte Expressionsphase eingeteilt werden. Zunächst werden Gene der frühen (early, E-) Region exprimiert, deren Proteine die Transkription (E1A), die DNA-Synthese (E2A und B) und Transport der Ad-mRNA ins Cytoplasma (E1B-55K/E4 Orf6) sowie die Immunregulation (E3, E1B, E4) steuern. Die späte (late, L-) Region codiert hauptsächlich für virale Strukturproteine (Horwitz 2004). Um die zelluläre Immunantwort des Wirtes während einer Infektion zu unterdrücken, besitzt das Virus eine spezielle Region, die E3-Region, welche für immunregulatorische Proteine codiert. Ihre Proteine sind bis auf eine Ausnahme dazu bestimmt, die verschiedenen Immunantworten des Wirts zu unterdrücken (Horwitz 2001). So bewirkt AdE3-gp19K eine Unterdrückung der Exposition von MHC-I-Proteinen an der Zelloberfläche, um eine Präsentation viraler Fragmente zu verhindern (Burgert, Maryanski, and Kvist 1987). Die Proteine AdE3-10.4K und -14.5K werden als RID-Komplex (receptor internalization and degradation) bezeichnet. Gemeinsam bilden sie einen Komplex, der die Fas-vermittelte Apoptose durch Internalisierung und Degradation des Rezeptors sowie die TNF-vermittelte Apoptose hemmt (Horwitz 2004). Wird AdE3-6.7K noch zusätzlich in den RID-Komplex integriert, so kommt es außerdem zu einer Hemmung der TRAIL-vermittelten Apoptose. Zusätzlich besitzt 6.7K allein einen inhibierenden Effekt auf die TNF-vermittelte Apoptose (Benedict et al. 2001; Moise et al. 2002). Das Protein AdE3-14.7K schließlich wirkt auch als singulär exprimierte Protein unabhängig von einer Virusinfektion in den meisten Zelllinien als genereller Inhibitor der TNF-, Fas sowie TRAIL-induzierten Apoptose (Gooding et al. 1990; Tollefson et al. 2001).

1.6.2 E3-14.7K

E3-14.7K ist ein lösliches Protein, welches sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist (Gooding et al. 1988). Über seinen C-Terminus interagiert es mit verschiedenen Bindungspartnern und mit sich selbst. 14.7K liegt in der Wirtszelle möglicherweise als Nonamer vor (Kim and Foster 2002). Zudem ist E3-14.7K innerhalb der verschiedenen adenoviralen Subtypen hochkonserviert, was für seine ungeheure Wichtigkeit für den Fortbestand der Adenoviren spricht (Horton et al. 1990). Zusätzlich wurde bekannt, dass Deletionen oder Mutationen innerhalb des Proteins in den meisten Fällen zu seinem Funktionsausfall führen (Ranheim et al. 1993). Um den Wirkmechanismus von E3-14.7K zu entschlüsseln, wurde Ende der 90er Jahre über ein yeast-two-hybrid-Screening versucht, Interaktionspartner von 14.7K zu ermitteln. Dabei wurden 4 zelluläre Proteine identifiziert und als FIPs (fourteen-point-seven K interacting proteins) bezeichnet. FIP-1 ist eine kleine GTPase und identisch mit RagA (Y. Li, Kang, and Horwitz 1997; Hirose et al. 1998). FIP-2/Optineurin besitzt putative Leucin-Zipper-Motive und kann über seinen C-Terminus an 14.7K binden (Y. Li, Kang, and Horwitz 1998). FIP-3, auch bekannt als NEMO oder IKK γ , ist am NF κ B-Signalweg beteiligt (Y. Li et al. 1999). FIP-4 schließlich ist identisch mit AIF (Daugas et al. 2000; Horwitz 2004).

1999 konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Hemmung der TNFR1-Internalisierung Schutz vor TNF-mediierter Apoptose bietet (Schütze et al. 1999). Später gelang es Schneider-Brachert et al., diesen Mechanismus bei 14.7K-exprimierenden Zellen zu zeigen: über radioaktiv markiertes TNF konnte nachgewiesen werden, dass die Rezeptorinternalisierung in Anwesenheit von 14.7K nach TNF-Stimulation gehemmt ist (Schneider-Brachert et al. 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es zusätzlich nicht mehr zur Rekrutierung der Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase-8 zur Bildung des DISC kommt. Der NF κ B-Signalweg scheint dabei unbeeinflusst zu sein, denn auch in Anwesenheit von 14.7K wurden TNFR1-Komplexe mit RIP-1 und TRAF-2 isoliert. Letzlich konnten auch die Proteine Rab 5 und Dynamin 2, die für die Endozytosemaschinerie in der Zelle essenziell sind, in 14.7K-exprimierenden Zellen nicht mehr am Rezeptor nachgewiesen werden (Schneider-Brachert et al. 2006).

Da 14.7K selbst bislang jedoch nicht am Rezeptor nachgewiesen werden konnte, ist der Apoptose und Internalisierung hemmende Mechanismus bis heute unverstanden. Möglicherweise sind weitere, noch nicht identifizierte intrazelluläre Interaktionspartner notwendig, um diesen Effekt zu vermitteln.

2. Ziel der Arbeit

Bisher ist bekannt, dass eine adenovirale Infektion oder sogar die alleinige Expression des adenoviralen Proteins E3-14.7K ausreicht, um die Wirtszelle vor TNF-induzierter Apoptose zu schützen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es in 14.7K-exprimierenden Zellen nach TNF-Stimulation weder zu einer Rezeptorinternalisierung, noch zu einer Bildung des DISC, bestehend aus den Proteinen TRADD, FADD und Caspase-8, am aktivierte TNFR1 kommt. Als Folge davon kommt es zudem nicht zur Aktivierung der Caspase-8, welche zu ihrer autokatalytischen Aktivierung dimerisiert vorliegen muss. Der Mechanismus, welcher die Zusammenlagerung der Caspase-8 verhindert, ist aber noch unverstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine mögliche direkte Interaktion von 14.7K und Caspase-8 nachzuweisen und zu charakterisieren sowie eine spezifische Bindungsregion innerhalb der Caspase-8 zu identifizieren.

Zu Beginn wurde der bereits bekannte protektive Effekt von 14.7K auf Zellen nach TNF-Stimulation und CHX-Behandlung in H1299-Zellen verifiziert. Um herauszufinden, ob die 14.7K-medierte TNF-Resistenz auf der Inhibierung der Caspase-8 beruht, sollte das Zell-Lysat TNF-stimulierter parentaler oder 14.7K-exprimierender Zellen auf das Vorhandensein der aktivierte Form von Caspase-8 untersucht werden. Mit einer zusätzlichen Analyse zur PARP-1-Spaltung sollte gezeigt werden, ob der Grad dieser Hemmung auch ausreicht, um ein Ablauen der distalen Caspasekaskade zu verhindern. Da die Überexpression von Caspase-8 *per se* in Zellen zur Induktion der Apoptose führt, sollte in einem weiteren Versuchansatz untersucht werden, ob durch gleichzeitige Überexpression von 14.7K die Überlebensrate der Zellen gesteigert werden kann. Zur genauen Charakterisierung der möglichen Interaktionsregion sollten zudem Genfragmente der Caspase-8 mittels PCR hergestellt werden, die die einzelnen Proteinregionen darstellen. Diese wurden neben der nativen Procaspsase-8 für Interaktionsstudien im Mammalian Two-Hybrid Assay verwendet. Die Proteinexpression der verschiedenen Konstrukte sollte schließlich über eine Western-Blot-Analyse belegt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	AppliChem
Ammoniumpersulfat APS	AppliChem
ATP	Fermentas
Cycloheximid	Sigma Aldrich, 5µg/µl stock
Desoxyribonucleotide	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DMEM	GIBCO/Invitrogen
DMEM Glutamax™-I	GIBCO/Invitrogen
Ethidiumbromid	Merck
FCS	Gibco, Lonza, PAN Biotech
LB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Milchpulver	Heirler
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Penicillin/Streptomycin: 10000 U/ml Pen., 10 mg/ml Strep.	PAN Biotech
Proteaseinhibitoren Complete EDTA-free	Roche
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Polyethylenimin	Polysciences Inc.
TNF, humanes	Knoll AG
Standard für Gelelektrophorese	Fermentas
Z-VAD(OMe)-FMK	Enzo Life Sciences

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

HEPES-Puffer	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
IP-Waschpuffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton X-100
Kristallviolett-Lösung	0,5 % Kristallviolett, 4 % Formaldehyd, 30 % Ethanol, 30 mM NaCl
KS-RIPA	50 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 10% Glycerol, 10 mM K ₂ HPO ₄
Ladepuffer	Fermentas
Ligasepuffer 10x	Roche
Lysepuffer	30 mM TRIS-Cl pH 7,5, 1 % Triton-X 100, 10 % Glycerol, 120 mM NaCl
10 %ige Nonidet P-40-Lösung	1 ml NP-40, 9 ml Aqua bidest.
PBS	150 mM NaCl, 8 mM K ₂ HPO ₄ , 2 mM K ₂ HPO ₄ , gelöst in H ₂ O, pH 7,3
PCR-Puffer	Roche
PNK A-Puffer	Roche
Puffer A	10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, Complete (40 µl auf 1 ml)
Puffer C	20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, Complete (40 µl auf 1 ml)
SDS	Merck
2x SDS-PAGE-Ladepuffer	125 mM Tris, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
SDS-Laufpuffer	144g Glycin (192mM), 30,g Tris (250mM), 10g SDS (1%) ad 1L bidest H ₂ O
SuperSignal West Pico Luminescent Substrate	Pierce

TBE-Puffer	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 50 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
TBS	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20
Western-Transferpuffer	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

10 cm Kulturschalen	BD, Falcon
175cm ³ Zellkulturflaschen	BD
1,5 ml Reaktionsgefäßss	Eppendorf
5 ml Röhrchen	BD
50 ml Röhrchen	BD
96-Well Platten	BD, Falcon
6-Well Platten	BD, Falcon
Einmal-Plastikküvetten	Greiner
Multipipettenspitzen Combitips	Eppendorf
Pipettenspitzen steril (10 µl - 1000 µl)	Biozym
PVDF Membran Westran CS, 0,45 µm	Hartenstein
Whatman Papier	Millipore
Zellschaber	Sarstedt

3.1.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Begasungsbrutschrank Hera cellsafe240	Heraeus
CCD-Kamera	Intas Chemilux Pro
Elektrophoresekammer Power Pac 3000	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop DMRX	Leica
Fluoreszenzphotometer Lumat LB 9501	Berthold
Heizblock BT 100	Kleinfeld Labortechnik

Microplate Reader Model 680	BIO-RAD
Nano drop	Thermo SCIENTIFIC
Neubauer-Zählkammer	LaborOptik
Mini Protean® System	Bio-Rad
Multipipette Repetman	Gilson
PCR-Thermocycler PTC 200	BIO-RAD
Pipettus Pipetboy acu	Integra Biosciences
Sterilbank	antair BSK
UV-Schirm	Bachhofer
Vortexer MS 1 Minishaker	IKA
Zentrifugen	Eppendorf

3.1.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
Easy Prep pro Plasmid Miniprep Kit	Biozym
Lowry Testreagenz DC Protein Assay, Reagent A und B	BIO-RAD
Mammalian Two-Hybrid Assay Kit	Stratagene
NucleoBondXtra Midi	Macherey-Nagel
QIAEX Gel extraction kit	Qiagen

3.1.6 Enzyme

Tabelle 6: Enzyme

BamHI	Roche, Fast Digest
BglII	Roche, Fast Digest
DNA-Ligase	Fermentas
DNA-Polymerase Pfu	Fermentas
Polynukleotidkinase	New England Biolabs
Sall	Roche, Fast Digest
Xhol	Roche, Fast Digest

3.1.7 Zelllinien/ Bakterienstämme

Tabelle 7: Zelllinien und Bakterienstämme

H1299/ 14.7K wt	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie, stabil transfiziert mit 14.7K wt
HEK293	Ad5-transformierte embryonale Nierenfibroblasten-Zelllinie
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)

3.1.8 Primer

Tabelle 8: Primer

3' h Caspase-8 Stop Sal I	5'-CGC GTC GAC TCA ATC AGA AGG GAA GAC AAG TT-3'
3' h Caspase-8 446 Stop Sal I	5'CGC GTC GAC TCA ATC CAT TTC TAA ATA GGG TT-3'
5' h Caspase-8 p10 ATG Bam HI	5'-CGC GGA TCC ATG GAT TTA TCA TCA CCT CAA-3'
3' h Caspase-8 277 Stop Sal I	5'-CGC GTC GAC TCA CTG TTC TCT TGG AGA GTC CG-3'
5' h Caspase-8 p18 ATG Bam HI	5'-CGC GGA TCC ATG ACA ATC TCG GAC TCT CCA AG-3'
3' h Caspase-8 p18 Stop Sal I	5'-CGC GTC GAC TCA ATC AGT GCC ATA GAT GAT GC-3'
3' h Caspase-8 157 Stop Sal I	5'-CGC GTC GAC TCA AAT TTG AGC CCT GCC TGG TGA-3'
5' h Caspase-8 DED2 ATG Bam HI	5'-CGC GGA TCC ATG GAA AGG GAA CTT CAG ACA CC-3'
3' h Caspase-8 DED2 Stop Sal I	5'-CGC GTC GAC TCA ATA GTC GTT GAT TAT CTT CA-3'
5' h Caspase-8 DED1 ATG Bam HI	5'-CGC GGA TCC ATG GAC TTC AGC

	AGA AAT CTT TA-3'
3' h Caspase-8 DED1 Stop Sal I	5'-CGC GTC GAC TCA GTA GGT AAT CAG CAA ATC CA-3'
5' h FADD ATG BamHI	5'-GCG GGA TCC ATG GAC CCG TTC CTG GTG CTG CTG CAC-3'
3'h FADD 209 aa Xhol as	5'-CGC CTC GAG TCA GGA CGC TTC GGA GGT AGA TGC-3'
3' crmA Stop	5'-GTC GAC TTA ATT AGT TGT TGG AGA GCA ATA TCT ACC-3'
5' crmA Bgl II ATG	5'-CGT AGA TCT ATG GAT ATC TTC AGG GAA ATC GCA TC-3'

3.1.9 Plasmide

Tabelle 9: Plasmide

pBS	Stratagene
pcDNA 3/crmA	arbeitsgruppeneigene Plasmidbank
pCMV-AD mit versch. Inserts	arbeitsgruppeneigene Plasmidbank
pCMV-BD mit versch. Inserts	arbeitsgruppeneigene Plasmidbank
pFLICE	D.V. Goeddel, Tularik Inc.
pQCXIP-CrmA	arbeitsgruppeneigene Plasmidbank
pQCXIP-EYFP	arbeitsgruppeneigene Plasmidbank
pFR-Luc	Stratagene
pRL-TK	Promega
pRKS-FADD	arbeitsgruppeneigene Plasmidbank

3.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durchgeführt von der Firma GeneArt, Regensburg.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologie

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen erfolgte mittels PCR mit folgendem Ansatz:

Template	1 µl
5' Primer	1 µl
3' Primer	1 µl
Desoxyribonukleotide	1 µl
DNA Polymerase (Pfu)	1 µl
PCR Puffer (10x)	5 µl
Aqua bidest.	Ad 50 µl

PCR-Programm

1. Initiale Denaturierung	94°C	1 Minute
2. Denaturierung	94°C	1 Minute
3. Annealing	57°C	30 Sekunden
4. Elongation	72°C	30 Sekunden

Die Schritte 2 – 4 wurden nach dem ersten Durchlauf 32 x wiederholt, danach folgte die konstante Kühlung der PCR-Produkte bei 4 °C. Die Aufreinigung erfolgte durch Extraktion aus einem Agarosegel nach Gelelektrophorese mit dem QIAEX Gel extraction Kit nach Herstellerangaben.

Das Template pFLICE wurde mittels PCR und folgenden Primern amplifiziert, um folgende Teilstücke von Caspase-8 zu erhalten:

Primer	Insert in pCMV-AD und pCMV-BD
5' h Caspase-8 DED1 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 Stop Sal I	Caspase-8
5' h Caspase-8 DED1 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 446 Stop Sal I	Caspase-8 DED1-DED2-p18
5' h Caspase-8 DED1 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 277 Stop Sal I	Caspase-8 DED1-DED2
5' h Caspase-8 DED1 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 DED1 Stop Sal I	Caspase-8 DED1
5' h Caspase-8 DED2 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 DED2 Stop Sal I	Caspase-8 DED2
5' h Caspase-8 p10 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 Stop Sal I	Caspase-8 p10
5' h Caspase-8 p18 ATG Bam HI 3' h Caspase-8 p18 Stop Sal I	Caspase-8 p18

Das Template pRKS-FADD wurde mittels PCR und Primern amplifiziert, um Folgendes zu erhalten:

5' h FADD ATG BamHI 3' h FADD 209 aa Xhol as	FADD
---	------

Das Template pQCXIP-CrmA wurde mittels PCR und Primern amplifiziert, um Folgendes zu erhalten:

5' crmA Bgl II ATG 3' crmA Stop	CrmA
------------------------------------	------

3.2.1.2 Kinasierung

Die Polynukleotidkinase überträgt Phosphat-Gruppen von ATP-Molekülen auf 5'-OH-Gruppen von einzel- oder doppelsträngiger DNA. Dies ist erforderlich, weil synthetisch hergestellte DNA-Fragmente am 5'-Ende nicht phosphoryliert sind und deshalb kein gutes Substrat für die Ligase darstellen.

Für die Kinasierung der PCR-Produkte setzte sich der Ansatz wie folgt zusammen:

PCR-Produkt	30 µl
PNK A-Puffer	4 µl
ATP (100mM)	1 µl
Polynucleotidkinase	1 µl
Aqua bidest.	Ad 40 µl

Inkubation bei 37°C für 20 Minuten, dann Temperaturerhöhung auf 75°C für weitere 5 Minuten.

3.2.1.3 Klonierung

Die Klonierung aller DNA-Konstrukte erfolgte unter Anwendung üblicher Techniken (Sambrook 2001). Die Präparation der verwendeten Vektorplasmide wurde durch den Verdaul mit entsprechenden Restriktionsenzymen gemäß den Herstellerangaben durchgeführt und die linearisierte DNA aus einem 1 % Agarosegel extrahiert.

Die durch PCR gewonnenen Inserts wurden im ersten Schritt über eine blunt-Ligation mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in den Vektor pBS subkloniert. Ziel war es, am Ende aller Klonierungsvorgänge die DNA-Fragmente jeweils im Vektor pCMV-AD und pCMV-BD vorliegen zu haben. Es wurde stets auf einen molaren Überschuss des Inserts geachtet. Nach Transformation kompetenter *E.coli*s, Gelextraktion und DNA-Präparation wurden die Inserts schließlich über eine gerichtete Ligation in die Zielvektoren pCMV-AD und pCMV-BD kloniert.

Der Ligationsansatz wurde 2 Stunden bei 22 °C inkubiert und setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (Insert)	6 µl
Vektor	0,5 µl
Ligasepuffer	2 µl
DNA-Ligase	1 µl
Aqua bidest.	Ad 20 µl

Um Caspase-8, ihre verkürzten Varianten sowie FADD in die Vektoren einzubringen, wurden sie zunächst in den Vektor pBS subkloniert, mit BamHI/ Sall verdaut, aufgereinigt und über diese Schnittstellen in die Vektoren pCMV-AD und pCMV-BD eingebbracht. Für die Klonierung von CrmA in die Zielvektoren wurde das Insert mittels BgIII/ Xhol –Schnittstellen in pBS einkloniert, mit BamHI / Sall verdaut und in die ebenfalls mit BamHI/ Sall verdauten Vektoren pCMV-AD und pCMV-BD einkloniert. Dies ist möglich, da die Schnittstellen der Enzyme kompatibel zueinander sind. Die verwendeten Plasmide pCMV-AD und pCMV-BD je mit 14.7K und Optineurin C-Terminus (Optineurin Δ 394) wurden von Laura Klingseisen hergestellt und zur Weiterverwendung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Details zu Primern und Herstellung können in ihrer Doktorarbeit (2011) nachgelesen werden.

3.2.1.4 Transformation in kompetente Zellen

Kompetente Bakterien vom Stamm *E.coli* XL1-Blue wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Dazu wurden 80-100 µl des kompetenten Stammes auf Eis aufgetaut, die DNA zugegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1,5 Minuten wurde nochmals 5 Minuten auf Eis inkubiert. Enthielt der Ansatz Vektoren mit Ampicillin-Resistenz, dann wurde er unmittelbar auf einer LB Platte mit Ampicillin ausplattiert. Handelte es sich um einen Vektor mit Kanamycin-Resistenz, so wurde vor dem Ausplattieren 1 ml LB Medium zugegeben, für 45 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt, abzentrifugiert, mit einem Rest von 100 µl resuspendiert und schließlich auf einer LB Platte mit Kanamycin ausplattiert. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das

Animpfen von Kulturen im Mini- (2 ml) oder Midi- (100 ml) Maßstab für die Plasmidpräparation in dem entsprechenden Medium.

3.2.1.5 Plasmid-Isolierung und Aufreinigung

Die Isolierung der DNA aus *E.coli* wurde mit dem Easy Prep pro Plasmid Miniprep Kit von Biozym durchgeführt. Sollten größere Mengen isoliert werden, so wurde NucleoBondXtra Midi von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Nach Verifizierung des Inserts durch einen Kontrollverdau wurde entweder ein präparativer Verdau des Inserts mit anschließender Gelextraktion und Ligation in den Zielvektor durchgeführt oder der Vektor direkt verwendet. Im letzten Schritt wurde die Reinheit der DNA bestimmt und die Richtigkeit der Plasmide durch Sequenzierung überprüft.

3.2.1.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wandern aufgrund der negativen Ladung der DNA in der gleichen Zeit kleinere Teilstücke schneller in Richtung Kathode als größere. Es wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % verwendet. Dazu wurden 0,7 g Agarose mit 70 ml TBE-Puffer vermischt, aufgekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Eingießen des Gels in die Elektrophoresekammer und seiner Verfestigung wurde es mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden zusammen mit einem Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert und eine Spannung von 80 V für 50 Minuten angelegt. Zur Größenbestimmung wurde zusätzlich eine Tasche mit einem Standard beladen. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht dokumentiert.

3.2.1.7 DNA-Restriktion

Vektor-DNA wurde mittels verschiedener Restriktionsenzyme verdaut. Waren diese bezüglich ihres Puffers nicht kompatibel, so wurden die Verdaue in mehreren

Etappen durchgeführt. Dazwischen fand jeweils eine Aufreinigung mit dem QIAEX Gel extraction Kit nach Angaben des Herstellers statt.

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Vektor-DNA	30 µl
Puffer (10x)	4 µl
Restriktionsenzym 1	1,5 µl
Restriktionsenzym 2	1,5 µl
Aqua bidest.	Ad 40 µl

Der Verdau wurde bei 37 °C für 30 Minuten (Fermentas) oder 90 Minuten (Roche) inkubiert und die DNA-Fragmente anschließend durch Agarosegelektrophorese aufgetrennt.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten, adhärent wachsenden und eukaryonten Zelllinien HEK293 und H1299 wurden in 175 cm³ Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂, sowie in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µl/ml) kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank ausgeführt.

Die Zellen wurden etwa alle 2-3 Tage bei einer Konfluenz von 90 % im Verhältnis von 1:5 bis 1:8 gesplittet. Dazu wurden zunächst die Zellen nach Abziehen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch Trypsinierung. Die Zellkulturflasche wurde nach Zugabe vom 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 2 Minuten im Brutschrank inkubiert, das Trypsin mit 7 ml Medium neutralisiert und nun die Zellen durch leichtes Beklopfen vom Flaschenboden abgelöst. Die Suspension wurde dann in ein 15 ml Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 300xg für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet

wurde mit der Pipette in 10 ml frischem Medium resuspendiert und ein entsprechendes Aliquot in eine neue Kulturflasche überführt.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um vergleichbare Versuche zu gewährleisten war die Aussaat einer definierten Zellzahl notwendig. Mithilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl einer Suspension durch Auszählen bestimmt.

Die Zellkonzentration wurde dabei wie folgt bestimmt:

$$\text{Zellzahl in 16 Kleinquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor}/4 = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{ml}$$

3.2.2.3 Transfektion

Zur Transfektion von Plasmiden in HEK293-Zellen wurden verschiedene Methoden angewendet.

a) Lipofectamin-Transfektion

Diese Methode greift zurück auf das Reagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), welches nach Angaben des Herstellers verwendet wurde.

Die Zellen wurden am Vortag in 2 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS ohne Antibiotikum in 6-well-Platten ausgesät. Ihre Gesamtzahl betrug $2,5 \times 10^5$ je Well. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1,5 ml DMEM-Medium gewaschen, das Medium abgezogen und 0,4 ml DMEM-Medium zugegeben. Der Reaktionsansatz je Well enthielt 4,5 µl Lipofektamin, 1,8 µg Plasmid-DNA sowie 200 µl DMEM-Medium bei einer Gesamtmenge von 400 µl. Lipofektamin und DMEM-Medium wurden zunächst vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Vorverdünnung der Plasmid-DNA und Vorlage in 5 ml Röhrchen wurde der Lipofektaminansatz darauf gegeben, vermischt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Schließlich wurde das DNA/Lipofektamin-Gemisch auf die Zellen pipettiert und im Brutschrank für 6 Stunden inkubiert. Um ein gutes Mischungsverhältnis zu erreichen, wurden die 6-well-Platten in regelmäßigen Abständen geschwenkt. Nach

Ende der Inkubationszeit wurden 1,2 ml DMEM-Medium mit 20 % FCS zugegeben. 48 Stunden später folgten die Ernte und Lyse der Zellen.

b) PEI-Transfektion

Um Zellen zur transienten Expression von Proteinen zu bringen, wurde mit der Polyethylenimin (PEI)-Transfektionsmethode (Godbey, Wu, and Mikos 1999a; Godbey, Wu, and Mikos 1999b) gearbeitet.

Zellen mit einer Gesamtzahl von 3×10^6 in 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin wurden in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel zu 5 ml DMEM-Medium durchgeführt. Nun wurden 10 µg Plasmid-DNA und 25 µl PEI in 1 ml Medium vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte das Auftröpfen des Ansatzes auf die Zellen und eine erneute Inkubation im Brutschrank für 6 Stunden. Schließlich wurde ein letzter Mediumwechsel zu 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin durchgeführt.

c) Calciumphosphat-Transfektion

Bei der Calciumphosphattransfektion werden Calcium-Ionen aus einer Calciumchloridlösung an die DNA gebunden. Zusammen mit einer Phosphatpufferlösung bildet sich ein Calciumphosphat-DNA-Niederschlag, der vermutlich durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann. Diese Transfektionsmethode ist einfach zu handhaben und beruht auf der Co-Präzipitation der einzubringenden DNA mit Calciumphosphat (Jordan and Wurm 2004).

Am Vortag wurden 3×10^6 Zellen in 10 cm Schalen in 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Bei ausreichender Konfluenz von 80-90 % wurde am nächsten Tag 1 Stunde vor Transfektion ein Mediumwechsel zu 5 ml Glutamax durchgeführt.

Nun wurde eine Gesamtmenge von 30 µg Plasmid-DNA in 450 µl Aqua bidest. mit 50 µl Calciumphosphatlösung (2,5 M) vermischt und auf 500 µl vorgelegten HEPES-Puffer in 15 ml Röhrchen gegeben und vermischt. Anschließend wurde die

Lösung tropfenweise auf die Zellen verteilt und für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Letztlich fand ein erneuter Mediumwechsel zu 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin statt.

3.2.2.4 Caspase-8-Inhibition

Um einen vorzeitigen Zelltod bei Transfektion mit Caspase-8 codierenden Plasmiden zu verhindern, wurde der Pancaspaseinhibitor z-VAD (Enzolifesciences) laut Herstellerangaben in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 50 µM verwendet. Die Zugabe erfolgte 6 Stunden nach Transfektion im Zuge des Mediumwechsels.

3.2.2.5 Transfektionskontrolle

Als Transfektionskontrolle diente das Plasmid pEYFP, welches zur Expression eines fluoreszierenden Proteins EYFP führt. Dieses kann mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

3.2.2.6 Zytotoxizitätsassay

Um die dosisabhängige Toxizität von TNF auf Zellen zu messen, wurde ein Zytotoxizitätsassay verwendet, mit dessen Hilfe sich auch eine Aussage über den protektiven Effekt von 14.7K treffen lässt. Die wurden die Zellen mit Cycloheximid, kurz CHX, behandelt, um die Neusynthese von antiapoptotischen Proteinen zu hemmen und so die Apoptose über die TNFR1-Signalkaskade einzuleiten.

Zunächst wurden H1299-Zellen in Triplets in 96-Wellen mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Well in 100 µl DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät. Nach Kultivierung der Zellen im Brutschrank über Nacht wurden je 25 µl einer CHX-Lösung auf die Zellen gegeben. Die verträgliche Konzentration von Cycloheximid ist zelltypspezifisch und liegt für H1299-Zellen bei 12,5 µg/ml.

Die Zellen der Reihe A wurden ausschließlich mit CHX behandelt und dienten als unstimulierte Kontrolle. Die Zellen der Reihen B-H wurden im weiteren Verlauf mit ansteigenden Konzentrationen von TNF behandelt. Das Gesamtvolumen je Well betrug 150 µl.

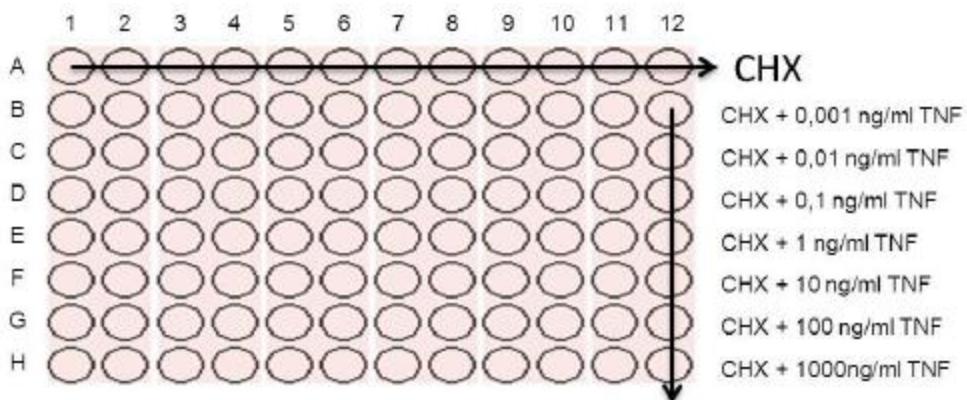


Abbildung 6: Pipettierschema des Zytotoxizitätsassays
aus der Dissertation von Laura Klingseisen, 2011.

Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden im Brutschrank wurde die 96-Well-Platte dreimal mit PBS gewaschen und ausgeklopft, um alle apoptotischen Zellen zu entfernen. Die verbliebenen, lebenden Zellen wurden je Well mit 50 µl Kristallviolett-Lösung für 15 Minuten gefärbt und die Lösung anschließend verworfen. Die Platte wurde mit destilliertem Wasser gespült und bei 37 °C weitere 15 Minuten getrocknet. Unter ständigem Schwenken für 1 Stunde wurde das Kristallviolett schließlich mit einer 33 %igen Essigsäure wieder gelöst und die optische Dichte der gefärbten Lösung bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Microplate Reader. In der Auswertung entsprechen die 100 %-Werte den Werten der CHX-Kontrolle, die Werte der verschiedenen TNF-Konzentrationen wurden anschließend in Abhängigkeit davon berechnet.

3.2.2.7 Mammalian Two-Hybrid Assay

Der Mammalian Two-Hybrid Assay dient der Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen. Die Detektion findet über eine Aktivierung der

Expression eines Reportergens statt. Das verwendete Plasmid namens pFR-Luc enthält einen Promotor mit fünf Repeats der GAL4-Bindedomäne der Hefe. Dieser Promotor kontrolliert die Expression des Luciferasegens von *Photinus pyralis*.

Für den Versuch werden die zwei zu testenden Proteine mithilfe von Expressionsplasmiden entweder mit einer Aktivierungs- (pCMV-AD) oder Bindedomäne (pCMV-BD) fusioniert. Bei Klonierung in pCMV-AD wird das Insert N-terminal mit der Aktivierungsdomäne des p65-Proteins fusioniert, wogegen bei einer Klonierung in pCMV-BD das Insert am N-Terminus mit der Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert wird. Die Größe der Aktivierungsdomäne beträgt ca. 20 kDa, die der Bindedomäne etwa 17 kDa.

Bei einer Assoziation der Proteine bildet sich nun ein funktionstüchtiger Transkriptionsfaktor, welcher an die oben beschriebene GAL4-Bindedomäne des Promotors im Reporterplasmid pFR-Luc bindet und die Expression des Luciferasegens startet.

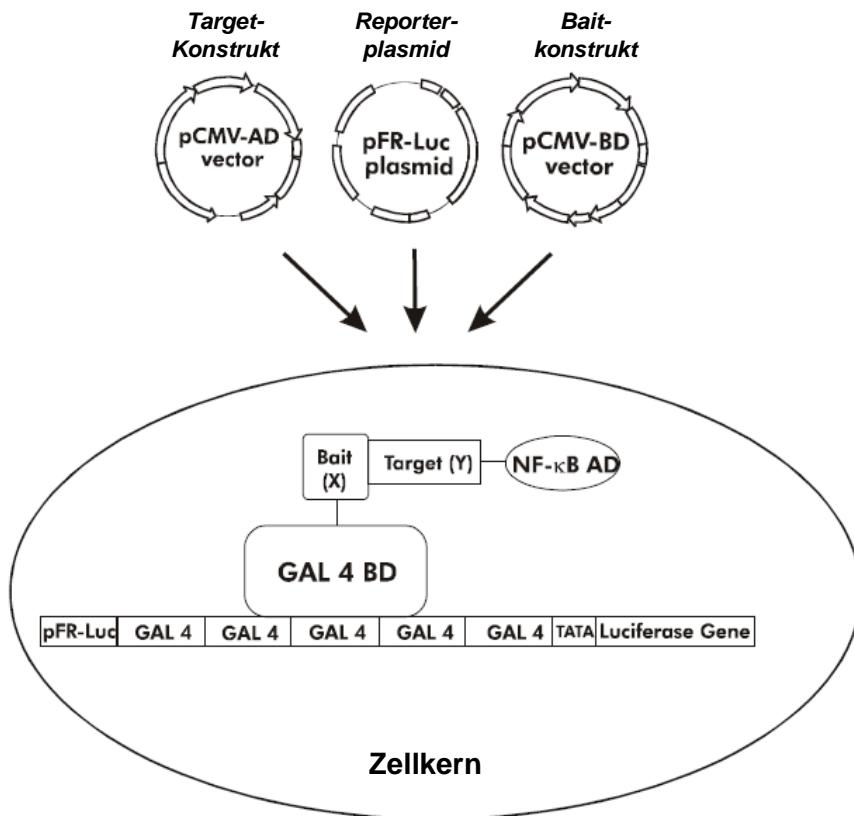


Abbildung 7: Aufbau des Mammalian Two-Hybrid Assays
aus dem Instruction Manual zum Mammalian Two-Hybrid Assay von Stratagene

Der Assay wurde im 6-Well-Format durchgeführt.

Die Transfektion der Plasmide fand wie in 3.2.2.3 beschrieben mit dem Reagenz Lipofectamine™ 2000 statt. Transfiziert wurden die Plasmide pCMV-AD, pCMV-BD und pFR-Luc sowie das Plasmid pRL-TK, welches der Expression einer weiteren Luciferase (Renilla) dient und eine Kontrolle der Transfektionseffizienz ermöglicht.

Den Reaktionsansatz je Well zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Pipettierschema Mammalian-Two-Hybrid-Assay

Lipofektamin	Plasmid-DNA			
4,5 µl	pCMV-AD 200ng	pCMV-BD 200ng	pRL-TK 200ng	pFR-Luc 1200ng

Für die Ernte und Lyse der Zellen wurden sie zunächst in 1,6 ml kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 6°C und 300xg für 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 100 µl Lysepuffer (Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega) resuspendiert. Das Lysat wurde dann bei -80°C für 30 Minuten eingefroren, im Wasserbad aufgetaut und bei Raumtemperatur für 10 Minuten geschüttelt. Nun wurde das Lysat bei Raumtemperatur für 2 Minuten bei 20000xg abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Schließlich wurden 5 µl des Lysats mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Verwendung nach Herstellerangaben) im Fluoreszenzphotometer für je 10 Sekunden vermessen.

3.2.2.8 Herstellung von Proteinlysaten

a) mittels KS-RIPA (s.3.1.2)

Nach Aussaat der Zellen in 10 cm Schalen und Transfektion mit PEI erfolgte nach 24 Stunden die Zelllyse mittels Lysepuffer KS-RIPA + frisch zugegebenen Proteaseinhibitoren Complete (40 µl pro ml aus 25x Stock).

Mengenangaben je 10 cm Schale:

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen auf Eis zweimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 350 µl Lysepuffer wurden die Zellen abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis bei regelmäßigen Vortexen für 20 Minuten inkubiert. Schließlich erfolgte die Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4 °C und 20000xg für 15 Minuten und die Überführung des Überstands in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt.

b) mittels EMSA zur Trennung von Cytosol und Zellkernen (s. 3.1.2)

Nach Aussaat der Zellen in 10 cm Schalen und Transfektion mit PEI erfolgte nach 24 Stunden die EMSA-Lyse. Dazu wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in PBS aufgenommen und bei 300xg für

10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm für 45 Sekunden bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 400 µl eiskaltem Puffer A resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Zellyse wurden die Zellen nach Zugabe von 20 µl 10 %iger NP-40 Lösung für 2 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Bei erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 Sekunden bei Raumtemperatur erfolgte die Sedimentation der Zellkerne. Schließlich wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer C aufgenommen und 30 Minuten bei 4 °C kräftig geschüttelt. Durch den Puffer C wurden die Zellkerne lysiert. Schließlich erfolgte eine letzte Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zur Sedimentation des Chromatingerüstes. Sowohl der Überstand mit den Bestandteilen des Cytosols als auch der so gewonnene nukleäre Überstand konnte nun für spätere Western-Blot-Analysen verwendet werden.

3.2.2.9 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Probe erfolgte mithilfe des DC Protein Assays von BIO-RAD nach dem Lowry-Prinzip.

Zunächst wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 und 11 µg/ml als Standard erstellt. Anschließend wurde je 1 µl Lysat mit 24 µl Aqua bidest. verdünnt und 150 µl von Lowry Reagenz A und 1 ml von Reagenz B zugefügt. Nach dem Vermischen wurde der Ansatz in eine Einmal-Plastikküvette überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vermessung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 750 nm. Anschließend wurden alle jeweiligen Lysatproben mit SDS-Probenpuffer auf eine einheitliche Konzentration gebracht.

3.2.2.10 Immunpräzipitation

Ziel der Immunpräzipitation ist die Isolierung eines Proteins durch einen spezifischen Antikörper. Das Protein bindet dabei über seinen Antikörper indirekt an eine Matrix wie z.B. Agarose oder Sepharose, welche wiederum direkt an den Fc-Teil des Antikörpers bindet. Um im Folgenden die gesuchten Proteine oder Proteinkomplexe zu isolieren, nutzt man das Eigengewicht der Matrix, welches eine Sedimentation erlaubt. Schließlich folgt das Lösen der Proteine von der Matrix durch Inkubation in SDS-Probenpuffer bei 95 °C. In der vorliegenden Arbeit wurde als Matrix ausschließlich G-Protein gekoppelte Sepharose verwendet.

Zunächst wurden die Zellen mit KS-RIPA lysiert und 1-2 mg Gesamtproteinmenge mit 1-2 µg des entsprechenden Antikörpers über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Aufgrund der Lagerung von Protein G Sepharose in 20 % Ethanol wurde sie vor ihrer Verwendung mit KS-RIPA gewaschen. Anschließend wurden pro Ansatz 15 µl gewaschene Protein G Sepharose zum bereits inkubierten Zelllysat pipettiert und dieses weitere 3 h im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Es folgte das fünfmalige Waschen der Sepharose mit IP-Waschpuffer und anschließender Sedimentation bei 500xg und 4 °C für 2 Minuten, wobei der Überstand stets verworfen wurde. Nun wurde die Sepharose mit einer Hamilton-Spitze trocken gesaugt und in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Schließlich wurde nach einer letzten Sedimentation der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteine mittels Western-Blot-Analyse detektiert.

3.2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer molaren Masse. Es kommt durch Anlagerung des negativ geladenen SDS zur Maskierung der Eigenladung der Proteine. Sie werden denaturiert und bewegen sich im elektrischen Feld entsprechend ihrer Masse in Richtung Kathode. Die SDS-PAGE-Analysen wurden nach Laemmli mit dem Mini Protean® System von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Laemmli 1970). Sammelgele enthielten jeweils eine

Acrylamidkonzentration von 5 %, Trenngele eine Konzentration von 8 oder 15 %. Alle Gele waren 0,75 mm dick. Die Gele wurden für den Zeitraum der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, vermischt, bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur und 20000xg für 1 Minute abzentrifugiert. Als Standard wurde der Page Ruler™ von Fermentas (vgl. Abb. 8) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200V und 25 mA je Gel in 60 Minuten durchgeführt.

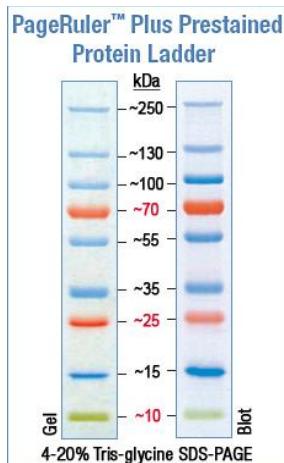


Abbildung 8: Prestained Protein Ladder von Fermentas

Tabelle 11: Zusammensetzung der Gele

Sammelgel		Trenngel	8%	15%
H ₂ O	3,44 ml	H ₂ O	2,3 ml	1,1 ml
Acrylamid	0,830 ml	Acrylamid	1,3 ml	2,5 ml
1M Tris pH 6,8	0,625 ml	1,5M Tris pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml	10% SDS	0,05 ml	0,05 ml
APS	0,075 ml	APS	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	TEMED	0,003 ml	0,002 ml

3.2.2.12 Western-Blot

Towbin et al. beschrieben 1979 die Western-Blot-Technik, mit deren Hilfe durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen werden (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979). Im Wet-Blot Verfahren wurden die Proteine nach folgendem Prinzip auf eine PVDF-Membran transferiert:

Kathode – 3x Whatman – Acrylamidgel – PVDF-Membran – 3x Whatman – Anode

Der Proteintransfer findet stets von Kathode zu Anode statt und erfolgte bei 150 V und 350 mA in 40 Minuten. Anschließend wurde die Membran wie folgt behandelt:

- Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Magermilchpulverlösung in TBS für 1h, schütteln bei Raumtemperatur (RT)
- 3x Waschen mit je 25 ml TBS/T, 10 Minuten Schütteln bei RT
- Primärantikörper: 5 ml Antikörperlösung in 1 % Milchpulverlösung in TBS, 4 °C über Nacht
- 3x Waschen mit 25 ml TBS-T für 10 Minuten, Schütteln bei RT
- Sekundärantikörper: 5 ml Antikörperlösung in 1 % Milchpulver für 1 Stunde, Schütteln bei RT
- 1x Waschen mit TBS-T für 10 Minuten, Schütteln bei RT
- 2x Waschen mit TBS für 2 Minuten, Schütteln bei RT

Zum Entwickeln wurden 2 ml Substratlösung auf die Membran gegeben und diese 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte über eine CCD-Kamera.

3.2.2.13 Antikörper

Tabelle 12: Antikörper

Primärantikörper			Sekundärantikörper		
Name	Hersteller	Verdünnung in TBS mit BSA (5%)	Name	Hersteller	Verdünnung in TBS mit Milchpulver (1%)
α -GAL4	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Goat α - rabbit HRP- conjugate	BIO RAD	1:20000
α -NF κ B p65	Santa Cruz Biotechnology	1:1000			
α -Caspase-8	Cell Signaling	1:500			
α -PARP-1	BD PharMingen	1:500			
α - β -Tubulin	Santa Cruz Biotechnology	1:1000			

Für die Immunpräzipitation wurden 1-2 µg Antikörper eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Darstellung der 14.7K-medierten TNF-Resistenz im Zytotoxizitätsassay

Der protektive Effekt von 14.7K nach TNF-Stimulation auf Zellen ist bereits seit 1988 bekannt und wurde von Ranheim in vergleichenden Studien an verschiedenen 14.7K-Mutanten untersucht. 14.7K-exprimierende Zellen zeigten demnach eine TNF-Resistenz, wogegen die meisten 14.7K-Mutanten funktionslos waren und die Zellen nicht mehr vor TNF-induzierter Apoptose schützen konnten (Gooding et al. 1988; Ranheim et al. 1993). Im vorliegenden Zytotoxizitätsassay wurden parentale H1299-Zellen sowie 14.7K-exprimierende H1299-Zellen, kurz H1299/14.7K, auf ihre Reaktion auf TNF getestet. Dazu wurden die Zellen mit ansteigenden TNF-Konzentrationen inkubiert und der zytotoxische Effekt anhand der Menge der überlebenden Zellen gemessen. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Eine Stimulation mit TNF induziert sowohl antiapoptotische (NF κ B-Signalweg) wie auch proapoptotische (Caspasekaskade) Mechanismen. Um die Neusynthese von antiapoptotischen Proteinen zu verhindern, wurde dem Versuchsansatz der Translationsinhibitor Cycloheximid, kurz CHX, zugesetzt.

Zellen, die nicht durch 14.7K gegen Apoptose protektiert waren, starben folglich nach TNF-Behandlung. Im Anschluss wurden die überlebenden, noch adhärenten Zellen mit Kristallviolett gefärbt, getrocknet und im Photometer vermessen. Die Farbintensität verhielt sich proportional zur Zellzahl.

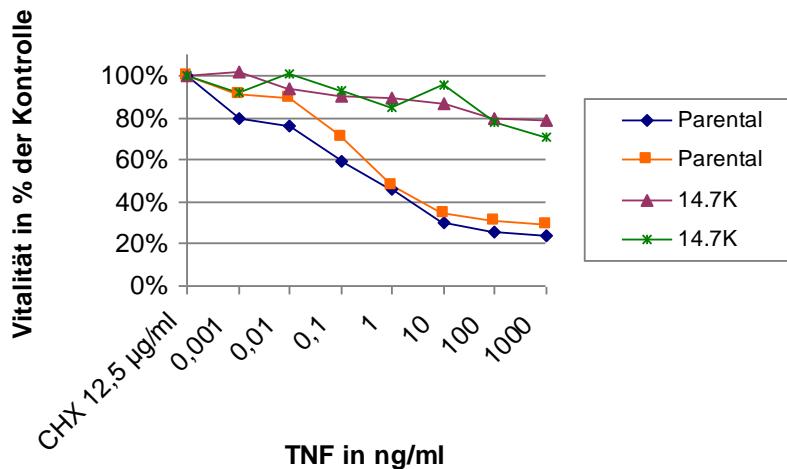


Abbildung 9: Schutz vor TNF-mediierter Apoptose durch 14.7K

H1299-Zellen wurden in Triplikaten ausgesät, mit CHX behandelt und anschließend mit ansteigenden TNF-Konzentrationen für 5 Stunden inkubiert. Tote Zellen wurden mit PBS entfernt, die übrigen vitalen Zellen dann mit Kristallviolett gefärbt. Schließlich erfolgte die Vermessung im Photometer, wobei sich die Farbintensität proportional zur Zellzahl verhielt. Die gemessenen Werte wurden prozentual zur Negativkontrolle berechnet.

Die Abbildung 9 zeigt die durch Expression von 14.7K vermittelte TNF-Resistenz in H1299-Zellen. In der parentalen Zelllinie kam zu einem Zellverlust von bis zu 70%, wohingegen der Zellverlust in 14.7K-exprimierenden Zellen nur bei 20% lag.

Um feststellen zu können, ob die TNF-Resistenz mit einer Blockade der Caspase-8-Aktivierung verknüpft ist, wurde die Spaltung der Proform der Caspase-8 in ihre aktive Form in einer Western-Blot-Analyse überprüft.

4.2 Hemmung der Apoptose in H1299/14.7K durch Blockade der Caspase-8-Kaskade

Um herauszufinden, ob der 14.7K-mediierte protektive Effekt auf einer Inhibierung der Caspase-8 beruht, wurden parentale H1299 und H1299/14.7K mit TNF stimuliert, lysiert und im Western-Blot analysiert. Dafür wurden die Zellen 2 Stunden vor Stimulation in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für die

angegebenen Zeitintervalle mit TNF stimuliert. Für die Western-Blot-Analyse wurde das Proteinlysat in gleichen Mengen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Als weiterer Indikator für die Aktivierung der Caspasekaskade dient die Spaltung von PARP-1 (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase). PARP-1 ist an der Reparatur der DNA beteiligt. Der wichtigste Reaktionspartner *in vivo* ist die durch Caspase-8 aktivierte Caspase-3 (Satoh and Lindahl 1992; Nicholson et al. 1995; Cohen 1997), zu deren Substraten PARP-1 gehört. Durch die Spaltung von PARP-1 wird die Disassemblierung/Demontage der Zelle gefördert, weshalb das Vorkommen der gespaltenen Form von PARP-1 auch als Marker für die Aktivierung der Apoptose verwendet werden kann. In Abbildung 10 wird die Caspase-8-Aktivierung in parentalen und 14.7K-exprimierenden H1299-Zellen gegenübergestellt.

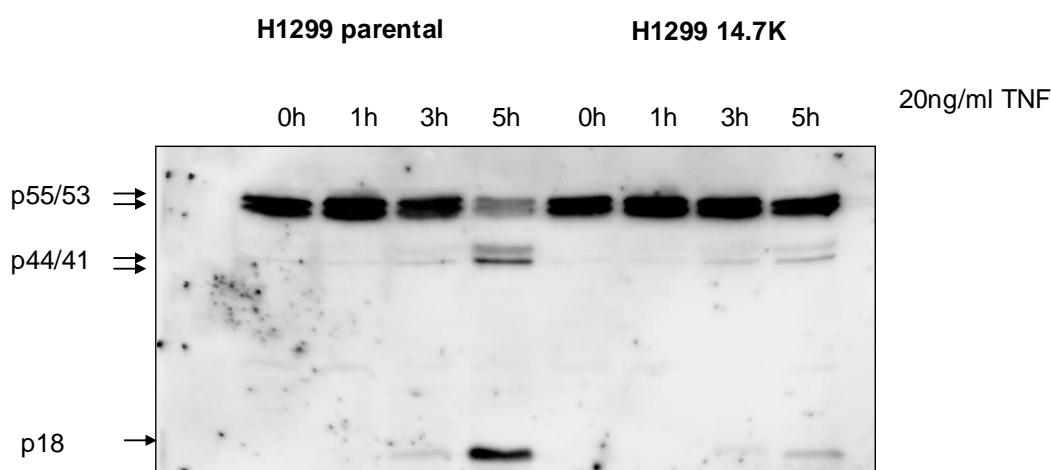


Abbildung 10: Aktivierung der Caspase-8 in Parental- und 14.7K-Zellen

Parentale und 14.7K-exprimierende H1299-Zellen wurden 2 h vor Stimulation in serumfreiem Medium inkubiert, für die angegebenen Zeitintervalle mit 20 ng/ml TNF stimuliert und mit RIPA lysiert. Das 15 % Gel wurde mit 60 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -Caspase-8- Antikörper.

Nach 5-stündiger TNF-Stimulation können in parentalen H1299-Zellen deutlich Banden auf der Höhe von 44/41 kDa und 18kDa nachgewiesen werden, welche den aktivierte Formen der Caspase-8 entsprechen. Gleichzeitig kann eine Abnahme der Caspase-8-Proform bei 55/53kDa detektiert werden. In 14.7K-exprimierenden

Zellen hingegen sind die Banden der aktivierte Caspase-8 nur sehr schwach erkennbar, was für eine starke Hemmung der Aktivierung der Protease spricht.

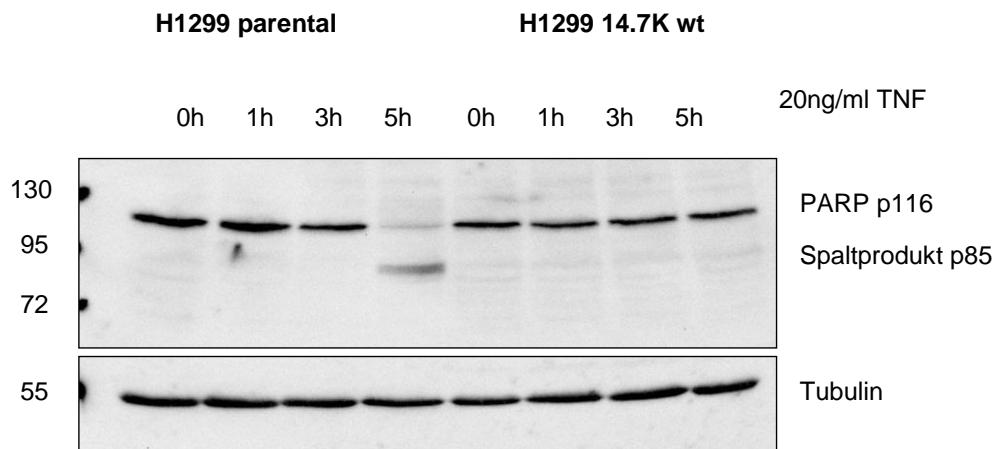


Abbildung 11: PARP-1-Spaltung

Parentale und 14.7K-exprimierende H1299-Zellen wurden 2h vor Stimulation in serumfreiem Medium inkubiert, für die angegebenen Zeitintervalle mit 20 ng/ml TNF stimuliert und mit RIPA lysiert. Das 15 %ige Gel wurde mit 60 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -PARP-Antikörper. Zur Ladekontrolle erfolgte die Behandlung mit einem α - β -Tubulin-Antikörper.

Abbildung 11 zeigt die Spaltung von PARP-1 in parentalen und 14.7K-exprimierenden H1299-Zellen. Nach 5-stündiger TNF-Stimulation wurde in Parentalzellen PARP-1 zu seinem Spaltprodukt mit einer Größe von 85kDa prozessiert. Bei den 14.7K-exprimierenden Zellen hingegen kam es nicht zur Spaltung von PARP-1. Die Ladekontrolle erfolgte mit einem β -Tubulin-Antikörper. Da auch eine Überexpression pro-apoptotischer Proteine zum Zelltod führen kann, sollte im Folgenden überprüft werden, ob 14.7K auch bei Überexpression von Caspase-8 protektierend wirkt.

4.3 Inhibition der Apoptose durch 14.7K nach Caspase-8-Überexpression

Die Aktivierung physiologischer Mengen an Caspase-8 kann durch 14.7K gehemmt werden (s. Abb. 9). Allerdings ist es bislang unklar, ob durch 14.7K auch die Aktivierung überexprimierter Caspase-8 gehemmt werden kann. Dies ist besonders im Zusammenhang mit der Durchführung eines Mammalian-Two-Hybrid Assays von Bedeutung, da hier Caspase-8 im Vektor pCMV-BD überexprimiert werden muss, um sie als sogenanntes *target*-Konstrukt zu synthetisieren. In einem Vorversuch wurde deshalb getestet, in welchem Verhältnis 14.7K und Caspase-8 überexprimiert werden können, um dabei die Apoptoseinduktion durch Caspase-8 möglichst gering zu halten. Um die Menge an lebendigen Zellen vergleichen zu können, wurde das für die Luciferase Renilla kodierendes Plasmid pRL-TK, welches auch später im Mammalian Two-Hybrid Assay verwendet wird, zusammen mit den Konstrukten pCMV-BD/Caspase-8 und pCMV-AD/14.7K co-transfiziert. Die Luciferase diente dabei auch als Transfektionskontrolle. Die so behandelten Zellen wurden 48 h nach Transfektion lysiert und die Aktivität der Luciferase im Zell-Lysat im Luminometer vermessen.

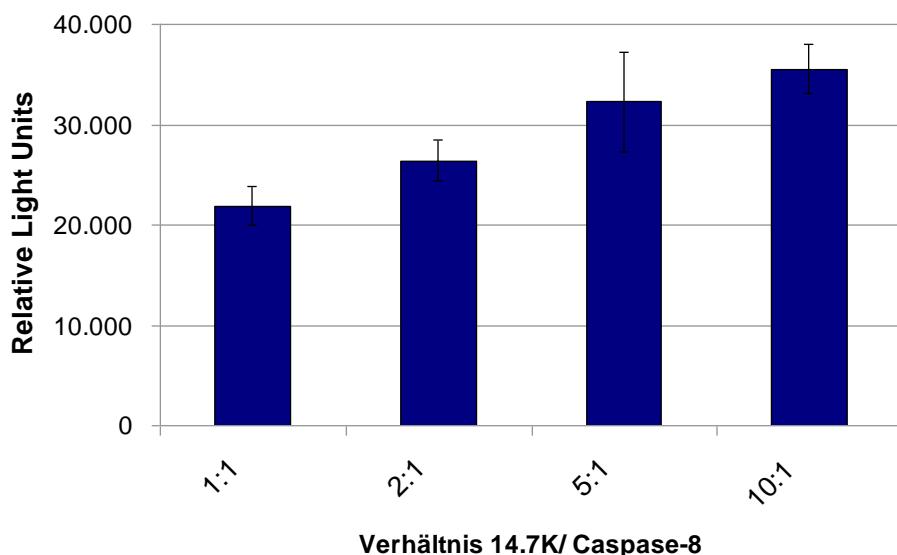


Abbildung 12: antiapoptotischer Effekt von 14.7K

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit 14.7K (pCMV-AD), Caspase-8 (pCMV-BD) und pRL-TK (Renilla) transfiziert. Die Menge des Caspase-8-Expressionsplasmids blieb mit 200 ng konstant, wogegen der Anteil an 14.7K bis auf das 10-Fache erhöht wurde. Nach 48 h erfolgten die Zelllyse sowie die Quantifizierung der Renillaaktivität.

Abbildung 12 zeigt, dass 14.7K bei gleichzeitiger Überexpression von Caspase-8 in Zellen einen protektiven Effekt aufweist. Analog zur Erhöhung der 14.7K-kodierenden Plasmidmenge (pCMV-AD/14.7K) und dem damit verbundenen Anstieg der 14.7K Proteinmenge in den Zellen erhöht sich auch die gemessene Aktivität der Luciferase Renilla im Zell-Lysat. Dies ist indikativ für eine größere Anzahl überlebender Zellen. Möglicherweise ist dafür eine direkte Interaktion von 14.7K und Caspase-8 verantwortlich, durch welche die Aktivierung der Caspase selbst und der nachfolgenden Caspasekaskade gehemmt werden kann.

4.4 Untersuchung der Interaktion von 14.7K und Caspase-8 mit Hilfe des Mammalian Two-Hybrid Assays

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen zwischen Caspase-8 und 14.7K wurde der Mammalian Two-Hybrid Assay verwendet. Um eine mögliche Interaktion auch gleich einem bestimmten Proteinabschnitt zuordnen zu können wurden mittels PCR definierte Genfragmente, entsprechend der funktionalen Proteinregionen, generiert (s. Abb.13). Nach Klonierung in die Zielvektoren pCMV-AD und pCMV-BD, kurz pAD und pBD, wurden die Konstrukte zusammen mit dem Reporterplasmid pFR-Luc in HEK293-Zellen transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Co-Transfektion mit Renilla, einer zweiten Luciferase, mit deren Hilfe die Transfektionseffizienz überprüft wurde. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Zell-Lysat nach dem Protokoll des Mammalian Two-Hybrid Assays im Luminometer vermessen. Der auf der y-Achse angegebene Wert der relativen Luciferaseaktivität errechnet sich aus dem Verhältnis von Reporterluciferase zu Renilla (s. 3.2.2.3 und 3.2.2.7).

Um eine Beeinflussung der Funktionalität der Konstrukte durch die unterschiedlichen Vektoren pAD und pBD auszuschließen, war das Vorliegen aller Konstrukte in beiden Vektoren und die Testung jeweils beider Konstrukte gegeneinander nötig. Auf diese Besonderheit wurde unsere Gruppe aufmerksam, als zwischen Optineurin und 14.7K nur eine Bindung nachgewiesen werden konnte, wenn Optineurin in pBD und 14.7K in pAD vorlag. Im Verlauf der Versuchsreihe konnten hierfür noch weitere Beispiele gefunden werden. Zusätzlich zu den testinternen Positivkontrollen wurden Optineurin, FADD, CrmA verwendet, da ihr Interaktionsverhalten bereits aus laboreigenen Versuchen bzw. aus der Literatur bekannt ist.

Einen Überblick über den Aufbau der Caspase-8 sowie die verwendeten Genfragmente geben die folgenden Abbildungen:

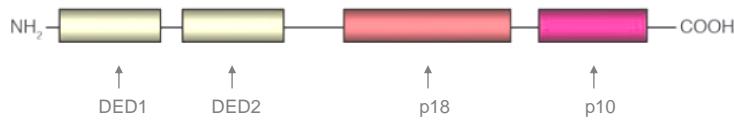


Abbildung 13: Aufbau der Caspase-8

Dargestellt ist die Caspase-8 in ihrer Proform. N-terminal befinden sich die zwei *death effector domains* DED 1 und 2. Im Anschluss daran folgen die große und kleine Untereinheit p18 und p10. Verändert nach Lavrik et al., 2005.

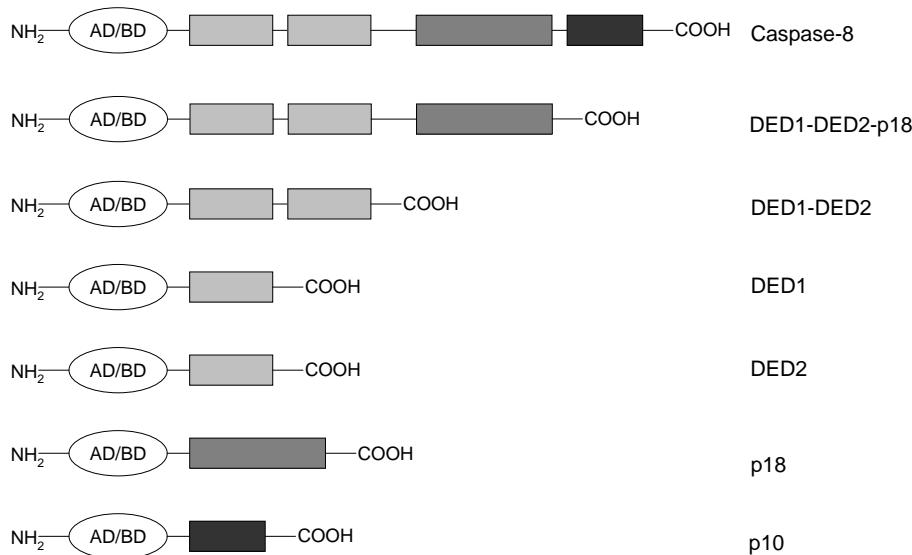


Abbildung 14: verwendete verkürzte Konstrukte der Caspase-8

In den folgenden Versuchen wurde die Caspase-8 sowohl in ihrer Proform als auch in kleineren Teilstücken verwendet. N-terminal befindet sich entweder die Aktivierungs- (AD) oder Bindedomäne (BD). Die zusätzlich generierten Teilstücke sind jeweils nach ihrem Proteinabschnitt benannt.

Eine besondere Schwierigkeit stellte die Apoptoseinduktion durch die überexprimierte Caspase-8 in den Zellen dar, da in sterbenden Zellen die nötigen Reporterluciferasen Firefly und Renilla nicht mehr exprimiert werden. Der vermehrte Zelltod zeigte sich sowohl makroskopisch durch das Ablösen der transfizierten Zellen als auch anhand der niedrigen Werte der Transfektionskontrolle Renilla im Luminometer. Allerdings besaß nur Caspase-8 in pBD diesen apoptotischen Effekt, da im pAD-Vektor keine Apoptose induziert wurde. Um die Aussagekraft des Assays durch die Apoptose nicht zu beeinflussen, wurde in einem späteren Versuch der Pancaspaseinhibitor z-VAD verwendet.

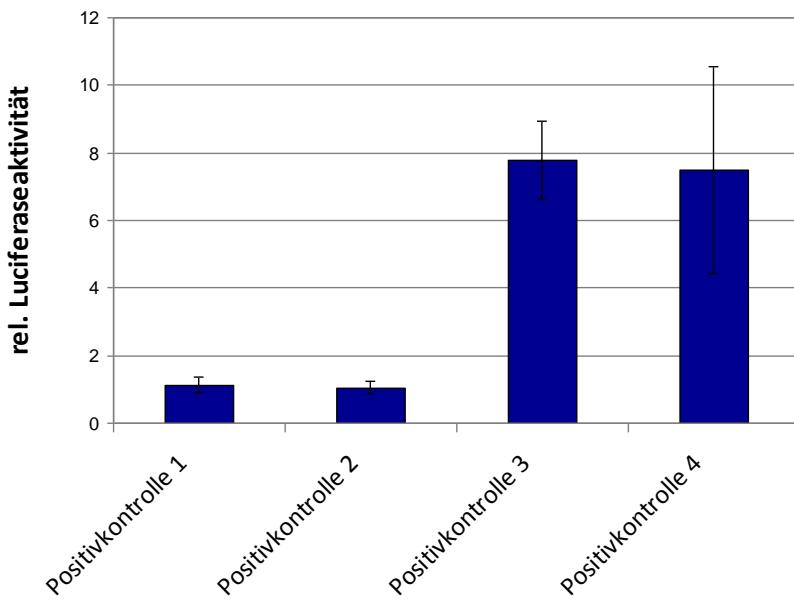


Abbildung 15: Positivkontrollen

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit verschiedenen Expressionskonstrukten (s.u.), pFR-Luc (Luciferase Firefly) und pRL-TK (Renilla) transfiziert. Nach 48 h erfolgten die Zelllyse sowie die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität als Verhältnis von Firefly zu Renilla. Die Positivkontakte 1 und 2 bezeichnen SV40T (pCMV-AD) / p53 (pCMV-BD) sowie Optineurin C-Terminus (pCMV-BD) / 14.7K (pCMV-AD), die Positivkontakte 3 und 4 DED1-DED2 (pCMV-AD) / FADD (pCMV-BD) sowie DED1-DED2 / DED1-DED2 (pCMV-AD und pCMV-BD).

Abbildung 15 zeigt zunächst eine Zusammenfassung aller Positivkontakte: als Positivkontrolle 1 die testinterne Kontrolle des Herstellers, als Positivkontrolle 2 der

Optineurin C-Terminus und 14.7K sowie als interne Positivkontrollen die Bindung der Caspase-8-DEDs an FADD (3) und die Bindung beider Caspase-8-DEDs aneinander (4).

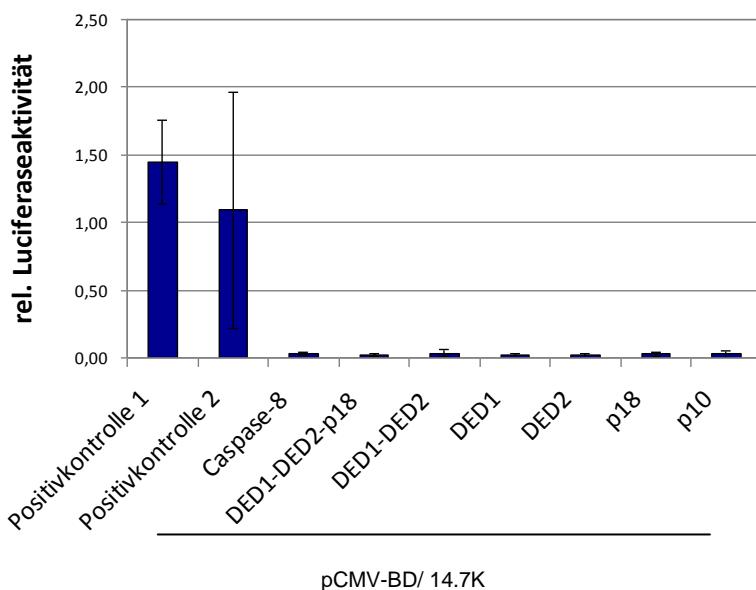
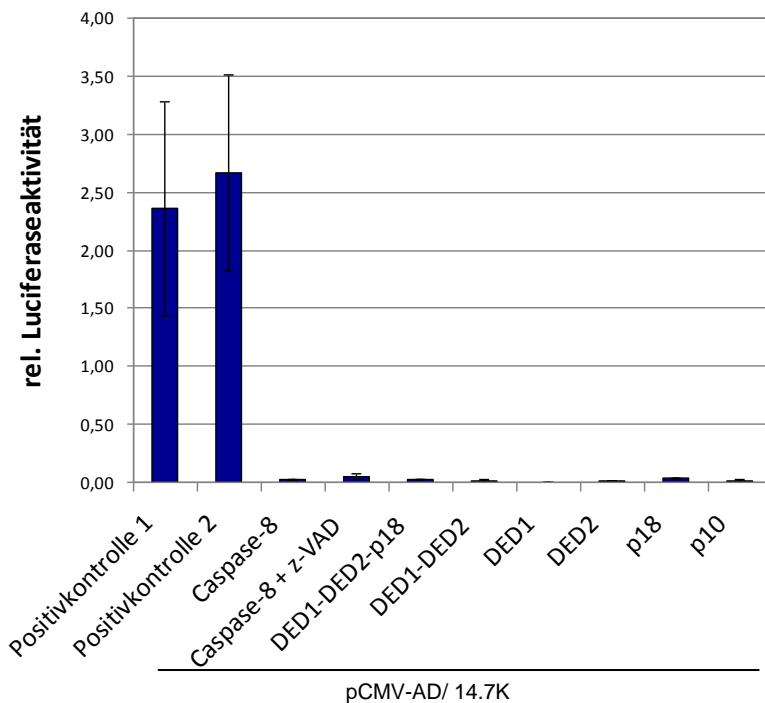


Abbildung 16: Caspase-8 in pCMV-AD

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten in ausgesät und mit 14.7K (pCMV-BD), Caspase-8 und ihren Teilstücken (pCMV-AD), pFR-Luc (Luciferase Firefly) und pRL-TK (Luciferase Renilla) transfiziert. Nach 48 h erfolgten die Zelllyse sowie die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität als Verhältnis von Firefly zu Renilla. Als Positivkontrollen 1 und 2 wurden SV40T (pCMV-AD) / p53 (pCMV-BD) sowie Optineurin C-Terminus (pCMV-BD) / 14.7K (pCMV-AD) verwendet.

Die Abbildung 16 zeigt, dass bei Co-Expression von 14.7K und Caspase-8 oder ihren einzelnen Proteinregionen keine Aktivität der Reporter-Luciferase Firefly gemessen werden kann. Dies bedeutet, dass keine Interaktion zwischen den Proteinen stattfindet.

Da wie oben beschrieben die Caspase-8 im Vektor pAD nicht in ihrer Funktion gestört zu sein scheint und selbst bei Überexpression keine Apoptose in den Zellen induziert, wurden die folgenden Versuche mit pBD/Caspase-8 durchgeführt. Es sollte dabei ausgeschlossen werden, dass aufgrund einer möglichen Beeinträchtigung der Proteinfaltung o. ä., die zum Funktionsverlust führt, ebenso die Interaktionsfähigkeit beeinträchtigt wird.

**Abbildung 17: Caspase-8 in pCMV-BD**

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten in ausgesät und mit 14.7K (pCMV-AD), Caspase-8 und ihren Teilstücken (pCMV-BD), pFR-Luc (Luciferase Firefly) und pRL-TK (Renilla) transfiziert. Nach 6 Stunden wurde zu einem der Ansätze mit Caspase-8 der Caspaseinhibitor z-VAD zugegeben. Nach 48 h erfolgten die Zelllyse sowie die Quantifizierung der Luciferaseaktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität als Verhältnis von Firefly zu Renilla. Als Positivkontrollen 1 und 2 wurden SV40T (pCMV-AD) / p53 (pCMV-BD) sowie Optineurin C-Terminus (pCMV-BD) / 14.7K (pCMV-AD) verwendet.

Die Abbildung 17 zeigt ebenfalls keine nachweisbare Reporter-Luciferase-Aktivität, was wiederum auf das Fehlen einer Interaktion hindeutet. Allerdings konnte hier eine Beeinträchtigung durch Funktionsverlust von Caspase-8 und 14.7K ausgeschlossen werden, da ein vermehrter Anteil an apoptotischen Zellen nach Transfektion beobachtet werden konnte. Zudem war die Messung der Aktivität der Kontroll-Luciferase Renilla sehr gering, was ebenfalls auf wenig vitale Zellen schließen lässt. Daher wurde in einem zweiten Ansatz der Caspaseinhibitor z-VAD (50 μ M) zugegeben um einen frühzeitigen Zelltod zu vermeiden, welcher eine mögliche Interaktion von 14.7K und Caspase-8 undetektierbar macht. Es konnte jedoch auch in Anwesenheit von z-VAD keine Renillaaktivität und damit also keine Bindung nachgewiesen werden.

Um die generelle Funktionalität der verwendeten Konstrukte im Mammalian Two-Hybrid Assay sicherzustellen, wurde sowohl die Fähigkeit von Caspase-8 zur Dimerisierung, jeweils im Vektor pAD bzw. pBD, als auch eine Bindung der einzelnen Proteindomänen untereinander überprüft.

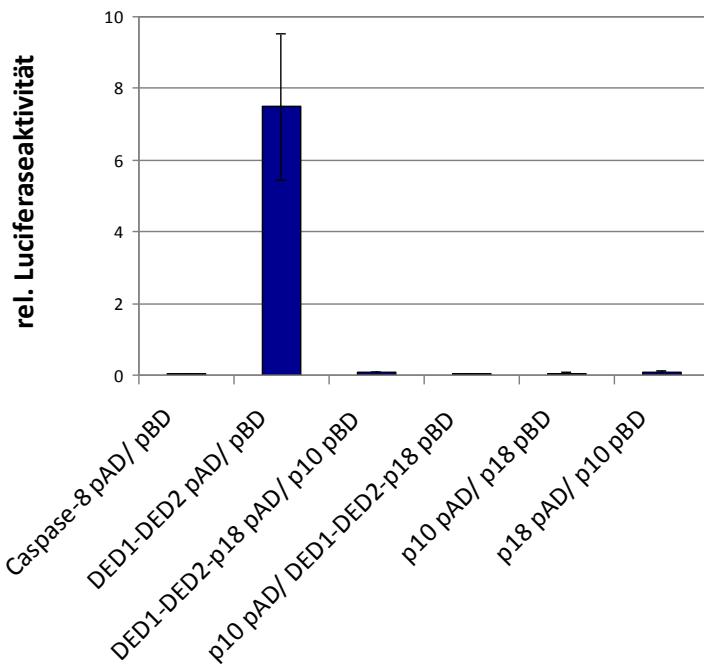


Abbildung 18: Bindung der DEDs aneinander

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit Caspase-8 oder ihren Teilstücken (je in pCMV-AD oder pCMV-BD), pFR-Luc (Luciferase Firefly) und pRL-TK (Renilla) transfiziert. Nach 48 h erfolgten die Zellyse sowie die Quantifizierung der Luciferaseaktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität als Verhältnis von Firefly zu Renilla.

Die Abbildung 18 zeigt eine nachweisbare Luciferase-Aktivität bei Expression der DEDs der Caspase-8, was für eine Interaktion der Proteindomänen spricht, wie sie auch bei der Dimerisierung zweier nativer Caspasen vorkommt. Zwischen den anderen einzeln exprimierten Proteindomänen fand keine Interaktion statt. Allerdings konnte aufgrund der Apoptoseinduktion durch pBD/Caspase-8 auch keine Interaktion zwischen den vollständigen Caspase-8-Proteinen nachgewiesen werden.

Ein weiteres bekanntes Interaktionsprotein von Caspase-8 ist FADD, welches ebenso wie TRADD und Caspase-8 im DISC vertreten ist, und zur Rekrutierung von Caspase-8 an den aktivierte TNFR1 dient. Die Interaktion zwischen FADD und den DEDs der Caspase-8 wurde im folgenden Versuch nachgewiesen.

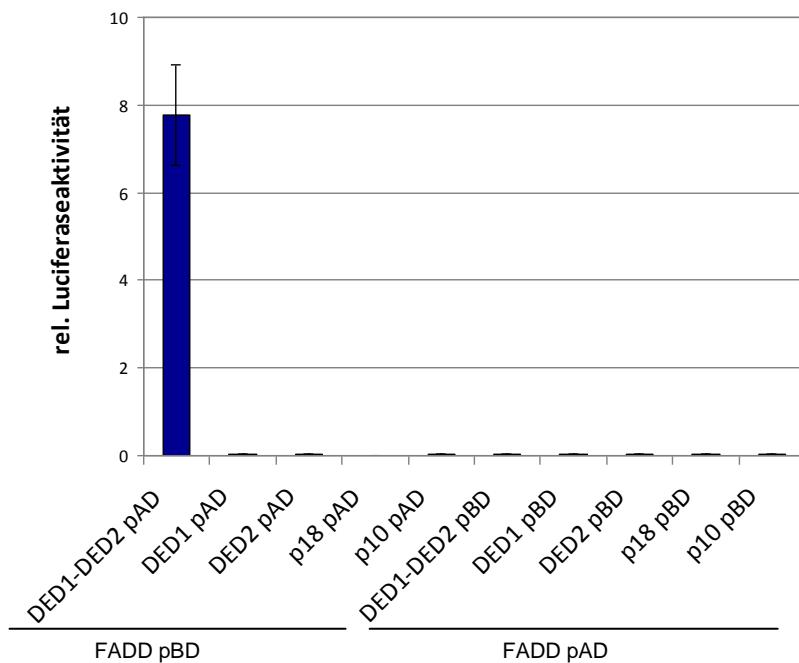


Abbildung 19: Bindung zwischen Caspase-8 und FADD

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit FADD (je in pCMV-AD oder pCMV-BD), Teilstücken von Caspase-8 (je in pCMV-AD oder pCMV-BD), pFR-Luc (Luciferase Firefly) und pRL-TK (Renilla) transfiziert. Nach 48 h erfolgten die Zelllyse sowie die Quantifizierung der Luciferaseaktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität als Verhältnis von Firefly zu Renilla.

Abbildung 19 zeigt die Interaktion von Caspase-8 mit FADD, einem der bekannten Partner bei der Bildung des DISC (Hsu, Shu, et al. 1996; Muzio et al. 1996). Die Bindung findet wie erwartet zwischen FADD und den DEDs der Caspase-8 statt, alle anderen Reaktionspartner interagieren nicht. FADD muss zum Nachweis der Bindung in pBD vorliegen (links), da im umgekehrten Fall keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (rechts). Außerdem müssen die DEDs als

gemeinsames Fusionsprotein exprimiert werden, da sie als einzeln exprimierte Proteindomänen nicht mit FADD interagieren können.

In einem weiteren Mammalian Two-Hybrid Assay wurde schließlich CrmA als ein bekannter Interaktionspartner der Caspase-8 verwendet. Dieser bindet als Inhibitor jedoch nicht an die Proform, sondern an das aktive Zentrum der Caspase-8 (Dobó et al. 2006).

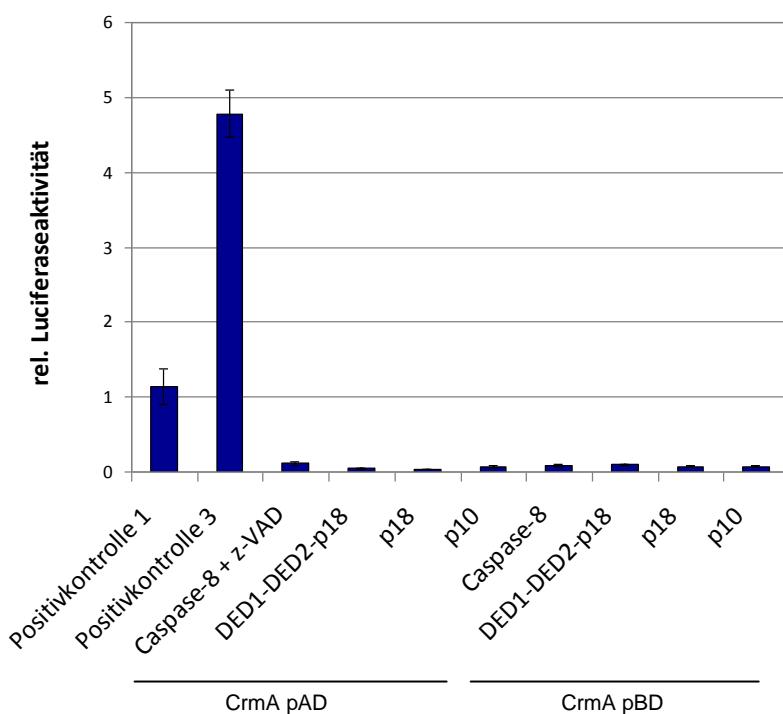


Abbildung 20: Caspase-8 und CrmA

HEK293-Zellen wurden in Triplikaten ausgesät und mit CrmA (je in pCMV-AD und pCMV-BD), Caspase-8 und ihren Teilstücken (je in pCMV-AD und pCMV-BD), pFR-Luc (Luciferase Firefly) und pRL-TK (Renilla) transfiziert. Nach 6 Stunden wurde zu einem der Ansätze mit Caspase-8 der Caspaseinhibitor z-VAD zugegeben. Nach 48 h erfolgten die Zelllyse sowie die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität als Verhältnis von Firefly zu Renilla. Als Positivkontrollen 1 und 3 wurden SV40T (pCMV-AD) / p53 (pCMV-BD) sowie DED1-DED2 / DED1-DED2 (je in pCMV-AD und pCMV-BD) verwendet.

Abbildung 20 zeigt, dass keine Proteininteraktion zwischen Caspase-8 und CrmA stattfindet. Wie in der Einleitung erwähnt (s. 1.3 u. 1.5.1), gehört CrmA zur Familie

der Serpine und inhibiert die Cysteinprotease Caspase-8 nach ihrer Aktivierung durch Bindung an ihr aktives Zentrum (s. Abb. 5). Nach der autokatalytischen Abspaltung der Prodomäne liegt die Caspase-8 in ihrer aktiven Form als Heterotetramer [$p18_2-p10_2$] vor, wobei sich durch Zusammenlagerung der Untereinheiten zwei aktive Zentren bilden, die einander gegenüberliegen (s. Abb. 3) (Chowdhury, Tharakan, and Bhat 2008; K. P. Wilson et al. 1994). Die Interaktion mit CrmA führt schließlich zu einem irreversiblen Komplex aus CrmA und einer p18-Untereinheit (Komiyama et al. 1994; Patston et al. 1991).

Ein Problem stellt die Abspaltung der N-terminalen DEDs der Caspase-8 bei ihrer Aktivierung dar, da durch den Mammalian Two-Hybrid-Vektor jeweils N-terminal ein Protein-*tag* fusioniert wird. Das Vorhandensein dieses *tags* (Aktivierungs- bzw. Bindedomäne) ist für die Detektion einer möglichen Protein-Interaktion aber zwingend notwendig. Die erwartete Interaktion von Caspase-8 und CrmA kann daher möglicherweise aufgrund der Abspaltung der erforderlichen Protein-*tags* nicht nachgewiesen werden. Da durch die verschiedenen, einzeln exprimierten Proteindomänen kein aktives Zentrum gebildet werden kann, ist auch zwischen diesen und CrmA keine Interaktion nachweisbar, obwohl es hier nicht zu einem Verlust der *tags* durch Abspaltung kommt.

4.5 Expressionsnachweis der Caspase-8-Konstrukte

Um die Ergebnisse aus 4.2 zu verifizieren, sollte die Expression der Fusionsproteine in der verwendeten Zelllinie mittels Antikörperbindung im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Klonierung der verwendeten Sequenzen in die Vektoren pCMV-AD und pCMV-BD ist durch die Fusion mit einem entsprechenden Protein-*tag* die Voraussetzung für den Mammalian Two-Hybrid Assay und gleichzeitig der Angriffspunkt für die beiden später in Western-Blot und Immunpräzipitation verwendeten Antikörper. Das jeweilige Insert wird bei der Klonierung durch den Vektor pCMV-AD mit der Aktivierungsdomäne des p65-Proteins, und durch den Vektor pCMV-BD mit der Bindedomäne des GAL-4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zellen mit den jeweiligen Konstrukten in pCMV-AD oder pCMV-BD mit PEI oder Calciumchlorid (s. 3.2.2.3) transfiziert und

nach 48 Stunden mittels RIPA oder EMSA-Lyse lysiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung durch SDS-PAGE erfolgte die Detektion der Proteine mittels α -p65 bzw. α -GAL4 Antikörpern. Es wurden, soweit nicht anders angegeben, 12%ige SDS-Gele verwendet. Bei einigen Proben wurde außerdem eine Immunpräzipitation durchgeführt, um die entsprechenden Proteine trotz möglicherweise sehr schwachem Expressionslevel nachweisen zu können.

4.5.1 Detektierte Fusionsproteine

Die Expression der im Mammalian Two-Hybrid Assay verwendeten Fusionsproteine Caspase-8, DED1-DED2-p18, p10, FADD und der testinternen Kontrolle p53 konnte im Western-Blot belegt werden.

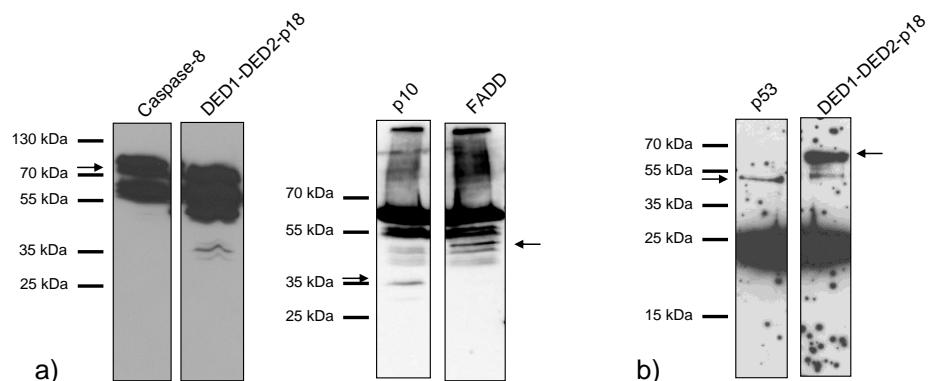


Abbildung 21: Expression in den Vektoren pCMV-AD und -BD

HEK293-Zellen wurden in **a)** mittels PEI mit 20 μ g der genannten Konstrukte in pCMV-AD und in **b)** mittels PEI mit 20 μ g der genannten Konstrukte in pCMV-BD transfiziert und nach 48 h mit RIPA lysiert. Das Gel wurde mit 50 μ g pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte in **a)** mit einem α -p65-, in **b)** mit einem α -GAL4 Antikörper.

Abbildung 21 bestätigt die Expression der genannten, verschiedenen Fusionsproteine mit jeweils einer Aktivierungs- (**a)**) oder Bindedomäne (**b**)). Als Besonderheit zeigt sich bei **a)** eine jeweils am stärksten ausgeprägte Bande bei 65 kDa, da der Antikörper auch zelleigenes p65 erkennt. Die Größen der jeweiligen

Fusionsproteine sind der folgenden Tabelle aufgeführt, die Größe des p65-/ GAL4-Tags beträgt ~ 20 bzw. 17 kDa.

Fusionsprotein		Molekulargewicht
a) p65-	Caspase-8	76 kDa
	DED1-DED2-p18	65 kDa
	p10	31 kDa
	FADD	46 kDa
b) GAL4-	DED1-DED2-p18	62 kDa
	Positivkontrolle p53	53 kDa

4.5.2 Nicht-detektierte Fusionsproteine

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, die bisher nicht nachweisbaren Fusionsproteine durch Immunpräzipitation sowie Veränderung der Gelkonzentration und des Transfektions- und Lyseverfahrens darzustellen.

Tabelle gibt einen Überblick über die jeweiligen Größen der zu detektierenden Fusionsproteine.

Tabelle 13: Größen der Fusionsproteine

p65-Fusionsprotein	Molekulargewicht
DED1-DED2	45 kDa
DED1	30 kDa
DED2	31 kDa
p18	34 kDa
CrmA	58 kDa
14.7K	32 kDa

GAL4-Fusionsprotein	Molekulargewicht
Caspase-8	73 kDa
DED1-DED2	62 kDa
DED1	27 kDa
DED2	28 kDa
p18	31 kDa
p10	28 kDa
14.7K	32 kDa
FADD	43 kDa
Optineurin C-Terminus	38 kDa
14.7K	32 kDa

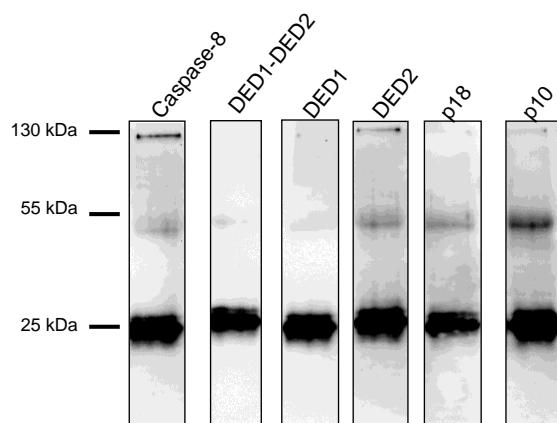


Abbildung 22: Immunpräzipitation

HEK293-Zellen wurden mit PEI mit 20 µg der genannten Konstrukte in pCMV-BD transfiziert und nach 48 h mit RIPA lysiert. Anschließend wurde 1 mg Gesamtproteinmenge mit 1 µg eines α-GAL4 Antikörpers bei 4°C im Überkopfschüttler über Nacht inkubiert. Dann wurden 15 µg der bereits gewaschenen Protein G Sepharose zugegeben und der Ansatz für weitere 3 h inkubiert. Nach Sedimentation und Trockensaugen wurde die Sepharose mit SDS-Probenpuffer bei 95°C inkubiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteindetektion erfolgte mittels Western-Blot-Analyse.

Abbildung 22 zeigt die Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation. Erkennbar sind die Banden der leichten und schweren Kette des Antikörpers bei 55 bzw. 25 kDa, Fusionsprotein-spezifische Banden zeigen sich jedoch nicht. Um eine Überlagerung von Banden im Western-Blot auszuschließen, wurden nun neben 12% SDS-Gelen auch 8% SDS-Gele angefertigt, um die Auftrennung der Proteingrößen zu verfeinern.

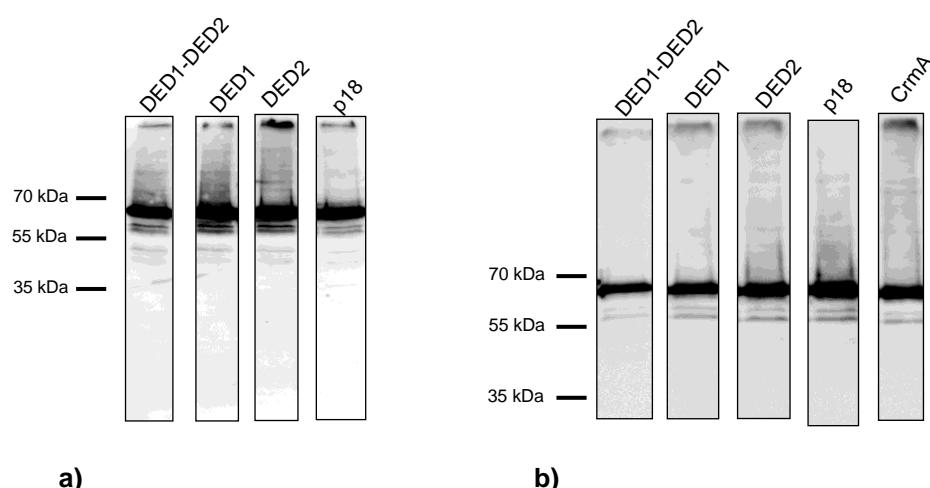


Abbildung 23: Caspase-8- und CrmA- Fusionsproteine bei 12- und 8%igem Gel
HEK293-Zellen wurden mittels PEI mit 20 µg der genannten Konstrukte in pCMV-AD transfiziert und nach 48 h mit RIPA lysiert. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -p65 Antikörper. Abbildung a) zeigt ein 12-, b) ein 8%iges Gel.

In Abbildung 23 wurden zwei verschiedene Gelkonzentrationen gewählt. Mit einer niedrigeren Konzentration des Gels können die zum Teil wohl auch unspezifischen Banden besser aufgetrennt werden. So kann, sofern vorhanden, die gesuchte Bande leichter identifiziert werden. Allerdings konnte auch bei niedriger konzentrierten Gelen keine Zuordnung einer Bande zum jeweiligen Fusionsprotein getroffen werden.

Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die Ursache der fehlenden oder zu geringen Proteinexpression in der Transfektionsmethode begründet ist.

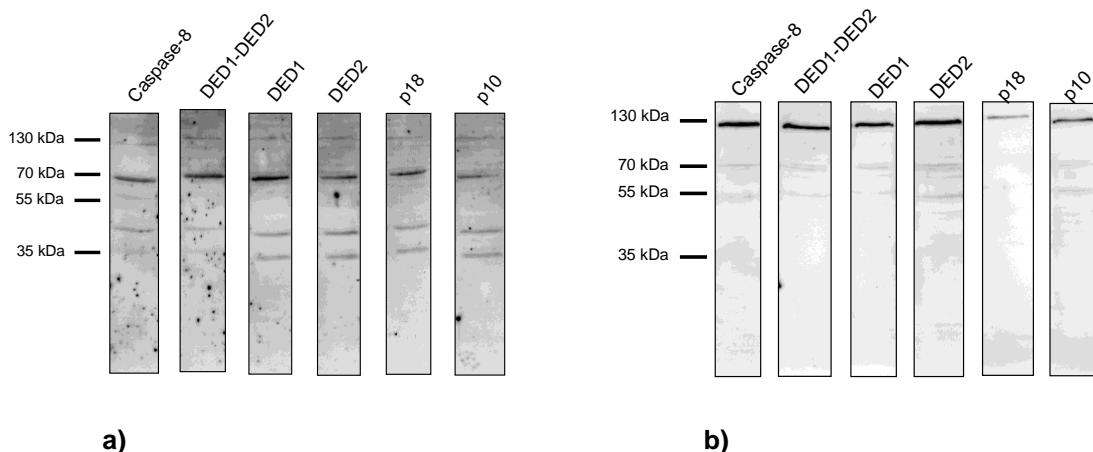
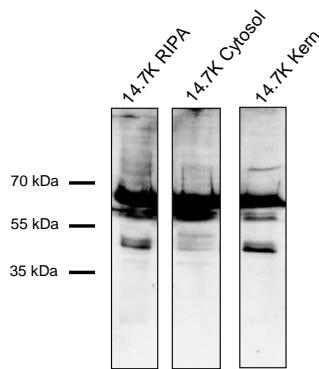


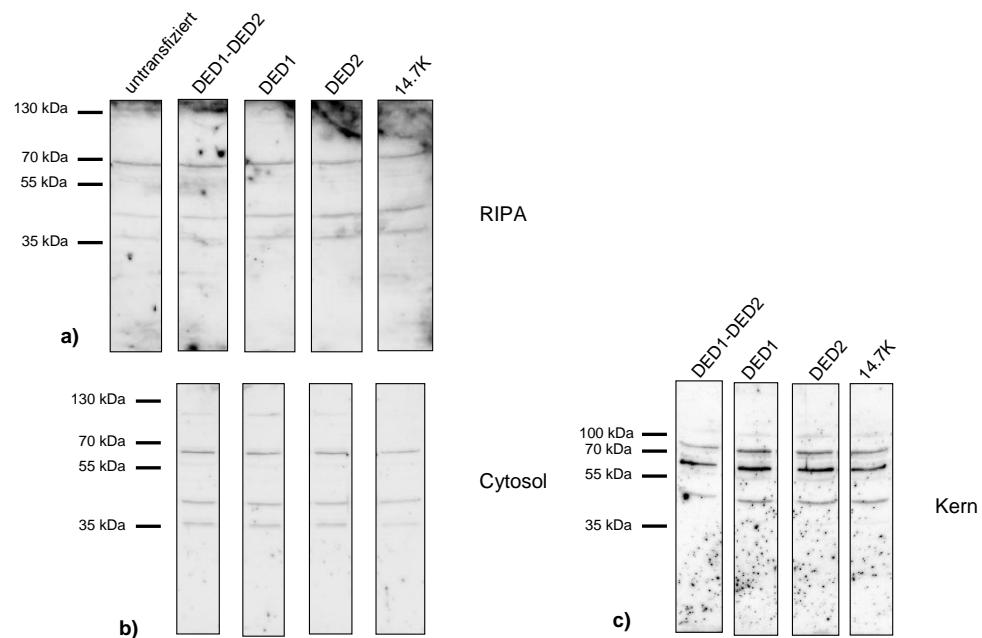
Abbildung 24: Transfektion der Caspase-8-Konstrukte mit PEI oder CaCl_2

HEK293-Zellen wurden in **a)** mit PEI mit 20 µg, in **b)** mit Calciumchlorid mit 30 µg der genannten Konstrukte in pCMV-BD transfiziert und nach 48 h mit RIPA lysiert. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -GAL4 Antikörper.

Abbildung 24 zeigt die Western-Blot-Analyse verschiedener Fusionsproteine nach Transfektion mit zwei verschiedenen Methoden, PEI und Calciumchlorid, um diese als Fehlerquelle auszuschließen. Trotzdem sind in beiden Western-Blots keine Fusionsprotein-spezifischen Banden erkennbar. Im weiteren Verlauf wurde deshalb die Lysemethode verändert.

**Abbildung 25: 14.7K-Fusionsproteine bei RIPA- und EMSA-Lyse**

HEK293-Zellen wurden mit PEI mit 20 µg der genannten Konstrukte in pCMV-AD transfiziert und nach 48 h mit RIPA bzw. EMSA lysiert. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -p65 Antikörper.

**Abbildung 26: Caspase-8-Fusionsproteine bei RIPA- und EMSA-Lyse**

HEK293-Zellen wurden mit PEI mit 20 µg der genannten Konstrukte in pCMV-BD transfiziert und nach 48 h mit RIPA bzw. EMSA lysiert. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -GAL4 Antikörper. Für Abbildung a) wurden mit RIPA hergestellte Lysate, für b) und c) mittels EMSA-Lyse hergestellte Lysate aufgetragen.

Die Abbildungen 25 und 26 dienen dem Vergleich der Banden bei RIPA- und EMSA-Lyse. Die EMSA-Lyse wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass die Zellkerne durch den RIPA-Puffer nicht ausreichend lysiert wurden. Da die Fusionsproteine aus pCMV-AD und -BD zusätzlich mit einer Kernlokalisationssequenz versehen sind, ist davon auszugehen, dass die Fusionsproteine im Zellkern in höheren Konzentrationen vorliegen als im Cytosol. Die gezielte Präparation der Zellkerne sollte also zu einer höheren Konzentration und Reinheit der Proteine und somit zu einer besseren Nachweisbarkeit im Western-Blot führen. Sowohl die Lyse mit RIPA als auch die EMSA-Lyse lieferten aber keine spezifischen Banden. Zuletzt wurden nun auch die bei der RIPA-Lyse sedimentierten Zellfragmente einschließlich des Zellkerns untersucht.

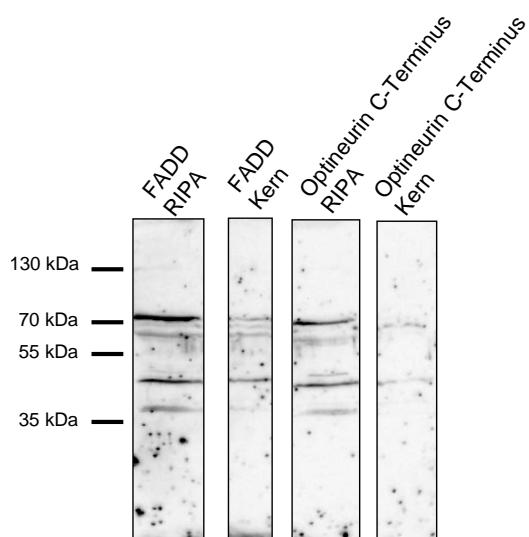


Abbildung 27: RIPA-Lyse und Zellkern-Lysat

HEK293-Zellen wurden mit PEI mit 20 µg der genannten Konstrukte in pCMV-BD transfiziert und nach 48 h mit RIPA lysiert. Anschließend wurden auch die sedimentierten Zellfragmente einschließlich des eventuell nicht lysierten Kerns mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und aufgetragen. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -GAL4 Antikörper.

Abbildung 27 zeigt die RIPA-Lyse der transfizierten Zellen. Um die eventuell im Zellkern verbliebenen Fusionsproteine zu detektieren, wurden auch die sedimentierten Zellkerne lysiert und aufgetragen. Trotzdem konnten den Fusionsproteinen keine Banden zugeordnet werden.

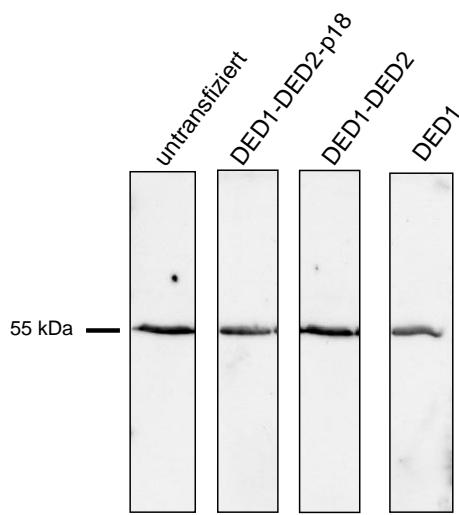


Abbildung 28: Ladekontrolle mit α - β -Tubulin Antikörper

HEK293-Zellen wurden mit PEI mit 20 µg der genannten Konstrukte in pCMV-BD transfiziert und nach 48 h mit RIPA lysiert. Das Gel wurde mit 50 µg pro Spur beladen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Die Detektion des zelleigenen Tubulins erfolgte mit einem α - β -Tubulin Antikörper, die Größe beträgt 55 kDa.

Um einen Fehler bei der Behandlung der PVDF-Membran mit Antikörpern oder bei der Entwicklung aufzudecken, wurde sie mit einem α - β -Tubulin Antikörper behandelt. Abbildung 28 zeigt, dass wie erwartet auf jeder Spur das zelleigene β -Tubulin mit einer Bande bei 55 kDa durch den Antikörper erkannt wurde.

5. Diskussion

Seit über 20 Jahren ist bekannt, dass sowohl eine adenovirale Infektion als auch die alleinige Expression des adenoviralen Proteins 14.7K die Wirtszellen vor TNF-induzierter Apoptose bewahren kann (Gooding et al. 1988; Horton et al. 1991). Der Wirkmechanismus hingegen ist noch immer größtenteils unbekannt. Durch die Entdeckung der TNFR1-Internalisierungs-Domäne TRID (TNF-receptor internalization domain) konnten Schneider et al. zeigen, dass die Internalisierung des Rezeptors für die Rekrutierung der DISC-Proteine essentiell ist (Schneider-Brachert et al. 2004).

Später wurde bekannt, dass auch in 14.7K-exprimierenden Zellen die Internalisierung des Rezeptors sowie die Bildung des DISC verhindert werden. Die Aktivierung der Caspase-8 findet folglich nicht mehr statt, wodurch ein TNF-induzierter Zelltod verhindert wird (Schneider-Brachert et al. 2006).

An welchen Punkten 14.7K in diesen Signalweg der TNF-induzierten Apoptose eingreift ist noch nicht geklärt. Bis heute konnte 14.7K in der Zelle weder am Rezeptor selbst, noch als direkter Bindungspartner der Proteine des DISC nachgewiesen werden. In vitro zeigten Chen et al. in den 90er Jahren mithilfe einer Co-Immunpräzipitation eine Bindung von 14.7K und Caspase-8. Auch Kim und Foster beschrieben, detektiert über ein GST-Pulldown-Experiment, eine Interaktion von 14.7K mit der DED der Caspase-8 (P. Chen et al. 1998; Kim and Foster 2002). Somit erschien die Caspase-8 als vielversprechender potentieller Bindungspartner für 14.7K. In der vorliegenden Arbeit sollte eine Interaktion der beiden Proteine in der Zelle untersucht werden.

Der in H1299-Zellen durchgeführte Zytotoxizitätsassay (s. Abb. 9) verdeutlicht, dass, im Vergleich zu parentalen Zellen, 14.7K-exprimierende Zellen eine TNF-Resistenz aufweisen. Es konnte bereits durch eine fluorimetrischen Bestimmung der Caspase-8-Aktivität gezeigt werden, dass bei diesen TNF-resistenten Zellen eine deutliche Hemmung der Caspaseaktivierung stattfindet (Klingseisen 2011). Auch der Western-Blot zur Caspaseaktivierung (s. Abb. 10) zeigt in TNF-resistenten Zellen nur noch eine geringe Aktivierung der Caspase-8. Da in 14.7K-exprimierenden

Zellen keine PARP-1-Spaltung stattfindet (s. Abb. 11), kann zusätzlich vermutet werden, dass es hier auch nicht zur Aktivierung der Caspase-3 kommt.

Demzufolge reicht der Anteil an aktiverter Caspase-8 in diesen Zellen nicht mehr aus, um die Caspasekaskade in Gang zu setzen. Im weiteren Verlauf wurde versucht, den protektiven Effekt von 14.7K ohne TNF-Stimulation bei gleichzeitiger Überexpression von Caspase-8 sichtbar zu machen (s. Abb. 12). Es konnte beobachtet werden, dass die Überexpression zum Zelltod führt, der durch die Co-Expression von 14.7K jedoch gehemmt werden kann.

Alle Ergebnisse führten zur eigentlichen Arbeitshypothese: 14.7K besitzt einen protektiven Effekt, welcher über die Inhibition der Caspase-8 vermittelt werden könnte. Nach Schneider et al. findet in 14.7K-exprimierenden Zellen keine Bildung des DISC mehr statt (Schneider-Brachert et al. 2006). All diese Sachverhalte sprechen für die Caspase-8 in ihrer Proform als möglichen Bindungspartner. Darum wurde versucht, eine Interaktion beider Proteine *in vivo* mittels eines Mammalian Two-Hybrid Assays nachzuweisen.

5.1 Mammalian Two-Hybrid Assay

Im Mammalian Two-Hybrid Assay werden zwei Fusionsproteine mit je einem p65-(Aktivierungsdomäne) und einem GAL4-*tag* (Bindedomäne) verwendet. Ihre Interaktion führt zur Expression der Reporter-Luciferase Firefly. Die Vektoren enthalten einen starken CMV-Promotor, der eine Überexpression der Proteine bewirkt und sie außerdem mit einer Kernlokalisations-Sequenz verseht, die beide Proteine zur Reaktion in einem Kompartiment, dem Zellkern, zusammenbringt.

Die Fusion an ein Protein-*tag* birgt allerdings auch immer die Gefahr, dass das entsprechende Fusionsprotein bei der Faltung der Tertiärstruktur beeinträchtigt wird, bzw. bestimmte Proteinregionen durch das *tag* verdeckt werden. Das Verbringen in den Zellkern stellt ein weiteres Problem dar, da die zu testenden Proteine oftmals nicht in natürlicherweise diesem Zellkompartiment vorkommen. Das adenovirale Protein 14.7K allerdings ist ebenso wie Caspase-8 ein Protein, welches sowohl im

Cytosol als auch im Zellkern vorhanden ist (Ranheim et al. 1993; Harrod, Mounday, and Whitsett 2000; Qin et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proform der Caspase-8 und ihre verkürzten Formen sowohl als p65- als auch als GAL4-Fusionsprotein im Mammalian Two-Hybrid Assay eingesetzt. Die Verwendung der verkürzten Formen sollte der genaueren Zuordnung der Proteinbindung von 14.7K zu bestimmten Domänen der Caspase-8 dienen.

5.1.1 Caspase-8 in pCMV-AD

Das Fusionsprotein aus Caspase-8 und der Aktivierungsdomäne (AD) führt nicht zur Apoptose, es kann also möglicherweise keine Spaltung zur aktiven Form stattfinden. Dieses könnte in der Behinderung der Ausbildung einer korrekten Proteinfaltung durch die Aktivierungsdomäne begründet sein. Da diese ebenso wie die DEDs, welche zur Ausbildung der aktiven Caspase-8 abgespalten werden müssen, am N-Terminus des Proteins liegt, ist es möglich, dass die Prozessierung der Proform beeinträchtigt ist. Folgt man aber der Hypothese, dass 14.7K mit der Proform der Caspase-8 interagiert, wäre eine Bindung der Proteine grundsätzlich auch mit einer nicht-aktivierbaren Variante der Caspase-8 möglich. Die Abbildung 16 zeigt, dass es zwischen 14.7K und der Proform der Caspase-8 bzw. ihren Teilstücken nicht zur Proteinbindung kommt. In Vorversuchen wurde allerdings festgestellt, dass das adenovirale Protein 14.7K als pCMV-BD-Fusionsprotein nicht mit seinem zellulären Interaktionspartner Optineurin interagieren kann. Daraus kann vermutet werden, dass in der Kombination Caspase-8/pAD – 14.7K/pBD nicht die inaktive Caspase-8 der begrenzende Faktor ist, sondern dies möglicherweise am 14.7K-Expressionskonstrukt liegt.

5.1.2 Caspase-8 in pCMV-BD

Das Fusionsprotein aus Caspase-8 und der Bindedomäne (BD) induzierte Apoptose, was an den abgelösten, toten Zellen deutlich wurde. Somit ist davon auszugehen, dass Caspase-8 voll funktionsfähig war und zur aktiven Form gespalten wurde, das *tag* störte die korrekte Proteinfaltung scheinbar nicht. In diesem Versuch war zudem 14.7K mit der Aktivierungsdomäne (AD) verbunden, jenem *tag*, mit welchem auch in der Positivkontrolle 1 eine Bindung gezeigt werden konnte. Diese Kombination hatte also die besten Bedingungen, eine Bindung auch detektieren zu können, sofern sie stattfinden würde.

Wie in Abbildung 17 gezeigt ist, konnte jedoch keine Interaktion zwischen 14.7K und der Caspase-8 detektiert werden. Durch die Überexpression der Caspase-8 kam es zur autokatalytischen Aktivierung (Keller et al. 2009), was nachfolgend zum Tod der transfizierten Zellen führte. Wie zu Beginn erwähnt, müssen die Zellen aber vital bleiben, um die entsprechenden Reporterluciferasen zu synthetisieren, welche den Mammalian Two-Hybrid Assay auswertbar machen. Auch durch co-exprimiertes 14.7K konnte das Absterben der Zellen nicht verhindert werden. Dieser Sachverhalt widerspricht der Beobachtung, dass die Expression von 14.7K die Aktivierung von Caspase-8 und damit die Apoptose verhindert (s. Abb. 10). Es muss aber beachtet werden, dass dabei in der Zelle nur physiologische Mengen an Caspase-8 vorhanden waren und es sich nicht wie hier um unphysiologische Proteinmengen durch Überexpression handelte. Gerade in fein regulierten Signalwegen wie die der Apoptose führt die Überexpression von beteiligten Proteinen zu artifiziellen Ergebnissen. Zudem fand die beobachtete 14.7K-medierte Zellprotektion nach Stimulation mit TNF statt. Hier wurde der Zelltod nun jedoch allein durch eine autokatalytisch aktivierte Caspase-8 induziert, was keinem physiologischen Zellzustand entspricht. Dass aber auch der durch Caspase-8-Überexpression vermittelte Zelltod durch 14.7K bis zu einem gewissen Grad blockiert werden kann, zeigt Abbildung 12. Durch eine Verschiebung des Verhältnisses der Proteinmenge von 14.7K zu Caspase-8 können die transfizierten Zellen geschützt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Stöchiometrie bei der Protektion vor TNF-induzierter Apoptose eine Rolle spielen könnte.

Um das Absterben der Zellen zu verringern, wurde den Zellen der Caspase-Inhibitor z-VAD zugesetzt. Da die zellulären Caspasen in ihrer Funktion gehemmt wurden, blieben die Zellen vital. Allerdings konnte auch hier keine Interaktion mit 14.7K nachgewiesen werden. z-VAD ist ein Inhibitor, welcher irreversibel an das aktive Zentrum bindet (Callus and Vaux 2007).

Bemerkenswerterweise kommt es auch nicht zur Interaktion mit den einzeln exprimierten Domänen der Caspase-8 und 14.7K. Da 14.7K die Prozessierung der Caspase hemmt, wäre zu erwarten gewesen, dass 14.7K mit den DEDs interagieren kann, wie bereits von Chen et al. sowie Kim und Foster gezeigt werden konnte (P. Chen et al. 1998; Kim and Foster 2002). Diese Strategie wurde bereits für andere virale Proteine, beispielsweise die der E6-Region des humanen Papillomavirus 16 gezeigt. E6 bindet an Schlüsselproteine der Apoptose und verhindert so deren Induktion. Bekannte Interaktionspartner sind TNFR1, die DED von FADD sowie die DEDs der Procaspsase-8 (Tungteakkhun et al. 2010).

Es ist bekannt, dass für die Bildung eines Proteinkomplexes oftmals die tertiäre Struktur der Proteine entscheidend ist, da ihre Domänen häufig definierte Funktionen übernehmen (Löffler 2005). Sofern dies auch hier der Fall ist, könnte es erklären, weshalb keine Interaktion zwischen 14.7K und den Caspase-8-Teildomänen detektiert werden kann.

5.1.3 Bindung der Caspase-8-DEDs untereinander

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob und welche der untersuchten Caspase-8-Teilstücke funktionstüchtig sind.

Im Versuch zu Abbildung 18 konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine aus den *death effector domains* 1 und 2 (DED1-DED2) und der Bindedomäne (BD) bzw. der Aktivierungsdomäne (AD) funktionsfähig waren, da bei Transfektion mit beiden Proteinen schließlich eine Bindung der DEDs aneinander erfolgte, wie sie für die Dimerisierung bei der Caspaseaktivierung notwendig ist (vgl. 1.3.1). Käme es also zu einer Bindung von 14.7K an die DEDs, so wäre sie wahrscheinlich auch sichtbar, da beide Fusionsproteine funktionstüchtig sind. Eine Bindung zwischen zwei Caspasen in ihrer ursprünglichen Form konnte nicht gezeigt werden. Grund hierfür

scheint erneut die Apoptoseinduktion zu sein, da kein Caspaseinhibitor zugesetzt wurde. Wie zu erwarten war, brachte die Transfektion mit zusammengehörigen, einzelnen Untereinheiten keine Bindung hervor, da es ohne DEDs nicht zur Anlagerung dieser Domänen kommt.

5.1.4 Caspase-8 und FADD

Der direkte Interaktionspartner der Caspase im DISC ist das Protein FADD, welches selbst eine N-terminale DED besitzt und Caspase-8 über eine Bindung ihrer DEDs hieran rekrutiert (Hsu, Shu, et al. 1996). Nachdem bisher keine Bindung zwischen Caspase-8 und 14.7K erkennbar war, wurde in einem weiteren Aufbau versucht, eine bereits bekannte Interaktion nachzuweisen. In Abbildung 19 konnte genau diese Bindung gezeigt werden. Dazu nötig war das in 5.1.3 beschriebene Fusionsprotein aus beiden *death effector domains* (DED1-DED2) der Caspase-8 und der Aktivierungsdomäne (AD) sowie FADD als Fusionsprotein mit der Bindedomäne (BD). In umgekehrter Version konnte erneut keine Bindung gezeigt werden. Somit wurde klar, dass der Test prinzipiell funktioniert, wenn funktionsfähige Fusionsproteine verwendet wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass FADD spezifisch mit den DED-Domänen der Caspase-8 wechselwirkt. Da es in der Zelle nach TNF-Stimulation zu einer Anlagerung der Caspase-8 an FADD kommt und es ohne FADD nicht zur Aktivierung der Caspase kommt, könnte auch FADD ein möglicher Angriffspunkt von 14.7K sein. Dies hätte eine direkte Auswirkung auf die Rekrutierung und Aktivierung der Caspase und könnte erklären, weshalb 14.7K diesen Effekt auf die Caspase hat, aber dennoch nicht mit ihr direkt interagieren muss.

5.1.5 Caspase-8 und CrmA

Abbildung 20 zeigt die Limitation des Tests. Von CrmA ist bekannt, dass es an das aktive Zentrum der Caspase-8 bindet. Beim Mammalian Two-Hybrid Assay befinden sich die Protein-tags jeweils N-terminal. Da zur Bildung der aktiven Caspase-8 die N-terminalen DEDs abgespalten werden, kommt es automatisch auch zum Verlust des jeweiligen tags. Käme es also wie bei CrmA auch zwischen Caspase-8 und

14.7K erst zu einer Bindung, nachdem die Caspaseaktivierung bereits stattgefunden hat, so ist der Mammalian Two-Hybrid Assay nicht zu einer Bindungsdetektion geeignet, weil diese mit dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht möglich ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Mammalian Two-Hybrid Assay nicht zur Untersuchung von Proteininteraktionen zwischen der aktivierte Caspase-8 und einem zweiten Protein geeignet ist, da das N-terminale Protein-tag zur Bindungs-Detektion bei der Aktivierung der Caspase-8 abgespalten wird. Es ist damit kein Nachweis der Interaktion mehr möglich. Ein Zelltod-induzierendes Protein ist zudem in einem zellbasierten System schwer zu handhaben, da für die Expression der entsprechenden Reporterluciferasen die transfizierten Zellen vital sein müssen.

Es konnte auch keine Bindung von 14.7K mit den einzelnen Proteindomänen, welche allein exprimiert nicht apoptotisch wirken, nachgewiesen werden. Daher ist entweder anzunehmen, dass 14.7K nicht mit einzelnen Caspase-8-Domänen interagiert oder für eine eventuelle Interaktion die strukturelle Integrität der aktiven Caspase-8 nötig ist.

5.2 Western-Blot-Analysen

Über eine Western-Blot-Analyse wurde nun versucht, die Expression der verwendeten Fusionsproteine zu belegen. Die Zuordnung der Größe der Banden zu dem jeweiligen Fusionsprotein mit einer *Aktivierungsdomäne (AD)* gelang bei Caspase-8, DED1-DED2-p18, p10 und FADD. Von den Fusionsproteinen mit einer *Bindedomäne (BD)* konnten p53 als testinterne Positivkontrolle sowie DED1-DED2-p18 nachgewiesen werden (s. Abb. 21). Alle anderen Proteine konnten trotz verschiedener Transfektions- und Lyseverfahren sowie Immunpräzipitation nicht detektiert werden (s. Abb. 21 bis 26). Da zur Detektion der AD-Proteine ein α -p65-Antikörper verwendet wurde und dieser auch zelleigenes p65 erkennt, ist auf jedem Blot eine starke Bande bei 65 kDa sichtbar. Da sich einige Proteine mit ihrem Molekulargewicht in dieser Größenordnung bewegen, ist es möglich, dass die Banden sich hier überlagern und keine Zuordnung getroffen werden kann. Um das Problem zu umgehen, wurde auch ein niedrig Prozentiges Gel (8%) verwendet,

welches einen höheren Auflösungsgrad bietet. Allerdings brachte auch das keinen Erfolg. Ein Versagen des Antikörpers lässt sich ausschließen, da sowohl mit dem α -p65- als auch mit dem α -GAL 4-Antikörper Fusionsproteine erkannt wurden. Obwohl verschiedene Fusionsproteine wie zum Beispiel die *death effector domains 1 und 2* der Caspase-8 im Western-Blot nicht nachgewiesen werden konnten, war im Mammalian Two-Hybrid Assay eine Interaktion sichtbar, d.h. das Protein wurde demnach auch exprimiert. Generell ist es möglich, dass die Proteinmengen im Western-Blot unter der Nachweisgrenze liegen, hier ist der Mammalian Two-Hybrid Assay deutlich sensitiver. Dennoch müssen aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit der Proteine die Ergebnisse des Mammalian Two-Hybrid Assays kritisch betrachtet werden. Denn nur solange sichergestellt wird, dass die zu testenden Proteine von der Zelle auch synthetisiert werden, können verlässliche Aussagen über Protein-Interaktionen gemacht werden.

Wie bereits dargelegt, ist der Mammalian Two-Hybrid Asay trotz seiner Sensitivität nicht die optimale Methode, um eine Bindung von 14.7K und Caspase-8 zu untersuchen. Die Induktion des Zelltods bei Überexpression der Caspase-8 stellt ein methodisches Hindernis dar, weshalb in zukünftigen Experimenten ausschließlich mit endogener Caspase-8 gearbeitet werden sollte. Hier könnte eine konventionelle Co-Immunpräzipitation ein Ansatz sein, bei welchen zudem die Abhängigkeit von einer TNF-Stimulation untersucht werden könnte. Eine weitere Möglichkeit stellt das Pull-Down-System dar, bei welchem rekombinant hergestelltes 14.7K-Protein an eine Matrix gekoppelt (Agarose bzw. Sepharose) zusammen mit stimuliertem bzw. unstimuliertem Zell-Lysat inkubiert wird.

6. Zusammenfassung

Der membranständige TNF-Rezeptor-1 (TNFR1) gehört zur Familie der Todesrezeptoren und wird vorwiegend durch Bindung von löslichem TNF stimuliert. Da der TNFR1 auf nahezu allen Zelltypen des Körpers exprimiert wird, stellt er aufgrund seiner konstitutiven Verbreitung den Hauptmediator der TNF-vermittelten biologischen Funktionen dar. Die Aktivierung des Rezeptors kann sowohl zur Einleitung der Apoptose-Kaskade führen als auch MAP-Kinasen und den NFkB-Signalweg aktivieren. Während die beiden zuletzt genannten Signalwege von der Internalisierung des TNFR1 unabhängig ablaufen können, ist die Endozytose des Rezeptors für die Initiation des Zelltods unverzichtbar (Schütze et al. 1999). Dabei werden die Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase-8 als sogenannter *death inducing signaling complex* (DISC), an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors rekrutiert. Hier kommt es schließlich zur autokatalytischen Aktivierung der Initiatorcaspase-8, welche nachfolgend die distale Caspasekaskade in Gang setzt, die zur Demontage des Zellgerüsts und der Zelle führt.

Die Expression des adenoviralen Proteins 14.7K kann Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützen, indem sowohl die Internalisierung als auch die Rekrutierung der Adapterproteine gehemmt wird. Schneider et al. konnten zudem zeigen, dass in 14.7K-exprimierenden Zellen keine Aktivierung der Initiatorcaspase-8 mehr stattfindet (Schneider-Brachert et al. 2006). Die direkte Interaktion von Caspase-8 und dem adenoviralen Protein 14.7K erschien daher als möglicher anti-apoptotischer Wirkmechanismus, welcher bis heute noch nicht vollkommen verstanden ist. Eine Interaktion von 14.7K und Caspase-8 wurde bereits von Chen et al. und Kim und Foster beschrieben, konnte jedoch nicht direkt in der lebenden Zelle nachgewiesen werden (P. Chen et al. 1998; Kim and Foster 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob es in der Zelle zu einer direkten Interaktion und Bindung von 14.7K und Caspase-8 kommt. Zudem wurde versucht, die Interaktionsregion beider Proteine durch verkürzte Genfragmente der Caspase-8 zu identifizieren.

Zunächst wurde über einen Zytotoxizitätsassay die 14.7K-vermittelte TNF-Resistenz verifiziert. Western-Blot-Analysen dieser Zellen zeigten, dass zudem in Anwesenheit von 14.7K die Aktivierung der Caspase-8, also ihre Prozessierung in ihre aktive Form, nach TNF-Stimulation deutlich geringer ausfällt als in der entsprechenden parentalen Zelllinie. Nachfolgend konnte auch die Aktivierung der distalen Caspasekaskade verhindert werden, was durch eine stark verringerte PARP-1 Spaltung in 14.7K-exprimierenden Zellen nachgewiesen wurde.

Durch die Transfektion unterschiedlicher Plasmidmengen wurde untersucht, ob ein erhöhtes Verhältnis von 14.7K zu Caspase-8 die durch Caspase-8-Überexpression induzierte Apoptose hemmen kann. Tatsächlich konnte der durch autokatalytische Spaltung der Caspase-8 verursachte Zelltod durch eine deutliche Überexpression von 14.7K vermindert werden. Zum Nachweis diente hier die Luciferase-Aktivität der Luciferase Renilla, welche in diesem Versuch co-transfiziert wurde. Eine direkte Interaktion von 14.7K und Caspase-8 schien daher wahrscheinlich.

Mit Hilfe des Mammalian Two-Hybrid Assays wurde deshalb untersucht, ob 14.7K und Caspase-8 in der Zelle miteinander interagieren. Zusätzlich wurde durch Expression definierter Genfragmente der Caspase-8 versucht, die Region der Bindung zu identifizieren.

Die Auswertung dieses Assays erwies sich jedoch als schwierig, da es zum Einen durch Überexpression der Caspase-8 im Vektor trotz gleichzeitiger Expression von 14.7K zu einem erheblichen Zellsterben kam. So konnte, angenommen es käme zur Bindung von 14.7K an die Proform der Caspase-8, diese Interaktion aufgrund des fehlenden Zellstoffwechsels nicht mehr nachgewiesen werden. Zum Anderen erfordert die Aktivierung der Caspase-8 die Abspaltung der N-terminalen Proteindomänen (*death effector domains*, DEDs), welche aber mit einem für den Test essentiellen *tag* fusioniert sind. Wird dieses *tag* abgespalten, kann keine Interaktion mehr detektiert werden, selbst wenn sie stattfindet. Auch die aus der Literatur bekannte Interaktion zwischen Caspase-8 und CrmA konnte aus diesem Grund in dem Assay nicht gezeigt werden.

Analog konnte daher keine Interaktion zwischen Caspase-8 und 14.7K nachgewiesen werden, obwohl der Zelltod durch den Caspaseinhibitor z-VAD verhindert werden konnte.

Auch der Ansatz, die Caspaseaktivierung und die damit verbundene Abspaltung des *tags* durch Verwendung von einzeln exprimierten Proteindomänen der Caspase-8 (DED-1, DED-2, p18, p10) zu umgehen, führte nicht zum erwarteten Ergebnis.

Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine nicht hinreichende Expression der betreffenden Proteine im Mammalian Two-Hybrid Assay zum Ausfall der Interaktion führte.

Im Western-Blot konnte auch die Proteinsynthese aus ungeklärten Gründen trotz verschiedender Transfektions- und Lysemethoden nur für wenige Konstrukte belegt werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit keine Interaktion zwischen der Caspase-8 oder ihren definierten Genfragmenten und dem adenoviralen Protein 14.7K nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Mammalian Two-Hybrid Assay speziell für den Nachweis einer Bindung zwischen der aktivierte Caspase-8 und 14.7K kein adäquater Test ist. Denn eine Interaktion der funktionalen, prozessierten Caspase-8 mit einem Interaktionspartner kann aufgrund der Abspaltung des N-terminalen *tags*, welches zur Detektion der Bindung erforderlich ist, nicht mehr nachgewiesen werden.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Tabelle 14: Abkürzungen

Ad	Adenovirus
AD	Aktivierungsdomäne
AIF	apoptosis inducing factor
AK	Antikörper
A-SMase	acid sphingomyelinase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BD	Bindedomäne
Bid	BH-3 interacting domain death agonist
BSA	bovines Serumalbumin
Caspase	cysteine-aspartat specific protease
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalie Virus
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco´s minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleotid acid
DR	death receptor
E3	early region 3
FADD	fas associated death domain protein
FCS	fetal calf serum
FIP	14.7K-interacting protein
GFP	green fluorescent protein
HEK	human embryonic kidney

L	late
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MVB	multivesicular bodies
NF κ B	nuclear factor κ B
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PLAD	preligand assembly domain
RID	receptor internalization and degradation
RIP-1	receptor internalization protein 1
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecysulfat
T4-PNK	Polynukleotidkinase aus dem Bakteriophagen T4
TACE	TNF alpha converting enzyme
TBS	tris buffered saline
TBS-T	TBS-Tween
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	TNF receptor 1
TNFR2	TNF receptor 2
TRADD	TNF receptor-associated death domain protein
TRAF2	TNF receptor-associated protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRID	TNF receptor internalization domain
wt	Wildtyp
zVAD	Z-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluoromethylketon

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Apoptosewege	5
Abbildung 2:	Struktureller Aufbau von Caspisen	7
Abbildung 3:	Modell zur Prozessierung von Caspase-8	9
Abbildung 4:	TNF-TNFR1-Signalkaskade	12
Abbildung 5:	Caspasehemmung durch CrmA und z-VAD	16
Abbildung 6:	Pipettierschema des Zytotoxizitätsassays	36
Abbildung 7:	Aufbau des Mammalian Two-Hybrid Assays	38
Abbildung 8:	Prestained Protein Ladder von Fermentas	42
Abbildung 9:	Schutz vor TNF-mediierter Apoptose durch 14.7K	46
Abbildung 10:	Aktivierung der Caspase-8 in Parental- und 14.7K-Zellen	47
Abbildung 11:	PARP-1-Spaltung	48
Abbildung 12:	antiapoptotischer Effekt von 14.7K	50
Abbildung 13:	Aufbau der Caspase-8	52
Abbildung 14:	verwendete verkürzte Konstrukte der Caspase-8	52
Abbildung 15:	Positivkontrollen	53
Abbildung 16:	Caspase-8 in pCMV-AD	54
Abbildung 17:	Caspase-8 in pCMV-BD	55
Abbildung 18:	Bindung der DEDs aneinander	56
Abbildung 19:	Bindung zwischen Caspase-8 und FADD	57
Abbildung 20:	Caspase-8 und CrmA	58
Abbildung 21:	Expression in den Vektoren pCMV-AD und -BD	60
Abbildung 22:	Immunpräzipitation	62
Abbildung 23:	Caspase-8- und CrmA- Fusionsproteine bei 12- und 8%igem Gel	63
Abbildung 24:	Transfektion der Caspase-8-Konstrukte mit PEI oder CaCl ₂	64
Abbildung 25:	14.7K-Fusionsproteine bei RIPA- und EMSA-Lyse	65
Abbildung 26:	Caspase-8-Fusionsproteine bei RIPA- und EMSA-Lyse	65
Abbildung 27:	RIPA-Lyse und Zellkern-Lysat	67
Abbildung 28:	Ladekontrolle mit α-β-Tubulin Antikörper	68

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 2:	Puffer und Lösungen	22
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 4:	Geräte	23
Tabelle 5:	Kits	24
Tabelle 6:	Enzyme	24
Tabelle 7:	Zelllinien und Bakterienstämme	25
Tabelle 8:	Primer	25

Tabelle 9: Plasmide	26
Tabelle 10: Pipettierschema Mammalian-Two-Hybrid-Assay	38
Tabelle 11: Zusammensetzung der Gele	42
Tabelle 12: Antikörper.....	44
Tabelle 13: Größen der Fusionsproteine.....	61
Tabelle 14: Abkürzungen	80

8. Literaturverzeichnis

- Acehan, Devrim, Xuejun Jiang, David Gene Morgan, John E Heuser, Xiaodong Wang, and Christopher W Akey. 2002. "Three-dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspace-9 Binding, and Activation." *Molecular Cell* 9 (2) (February): 423–432.
- Adam, K Wiegmann, S Adam-Klages, A Ruff, and M Krönke. 1996. "A Novel Cytoplasmic Domain of the P55 Tumor Necrosis Factor Receptor Initiates the Neutral Sphingomyelinase Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (24) (June 14): 14617–14622.
- Aggarwal, Bharat B. 2003. "Signalling Pathways of the TNF Superfamily: a Double-edged Sword." *Nature Reviews. Immunology* 3 (9) (September): 745–756. doi:10.1038/nri1184.
- Algeciras-Schimrich, Alicia, Eric M Pietras, Bryan C Barnhart, Patrick Legembre, Shrijay Vijayan, Susan L Holbeck, and Marcus E Peter. 2003. "Two CD95 Tumor Classes with Different Sensitivities to Antitumor Drugs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20) (September 30): 11445–11450. doi:10.1073/pnas.2034995100.
- Alnemri, E S, D J Livingston, D W Nicholson, G Salvesen, N A Thornberry, W W Wong, and J Yuan. 1996. "Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature." *Cell* 87 (2) (October 18): 171.
- Baud, V, and M Karin. 2001. "Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor and Its Relatives." *Trends in Cell Biology* 11 (9) (September): 372–377.
- Benedict, C A, K D Butrovich, N S Lurain, J Corbeil, I Rooney, P Schneider, J Tschopp, and C F Ware. 1999. "Cutting Edge: a Novel Viral TNF Receptor Superfamily Member in Virulent Strains of Human Cytomegalovirus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (12) (June 15): 6967–6970.
- Benedict, P S Norris, T I Prigozy, J L Bodmer, J A Mahr, C T Garnett, F Martinon, J Tschopp, L R Gooding, and C F Ware. 2001. "Three Adenovirus E3 Proteins Cooperate to Evade Apoptosis by Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Receptor-1 and -2." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (5) (February 2): 3270–3278. doi:10.1074/jbc.M008218200.
- Benedict, Paula S Norris, and Carl F Ware. 2002. "To Kill or Be Killed: Viral Evasion of Apoptosis." *Nature Immunology* 3 (11) (November): 1013–1018. doi:10.1038/ni1102-1013.
- Best. 2008. "Viral Subversion of Apoptotic Enzymes: Escape from Death Row." *Annual Review of Microbiology* 62: 171–192. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.163009.
- Boya, Patricia, Anne-Laure Pauleau, Delphine Poncet, Rosa-Ana Gonzalez-Polo, Naoufal Zamzami, and Guido Kroemer. 2004. "Viral Proteins Targeting Mitochondria: Controlling Cell Death." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1659 (2-3) (December 6): 178–189. doi:10.1016/j.bbabi.2004.08.007.
- Burgert, H G, J L Maryanski, and S Kvist. 1987. "'E3/19K' Protein of Adenovirus Type 2 Inhibits Lysis of Cytolytic T Lymphocytes by Blocking Cell-surface Expression of Histocompatibility Class I Antigens." *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (5) (March): 1356–1360.
- Cain, K, S B Bratton, C Langlais, G Walker, D G Brown, X M Sun, and G M Cohen. 2000. “Apaf-1 Oligomerizes into Biologically Active Approximately 700-kDa and Inactive Approximately 1.4-MDa Apoptosome Complexes.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9) (March 3): 6067–6070.
- Callus, B A, and D L Vaux. 2007. “Caspase Inhibitors: Viral, Cellular and Chemical.” *Cell Death and Differentiation* 14 (1) (January): 73–78. doi:10.1038/sj.cdd.4402034.
- Chan, F K, H J Chun, L Zheng, R M Siegel, K L Bui, and M J Lenardo. 2000. “A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-independent Receptor Assembly and Signaling.” *Science (New York, N.Y.)* 288 (5475) (June 30): 2351–2354.
- Chen, Guoqing, and David V Goeddel. 2002. “TNF-R1 Signaling: a Beautiful Pathway.” *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573) (May 31): 1634–1635. doi:10.1126/science.1071924.
- Chen, P, J Tian, I Kovesdi, and J T Bruder. 1998. “Interaction of the Adenovirus 14.7-kDa Protein with FLICE Inhibits Fas Ligand-induced Apoptosis.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10) (March 6): 5815–5820.
- Chowdhury, Indrajit, Binu Tharakan, and Ganapathy K Bhat. 2008. “Caspases - an Update.” *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 151 (1) (September): 10–27. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.010.
- Clarke, and Clarke. 1995. “Historic Apoptosis.” *Nature* 378 (6554) (November 16): 230. doi:10.1038/378230c0.
- Clem, R J, M Fechheimer, and L K Miller. 1991. “Prevention of Apoptosis by a Baculovirus Gene During Infection of Insect Cells.” *Science (New York, N.Y.)* 254 (5036) (November 29): 1388–1390.
- Cohen, G M. 1997. “Caspases: The Executioners of Apoptosis.” *The Biochemical Journal* 326 (Pt 1) (August 15): 1–16.
- Cohen, G M, X M Sun, H Fearnhead, M MacFarlane, D G Brown, R T Snowden, and D Dinsdale. 1994. “Formation of Large Molecular Weight Fragments of DNA Is a Key Committed Step of Apoptosis in Thymocytes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (2) (July 15): 507–516.
- Collins, R J, B V Harmon, G C Gobé, and J F Kerr. 1992. “Internucleosomal DNA Cleavage Should Not Be the Sole Criterion for Identifying Apoptosis.” *International Journal of Radiation Biology* 61 (4) (April): 451–453.
- Danial, Nika N, and Stanley J Korsmeyer. 2004. “Cell Death: Critical Control Points.” *Cell* 116 (2) (January 23): 205–219.
- Daugas, E, D Nochy, L Ravagnan, M Loeffler, S A Susin, N Zamzami, and G Kroemer. 2000. “Apoptosis-inducing Factor (AIF): a Ubiquitous Mitochondrial Oxidoreductase Involved in Apoptosis.” *FEBS Letters* 476 (3) (July 7): 118–123.
- Dobó, József, Richard Swanson, Guy S Salvesen, Steven T Olson, and Peter G W Gettins. 2006. “Cytokine Response Modifier a Inhibition of Initiator Caspases Results in Covalent Complex Formation and Dissociation of the Caspase

- Tetramer." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (50) (December 15): 38781–38790. doi:10.1074/jbc.M605151200.
- Du, C, M Fang, Y Li, L Li, and X Wang. 2000. "Smac, a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome C-dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition." *Cell* 102 (1) (July 7): 33–42.
- Du, Q, D Lehami, O Faktor, Y Qi, and N Chejanovsky. 1999. "Isolation of an Apoptosis Suppressor Gene of the Spodoptera littoralis Nucleopolyhedrovirus." *Journal of Virology* 73 (2) (February): 1278–1285.
- Earnshaw, W C, L M Martins, and S H Kaufmann. 1999. "Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis." *Annual Review of Biochemistry* 68: 383–424. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383.
- Fadeel, B, and S Orrenius. 2005. "Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease." *Journal of Internal Medicine* 258 (6) (December): 479–517. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
- Fuentes-Prior, Pablo, and Guy S Salvesen. 2004. "The Protein Structures That Shape Caspase Activity, Specificity, Activation and Inhibition." *The Biochemical Journal* 384 (Pt 2) (December 1): 201–232. doi:10.1042/BJ20041142.
- Garcia-Calvo, M, E P Peterson, B Leiting, R Ruel, D W Nicholson, and N A Thornberry. 1998. "Inhibition of Human Caspases by Peptide-based and Macromolecular Inhibitors." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (49) (December 4): 32608–32613.
- Godbey, W T, K K Wu, and A G Mikos. 1999a. "Size Matters: Molecular Weight Affects the Efficiency of Poly(ethylenimine) as a Gene Delivery Vehicle." *Journal of Biomedical Materials Research* 45 (3) (June 5): 268–275.
- . 1999b. "Poly(ethylenimine) and Its Role in Gene Delivery." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 60 (2-3) (August 5): 149–160.
- Gonzalvez, F, and A Ashkenazi. 2010. "New Insights into Apoptosis Signaling by Apo2L/TRAIL." *Oncogene* 29 (34) (August 26): 4752–4765. doi:10.1038/onc.2010.221.
- Gooding, L R, L W Elmore, A E Tollefson, H A Brady, and W S Wold. 1988. "A 14,700 MW Protein from the E3 Region of Adenovirus Inhibits Cytolysis by Tumor Necrosis Factor." *Cell* 53 (3) (May 6): 341–346.
- Gooding, L R, I O Sofola, A E Tollefson, P Duerksen-Hughes, and W S Wold. 1990. "The Adenovirus E3-14.7K Protein Is a General Inhibitor of Tumor Necrosis Factor-mediated Cytolysis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145 (9) (November 1): 3080–3086.
- Grell, M, E Douni, H Wajant, M Löhden, M Clauss, B Maxeiner, S Georgopoulos, et al. 1995. "The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor." *Cell* 83 (5) (December 1): 793–802.
- Grell, M, H Wajant, G Zimmermann, and P Scheurich. 1998. "The Type 1 Receptor (CD120a) Is the High-affinity Receptor for Soluble Tumor Necrosis Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (2) (January 20): 570–575.

- Gross, A, X M Yin, K Wang, M C Wei, J Jockel, C Milliman, H Erdjument-Bromage, P Tempst, and S J Korsmeyer. 1999. "Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, While BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis factor-R1/Fas Death." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (2) (January 8): 1156–1163.
- Harrod, K S, A D Mounday, and J A Whitsett. 2000. "Adenoviral E3-14.7K Protein in LPS-induced Lung Inflammation." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 278 (4) (April): L631–639.
- Hehlgans, Thomas, and Klaus Pfeffer. 2005. "The Intriguing Biology of the Tumour Necrosis Factor/tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily: Players, Rules and the Games." *Immunology* 115 (1) (May): 1–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
- Heinrich, J Neumeyer, M Jakob, C Hallas, V Tchikov, S Winoto-Morbach, M Wickel, et al. 2004. "Cathepsin D Links TNF-induced Acid Sphingomyelinase to Bid-mediated Caspase-9 and -3 Activation." *Cell Death and Differentiation* 11 (5) (May): 550–563. doi:10.1038/sj.cdd.4401382.
- Heinrich, M Wickel, W Schneider-Brachert, C Sandberg, J Gahr, R Schwandner, T Weber, et al. 1999. "Cathepsin D Targeted by Acid Sphingomyelinase-derived Ceramide." *The EMBO Journal* 18 (19) (October 1): 5252–5263. doi:10.1093/emboj/18.19.5252.
- Henderson, S, D Huen, M Rowe, C Dawson, G Johnson, and A Rickinson. 1993. "Epstein-Barr Virus-coded BHRF1 Protein, a Viral Homologue of Bcl-2, Protects Human B Cells from Programmed Cell Death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18) (September 15): 8479–8483.
- Hengartner, M O. 2000. "The Biochemistry of Apoptosis." *Nature* 407 (6805) (October 12): 770–776. doi:10.1038/35037710.
- Hirose, E, N Nakashima, T Sekiguchi, and T Nishimoto. 1998. "RagA Is a Functional Homologue of *S. Cerevisiae* Gtr1p Involved in the Ran/Gsp1-GTPase Pathway." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 1) (January): 11–21.
- Hof, Herbert. 2005. *Medizinische Mikrobiologie Nach Neuer AO - Mit Den Fächern: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene*. Stuttgart :: Thieme,.
- Horton, T M, T S Ranheim, L Aquino, D I Kushner, S K Saha, C F Ware, W S Wold, and L R Gooding. 1991. "Adenovirus E3 14.7K Protein Functions in the Absence of Other Adenovirus Proteins to Protect Transfected Cells from Tumor Necrosis Factor Cytolysis." *Journal of Virology* 65 (5) (May): 2629–2639.
- Horton, T M, A E Tollefson, W S Wold, and L R Gooding. 1990. "A Protein Serologically and Functionally Related to the Group C E3 14,700-kilodalton Protein Is Found in Multiple Adenovirus Serotypes." *Journal of Virology* 64 (3) (March): 1250–1255.
- Horwitz. 2001. "Adenovirus Immunoregulatory Genes and Their Cellular Targets." *Virology* 279 (1) (January 5): 1–8. doi:10.1006/viro.2000.0738.
- . 2004. "Function of Adenovirus E3 Proteins and Their Interactions with Immunoregulatory Cell Proteins." *The Journal of Gene Medicine* 6 Suppl 1 (February): S172–183. doi:10.1002/jgm.495.

- Hsu, H, J Huang, H B Shu, V Baichwal, and D V Goeddel. 1996. "TNF-dependent Recruitment of the Protein Kinase RIP to the TNF Receptor-1 Signaling Complex." *Immunity* 4 (4) (April): 387–396.
- Hsu, H, H B Shu, M G Pan, and D V Goeddel. 1996. "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD Interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways." *Cell* 84 (2) (January 26): 299–308.
- Hsu, H, J Xiong, and D V Goeddel. 1995. "The TNF Receptor 1-associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-kappa B Activation." *Cell* 81 (4) (May 19): 495–504.
- Idriss, H T, and J H Naismith. 2000. "TNF Alpha and the TNF Receptor Superfamily: Structure-function Relationship(s)." *Microscopy Research and Technique* 50 (3) (August 1): 184–195. doi:10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
- Ishizuya-Oka, A, and A Shimozawa. 1992. "Programmed Cell Death and Heterolysis of Larval Epithelial Cells by Macrophage-like Cells in the Anuran Small Intestine in Vivo and in Vitro." *Journal of Morphology* 213 (2) (August): 185–195. doi:10.1002/jmor.1052130205.
- Jordan, Martin, and Florian Wurm. 2004. "Transfection of Adherent and Suspended Cells by Calcium Phosphate." *Methods (San Diego, Calif.)* 33 (2) (June): 136–143. doi:10.1016/jymeth.2003.11.011.
- Kataoka, Takao, and Jürg 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." *Molecular and Cellular Biology* 24 (7) (April): 2627–2636.
- Keller, Nadine, Jirí Mares, Oliver Zerbe, and Markus G Grüter. 2009. "Structural and Biochemical Studies on Procaspsase-8: New Insights on Initiator Caspase Activation." *Structure (London, England: 1993)* 17 (3) (March 11): 438–448. doi:10.1016/j.str.2008.12.019.
- Kerr, J F, A H Wyllie, and A R Currie. 1972. "Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4) (August): 239–257.
- Kim, Hee-Jung, and Mark P Foster. 2002. "Characterization of Ad5 E3-14.7K, an Adenoviral Inhibitor of Apoptosis: Structure, Oligomeric State, and Metal Binding." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 11 (5) (May): 1117–1128.
- Kischkel, F C, S Hellbardt, I Behrmann, M Germer, M Pawlita, P H Krammer, and M E Peter. 1995. "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated Proteins Form a Death-inducing Signaling Complex (DISC) with the Receptor." *The EMBO Journal* 14 (22) (November 15): 5579–5588.
- Kischkel, F C, D A Lawrence, A Tinel, H LeBlanc, A Virmani, P Schow, A Gazdar, J Blenis, D Arnott, and A Ashkenazi. 2001. "Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (49) (December 7): 46639–46646. doi:10.1074/jbc.M105102200.
- Klingseisen, Laura. 2011. "Bedeutung Der Interaktion Von Optineurin Mit Dem Adenovirus E3-14.7K Protein Für Die TNFR1-Signalkaskade". Regensburg. urn:nbn:de:bvb:355-epub-215813.

- Komiyama, T, C A Ray, D J Pickup, A D Howard, N A Thornberry, E P Peterson, and G Salvesen. 1994. "Inhibition of Interleukin-1 Beta Converting Enzyme by the Cowpox Virus Serpin CrmA. An Example of Cross-class Inhibition." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (30) (July 29): 19331–19337.
- Krammer, P H. 2000. "CD95's Deadly Mission in the Immune System." *Nature* 407 (6805) (October 12): 789–795. doi:10.1038/35037728.
- Krueger, A, I Schmitz, S Baumann, P H Krammer, and S Kirchhoff. 2001. "Cellular FLICE-inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-inducing Signaling Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (23) (June 8): 20633–20640. doi:10.1074/jbc.M101780200.
- Kumar, S. 2007. "Caspase Function in Programmed Cell Death." *Cell Death and Differentiation* 14 (1) (January): 32–43. doi:10.1038/sj.cdd.4402060.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259) (August 15): 680–685.
- Lavrik, Inna, Alexander Golks, and Peter H Krammer. 2005. "Death Receptor Signaling." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 2) (January 15): 265–267. doi:10.1242/jcs.01610.
- Lavrik, Inna N, Alexander Golks, and Peter H Krammer. 2005. "Caspases: Pharmacological Manipulation of Cell Death." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (10) (October): 2665–2672. doi:10.1172/JCI26252.
- Li, P, D Nijhawan, I Budihardjo, S M Srinivasula, M Ahmad, E S Alnemri, and X Wang. 1997. "Cytochrome c and dATP-dependent Formation of Apaf-1/caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade." *Cell* 91 (4) (November 14): 479–489.
- Li, Y, J Kang, J Friedman, L Tarassishin, J Ye, A Kovalenko, D Wallach, and M S Horwitz. 1999. "Identification of a Cell Protein (FIP-3) as a Modulator of NF-kappaB Activity and as a Target of an Adenovirus Inhibitor of Tumor Necrosis Factor Alpha-induced Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (3) (February 2): 1042–1047.
- Li, Y, J Kang, and M S Horwitz. 1997. "Interaction of an Adenovirus 14.7-kilodalton Protein Inhibitor of Tumor Necrosis Factor Alpha Cytolysis with a New Member of the GTPase Superfamily of Signal Transducers." *Journal of Virology* 71 (2) (February): 1576–1582.
- _____. 1998. "Interaction of an Adenovirus E3 14.7-kilodalton Protein with a Novel Tumor Necrosis Factor Alpha-inducible Cellular Protein Containing Leucine Zipper Domains." *Molecular and Cellular Biology* 18 (3) (March): 1601–1610.
- Liu, Gang, and Xinbin Chen. 2006. "Regulation of the P53 Transcriptional Activity." *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (3) (February 15): 448–458. doi:10.1002/jcb.20700.
- Löffler. 2005. *Basiswissen Biochemie*. 6. Auflage.
- MacNeill, Amy L, Peter C Turner, and Richard W Moyer. 2006. "Mutation of the Myxoma Virus SERP2 P1-site to Prevent Proteinase Inhibition Causes Apoptosis in Cultured RK-13 Cells and Attenuates Disease in Rabbits, but Mutation to Alter Specificity Causes Apoptosis Without Reducing Virulence." *Virology* 356 (1-2) (December 5): 12–22. doi:10.1016/j.virol.2006.07.049.

- Martin, S J, G A O'Brien, W K Nishioka, A J McGahon, A Mahboubi, T C Saido, and D R Green. 1995. "Proteolysis of Fodrin (non-erythroid Spectrin) During Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (12) (March 24): 6425–6428.
- Means, John C, Taryn Penabaz, and Rollie J Clem. 2007. "Identification and Functional Characterization of AMVp33, a Novel Homolog of the Baculovirus Caspase Inhibitor P35 Found in *Amsacta Moorei* Entomopoxvirus." *Virology* 358 (2) (February 20): 436–447. doi:10.1016/j.virol.2006.08.043.
- Micheau, Olivier, and Jürg Tschoopp. 2003. "Induction of TNF Receptor I-mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes." *Cell* 114 (2) (July 25): 181–190.
- Moise, Alexander R, Jason R Grant, Timothy Z Vitalis, and Wilfred A Jefferies. 2002. "Adenovirus E3-6.7K Maintains Calcium Homeostasis and Prevents Apoptosis and Arachidonic Acid Release." *Journal of Virology* 76 (4) (February): 1578–1587.
- Muzio, M, A M Chinnaiyan, F C Kischkel, K O'Rourke, A Shevchenko, J Ni, C Scaffidi, et al. 1996. "FLICE, a Novel FADD-homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death--inducing Signaling Complex." *Cell* 85 (6) (June 14): 817–827.
- Nicholson, D W, A Ali, N A Thornberry, J P Vaillancourt, C K Ding, M Gallant, Y Gareau, P R Griffin, M Labelle, and Y A Lazebnik. 1995. "Identification and Inhibition of the ICE/CED-3 Protease Necessary for Mammalian Apoptosis." *Nature* 376 (6535) (July 6): 37–43. doi:10.1038/376037a0.
- Nikolaev, Anatoly, Todd McLaughlin, Dennis D M O'Leary, and Marc Tessier-Lavigne. 2009. "APP Binds DR6 to Trigger Axon Pruning and Neuron Death via Distinct Caspases." *Nature* 457 (7232) (February 19): 981–989. doi:10.1038/nature07767.
- Owen-Schaub, L B, W Zhang, J C Cusack, L S Angelo, S M Santee, T Fujiwara, J A Roth, A B Deisseroth, W W Zhang, and E Kruzel. 1995. "Wild-type Human P53 and a Temperature-sensitive Mutant Induce Fas/APO-1 Expression." *Molecular and Cellular Biology* 15 (6) (June): 3032–3040.
- Patston, P A, P Gettins, J Beechem, and M Schapira. 1991. "Mechanism of Serpin Action: Evidence That C1 Inhibitor Functions as a Suicide Substrate." *Biochemistry* 30 (36) (September 10): 8876–8882.
- Perkins, N D. 2000. "The Rel/NF-kappa B Family: Friend and Foe." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (9) (September): 434–440.
- Peter, and P H Krammer. 2003. "The CD95(APO-1/Fas) DISC and Beyond." *Cell Death and Differentiation* 10 (1) (January): 26–35. doi:10.1038/sj.cdd.4401186.
- Pop, Cristina, Patrick Fitzgerald, Douglas R Green, and Guy S Salvesen. 2007. "Role of Proteolysis in Caspase-8 Activation and Stabilization." *Biochemistry* 46 (14) (April 10): 4398–4407. doi:10.1021/bi602623b.
- Qin, Z H, Y Wang, K K Kikly, E Sapp, K B Kegel, N Aronin, and M DiFiglia. 2001. "Pro-caspase-8 Is Predominantly Localized in Mitochondria and Released into Cytoplasm Upon Apoptotic Stimulation." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (11) (March 16): 8079–8086. doi:10.1074/jbc.M007028200.

- Ranheim, T S, J Shisler, T M Horton, L J Wold, L R Gooding, and W S Wold. 1993. "Characterization of Mutants Within the Gene for the Adenovirus E3 14.7-kilodalton Protein Which Prevents Cytolysis by Tumor Necrosis Factor." *Journal of Virology* 67 (4) (April): 2159–2167.
- Renatus, M, Q Zhou, H R Stennicke, S J Snipas, D Turk, L A Bankston, R C Liddington, and G S Salvesen. 2000. "Crystal Structure of the Apoptotic Suppressor CrmA in Its Cleaved Form." *Structure (London, England: 1993)* 8 (7) (July 15): 789–797.
- Rodman, J S, M A Levy, S Diment, and P D Stahl. 1990. "Immunolocalization of Endosomal Cathepsin D in Rabbit Alveolar Macrophages." *Journal of Leukocyte Biology* 48 (2) (August): 116–122.
- Rodriguez, J, and Y Lazebnik. 1999. "Caspase-9 and APAF-1 Form an Active Holoenzyme." *Genes & Development* 13 (24) (December 15): 3179–3184.
- Rowe, W P, R J Huebner, L K Gilmore, R H Parrot, and T G Ward. 1953. "Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 84 (3) (December): 570–573.
- Salvesen, and V M Dixit. 1999. "Caspase Activation: The Induced-proximity Model." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20) (September 28): 10964–10967.
- Sambrook, Joseph. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh, M S, and T Lindahl. 1992. "Role of poly(ADP-ribose) Formation in DNA Repair." *Nature* 356 (6367) (March 26): 356–358. doi:10.1038/356356a0.
- Sayers, Thomas J. 2011. "Targeting the Extrinsic Apoptosis Signaling Pathway for Cancer Therapy." *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* (April 6). doi:10.1007/s00262-011-1008-4.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626033>.
- Schneider-Brachert, Vladimir Tchikov, Oliver Merkel, Marten Jakob, Cora Hallas, Marie-Luise Kruse, Peter Groitl, et al. 2006. "Inhibition of TNF Receptor 1 Internalization by Adenovirus 14.7K as a Novel Immune Escape Mechanism." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (11) (November): 2901–2913. doi:10.1172/JCI23771.
- Schneider-Brachert, Vladimir Tchikov, Jens Neumeyer, Marten Jakob, Supandi Winoto-Morbach, Janka Held-Feindt, Michael Heinrich, et al. 2004. "Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles." *Immunity* 21 (3) (September): 415–428. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.017.
- Schütze, T Machleidt, D Adam, R Schwandner, K Wiegmann, M L Kruse, M Heinrich, M Wickel, and M Krönke. 1999. "Inhibition of Receptor Internalization by Monodansylcadaverine Selectively Blocks P55 Tumor Necrosis Factor Receptor Death Domain Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (15) (April 9): 10203–10212.
- Simonovic, M, Gettins PGW, and K Volz. 2000. "Crystal Structure of Viral Serpin crmA Provides Insights into Its Mechanism of Cysteine Proteinase Inhibition."

- Protein Science: A Publication of the Protein Society* 9 (8) (August): 1423–1427. doi:10.1110/ps.9.8.1423.
- Stennicke, H R, Q L Deveraux, E W Humke, J C Reed, V M Dixit, and G S Salvesen. 1999. “Caspase-9 Can Be Activated Without Proteolytic Processing.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (13) (March 26): 8359–8362.
- Tenev, Tencho, Anna Zachariou, Rebecca Wilson, Mark Ditzel, and Pascal Meier. 2005. “IAPs Are Functionally Non-equivalent and Regulate Effector Caspases Through Distinct Mechanisms.” *Nature Cell Biology* 7 (1) (January): 70–77. doi:10.1038/ncb1204.
- Thornberry, N A, and Y Lazebnik. 1998. “Caspases: Enemies Within.” *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381) (August 28): 1312–1316.
- Tollefson, A E, T W Hermiston, D L Lichtenstein, C F Colle, R A Tripp, T Dimitrov, K Toth, C E Wells, P C Doherty, and W S Wold. 1998. “Forced Degradation of Fas Inhibits Apoptosis in Adenovirus-infected Cells.” *Nature* 392 (6677) (April 16): 726–730. doi:10.1038/33712.
- Tollefson, A E, K Toth, K Doronin, M Kuppuswamy, O A Doronina, D L Lichtenstein, T W Hermiston, C A Smith, and W S Wold. 2001. “Inhibition of TRAIL-induced Apoptosis and Forced Internalization of TRAIL Receptor 1 by Adenovirus Proteins.” *Journal of Virology* 75 (19) (October): 8875–8887. doi:10.1128/JVI.75.19.8875-8887.2001.
- Towbin, H, T Staehelin, and J Gordon. 1979. “Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9) (September): 4350–4354.
- Tungteakkhun, Sandy S, Maria Filippova, Nadja Fodor, and Penelope J Duerksen-Hughes. 2010. “The Full-length Isoform of Human Papillomavirus 16 E6 and Its Splice Variant E6* Bind to Different Sites on the Procasparse 8 Death Effector Domain.” *Journal of Virology* 84 (3) (February): 1453–1463. doi:10.1128/JVI.01331-09.
- Verhagen, A M, P G Ekert, M Pakusch, J Silke, L M Connolly, G E Reid, R L Moritz, R J Simpson, and D L Vaux. 2000. “Identification of DIABLO, a Mammalian Protein That Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins.” *Cell* 102 (1) (July 7): 43–53.
- Wajant, H, K Pfizenmaier, and P Scheurich. 2003. “Tumor Necrosis Factor Signaling.” *Cell Death and Differentiation* 10 (1) (January): 45–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189.
- Wang, J, H J Chun, W Wong, D M Spencer, and M J Lenardo. 2001. “Caspase-10 Is an Initiator Caspase in Death Receptor Signaling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24) (November 20): 13884–13888. doi:10.1073/pnas.241358198.
- Wiegmann, K, S Schütze, T Machleidt, D Witte, and M Krönke. 1994. “Functional Dichotomy of Neutral and Acidic Sphingomyelinases in Tumor Necrosis Factor Signaling.” *Cell* 78 (6) (September 23): 1005–1015.
- Wilson, K P, J A Black, J A Thomson, E E Kim, J P Griffith, M A Navia, M A Murcko, S P Chambers, R A Aldape, and S A Raybuck. 1994. “Structure and

- Mechanism of Interleukin-1 Beta Converting Enzyme.” *Nature* 370 (6487) (July 28): 270–275. doi:10.1038/370270a0.
- Wilson, N. S., Vishva Dixit, and Avi Ashkenazi. 2009. “Death Receptor Signal Transducers: Nodes of Coordination in Immune Signaling Networks.” *Nature Immunology* 10 (4) (April): 348–355. doi:10.1038/ni.1714.
- Yusuf, Usman, Gregory A Hale, Jeanne Carr, Zhengming Gu, Ely Benaim, Paul Woodard, Kimberly A Kasow, et al. 2006. “Cidofovir for the Treatment of Adenoviral Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients.” *Transplantation* 81 (10) (May 27): 1398–1404. doi:10.1097/01.tp.0000209195.95115.8e.
- Zamzami, N., and G Kroemer. 2001. “The Mitochondrion in Apoptosis: How Pandora’s Box Opens.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (1) (January): 67–71. doi:10.1038/35048073.
- Zhou, Q, S Snipas, K Orth, M Muzio, V M Dixit, and G S Salvesen. 1997. “Target Protease Specificity of the Viral Serpin CrmA. Analysis of Five Caspases.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (12) (March 21): 7797–7800.

9. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Wulf Schneider sehr dafür, dass er mir als Zahnmedizinerin mit der Überlassung des Themas die Möglichkeit gegeben hat, den Forschungsalltag und das wissenschaftliche Arbeiten in einem fremden Fachbereich kennen zu lernen. Diese Chance hat meinen Blick auf die Forschung verändert und mir gezeigt, wie nah Freude und Frustration beieinander liegen können. Es hat sehr gut getan, mit einer fachfremden Arbeit über den eigenen Tellerrand zu blicken.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlisans für seine nicht selbstverständliche Bereitschaft danken, meine Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Kollegen der AG Schneider, insbesondere bei Maria Kurz und Gertrud Knoll für ihre Zeit, ihre große Geduld und ihre Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt Laura Klingseisen, Ulrike Heigl und Matthias Hölzl, die mich vom ersten Tag an sehr nett aufgenommen und mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat, Tat und ermutigenden Worten zur Seite gestanden haben. Ich bin froh, dass wir miteinander lachen, weinen und feiern konnten und so gute Freunde geworden sind.

Danke Laura, dass du dir so viel Zeit genommen hast, um mir die Welt zu erklären.

Meinen Eltern und meinem Freund Sebastian bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mich auch in schlechten Zeiten ertragen haben und immer für mich da waren.