

FLASH:
eine neue PML-Kerndomänenkomponente mit der
Bindegliedfunktion bei der CD95-vermittelten
Apoptose

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
vorgelegte Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr.rer.nat.

von
KRISTIJANA MILOVIC
geb. am 17.07.1975

Hamburg 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Prof. Dr. H. WILL
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Prof. Dr. U. IVENAND

Tag der Disputation: 19. März 2004

Hamburg, den 02. April 2004



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Arno Frühwald'.

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Die vorliegende Dissertation wurde im Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg in der Zeit von Januar 2000 bis April 2004 angefertigt.

Dissertationsgutachter:

Prof. Dr. Hans Will & Prof. Dr. Udo Wienand

Disputationsgutachter:

Prof. Dr. Klaus Harbers & Prof. Dr. Hans-Peter-Mühlbach

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke besonders Herrn Dr. Thomas Hofmann für eine großartige Zusammenarbeit, insbesondere für seine Ideen und Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Hans Will, der mich stets unterstützt hat und für alle meine Fragen jederzeit ein offenes Ohr hatte.

Weiterhin möchte ich Dr. Hannah Staeger und Nicole Stollberg für die Hilfsbereitschaft und Anregungen danken. Daneben gilt mein Dank auch anderen Mitgliedern der „DOT“ Arbeitsgruppe Jorge Braz und Sandra Fleischer und allen anderen Personen in der Abteilung von Prof. Will.

Außerdem danken möchte ich Herrn Prof. Udo Wienand für seine freundliche Übernahme der Vertretung dieser Arbeit als Gutachter vor der Fakultät der Biologie an der Universität Hamburg.

Den größten Dank schulde ich Dirk Holm, der mit mir alle Höhen und Tiefen meines bisherigen Forscherlebens durchgestanden hat und immer für mich da war.

Ein letzter Dank geht an meine Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

I Einleitung	1
1. PML-Kerndomänen	1
1.1 Zelluläre Proteine der PML-Kerndomänen	2
1.2 Das PML-Protein	3
1.3 Das Sp100-Protein	5
1.4 Das SUMO-1-Protein	7
1.5 Dynamische Eigenschaften der PML-Kerndomänen	8
2. Der programmierte Zelltod (Apoptose)	10
2.1 Die Signaltransduktion des CD95-Rezeptors	12
2.2 Das FLASH-Protein	15
2.3 Die Todeseffektor-Filamente	17
3. Regulation der Apoptose durch PML-Kerndomänen	19
4. Ziel der Dissertation	22
II Material und Methoden	24
1. Material	24
1.1 Chemikalien	24
1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	24
1.3 Biologisches Material	27
1.3.1 Bakterienstämme	27
1.3.2 Eukaryontische Zellen	27
1.4 Nährmedien	28
1.4.1 Bakterielle Nährmedien	28
1.4.2 Medien für die eukaryontische Zellkultur	28

1.5 Antikörper	29
1.5.1 Primärantikörper	29
1.5.2 Sekundärantikörper	30
1.6 Molekulargewichtsmarker	31
1.6.1 DNA-Marker	31
1.6.2 Proteinmarker	31
1.7 Synthetische Oligonukleotide	31
1.7.1 Synthetische Oligonukleotide zur Klonierung	31
1.7.2 Synthetische Oligonukleotide für die RNAi	32
1.8 Vektoren	33
1.9 Expressionsplasmide	33
1.10 Enzyme und Kits	34
1.11 Synthetische Inhibitoren	34
1.12 Fluoreszenz-gekoppelte Marker für die Zellorganellen	35
2. Methoden	35
2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	35
2.1.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen	35
2.1.2 Kultur von adhärent wachsenden Zellen	35
2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
2.2 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	36
2.2.2 Isolierung von gesamt-RNA	37
2.2.3 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.2.4 cDNA-Synthese und Amplifikation durch Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	38
2.2.5 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	39
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	39
2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel	40
2.2.8 Dephosphorylierung von DNA	40
2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA	40
2.2.10 Klonierung der humanen FLASH DNA-Sequenz	41
2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	43

2.2.12 Transformation von Bakterien	43
2.3 Zellbiologische Methoden	44
2.3.1 Transfektion von Zellen	44
2.3.2 Herstellung stabiler Zelllinien	45
2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz	45
2.4 Proteinbiochemische Methoden	46
2.4.1 Herstellung des Kaninchen anti-FLASH Peptidantikörpers	46
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.4.3 Western Blot	47
2.4.4 Immunpräzipitation	48
2.4.5 Immunpräzipitation von CD95-Rezeptor und Caspase-8 nach der Induzierung des CD95-vermittelten Zelltodes	48
2.4.6 Zelluläre Fraktionierung	49
III Ergebnisse	51
IDENTIFIZIERUNG VON FLASH ALS SP100 INTERAKTIONSPARTNER	51
Evidenz durch Analyse mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid-Systems	51
FLASH interagiert spezifisch mit Sp100 <i>in vivo</i>	52
Kartierung der Interaktionsdomäne von FLASH mit Sp100	53
SUBZELLULÄRE LOKALISATION UND EXPRESSION VON ENDOGENEM FLASH-PROTEIN	55
Subzelluläre Lokalisation von endogen exprimertem FLASH in 293T- und HT1080-Zellen	55
CHARAKTERISIERUNG DER FLASH-KERNDOMÄNEN	57
FLASH lokalisiert partiell in PML-Kerndomänen	57
FLASH ist eine transient mit PML-Kerndomänen assoziierte Komponente	59
Die subzelluläre Lokalisation von FLASH-Deletionsmutanten	61
FLASH enthält mehrere Konsensus SUMO-1 Modifikationsmotive und	

kolokalisiert mit SUMO-1 in Kerndomänen	63
DIE ROLLE VON FLASH UND SP100 IN DER CD95-VERMITTELTEN APOPTOSE	64
Blockierung der FLASH-Expression mit siRNA führt zur Repression der CD95-vermittelten Apoptose	64
FLASH und Sp100 translozieren nach Aktivierung des CD95-Rezeptors aus dem Zellkern und PML-Kerndomänen in das Zytoplasma	66
FLASH transloziert nach Induktion CD95-vermittelter Apoptose an Mitochondrien und kolokalisiert dort mit Caspase-8	69
Die Translokation von FLASH nach CD95-Rezeptor Aktivierung wird durch Inhibition der Aktivierung von Caspase-8 verlangsamt	71
In HT1080 ^{FADD-DN} -Zellen wird die FLASH-Translokation nach der CD95-Rezeptor Aktivierung verlangsamt	72
Die Translokation von FLASH nach CD95-Rezeptor Aktivierung wird durch Leptomycin B verhindert	74
FLASH interagiert mit Caspase-8 im Zytoplasma	76
Die CD95-vermittelte Apoptose induziert die Freisetzung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien	78
DAS ADENOVIRALE PROTEIN E1B 19K INHIBIERT CD95-VERMITTELTE APOPTOSE DURCH DIE INTERAKTION MIT FLASH AN DEN MITOCHONDRIEN	80
In HT1080 ^{E1B 19K} -Zellen wurden FLASH und Caspase-8 von dem adenoviralen anti-apoptotischen E1B 19K-Protein an die Mitochondrien rekrutiert	80
Die Aktivierung der Caspase-8 wird im Komplex von FLASH-E1B 19K-Caspase-8 verhindert	83
FLASH BILDET TODESEFFEKTOR-FILAMENTE	85
Zytoplasmatisches FLASH führt zur Ausbildung von Todeseffektor-Filamenten (<i>Death effector filaments, DEFs</i>)	85
FLASH rekrutiert endogene Pro-Caspase-8 in Todeseffektor-Filamente	87
FLASH Lokalisation in Todeseffektor-Filamenten korreliert mit dessen	

Funktion in der Apoptose	88
Exogen exprimiertes FLASH rekrutiert Mitochondrien in Todeseffektor-Filamente	90
Expression des adenoviralen E1B 19K-Proteins führt zur Auflösung von FLASH-DEFs	91
FLASH-DEFs verändern die subzelluläre Lokalisation von Sp100, aber nicht die von PML	92
SP100 REGULIERT FLASH-LOKALISATION UND CD95-VERMITTELTE APOPTOSE	94
Verminderte Expression des Sp100-Proteins führt zur verstärkten FLASH-Lokalisation im Zytoplasma	94
Verminderte Expression des Sp100-Proteins führt zum verstärkten Zelltod nach der Aktivierung des CD95-Rezeptors	96
IV Diskussion	98
FLASH-LOKALISATION IN PML-KERNDOMÄNEN UND INTERAKTION MIT SP100	100
DIE ROLLE VON FLASH UND SP100 IN DER CD95-VERMITTELTEN APOPTOSE	102
DIE PRO-APOPTOTISCHE FUNKTION VON FLASH IST ABHÄNGIG VON SEINER SUBZELLULÄREN LOKALISATION	110
V Zusammenfassung	112
VI Abkürzungen	114
VII Literatur	117
VIII Anhang	129

I Einleitung

1. PML-Kerndomänen

Die Zellkerne höherer Eukaryonten enthalten zahlreiche, morphologisch unterschiedliche Substrukturen, die in ihrer Gesamtheit Kernkörperchen genannt werden (Matera, 1999). Diese einzelnen Kernkörperchen unterscheiden sich von anderen nukleären Organellen und wurden erstmals mit Hilfe von Autoimmunseren entdeckt. Eine Subspezies dieser Kernkörperchen sind die *nukleären Domänen*, die auch PML-Kerndomänen, Kremer-Körper, ND10 oder POD (PML onkogene Domänen) genannt werden. Der Name PML Kerndomänen und POD stammt aus verschiedenen Studien in denen gezeigt werden konnte, dass das Promyelozytische Leukämie Protein (PML) mit diesen Strukturen assoziiert ist (Ascoli and Maul, 1991; Dyck et al., 1994; Hodges et al., 1998; Koken et al., 1994; Maul et al., 2000). Im Folgenden werden diese nukleären Domänen PML-Kerndomänen genannt. PML-Kerndomänen stellen Multiproteinkomplexe dar, die meist zu einem großen Teil an die unlösliche nukleäre Matrix, gebunden sind. Die Zusammensetzung dieser Multiproteinkomplexe, deren Anzahl, Morphologie und Beweglichkeit sind jedoch stark Zelltyp sowie von endogenen und exogenen Faktoren abhängig. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit geeigneten Antikörpern können die PML-Kerndomänen in Interphase-Zellkernen meist als einzelne punktförmige oder ringähnliche Strukturen sichtbar gemacht werden. Abhängig vom Zelltyp sind meist 10-30 dieser nukleären Domänen pro Zellkern vorhanden (Ascoli and Maul, 1991), mit einem Durchmesser von 0,2 bis 1µm. Anzahl und Größe der PML-Kerndomänen ändern sich während des Zellzyklus (Koken et al., 1995). Die Untersuchung der molekularen Zusammensetzung der PML-Kerndomänen war Gegenstand zahlreicher Forschungen der vergangenen Jahre und ist auch heute noch ein sehr aktives Forschungsgebiet. So konnte bereits eine Vielzahl von permanent oder transient mit PML-Kerndomänen assoziierten Komponenten identifiziert werden, von denen ein Grossteil in Abbildung 1.1 aufgeführt ist. Die Art der in den PML-Kerndomänen gefundenen Proteine lässt vermuten, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege der Zelle von und nach der dynamischen Interaktion dieser Proteine mit diesen Kerndomänen beeinflusst werden kann. So ist für einige Proteine, die in PML-Kerndomänen lokalisieren, bekannt, dass sie an der Regulation der Transkription von Genen sowie an Signalübertragungswegen der Apoptose beteiligt sind

(Hess and Korsmeyer, 1998; Salomoni and Pandolfi, 2002). Weitere Beobachtungen zeigen, dass PML-Kerndomänen durch die Infektion der Zelle mit verschiedenen DNA- und RNA-Viren beeinflusst werden, wobei die PML-Kerndomänen entweder ganz zerstört oder die Zusammensetzung und Morphologie verändert wird (Carvalho et al., 1995; Chelbi-Alix and de The, 1999; Everett et al., 1998; Maul et al., 1996).

Ausgehend von diesen Daten wird angenommen, dass PML-Kerndomänen ein Depot zur Lagerung und Titration nukleärer Proteine und einen Ort post-transkriptioneller Modifikationen darstellen könnten. Desweiteren wird ihnen eine Rolle in der Genregulierung, in der Wachstumskontrolle, Differenzierung und Apoptose zugesprochen (Seeler and Dejean, 1999).

1.1 Zelluläre Proteine der PML-Kerndomänen

PML-Kerndomänen repräsentieren eine Klasse von hochdynamischen Strukturen. Eine Liste der zellulären Proteine, die mit diesen nukleären Domänen assoziiert sind (Abbildung 1.1), basiert auf Ergebnissen von Lokalisierungsstudien mit spezifischen Antisera, von Interaktionsstudien (Hefe 2-hybrid System) sowie von funktionellen Tests (z.B. transkriptionelle Aktivierung). Neben dem PML-Protein, das im Interphasestadium in PML-Kerndomänen lokalisiert und als Gerüst des ND-Netzwerkes betrachtet wird, lokalisieren verschiedene Transkriptionsfaktoren (Li et al., 2000; Zhong et al., 2000b), Proteine mit der Funktion in DNA-Reparatur (Bischof et al., 2001; Carbone et al., 2002), Tumorsuppressoren (Salomoni and Pandolfi, 2002) und Proto-Onkogene (Le et al., 1996) an diesen Strukturen.

Im Folgenden werden einige Proteine, die an PML-Kerndomänen lokalisieren und für das Verständnis dieser Dissertation und einiger Experimente wichtig sind, vorgestellt.

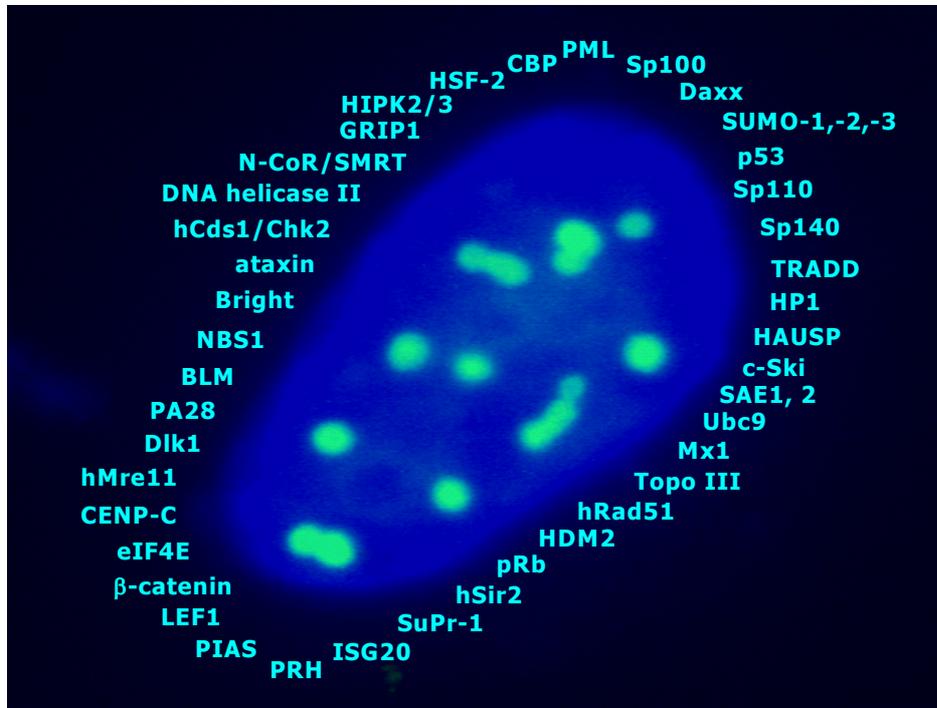


Abbildung 1.1. Bisher bekannte zelluläre Proteine, die mit PML-Kerndomänen assoziieren. Das Bild stammt aus der Publikation: Hofmann, T. G., and Will, H. (2003). „*Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation.*“ *Cell Death and Differentiation* 10, 1290-1299.

1.2 Das PML-Protein

In Patienten, die an akuter promyelozytischer Leukämie (APL) leiden, wurde das *PML*-Gen (Promyelozytisches Leukämie-Gen) ursprünglich als t(15;17) chromosomaler Translokationspartner des Retinsäurerezeptorgens RARalpha entdeckt (de The et al., 1991; Goddard et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Pandolfi et al., 1991). Diese reziproke Translokation führt zur Expression der Fusionsproteine PML-RARalpha und RARalpha-PML. Die APL ist eine hämatopoetische Erkrankung, in der die normale Entwicklung myeloider Leukozyten auf der promyelozytischen Ebene arretiert ist. Die Expression des PML-RARalpha Fusionsproteins in APL-Zellen äußert sich in einer massiven Umverteilung der nukleären Domänen in sogenannte „Mikrodots“ im Vergleich zu nicht

leukämischen Zellen (Melnick and Licht, 1999). Diese Umverteilung kann durch Behandlung mit Retinsäure sowie mit Arsentrioxid behoben werden (Chen et al., 1997; Huang et al., 1988). Eine Therapie mit Retinsäure führt zu einer Aufhebung des Differenzierungsblocks, während Behandlung mit Arsentrioxid zur Induktion von Apoptose in APL-Zellen führt. Beide Therapeutika führen zu einer klinischen Remission bei einer Vielzahl von Patienten.

Das PML-Protein besitzt eine C₃HC₄-Zinc-Finger-ähnliche Domäne (RING-Finger), zwei B-Boxen und eine „coiled coil“ Dimerisationsdomäne (Dyck et al., 1994).

Die RING-Finger Domäne spielt bei den Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle (Borden et al., 1995), wobei die Dimerisierungsdomäne für die Aufrechterhaltung von PML und PML-RARalpha Homo- und Heterodimeren notwendig ist (Kastner et al., 1992). Bisher sind 15 PML-Isoformen bekannt, die sich hauptsächlich im C-Terminus des Proteins unterscheiden (Jensen et al., 2001). Das PML-Protein ist normalerweise in vereinzelt, punktförmigen nukleären PML-Kerndomänen zusammen mit anderen nukleären Proteinen zu finden. In Zellen, in denen das PML-RARalpha-Fusionsprotein exprimiert wird oder in denen PML nicht vorhanden ist, zeigen auch andere Bestandteile der PML-Kerndomänen wie z.B. SUMO-1, Sp100, Sp140, CBP, BLM und Daxx ein aberrantes Lokalisierungsmuster (Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000c). Andererseits führt der Verlust anderer PML-Kerndomänen-Bestandteile nicht zu einer Veränderung der PML Lokalisation (Zhong et al., 1999). Diese Daten legen nahe, dass PML für die Bildung der PML-Kerndomänen nicht nur benötigt wird, sondern auch der definierende Marker dieser nukleären Strukturen ist.

Diverse Untersuchungen weisen auf eine Vielzahl von physiologischen Funktionen hin, in denen PML eine Rolle zu spielen scheint. Interferone des Typs I und II können die Transkription des *PML*-Gens wie auch des Sp100 Gens erheblich erhöhen und dies ist zum Teil durch ein ISRE- (*Interferon-stimulated response element*) als auch ein GAS- (*IFN-γ activation site*) Sequenzelement im *PML*-Promoter vermittelt. Durch die so verstärkte Transkription erhöht sich die Größe und Anzahl der PML-Kerndomänen (Grötzinger et al., 1996a; Grötzinger et al., 1996b; Guldner et al., 1992; Lavau et al., 1995; Stadler et al., 1995). Diese und spätere Studien lassen vermuten, dass PML und PML-Kerndomänen eine Rolle bei der intrazellulären Virusabwehr spielen. Verschiedene Experimente zeigten auch, dass die Überexpression von PML in verschiedenen Zelllinien mithilfe von Expressionsvektoren zu einem Anstieg der Apoptose führen kann, woraus geschlossen wurde, dass PML als pro-apoptotischer Faktor agieren kann (Borden et al., 1997; Fagioli et

al., 1998; Quignon et al., 1998; Wang et al., 1998). Desweiteren wird dem PML-Protein tumorsuppressive Aktivität zugeschrieben, die sich auf der Ebene der Kontrolle des Zellwachstums, des Überlebens der Zellen sowie der genomischen Stabilität manifestieren könnte. Da PML mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (z.B: CBP, Daxx, p53) interagiert, wird auch eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl von Genen angenommen (Fogal et al., 2000; Li and Chen, 2000; Pearson et al., 2000; Zhong et al., 2000b). Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die genaue biologische Funktion von PML zu klären.

1.3 Das Sp100-Protein

Der Einsatz von Seren der Patienten mit der Primären Biliären Zirrhose (PBC) mit diesen Autoantikörpern für einen Immunoscreen einer cDNA-Bibliothek führte zu der Entdeckung und Charakterisierung des ersten PML-Kerndomänen-spezifischen Proteins, das Sp100 (*Speckled protein 100 kDa*) genannt wurde (Szostecki et al., 1990; Szostecki et al., 1987)

Sp100 ist ein saures Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 54 kDa und einem aberranten elektrophoretischen Laufverhalten zwischen 70 und 100 kDa, je nach benutztem SDS-Polyacrylamidgelsystem und Bedingungen der Elektrophorese (Szostecki et al., 1990). Das an den nukleären Domänen lokalisierende Sp100 ist meist zum großen Teil fest an die nukleäre Matrix gebunden, ein Teil ist auch in der leicht löslichen Zellfraktion enthalten (Szostecki et al., 1987; Zong et al., 2000).

Das Sp100-Protein enthält eine sogenannte HSR-Domäne (*homogeneously staining region*), die für seine Oligomerisierung, Protein-Protein Interaktionen sowie für die Lokalisierung an PML-Kerndomänen benötigt wird (Sternsdorf et al., 1999). Diese Domäne erweist Homologie zur Maus HSR-Domäne welche durch starke Gen Vervielfachung entstanden ist (Agulnik et al., 1993; Grotzinger et al., 1996). Desweiteren gibt es am N-Terminus von Sp100 ein Sequenzabschnitt, der eine hohe Ähnlichkeit zu Teilen des peptidbindenden Bereiches der Gruppe der MHC Klasse I Molekülen besitzt. Die Bedeutung dieser Domäne für Sp100 ist bisher jedoch unklar. In der zentralen Region des Sp100-Proteins liegt eine transaktivierende Domäne (Aminosäure 297-334), die eine Ähnlichkeit zu Sequenzen aufweist, die in verschiedenen viralen transaktivierenden

Proteinen, z.B. in dem HIV-1 Nef Protein, vorkommt (Xie et al., 1993). Am C-terminalen Ende des Sp100-Proteins konnte ein funktionelles Kernlokalisierungssignal (NLS) kartiert werden, welches notwendig und ausreichend für dessen Kerntransport ist (Sternsdorf et al., 1999).

Sp100 wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, die sich in ihrer C-terminalen Aminosäuresequenz unterscheiden (Guldner et al., 1999; Seeler et al., 1998). Diese Spleissvarianten wurden von unserer Arbeitsgruppe SpAltC, SpAlt212 und SpAlt-HMG benannt. Spleissvarianten SpAlt-212 und SpAlt-HMG, enthalten eine SAND-ähnliche Domäne, (SAND wird abgeleitet von Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1) (Dent et al., 1996; Guldner et al., 1999). Diese Art von DNA-Bindungsdomänen sind zurzeit bekannt für ihre Funktion bei Chromatin-assoziiierter Regulation von Transkriptionvorgängen (Bottomley et al., 2001). Die Sp100- Spleissvariante mit einer fast vollständigen *High Mobility Group 1*-Proteinsequenz am C-Terminus ist SpAlt-HMG (Guldner et al., 1999). Da viele Proteine der HMG-Superfamilie zu den Kategorien der Transkriptionsfaktoren und Koaktivatorproteinen gehören, wird vermutet, dass auch die SpAlt-HMG Variante eine regulatorische Funktion bei der Transkription hat.

In letzten Jahren häufen sich Hinweise, dass Sp100 eine Rolle in der transkriptionellen Regulation spielt. So wurde z.B. im Jahr 1998 von der Interaktion zwischen Sp100 und dem Heterochromatin-Protein 1 (HP1) berichtet (Lehming et al., 1998; Seeler et al., 1998). HP1 gehört zu der Familie der nicht-Histon chromosomalen Proteine. Die Interaktion dieser beiden Proteine weist indirekt auf eine Funktion von Sp100 bei der transkriptionellen Regulation hin. So wurde berichtet, dass die Sp100-Wechselwirkung mit HP1 auf einen reprimierend wirkenden Komplex schließen lässt, der durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren an die DNA rekrutiert wird (Lehming et al., 1998; Seeler et al., 1998). Desweiteren konnte für Sp100 eine reprimierende Wirkung der transaktivierenden Aktivität von *Bright* (*B-cell regulator of IgH transcription*), einem mit Sp100 kolokalisierendem Protein, gezeigt werden (Zong et al., 2000). Außer der reprimierenden Wirkung wurde kürzlich berichtet, dass Sp100 die Transkription spezifischer Gene auch aktivieren kann, durch Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor ETS-1, das anscheinend eine Konformationsänderung und Aktivierung von ETS-1 bewirkt (Wasylyk et al., 2002). Letztes Jahr wurde darüberhinaus berichtet, dass Sp100 mit der Serin-Threonin Kinase HIPK2 interagiert. Dabei verstärkt

Sp100 die HIPK2-vermittelte Regulation der p53-Transkription (Moller et al., 2003b). Somit ist Sp100 in der Lage, die Transkription nicht durch direkte Bindung an DNA, sondern durch Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor, einer Kinase und direkt oder indirekt mit einem Tumorsuppressor-Protein zu regulieren.

Sp100 interagiert auch mit NBS1, ein Protein welches das sogenannte *Nijmegen breakage syndrome* (NBS) auslöst (Naka et al., 2002). In den Zellen von NBS-Patienten wurden Defekte in der Erkennung von DNA-Schäden nachgewiesen, die zu chromosomalen Abberationen führen, (Weemaes et al., 1994). Basierend auf dieser Arbeit wurde spekuliert, dass die Interaktion mit Sp100 und Lokalisation von NBS1 in PML-Kerndomänen bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität eine Rolle spielen könnte (Weemaes et al., 1994).

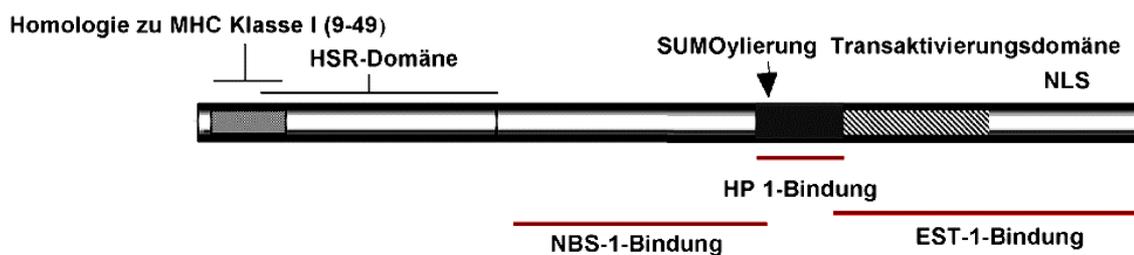


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung des Sp100-Proteins.

1.4 Das SUMO-1 Protein

PML und Sp100 werden posttranslational durch SUMO-1, einem Mitglied der Familie von Proteinen, die Homologien zu Ubiquitin aufweisen, modifiziert (Sternsdorf et al., 1997). Die cDNA, die für das Protein kodiert, wurde gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben und trägt daher die verschiedenen Namen PIC1 (*PML interacting clone 1* (Boddy et al., 1996)), SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier*, (Mahajan et al., 1997)), GMP1 (*GAP modifying protein*, (Matunis et al., 1996)), Sentrin (Okura et al., 1996) und UBL1 (*ubiquitin-like 1* (Shen et al., 1996)). Im weiteren Verlauf wird das Protein SUMO-1 genannt. SUMO-1 ist ein 101 As langes Polypeptid, das über eine Thioesterbindung an bestimmte Lysinreste seiner Zielproteine angeheftet wird (Saitoh et al., 1997). Im Gegensatz zur Ubiquitin Modifikation, die zur sofortigen Degradation des Zielproteins durch das 26S Proteosom führt, scheint die SUMOylierung einen Einfluss auf

die Stabilisierung des Zielproteins, sowie auf seine subzelluläre Lokalisation und die Interaktion auszuüben. (Desterro et al., 1998a; Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1998). In Falle von I κ B-alpha, einem bekannten Substrat des Ubiquitin/Proteasom-Systems, führt die SUMOylierung zu einer Stabilisierung und Unempfindlichkeit des I κ B-alpha Moleküls gegenüber der Degradation durch das Ubiquitin/Proteasom System (Desterro et al., 1998b). SUMO-1 wurde ebenfalls in PML-Kerndomänen gefunden. Studien in PML-negativen Fibroblasten legten nahe, dass SUMO-1 kovalente Modifikation von PML essentiell für die Aufrechterhaltung von PML-Kerndomänen ist und ebenso für die PML-abhängige Rekrutierung von Proteinen wie Daxx oder CBP zu diesen Domänen (Doucas et al., 1999; Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000a).

Sp100 wird auch durch SUMO-1 kovalent modifiziert, wobei diese Modifikation jedoch nicht notwendig für Sp100-Lokalisierung an PML-Kerndomänen ist (Sternsdorf et al., 1997) (Muller et al., 1998).

1.5 Dynamische Eigenschaften der PML-Kerndomänen

Der eukaryotische Zellkern enthält verschiedenartige Domänen, in welchen Komponenten mit spezifischen Funktionen akkumulieren. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass diese Multiprotein Komplexe einen dynamischen Charakter aufweisen. Fluoreszenz- und Photobleichungsexperimente zeigten, dass die Mehrheit der Proteine im Nukleoplasma mobile Eigenschaften besitzt und, dass deren funktioneller Austausch zwischen Chromatin und nukleären Subdomänen dynamisch verläuft (Misteli, 2001).

PML-Kerndomänen sind in verschiedenartigen zellulären Prozessen involviert, deshalb ist deren genaue Funktion schwer zu ermitteln. Unterschiedliche Arbeitsmodelle für die Aufklärung der PML-Kerndomänen Funktionen wurden bisher vorgeschlagen, eine Hypothese wäre, dass PML-Kerndomänen in Form eines Depots, die Proteinmenge im Nukleoplasma regulieren und diese bei Bedarf an die Wirkorte entlassen werden (Maul et al., 2000). In einem anderen Model stellen PML-Kerndomänen die Verschrottungsorte dar, da die 11S Proteasomen unter bestimmten Bedingungen, wie die Behandlung mit Arsentrioxid in die PML-Kerndomänen rekrutieren und somit die Proteasome-abhängige Degradation von PML bewirken (Lallemand-Breitenbach et al., 2001).

Eine Reihe von Studien weisen drauf hin, dass PML-Kerndomänen einen dynamischen Charakter besitzen. So führt die Induktion von Stress mittels Hitzeschock,

Schwermetallbehandlung oder der Expression viraler Proteine zur Abtrennung von PML-enthaltenden sogenannten Mikrodots (Eskiw et al., 2003; Everett et al., 1998; Maul et al., 1995). Interessanterweise, fusionieren diese Mikrodots mit Überresten von „parentalen“ PML-Kerndomänen, nach dem Stress (Eskiw et al., 2003). Wiederhergestellte PML-Kerndomänen lokalisieren nicht zufällig in Kern, sondern an den Seiten der alten PML-Kerndomänen, was darauf hindeutet, dass die Lokalisation und Akkumulation der PML-Kerndomänenkomponenten festgelegt ist (Eskiw et al., 2003). Anschließend wurde herausgefunden, dass SUMO-1-Protein, welches in Mikrodots nicht präsent ist, während der Fusion in Mikrodots akkumuliert (Eskiw et al., 2003). Die transiente Überexpression von SUMO-1 verhindert die Stress-assoziierte Dissoziation von PML-Kerndomänen in Mikrodots. Diese Daten implizieren eine Schlüsselrolle von SUMO-1 im Mechanismus der Stress-induzierten Dissoziation und Wiederherstellung von PML-Kerndomänen.

Interessanterweise wurde herausgefunden, dass auch einzelne Komponenten der PML-Kerndomänen dynamisch mit PML-Kerndomänen assoziieren und dissoziieren. Eine von diesen Komponenten ist der Transkriptions-Koaktivator CBP (*CREB-binding Protein*). CBP kann sich schnell in PML-Kerndomänen hinein und heraus bewegen (Boisvert et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass Sp100 nicht nur in statischen PML-Kerndomänen lokalisiert, sondern auch in kleineren, dynamischen Domänen, die allerdings kein PML beinhalten (Wiesmeijer et al., 2002). Kleine, Sp100-haltige Domänen verschmelzen nach einiger Zeit mit den PML-Kerndomänen. Obwohl das PML-Protein für die Aufrechterhaltung der PML-Kerndomänen wichtig ist, lokalisiert ein Teil von PML in separaten, dynamischen Domänen (Wiesmeijer et al., 2002).

Die dynamischen Eigenschaften der PML-Kerndomänenkomponenten, spielen wahrscheinlich bei deren Funktionen eine große Rolle. Es kann aber derzeit auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Komponenten allein oder zusätzlich innerhalb der PML-Kerndomänen spezifische Aufgaben ausüben. Zumindest für PML ist die Präsenz von intakten PML-Kerndomänen für deren Aktivität in unterschiedlichen biochemischen Prozessen wichtig (Salomoni and Pandolfi, 2002).

2. Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Zellen können sich selbst mittels eines intrinsischen Zelltodprogramms zerstören (Steller, 1995). Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes und ist charakterisiert durch spezifische morphologische und biochemische Eigenschaften (Wyllie et al., 1980). Morphologisch zeigt die Apoptose eine Reihe von spezifischen Veränderungen: die Zelle schrumpft, das Chromatin wird kondensiert und die Stabilität der Plasmamembran geht verloren. Dies führt zur Ausstülpungen der Zelle und schließlich zum Abschnüren membranumhüllter Apoptosekörperchen (Steller, 1995; Wyllie et al., 1980). Biochemisch ist Apoptose durch Chromatindegradation in 200 Basenpaare große Fragmente charakterisiert (Oberhammer et al., 1993; Wyllie et al., 1980). Weitere biochemische Marker der Apoptose sind erhöhte Menge des Proteins Clusterin (Pearse et al., 1992), und Aktivierung des Enzyms Typ II Transglutaminase, welches die Ausbildung der Apoptosekörperchen induziert (Fesus et al., 1991). Apoptose ist ein komplexes Phänomen von zusammenhängenden morphologischen und biochemischen Prozessen und kann in Abhängigkeit von den Geweben und dem Zelltyp variieren (Zakeri and Lockshin, 1994).

Die Apoptose kann man, im Gegensatz zur Nekrose, mit einem Selbstverdauungsprogramm der Zelle vergleichen. Dieser genau kontrollierte Eliminierungsvorgang entfernt gezielt innerhalb eines Organismus mutierte, Virus-befallene, gealterte oder überflüssig gewordene Zellen (Vaux et al., 1994). Im Gegensatz dazu führt die Nekrose, die beispielsweise durch Gewebeschädigungen verursacht wird, zum Anschwellen der Zelle und schließlich zum Platzen, was aufgrund des Verlustes der Membranintegrität zur Freisetzung des Zellinhalts führt (Nicotera et al., 1999).

Apoptose besitzt innerhalb der vielzelligen Organismen eine fundamentale Bedeutung. Bei Prozessen wie der Embryonalentwicklung, Organogenese, Homeostase von Geweben, oder der Immunantwort spielt die Apoptose eine zentrale Rolle (Thompson, 1995). Obwohl sie in der normalen Entwicklung von essentieller Bedeutung ist, kann die verstärkte, unkontrollierte Apoptose bei verschiedenen Krankheiten, wie AIDS oder neurodegenerativen Krankheiten, zum Krankheitsbild beitragen (Thompson, 1995). Störungen der Apoptose, die zur Blockade des Zelltodes führen, können bei Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen oder Krebs von Bedeutung sein. Es wurden

einige Mechanismen beschrieben, wie sich Tumorzellen von der Eliminierung schützen können. So wurde berichtet, dass Tumorzellen verschiedenen Ursprungs in der Lage sind, den Apoptose-auslösenden CD95-Liganden zu exprimieren und darüber die tumorreaktiven cytotoxischen T-Zellen eliminieren können (Hahne et al., 1996; Strand et al., 1996). Ein weiterer Mechanismus besteht in der verstärkten Expression von anti-apoptotischen Proteinen, wie beispielsweise anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie (Adams and Cory, 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass Tumorzellen die Expression verschiedener pro-apoptotischer Proteine reprimieren bzw. diese verstärkt degradieren (Antonia et al., 1998). Das pro-apoptotische Protein Bax wird, z.B. durch Prostata Krebszellen degradiert (Li and Dou, 2000).

Einige der molekularen Komponenten des apoptotischen Programms sind evolutionär konserviert (Steller, 1995). Vier von diesen Genen; *ced-9*, *ced-3*, *ced-4* (*ced* steht für *cell death defective*) und *egl-1* sind homolog zu humanen Genen: dem proto-onkogen *Bcl-2*, der *ice*-Familie (*interleukin-1-beta-converting enzyme*), auch Caspasen genannt, dem *apaf-1* (*apoptosis protease-activating factor 1*) und der *BH3-only*-Proteinfamilie (Adams and Cory, 1998; Conradt and Horvitz, 1998; Yang et al., 1998; Zou et al., 1997) Ektopische Expression von *ced-9/bcl2* verhindert Apoptose in verschiedenen experimentalen Systemen (Reed, 1995).

ced-3/ice enthalten einen Cysteinrest im aktiven Zentrum, und sind in der Lage, die Substrate nach einem Aspartatrest zu spalten (Martin et al., 1996). Deshalb werden die menschlichen ICE-Proteasen auch Caspasen (Cystein Aspartasen) genannt (Henkart, 1996). *Ced-3*-Mutationen inhibieren Apoptose in *C.elegans* und deren ektopische Expression induziert Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen (Martin et al., 1996).

Ced-4/apaf-1 haben eine Aktivator- oder Effektor-Funktion in der zellulären Todesmaschinerie. So bindet Apaf-1 an die CED-3-homologe Caspase-9 und aktiviert sie (Hengartner, 1998). Auf der anderen Seite, führt die CED-4-Interaktion mit CED-9 zur Inhibition der CED-3 pro-apoptotischen Aktivitäten (Xie and Ding, 2000).

Das EGL-1-Protein, welches im Besitz einer BH3-Domäne ist (*BH3-only proteins*), wirkt pro-apoptotisch in dem es mit dem CED-9 interagiert und somit dem Adapterprotein CED-4 die Interaktion und die Aktivierung von CED-3 ermöglicht (Conradt and Horvitz, 1998)

In der letzten Dekade wurden unterschiedliche molekulare Mechanismen innerhalb der apoptotischen Signale untersucht. Zwei Hauptsignalwege, der erste wird über Todesrezeptoren induziert (extrinsischer Signalweg), und der zweite, der über

Mitochondrien verläuft (intrinsischer Signalweg), benutzen Caspasen als Effektor Moleküle. In den letzten Jahren häufen sich aber immer mehr Hinweise, dass bestimmte Formen von Zelltod auch in der Abwesenheit der Caspasen verlaufen können (Quignou et al., 1998).

2.1 Die Signaltransduktion des CD95-Rezeptors

Todesrezeptoren sind Zelloberflächenrezeptoren, welche durch spezifische Liganden an der Zellmembran ausgelöste Signale in das Zellinnere vermitteln. In der Apoptose spielen sie eine wichtige Rolle, wobei sie nach der Aktivierung, binnen Sekunden die Caspase-Kaskade aktivieren können. Todesrezeptoren gehören zur TNF-Superfamilie (Tumor Nekrose Faktor) (Smith and Baglioni, 1992) und besitzen, außer in der Apoptose auch weitere Funktionen. Die am besten charakterisierten Todesrezeptoren sind CD95 (Fas, Apo-1), TNFR-1 (TNF-Rezeptor-1) und TRAIL-Rezeptor (*TNF-related apoptosis inducing ligand*).

Die Aktivierung von CD95 erfolgt folgendermaßen: Der CD95-Rezeptor, welcher im Form eines Heterotrimeres an der Zelloberfläche exprimiert ist, wird durch die Bindung des CD95-Ligandes (CD95L) aktiviert (Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). Der zytoplasmatische Teil des CD95-Rezeptors enthält eine für Todesrezeptoren charakteristische etwa 60 Aminosäuren lange Todesdomäne (DD, *Death domain*) (Peter et al., 1999).

An die zytoplasmatische Todesdomäne des Rezeptors bindet die homologe Todesdomäne eines Adapterproteins, sog. FADD (MORT-1) (*Fas-associated death domain containing protein*) (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). Außer der Todesdomäne enthält FADD auch eine Todeseffektordomäne (DED, *Death effector domain*). Diese N-terminale Domäne wird für die Weiterleitung des apoptotischen Signals benötigt. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass FADD-DN, eine FADD-Mutante, welcher der N-Terminus fehlt, ein dominant negativer Inhibitor der CD95-vermittelten Apoptose ist (Chinnaiyan et al., 1996).

Die DED von FADD erlaubt die Bindung der Pro-Caspase-8 an den CD95-FADD Komplex (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Pro-Caspase-8, auch bekannt als FLICE (*FADD-like ICE*), assoziiert mit FADD über ihre eigene Todeseffektordomäne. Pro-Caspase-8 wird als katalytisch inaktives Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, das nach

proteolytischen Spaltung nach definierten Aspartatresten, was zur Freisetzung einer großen und einer kleinen aktiven Untereinheit führt, aktiviert wird. (Medema et al., 1997). Außer der essentiellen Rolle beim apoptotischen Zelltod, wird Caspase-8 paradoxerweise auch bei der Proliferation von Lymphozyten benötigt. T-Zellen ohne Caspase-8 Aktivitäten, sind nicht nur resistent gegenüber der Apoptose, sondern auch nicht in der Lage Interleukin-2 zu produzieren und zu proliferieren. Diese duale Rolle der Caspase-8 ist wichtiger Kontrollpunkt, um sicher zu stellen, dass aktive Lymphozyten nach der Aktivierung eliminiert werden (Chun et al., 2002; Salmena et al., 2003).

An der Aktivierung der Caspase-8 am CD95-Rezeptor soll ein weiteres Protein, genannt FLASH (*FLICE associated huge protein*), beteiligt sein (Imai et al., 1999). Es wurde berichtet, dass FLASH mit dem Adapterprotein FADD und der Pro-Caspase-8 interagiert und mittels dieser Interaktion einen verstärkten Effekt auf die Aktivierung der Pro-Caspase-8 ausübt (Imai et al., 1999). Zusätzlich spielt die Oligomerisierung von FLASH eine Rolle bei der Rekrutierung von Pro-Caspase-8 an den aktivierenden CD95-Rezeptor (Imai et al., 1999). Der so entstehende Komplex der Proteine CD95, FADD, FLASH und Pro-Caspase-8, welcher die Pro-Caspase-8 Aktivierung begünstigt, wird auch DISC (*Death Inducing Signalling Complex*) genannt (Abbildung 1.3). Nach der Aktivierung wird die Caspase-8 in das Zytosol freigesetzt um dort weitere Substrate, wie Pro-Caspase-3, zu spalten und so zu aktivieren (Stennicke et al., 1998).

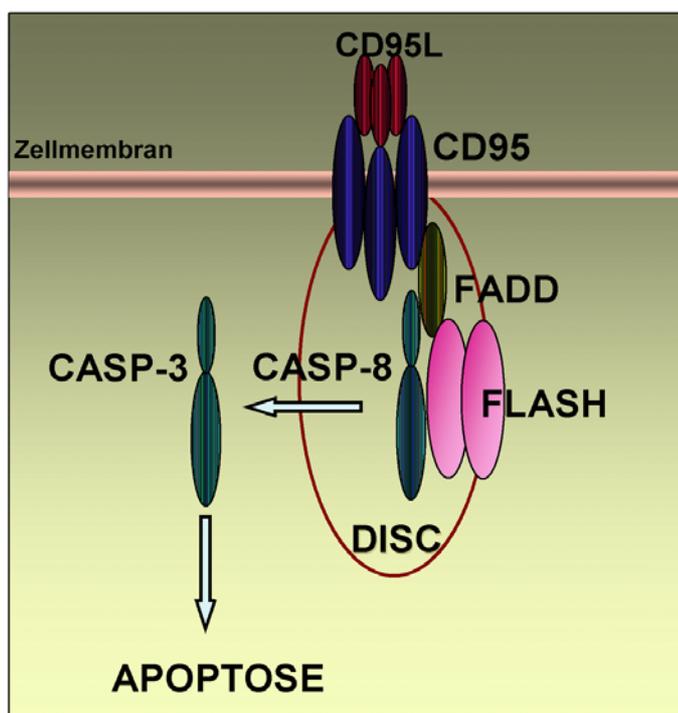


Abbildung 1.3. Die Signal-transduktion des CD95. Siehe Text für Erläuterungen.

Die Menge der am DISC aktivierten Caspase-8 ist vom Zelltyp abhängig. Sogenannte Typ I Zellen zeigen eine fulminante Aktivierung der gesamten zellulären Caspase-8 Menge am DISC, was wahrscheinlich in einer direkten Aktivierung der Effektor Caspase-3 resultiert (Scaffidi et al., 1998). In Typ II Zellen werden nur sehr geringe Mengen Caspase-8 und mit viel langsamer Kinetik am DISC rekrutiert und aktiviert. Diese Zellen benutzen einen alternativen, verstärkenden Signalweg, der zumindest teilweise über die Spaltung des Caspase-8-Substrats BID läuft und dessen Translokation in die Mitochondrien bewirkt (Li et al., 1998). BID ist Mitglied der Bcl-2 Familie, dessen gespaltene Form (tBID) eine proapoptische Funktion an den Mitochondrien ausübt (Wei et al., 2001). Dies resultiert in einer Depolarisation des mitochondrialen Transmembranpotentials, der, unter anderen, eine Freisetzung von Cytochrom C und Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase*) folgt (Peter et al., 1999). Cytochrom C bildet mit Apaf-1 und Pro-Caspase-9 einen Komplex, der auch Apoptosom genannt wird (Li et al., 1997). Die durch das Apoptosom aktivierte Caspase-9 spaltet nun die Effektor-Caspase-3 und löst so die Apoptose aus (Zou et al., 1997). Smac/DIABLO wird mit Cytochrom C von Mitochondrien freigesetzt und unterstützt die Aktivierung von Caspasen durch Inhibierung der Mitgliedern der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis*) (Deng et al., 2002).

Typ II Zellen stehen unter dem Einfluss der anti-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie. Die Expression von Bcl-2 oder Bcl-x_L führt in Typ II Zellen zur Resistenz gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose (Scaffidi et al., 1998). Die physiologische Bedeutung dieser zwei unterschiedlichen Signalwege wurde mit Hilfe einer BID-defizienten Maus dargestellt. Der Verlust von BID führte zur normalen CD95-induzierten Apoptose bei Maus-Thymozyten. Dagegen waren Hepatozyten gegenüber der CD95-induzierten Apoptose geschützt (Yin et al., 1999). Daraus lässt sich schließen, dass Thymozyten Typ I und Hepatozyten Typ II Zellen darstellen.

2.2 Das FLASH-Protein

Im Jahr 1999 haben Imai und Kollegen mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid Methode nach neuen Interaktionspartnern der Caspase-8 gesucht. Sie fanden außer bekannten Caspase-8-Interaktionspartnern wie FADD oder cFLIP (*FLICE inhibitory protein*) auch ein bis dato unbekanntes Protein mit partiellen Sequenzhomologien zur Caspase-8 DED-Domäne. Dieses Protein nannten sie FLASH (*FLICE associated huge protein*) und seine DED-

ähnliche Domäne, DRD (*DED-related domain*) (Imai et al., 1999). FLASH ist ein langes Polypeptid mit 1962 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 220 kDa. FLASH interagiert in den Studien außer mit Caspase-8 auch mit FADD, die Interaktion zwischen FADD und FLASH fand jedoch nur nach der Stimulation von CD95-Rezeptor statt (Imai et al., 1999). Immunpräzipitationsstudien mit aktiviertem CD95-Rezeptor ergaben, dass FLASH mit CD9-Rezeptor assoziiert. Daraus schlossen Imai und Kollegen, dass FLASH eine neue Komponente des Rezeptor-assoziierten DISC-Komplexes darstellt (Abbildung 1.3). In weiteren Studien wurde mittels Überexpression gezeigt, dass FLASH mit seiner DED-ähnlichen Domäne (DRD) die Aktivierung der Caspase-8 in der CD95-vermittelten Apoptose verstärkt. Außer der Interaktion mittels seiner DRD-Domäne scheint die Oligomerisierung von FLASH wichtig für die Rekrutierung der Pro-Caspase-8 an DISC zu sein (Imai et al., 1999). Die dafür verantwortliche Oligomerisierungsdomäne liegt im mittleren Teil der FLASH-Sequenz (Abbildung 1.4).

Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde weiterhin berichtet, dass FLASH mit dem adenoviralen anti-apoptotischen E1B 19K-Protein interagiert (Imai et al., 1999). Bis dahin konnte der genaue Mechanismus des E1B 19K-Proteins bei der Inhibition der Caspase-8 Aktivierung in der CD95-vermittelten Apoptose nicht definiert werden, da E1B 19K weder mit CD95, FADD oder Caspase-8 interagiert (Perez and White, 1998). Es wurde aber gezeigt, dass E1B 19K die FADD-induzierte Apoptose, nicht aber die Caspase-8-induzierte Apoptose verhindern kann was bedeutet, dass E1B 19K in der Signalkaskade zwischen FADD und Caspase-8 agiert (Perez and White, 1998).

Die Entdeckung von FLASH schloss diesen Kreis und entschlüsselte den Mechanismus der E1B19K-vermittelten Caspase-8 Inhibition.

E1B 19K besitzt eine Sequenzhomologie zu den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie, Bcl-2 und Bcl-x_L (Chiou et al., 1994). Diese anti-apoptotischen Proteine weisen funktionelle Homologie zum Nematoden-Protein CED-9 auf, welches die Aktivierung des pro-apoptotischen CED-3-Proteins über die Interaktion mit CED-4 inhibiert (Korsmeyer, 1995; Wu et al., 1997). Es wurde nachgewiesen, dass überexprimiertes E1B 19K mit CED-4 interagiert und somit die Apoptose verhindert (Han et al., 1998). Aufgründessen wird FLASH eine CED-4-ähnliche Funktion zugeschrieben. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen CED4 und FLASH ist das Vorhandensein einer Oligomerisierungsdomäne. Die

Oligomerisierung von CED4 führt zu Aktivierung von CED3 in *C.elegans* (Yang et al., 1998).

Außer CD95, beeinflusst FLASH auch die TNF-R1-induzierte Signalkaskade (Choi et al., 2001). FLASH interagiert mit dem Adapterprotein TRAF2 (*TNF receptor-associated factor*) welches, in der TNF-R1-vermittelten Aktivierung von NF- κ B involviert ist. Mittels dieser Interaktion wird die anti-apoptotische Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B verstärkt (Choi et al., 2001). Diese Daten deuten auf eine pro- und antiapoptotische Funktion von FLASH in den Todesrezeptor vermittelten Signalaskaden.

Die neuesten Daten zeigen, dass FLASH auch bei der Apoptose während der embryonalen Entwicklung eine Rolle spielt (Morgan et al., 2004). Die *Hox* Gene gehören zur Familie der hoch konservierten Transkriptionsfaktoren, welche die zelluläre Identität in der frühen embryonalen Phase bestimmen. Die Fehlexpression einiger *Hox* Gene führt zur homeotischen Transformationen, wobei ein Körperteil durch einen anderen ersetzt werden kann (Burke, 2000). So wurde gezeigt, dass FLASH im Notochord des Froschembryos exprimiert wird, wobei die Expression durch den Transkriptionsfaktor Hoxb4 induziert wird (Morgan et al., 2004). Die Behandlung des Notochords mit *anti-sense* RNA von FLASH oder Hoxb4 führte zur Resistenz gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose, was für eine Bedeutung von Hoxb4 und FLASH bei der Apoptose von Notochord-Zellen spricht (Morgan et al., 2004).

FLASH enthält zwei vermutete, C-terminal gelegene Kernlokalisierungssignale und ein vermutetes, ebenso C-terminal gelegenes Kernexportsignal (Imai et al., 1999). Übereinstimmenderweise wurde FLASH im Zellkern und im Zytoplasma detektiert. Im Kern übt FLASH eine Funktion bei der transkriptionellen Aktivität des Glukokortikoid Rezeptors (GR) aus (Kino and Chrousos, 2003). FLASH interagiert mit dem Kernrezeptorkoaktivator GRIP1 und antagonisiert dadurch die GRIP1-GR Interaktion und verhindert die GR-induzierte Transaktivierung (Kino and Chrousos, 2003).

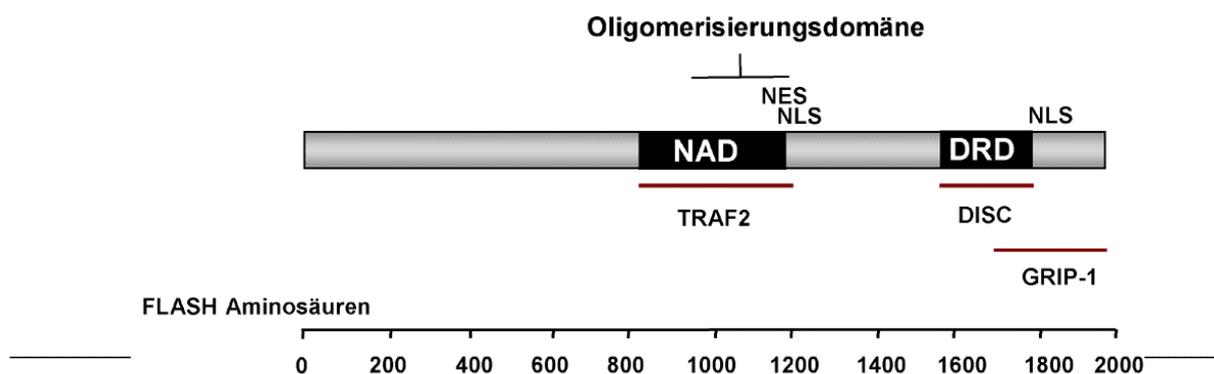


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung von FLASH. NAD (*NF- κ B activating domain*) dient der Interaktion mit TRAF2. Mittels DRD (*DED recruiting domain*) interagiert FLASH mit DISC. GRIP-1 bindet an das C-terminale Ende der FLASH-Sequenz. NLS: Nukleäres Lokalisierungssignal, NES: Nukleäres Exportsignal. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

2.3 Die Todeseffektor-Filamente

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen mit der Todeseffektordomäne (DED), wie FADD, mittels transienter Expression ergab eine zytoplasmatische, filamentöse Verteilung dieser Proteine (Siegel et al., 1998). Die Filamente zeigten einen schwer löslichen Charakter und keine Assoziation mit dem zytoskeletalen Protein Tubulin sowie intermediären Filamenten. Die morphologische Untersuchung der überexprimierten Zellen ergab typische Merkmale des apoptotischen Zelltodes, wie Chromatinkondensation oder Zell-Schrumpfung. Die Tatsache, dass diese Filamente mittels DED-Domänen geformt werden und den Zelltod auslösen, führte dazu, dass die Todeseffektor-Filamente (*death effector filaments*, DEFs) genannt wurden (Siegel et al., 1998). Weiterhin wurde herausgefunden, dass der pro-apoptotische Mechanismus der zytoplasmatischen DEFs, ähnlich der Rezeptor-vermittelten Apoptose, über die Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-8 verläuft (Siegel et al., 1998).

DEFs vermitteln eine zytoplasmatische, Rezeptor-unabhängige Apoptose, welche durch einige anti-apoptotische Mitglieder inhibiert werden kann. Obwohl etliche virale Proteine wie das *molluscum contagiosum virus* MC159-Protein oder Herpesvirus Typ 2 E8-Protein eine Todeseffektordomäne enthalten, wirken sie bei Überexpression eher anti-apoptotisch (Stegh et al., 2002). Detaillierte Untersuchungen ergaben, dass diese sogenannten v-FLIPs (*viral FLICE inhibitory proteins*) anti-apoptotisch wirken, weil sie nicht in der Lage sind, DEFs auszubilden und somit die endogenen Caspasen zu aktivieren (Siegel et al., 1998). Weiterhin führt die transiente Expression von v-FLIPs zur Auflösung von FADD DEFs (Siegel et al., 1998).

Auch das adenovirale, anti-apoptotisch wirkende Protein E1B 19K kann die FADD-DEFs auflösen (Perez and White, 1998). E1B 19K assoziiert mit der Kernlamina und mit zytoplasmatischen Membranen und ist darüber hinaus in der Lage, FADD und Caspase-8 in diese zellulären Bereiche zu rekrutieren. Die Veränderung der FADD- und Caspase-8-

Lokalisation in der Zelle suggeriert einen Mechanismus, bei welchem E1B 19K die Zelle vor der Apoptose schützt (Perez and White, 1998).

3. Regulation der Apoptose durch PML-Kerndomänen

Untersuchungen an Zellen von PML defizienten Mäusen (PML^{-/-}) zeigten außer Defekten in der Ceramid- und durch Gamma-Strahlung-induzierten Apoptose auch eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose nach Stimulation mit CD95L oder TNF- α (Wang et al., 1998). Diese Befunde reflektieren die besondere Bedeutung der PML-Kerndomänen in verschiedenen apoptotischen Signalwegen.

Obwohl mehrere Hinweise darauf hindeuten, dass PML in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose eine Rolle spielt, existieren bisher keine konkreten Daten über eine direkte Funktion in der Todesrezeptor-Signalkaskade. Eine denkbare Rolle wäre die Kontrolle der biologischen Verfügbarkeit der in der Todesrezeptor-Signaltransduktion involvierten Komponenten durch PML-Kerndomänen über die Regulation der subzellulären Distribution. So werden wahrscheinlich die Komponententen Daxx und TRADD reguliert, welche in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose involviert sind (Kischkel et al., 2000; Yang et al., 1997). Es wurde herausgefunden, dass Daxx und TRADD in PML-Kerndomänen lokalisieren (Morgan et al., 2002; Torii et al., 1999) Das TRADD-Protein (*TNFR-1 associated DD protein*) transloziert zwischen Kern und Zytoplasma (Morgan et al., 2002). Im Zytoplasma ist TRADD an der Rekrutierung von FADD und Caspase-8 an den TNF-R1 Rezeptor beteiligt (Kischkel et al., 2000). Im Kernkompartiment assoziiert TRADD mit PML-Kerndomänen (Morgan et al., 2002). Die Todesdomäne (DD) von TRADD, welche die Interaktion mit TNF-R1 vermittelt, ist ebenso für die Lokalisation in PML-Kerndomänen und für die Induktion des Caspasen-unabhängigen Zelltods verantwortlich (Morgan et al., 2002). Die mittels Überexpression von TRADD-DD induzierte Apoptose kann durch die anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-Familie oder durch PML-Expression inhibiert werden (Morgan et al., 2002). Das Daxx-Protein, assoziiert ebenfalls mit PML-Kerndomänen (Torii et al., 1999). Daxx agiert als pro-apoptotisches Molekül, das zum einen CD95-vermittelte Apoptose und zum anderen die CD95-vermittelte Aktivierung des JNK-Signalwegs verstärkt (Chang et al., 1998). Es

wurde postuliert, dass Daxx über die Assoziation mit PML-Kerndomänen die lymphozytäre Apoptose reguliert (Torii et al., 1999).

Zusätzlich zur regulatorischen Funktion in der Rezeptor-vermittelten Apoptose sind PML-Kerndomänen auch an der Regulation eines zentralen apoptotischen Moleküls, dem Tumorsuppressor p53, beteiligt (Ferbeyre et al., 2000; Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000). Das p53-Protein ist an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. an der Regulation der Apoptose, der Seneszenz, der DNA-Reparatur, der Zelldifferenzierung sowie der Angiogenese. Eine signifikante Anzahl an Proteinen, welche wichtige Funktionen in der Regulation der p53-Aktivität ausüben, wie z.B. CBP (Pearson et al., 2000), PML (Ferbeyre et al., 2000; Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000), HIPK2 (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002), HAUSP (Everett et al., 1997; Li et al., 2002), hSir2 (Langley et al., 2002), Chk2 (Louria-Hayon et al., 2003; Yang et al., 2002) (für nähere Erläuterung siehe Tabelle 1.1) sind entweder konstitutiv teilweise mit PML-Kerndomänen assoziiert oder können nach Bedarf und entsprechendem Stimulus dorthin vermehrt rekrutiert werden. So kann z.B. das p53-Protein durch eine spezifisch PML-Isoform, das sogenannte PML IV, fast vollständig in PML-Kerndomänen rekrutiert werden (Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000). In PML-Kerndomänen oder auf dem Weg dorthin ist die p53-Aktivierung anscheinend durch verschiedene Stimuli regulierbar. So kolokalisiert z.B. HIPK2 nach UV-Strahlung mit CBP und p53 in PML-Kerndomänen und es kommt zur Phosphorylierung von p53 am Serinrest 46 (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002). Wie Experimente mit PML^{-/-}-Zellen verdeutlichten, ist dabei die Anwesenheit von PML für die HIPK2-vermittelte p53-Phosphorylierung und folgende Apoptose essentiell (Moller et al., 2003a).

Außer den unterschiedlichen p53-aktivierenden Enzymen, wurden in PML-Kerndomänen auch p53-negative Regulatoren, wie hSir2, identifiziert (Langley et al., 2002). hSIR2 inhibiert p53-Aktivität durch Deazetylierung von Lys382 und antagonisiert durch genotoxischen Stress induzierte Apoptose (Vaziri et al., 2001). Zusammengenommen zeigten die bisherigen Studien, dass PML-Kerndomänen unter verschiedenen zellulären Bedingungen wichtige Orte der post-translationalen p53-Modifikation darstellen.

Interessanterweise reguliert PML auch die Caspase-unabhängige Apoptose (Quignon et al., 1998), denn es wurde gezeigt, dass die Überexpression von PML ein Todessignal induziert, welches unabhängig von der *de-novo*-Proteinsynthese und selbst unter

Behandlung mit synthetischen Caspase-Inhibitoren stattfindet. Allerdings sollte dieser Befund in der Zukunft anders als bisher unter physiologischen Bedingungen untersucht werden.

	apoptotischer Signalweg
PML	CD95, TNF-R1, Ceramid, p53
Daxx	CD95, TGF- β -R1, nukleär, p53
TRADD	TNF-R1, nukleär
HIPK2	p53, TGF- β -R1
P53	p53
CBP	p53
hSir2	p53
Hdm2	p53
HIPK3	unbekannt

Tabelle 1.1. PML-Kerndomänen-assoziierte Proteine und deren Beteiligung an apoptotische Signalwege. PML (*promyelocytic leukaemia protein*), TRADD (*TNF-R1-associated death domain protein*), HIPK2, HIPK3 (*homeodomain-interacting protein kinase 2,3*). CBP (*CREB-binding protein*), hSIR2 (*human NAD-dependent histone deacetylase*), Hdm2 (*human Mdm2*), TNF-R1 (*tumour necrosis factor receptor 1*), TGF- β -R1 (*transforming growth factor β receptor 1*).

4. Ziel der Dissertation

Zu Beginn meiner Dissertation mehrten sich die Hinweise, dass Komponenten von PML-Kerndomänen oder diese selbst wichtige Funktionen bei vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen, einschließlich der Kontrolle der Transkription, der Tumorsuppression und der Apoptose haben. Die Tatsache, dass mehrere apoptotische Regulatoren in den PML-Kerndomänen lokalisieren, ließ insbesondere vermuten, dass diese Kerndomänen an unterschiedlichen apoptotischen Signalkaskaden beteiligt sind. Mehrere Hinweise, die zum Teil erst während meiner Dissertation publik wurden, deuteten auf eine Funktion von PML-Kerndomänen insbesondere auch bei der CD95-vermittelten Apoptose hin. Im Rahmen dieser Dissertation sollte versucht werden, einen molekularen Mechanismus aufzudecken, wie dies von PML-Kerndomänen und durch welche PML-Kerndomänen-assoziierte Moleküle gesteuert werden könnte. Die im Rahmen meiner Diplomarbeit erhaltene, jedoch lediglich auf einem Hefe 2-Hybrid System beruhende Evidenz für die Wechselwirkung von Sp100 mit dem FLASH-Protein, für das laut einer Publikation zu Beginn meiner Dissertation eine wichtige Rolle bei der Apoptose postuliert wurde, bot einen möglichen Ansatzpunkt für diese Fragestellung.

Deshalb sollte zunächst die nur auf Hefe 2-Hybrid Assays beruhende Evidenz für eine Interaktion zwischen dem PML-Kerndomänen Protein Sp100 und dem FLASH (*FLICE associated huge protein*), im Rahmen dieser Dissertation durch unabhängige weitere experimentelle Evidenzen bestätigt oder widerlegt werden.

Hierzu gehörte neben zellbiologischen, biochemischen und immunologischen Versuchsansätzen auch die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von FLASH mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz analysiert werden.

Da berichtet worden war, dass FLASH eine wichtige Rolle bei der CD95-vermittelten Aktivierung der Pro-Caspase-8 spielt, stellte sich bei Bestätigung der Sp100-FLASH Interaktion die Frage, ob dies für die CD95-vermittelte Apoptose von Bedeutung ist. Konkret sollten hierzu in Zellen, welche sensitiv gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose sind unter anderem durch siRNA Experimente und subzelluläre Proteinlokalisationsstudien, untersucht werden, ob die Expression und intrazelluläre Lokalisation von Sp100 und FLASH für die CD95-Rezeptor vermittelte Apoptose von Bedeutung ist.

Insgesamt sollte diese Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Klärung der zu Beginn meiner Arbeit und bis zum heutigen Tage nicht ausreichend verstandenen Funktionen der PML-Kerndomänen liefern. Mit dieser Arbeit war auch die Hoffnung an erste Einblicke in einen molekularen Mechanismus für PML-Kerndomänen-vermittelte Steuerung von CD95-Rezeptor abhängige apoptotische Vorgängen verknüpft.

II Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (München), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Life Technologies (Eggenstein) und Biozym (Oldendorf) bezogen.

1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

PBS	137 mM	NaCl	pH = 7,4
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄	
TBS	10 mM	Tris/HCl	pH = 7.6
	150 mM	NaCl	
TAE (50x)	2 M	Tris-Acetat	
	50 mM	EDTA	
SDS-Probenpuffer (5 x)	312,5 mM	Tris-HCL,	pH = 6,8

	25% (v/v)	β -Mercaptoethanol	
	50% (v/v)	Glycerol	
	10% (w/v)	SDS	
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau	
SDS-Sammelgel (5%)	125 mM	Tris-HCl,	pH = 6,8
	5% (v/v)	Acrylamid	
	0,1%(w/v)	SDS	
	0,04%(v/v)	APS	
	0,3%(v/v)	TEMED	
SDS-Trenngel	350 mM	Tris-HCl	pH = 8,8
	7,5-15%	Acrylamid	
	0,1%(w/v)	SDS	
	0,04%(v/v)	APS	
	0,075%(v/v)	TEMED	
SDS-Laufpuffer (5x)	125 mM	Tris-Base	
	960 mM	Glycin	
	0,5%(w/v)	SDS	
Transferpuffer Westernblot	25 mM	Tris	
	190 mM	Glycin	
	20%(v/v)	Methanol	
	0,038%(w/v)	SDS	
NP-40 Lysepuffer	150/300 mM	NaCl	
	50 mM	HEPES	pH = 7,5
	5 mM	EDTA	

	0,5 %	NP-40	
	1X	Proteasen Inhibitor Mix	
APO-1 Lysepuffer	30 mM	Tris/HCl	pH 7,5
	150 mM	NaCl	
	1 %	Triton X-100	
	10 %	Glycerol	
	1 X	Proteasen Inhibitor Mix	
DNA-Probenpuffer	30 % (v/v)	Glycerol	
	60 mM	EDTA	
	6mM	Tris	pH = 7
Fixierlösung	50% (v/v)	Methanol	
	50% (v/v)	Essigsäure	
Mowiol	6g	Glycerol (anal. Grade)	
	2.4g	Mowiol,	
	6ml	H ₂ O, rühren 2 Stunden, RT	
	12ml	0.2M Tris-Puffer	pH=8.5
		inkubieren 10 min. 50°C, zentrifugieren 15 Min.	
		lagern bei -20°C	

Weitere Lösungen und Puffer sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Verwendung	Referenz/Bezugsquelle
BL21	Herstellung von rekombinanten Proteinen	Novagen
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen
DH5 α	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen

1.3.2 Eukaryontische Zellen

Zelllinien	Herkunft
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit dem langen Arm des SV-40 Virus
HeLa	Humane Cervixcarzinomzelllinie
HeLa ^{CD95}	Humane Carvixcarzinomzelllinie, stabil transfiziert mit dem CD95-Rezeptor
U2OS	Humane Osteosarkomazelllinie
HT1080	Humane Fibrosarkomazelllinie
HT1080 ^{pCDNA3} , HT1080 ^{FADD-DN} , HT1080 ^{E1B19K}	Humane Fibrosarkomazelllinie, stabil transfiziert mit dem pCDNA3-Vektor, FADD-DN oder E1B19K
CV1	Afrikanische Grüneaffenzelllinie

1.4 Nährmedien

1.4.1 Bakterielle Nährmedien

LB-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefe-Extrakt
	5 g/l	NaCl

Zur Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Zur Selektion resistenter Bakterienkolonien wurden folgende Antibiotika in den unten angegebenen Konzentrationen zugesetzt.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

1.4.2 Medien für die eukaryontische Zellkultur

Medium für U2OS, HeLa- und 293T-Zellen

U2OS-, HeLa- und 293T-Zellen wurden in DMEM (Life Technologies) kultiviert.

DMEM	10% (v/v)	Hitzeinaktiviertes Fötale Rinderserum
	(FBS)	
	0,01 mg/ml	Penicillin / Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin

Medium für CV1-Zellen

CV-1-Zellen wurden im DMEM (Life Technologies) kultiviert.

DMEM	3% (v/v) Hitzeinaktiviertes FBS
	3%(v/v) Hitzeinaktiviertes Pferdeserum
	0,01 mg/ml Penicillin / Streptomycin
	2mM L-Glutamin

Medium für HT1080-Zellen

HT1080 Zellen wurden in MEME (ATCC) kultiviert.

MEME	10% (v/v)	Hitzeinaktiviertes FBS
------	-----------	------------------------

Medium für stabil exprimierende HT1080-Zellen

Das Medium für stabil exprimierende HT1080-Zellen enthält zusätzlich jeweils 850 µg/ml G418 (Sigma).

1.5 Antikörper

1.5.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Herkunft/Referenz
Anti-Actin	Maus	C-Terminus	Sigma
Anti-APO-1	Maus	CD95	Trauth et al. 1989
Anti-Caspase-8 (C1)	Maus	C-Terminus	P.Krammer, Heidelberg

Anti-Caspase-8 (C15)	Maus	p18-Untereinheit	Scaffidi et al, 1997
Anti-Caspase-8 (C-20)	Ziege	C-Terminus	S.Cruz
Anti-Coilin	Maus	C-Terminus	Hemmerich, P., Jena
Anti-FLAG M2	Maus	DYKDDDDK	Sigma
Anti-FLAG	Kaninchen	DYKDDDDK	Sigma
Anti-GAPDH (V-18)	Ziege	GAPDH	S. Cruz
Anti-HA	Ratte	YPYDVPDYA	Roche Diagnostics
Anti-Smac/DIABLO	Maus	C-Terminus	BD Transduction Laboratories
Anti-SUMO-1	Maus	SUMO-1	Zymed Laboratories
Anti-FADD	Maus	C-Terminus	BD Transduction Laboratories
Anti-E1B19K	Maus	C-Terminus	Oncogene
Anti-FLASH	Kaninchen	C-Terminus	Santa Cruz
Anti-FLASH-522	Kaninchen	CLEKEGKPHSI KRSTS	Eurogentec
Anti-PARP	Maus	PARP	BD Biosciences
Anti-PML	Maus	N-Terminus	Santa Cruz
Anti-PML	Kaninchen	N-Terminus	Santa Cruz
Anti-Sp100 (GH)	Kaninchen	C-Terminus	Szostecki, C. Hamburg
Anti-Sp100 (DF)	Kaninchen	C-Terminus	Szosceki, C. Hamburg
Anti-Sp100 (SP26)	Ratte	C-Terminus	Sternsdorf, T Hamburg
Anti-Tim23	Maus	N-Terminus	BD Transduction Laboratories
Anti-Tubulin	Maus	C-Terminus	Sigma
Anti-Vimentin	Maus	C-Terminus	Sirma, H. Hamburg

Zur Immunpräzipitation wurden 1-5 µg der Antikörper je Probe eingesetzt. Zum Western Blot wurden Lösungen der Antikörper im Konzentrationsbereich 0,1-1 µg/ml in TBST-1,5% Magermilch verwendet.

1.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Herkunft/Referenz
Anti-Maus	Ziege	Peroxidase	Dianova
Anti-Hase	Ziege	Peroxidase	Dianova
Anti-Ratte	Ziege	Peroxidase	Dianova
Anti-Maus	Ziege	Alexa-Fluor 488	Molecular Probes
Anti-Maus	Ziege	Alexa-Fluor 594	Molecular Probes
Anti-Hase	Ziege	Alexa-Fluor 488	Molecular Probes
Anti-Hase	Ziege	Alexa-Fluor 594	Molecular Probes
Anti-Ratte	Ziege	Alexa-Fluor 488	Molecular Probes
Anti-Ratte	Ziege	Alexa-Fluor 594	Molecular Probes

Die Peroxidase gekoppelten Antikörper wurden mit 50% Glycerol verdünnt bei -20°C gelagert, und in Western Blot in einer Verdünnung von 1:20 000 verwendet. Die Alexa-Fluor gekoppelten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:450 für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet.

1.6 Molekulargewichtsmarker

1.6.1 DNA-Marker

Smart Ladder (200-10.000 bp) Eurogentec

1.6.2 Proteinmarker

Vorgefärbter Proteinmarker (10-250 kDa) Amersham

Precision Plus Proteinmarker (10-250 kDa) BIO-RAD

1.7 Synthetische Oligonukleotide

1.7.1 Synthetische Oligonukleotide zur Klonierung

Sämtliche aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
BC012574 sense (BamH1)	GGA TTC ATG GCA GCA GAT GAT GAC
BC012574 antisense	CAG GAT GTC CTT GTA GCC
AW612479 sense	AGA AAT ATG GTA AAG GTG AAC C
AW612479 antisense	GTC TTG TGA TTT AAC TTC TTT CC
AW502509 sense	AAA GAA GAA AGA AAA GTT GAT CAA AAA C
AW502509 antisense	ATC AGT AGT GGT TTT CTT AG
RT-PCR sense	TTA AAG AAA CAG AAT GGA CCA AAG ACT
RT-PCR antisense	CCA CAA TAA TCT GAA TTA TCA TTT C

1.7.2 Synthetische Oligonukleotide für die RNAi

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma Oligoengine (Seattle) bezogen.

Die Oligonukleotidsequenzen wurden, nach der Annealing-Reaktion, in den pSUPER Vektor, über die BglIII und HindIII Restriktionsstellen inkloniert (Brummelkamp, Bernards et al. 2002).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Sp100 sense	CAT GCA GGA ATA CCC CGA T
Sp100 antisense	ATC GGG GTA TTC CTG CAT G
FLASH sense	GAT TGT CTG AGT TTC CAC A
FLASH antisense	TGT GGA AAC TCA GAC AAT C

1.8 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Herkunft/ Referenz
pcDNA3	Eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
pCMV	Eukaryontischer Expressionsvektor	Dr. White, New Jersey
pSG5	Eukaryontischer Expressionsvektor	Stratagene
pME18S	Eukaryontischer Expressionsvektor	Imai et. al. 1999.
pSUPER	siRNA Expressionsvektor	Brumellkamp et. al. 2002
pEGFP-C2	Eukaryontischer Expressionsvektor	Clontech

1.9 Expressionsplasmide

cDNA	Vektor	Epitop-Tag	Herkunft
CrmA	pCDNA3	Ohne	Dr. Hofmann, Hamburg
FLASH	pME18S	FLAG	Dr. Imai, Tokio
FLASH	pCDNA3	HA	Dr. Kino, Seoul
FLASH Δ A, Δ C, Δ D	pCDNA3	FLAG	Dr. Kino, Seoul
FLASH Δ B	pCDNA3	HA	Dr. Kino, Seoul
hFLASH (714-Ende)	pCDNA3	V5/HIS	Dr. Tschopp, Geneva
FADD	pCDNA3	AU1	Dr. Dixit, SanFrancisco
SUMO-1	pCDNA3	GFP/HA	Dr. Hofmann, Hamburg
Ubc9	pCDNA3	HA	Dr. Hofmann, Hamburg
Sp100	pSG5	Ohne/FLAG	Prof. Will, Hamburg
Caspase-8	pCDNA3	HA	Dr. Hofmann, Hamburg
Caspase-8 C360S	pCDNA3	GFP	Dr. Lenardo, Bethesda,
HIPK2	pEGFP-C2	GFP	Dr. Hofmann, Hamburg

E1B 19K	pCMV	Ohne	Dr. White, New Jersey
Bcl-10-CARD	pCMV	FLAG	Dr. Schmitz, Bern

1.10 Enzyme und Kits

Enzym /Kit	Herkunft
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
Pfu DNA Polymerase	Boehringer Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Trypsin-EDTA Lösung	Life Technologies
Protein A/G Sepharose	Santa Cruz
Geneticin Sulfat (G418)	Life Technologies

Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden von MBI Fermentas, Pharmacia und New England Biolabs bezogen.

1.11 Synthetische Inhibitoren

Name	Funktion	Herkunft
Leptomycin B	Kernexport Inhibitor	Prof. Hauber, Hamburg
zVAD-fmk	Allgemeiner Caspasen Inhibitor	Enzyme System Products
zIETD-fmk	Caspase-8 Inhibitor	Calbiochem
SB202190	P38+ JNK Inhibitor	Calbiochem
SB203580	P38 Inhibitor	Calbiochem
PD98059	Erk Inhibitor	Calbiochem

Das Leptomycin B wurde in DMEM und die restlichen Inhibitoren in DMSO gelöst und bei -80°C gelagert.

1.12 Fluoreszenz-gekoppelte Marker für die Zellorganellen

Name	Funktion	Herkunft
DAPI	Zellkern-Detektion	Sigma
DRAQ5	Zellkern-Detektion	Apotech
Mitotracker Red	Mitochondrien-Detektion	Molecular Probes

2. Methoden

2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

2.1.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Alle Tätigkeiten im Zusammenhang mit der Kultivierung von Säugerzellen erfordern sterile Arbeitstechniken zur Vermeidung bakterieller oder sonstiger Kontaminationen. Aus diesem Grunde wurden alle diesbezüglichen Arbeiten in eigens dafür vorgesehenen Sterilwerkbänken durchgeführt. Darüber hinaus wurden ausschließlich sterile Zellkulturmaterialien wie Kulturflaschen, Kulturschalen oder Zentrifugalröhrchen der Firma Greiner (Frickenhäusen), Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) verwendet.

2.1.2 Kultur von adhärent wachsenden Zellen

Adhärenz Zelllinien wurden in einer Dichte von maximal 8×10^5 /ml in DMEM- oder MEME-Medium in einer humiden Atmosphäre (95% relative Luftfeuchtigkeit) bei 37°C

und der CO₂ Konzentration von 5% kultiviert. Zum Teilen bzw. aussähen wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung von den Zellkulturflaschen abgelöst. Überschüssiges Trypsin wurde im Anschluss daran durch Zugabe von frischem vorgewärmtem Vollmedium inaktiviert und die resuspendierten Zellen dann in einer Dichte von 10-20% ausgesät.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Als Einfriermedium wurde eine Mischung aus 90% hitzeinaktiviertem FCS und 10% DMSO verwendet. Jeweils etwa 10⁷ Zellen wurden in 1 ml des vorgekühlten Einfriermediums aufgenommen und nach einer maximal einwöchigen Zwischenlagerung bei -80°C dauerhaft in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch, durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C und Überführen der Zellsuspension in ein vorgewärmtes Medium.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab

Zur Präparation von DNA aus exponentiell wachsenden 2 ml Übernacht-Bakterienkulturen wurde das Qiaquick Miniprep-Kit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Ausbeuten lagen bei Verwendung der *E.coli* Stämme DH5α oder TOP10 routinemäßig bei etwa 30 µg.

Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid Kit durchgeführt. Dazu werden zunächst 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Die Bakterienzellen wurden nach Zentrifugation unter alkalischen Bedingungen lysiert, und die freigesetzte Plasmid-DNA mit verschiedenen Salzkonzentrationen über eine Anionenaustauschsäule von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Es erfolgt eine Elution und eine Fällung mit Isopropanol. Das DNA-Pellet wird in 200 µl destilliertem Wasser aufgenommen und kann bei -20°C gelagert werden. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgt im Spektralphotometer.

2.2.2 Isolierung von gesamt-RNA

Isolierung der unbeschädigten RNA ist erforderlich für die Analyse der Genexpression. Diese Methode wurde mit dem „*High pure RNA isolation kit*“ der Firma Roche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in der Anwesenheit von Lyse-Puffer und DNase I lysiert. An eine Säule gebundene RNA wird anschließend durch eine Serie von Waschschritten von restlichen zellulären Verunreinigungen wie Salze und Proteine entfernt. Schließlich erfolgte die Elution der RNA durch einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration. Auf diesen Weg wurde die gesamt-RNA aus 293T-Zellen isoliert.

2.2.3 DNA Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion läßt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Diese Technik wurde in erster Linie zur Klonierung der humanen FLASH Sequenz genutzt. Typischerweise wurde folgender Reaktionsansatz benutzt:

300 ng	Matritze
5 µl	10 X PCR-Puffer
3 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
3 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
5 µl	Desoxynukleotide (je 10 mM)

1 μ l	PFU-Polymerase
ad 50 μ l	H ₂ O

Zur Verminderung von Änderungen der Salzkonzentration während der PCR infolge von Verdunstung flüssiger Bestandteile wurde der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Das Temperaturprogramm für die Durchführung der PCR gestaltete sich typischerweise wie folgt:

Start		2 min bei 95°C
27 Zyklen	Denaturierung	30 s bei 95°C
	Annealing	1 min 52-58°C
	Elongation	2-4 min 72°C
Termination		5 min 72°C

2.2.4 cDNA Synthese und Amplifikation durch Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

RT-PCR ist die empfindlichste Technik um die Gegenwart von RNA-Molekülen zu bestimmen oder um die Stärke der Genexpression zu quantifizieren. Zwei verschiedene Schritte werden für die RT-PCR eingesetzt: Im ersten Schritt wird die cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase durchgeführt. Anschließend wird mit einer entsprechenden DNA-Polymerase die entstehende cDNA amplifiziert. In dem von mir verwendeten Titan One-Tube-RT-PCR System von der Firma Roche wurden cDNA-Synthese und PCR nacheinander aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien durchgeführt. Dafür wurden zwei Mastermixe hergestellt:

Mastermix 1:

RNA Matritze	1 μ g
DTT-Lösung (100 mM)	2,5 μ l
Desoxynukleotide (je 10 mM)	4 μ l
Primer 1 (20 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 2 (10 pmol/ μ l)	1 μ l

RNase Inhibitor (10 U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	ad 25 μ l

Mastermix 2:

5 X RT-PCR Puffer	10 μ l
Enzym-Mix	1 μ l
H ₂ O	ad 25 μ l

Mastermixe wurden in ein Reaktionsgefäß zusammengegeben und mit 30 μ l Mineralöl überschichtet. Das Temperaturprogramm für die Durchführung der RT-PCR gestaltete sich wie folgt:

DNA Synthese		50 min bei 30°C
PCR-Start		2 min 94°C
35 Zyklen	Denaturierung	10 s 94°C
	Annealing	30 s 61°C
	Elongation	2 min 68°C
Termination		5 min 68°C

2.2.5 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsspaltung von DNA diente entweder der Analyse der aufgereinigten DNA oder der Isolation spezifischer DNA-Fragmente zum Zwecke der Klonierung. Typischerweise wurden Restriktionsverdau von Plasmid-DNA oder auch von PCR-Produkten in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l durchgeführt. Dabei wurden je Mikrogramm DNA mindestens 2U des (der) jeweiligen Restriktionsendonuklease(n) eingesetzt. Nach einer Mindestinkubationszeit von einer Stunde bei einer für die Aktivität des (der) Enzyme(s) optimalen Temperatur (im Regelfall 37°C) wurden die erhaltenen Fragmente schließlich in einem Agarosegel aufgetrennt und weiterverarbeitet.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstandene DNA-Fragmente sowie PCR-Produkte können im analytischen TAE-Agarosegel (0,8-2% (w/v) Agarose / 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) mittels Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurden sie mit DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung zwischen 80 und 130 V aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurde neben den Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit einem definierten Fragmentgemisch aufgetragen. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die DNA-Banden durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA und führt nach Anregung mit UV-Licht zu einer orangefarbenen Fluoreszenz.

2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Gel zum Zwecke der weiteren Klonierung wurde das Gel-Extraktion-Kit der Firma Qiagen nach den Herstellerangaben verwendet. Zur Überprüfung von Reinheit und Menge der isolierten DNA wurde ein Aliquot auf einem 1%igen Agarosegel analysiert.

2.2.8 Dephosphorylierung von DNA

Nach dem Verdau von Plasmid-DNA durch Restriktionsenzyme ist es vorteilhaft, die Vektor-DNA am 5'-Terminus mit alkalischer Phosphatase zu dephosphorylieren, um die Religation der Vektor-DNA mit sich selbst zu verhindern. Die Klonierungseffizienz von neukombiniertem Vektor erhöht sich dadurch. Zum gesamten Restriktionsansatz wird 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase pipettiert und 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 15 min.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Die Ligation von hydrolysierten und dephosphorylierten Plasmiden erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, die die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA katalysiert. Die, mittels eines präparativen Agarosegels aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit der Vektor-DNA nach einem Protokoll der Firma Roche ligiert. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

2.2.10 Klonierung der humanen FLASH DNA-Sequenz

Um die humane FLASH Sequenz in der vollen Länge herzustellen wurden EST-Klone vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin), die Teilsequenzen von FLASH beinhalten, gekauft. Die Teilsequenz zwischen Basenpaaren 1381 und 2180 wurde mittels RT-PCR aus 293T-Zellen gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.4) Die restliche FLASH Sequenz (2160-5946 bp) wurde freundlicherweise von Dr. Tschopp (Schweiz) zu Verfügung gestellt.

Folgenden RZPD Klone mit FLASH-identischen Teilsequenzen wurden verwendet:

RZPD Klon	cDNA-Bereich in der FLASH-Sequenz
BC 012574	1-886 bp
AW 612479	886-1085 bp
AW 502509	1085-1381 bp

Die DNA von RZPD Klonen wurde mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 2.2.3) und mit dem Gel-Extraktion-Kit isoliert (Abschnitt 2.2.7). Es folgte die Ligation von den Klonen AW612479 und AW502509 und anschließend eine PCR-Reaktion mit entsprechenden Primern. Ein so gewonnenes Fusionsprodukt wurde dann mit dem nächststehenden RZPD-Klon bzw. RT-PCR Produkt fusioniert (Abbildung 2.1B). Das dritte Fusionsprodukt wurde mit der Restsequenz (2160-5946 bp) über die Schnittstelle des BfuI-Enzymes ligiert. Jedes Fusionsprodukt wurde in den TOPO-Vektor (Invitrogen), welches sich für die Klonierung des *blunt-end* PCR Produkten eignet, kloniert und die DNA wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Anschließend wurde die FLASH-Sequenz in der vollen Länge in den pSG5-Vektor einkloniert.

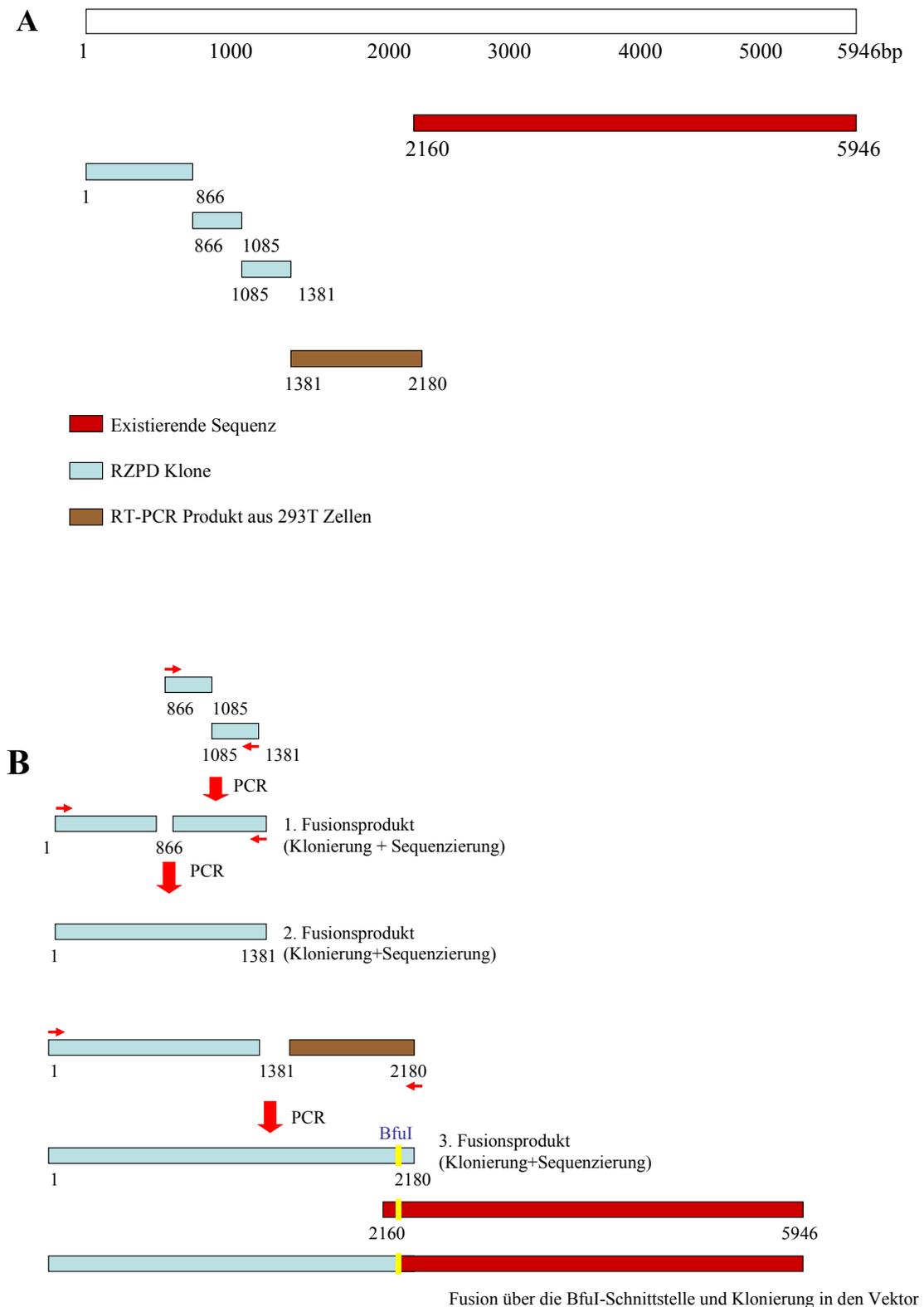


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung von Klonierung der humanen FLASH-Sequenz. (A) Darstellung der Sequenzabschnitte, die als RZPD Klone, RT-PCR Produkt und C-terminale Deletionsmutante zur Verfügung standen. **(B)** Klonierungsstrategie zur Herstellung des humanen FLASH Expressionsvektors.

2.2.11 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien

Auf einer LB-Agarplatte, die kein Antibiotikum enthält, wurden TOP 10 und DH5 α kompetente Bakterien zur Verdünnung ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Einzelklone wurden verwendet für die Vorbereitung einer 20 ml Übernachtskulturen, die anschließend bis zur einer OD₆₀₀= 0,4-0,6 bei 37°C und 225 rpm inkubiert wurde. Anschließend wurden die Bakterien in eiskalte Glasröhrchen überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 5 min bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 10 ml von eiskaltem RF1 Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem wiederholten Zentrifugationsschritt wurden die Bakterienpellets in 1 ml von eiskaltem RF2 Puffer resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden anschließend aliquotiert, die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

RF1 Puffer

100 mM RbCl₂
50 mM MnCl
10 mM CaCl₂-Dihydrat
15 % Glycerin
30 mM K-Acetat
pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen)

RF2 Puffer

10 mM RbCl₂
75 mM CaCl₂-Dihydrat
15 % Glycerin
10 mM MOPS
pH 6,8 (mit NaOH einstellen)
-> sterilfiltrieren

2.2.12 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren dienten in erster Linie chemisch kompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes TOP10. Für die Transformation wurden jeweils 100 μ l der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 200-400 ng DNA wurde zugefügt. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation auf Eis wurde, durch kurzes Erhitzen auf 42°C (für 45 s) und unmittelbare zweiminütige Eiskühlung, die Bakterienzellwand für die Aufnahme der DNA permeabilisiert. Die Reaktionsansätze wurden dann mit je 900 μ l antibiotikafreiem LB-Medium versehen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Selektion

auf plasmidtragenden und somit antibiotikaresistenten Bakterien erfolgte über Nacht auf antibiotikahaltigen LB-Agerplatten.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Transfektion von Zellen

Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Kalziumphosphat-präzipitation

Die Transfektion nach Chen und Okayama ist eine Methode zur Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Die 293T-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Es wurden 10 ml DMEM-Kulturmedium pro Zellkulturschale eingesetzt. Die zur Transfektion eingesetzte DNA-Menge (5-10 μg) wurde in 220 μl dH₂O resuspendiert. Zu dem Ansatz wurden 250 μl 2x HBS-Puffer (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 12 mM Dextrose (D (+)-Glucose) und 50 mM HEPES) und tropfenweise 31 μl 2M CaCl₂ zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei der Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kalziumphosphat-Präzipitate auf die Zellen getropft. Die Präzipitate lagern sich an der Zelloberfläche an, was letztlich zur Aufnahme der DNA in die Zelle führt. Die so transfizierten Zellen wurden nach 24 bis 48 Stunden geerntet und weiterverarbeitet.

Transfektion eukaryotischer Zellen mittels FuGENE Reagenz

FuGENE 6 (Roche) gehört zur Gruppe der kationischen Liposom-Reagenzien, die im Komplex mit DNA an die negativ geladenen Oberflächenstrukturen der Zellen binden. Anschließend erfolgt die endosomale Aufnahme der DNA in die Zelle. Dieses Verfahren wurde insbesondere zur transienten Transfektion von HeLa-, U2OS- und HT1080-Zellen angewandt.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 40-50% ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurde die DNA-Lösung mit serumfreiem Medium im Verhältnis 1µg DNA: 100µl Medium gemischt. Dieser Mischung wurde dann FuGENE Reagenz in dem Verhältnis 1:1,5 (DNA: FuGENE) zugesetzt und so erhaltene Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die FuGENE-DNA Mischung wurde dann auf die Zellen aufgebracht. Nach 4 bis 5 Stunden wurde der Zellen das frische Medium zugefügt und folglich 24 bis 48 Stunden inkubiert.

2.3.2 Herstellung stabiler Zelllinien

HT1080 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Es wurden 5 µg DNA pro Zellkulturschale mittels FuGENE Reagenz (siehe Protokoll 2.3.1) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen unter Selektionsdruck mit 850µg/ml G418 gesetzt.

Für die Gewinnung der stabilen HT1080^{FADD-DN}-Zellen wurden G418 selektionierte Zellen noch einer weiteren Selektion mit 1µg/ml anti-APO-1 Antikörper für 16 Stunden ausgesetzt um die Apoptose-resistente Zellen zu gewinnen. Für die folgenden Experimente wurde so gewonnener Zellpool benutzt.

Für die Gewinnung der stabilen HT1080^{E1B19K}- und HT1080^{pCDNA3}-Zellen wurden etwa zwei Wochen nach Beginn der Selektion mit G418 die Zellklone gepickt und weiter expandiert. In stabilen Zelllinien wurde mittels Western Blot die Anwesenheit des gewünschten Proteins überprüft.

2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen auf Glasplättchen (Nunc, Wiesbaden) ausplattiert und am folgenden Tag bzw. in Fall der Transfektion 24 bis 48 Stunden danach, zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskalter Fixierlösung (siehe 1.2) eine Minute auf Eis fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte dann eine einstündige Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern die zwischen 1:50 und 1:1000 in PBS verdünnt waren. Danach wurden die Glasplättchen 3 Mal je 2-3 Minuten mit PBS

gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter gegen den ersten Antikörper gerichteter Antikörper von Firma Molecular Probes in einer 1:450 Verdünnung verwendet. Die chromosomale DNA wurde mittels DAPI (Sigma) oder DRAQ5 (Apotech) angefärbt. Nach mindestens 45 Minuten in einer feuchten und dunklen Kammer wurden die Glasplättchen mit PBS wieder drei Mal gewaschen und anschließend mit Mowiol (siehe 1.2) auf einem Objektträger befestigt. Die Analyse der Färbungen wurde mit einem Axioplan-Mikroskop oder einem konfokalen Mikroskop beide von der Firma Zeiss vorgenommen, welche zur unmittelbaren EDV-gestützten Weiterverarbeitung der aufgenommenen Bilder mit einer Digitalkamera gekoppelt waren. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop 7.0 nachbearbeitet.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Herstellung des Kaninchen anti-FLASH Peptid-Antikörpers

Zwei anti-FLASH Antikörpern wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Peptidsequenzen (siehe Tabelle) hergestellt. So gewonnene Seren wurden mittels der Affinitätschromatographie gereinigt. Diese Arbeit wurde in unserem Auftrag von der Firma Eurogentech (Seraing, Belgium) durchgeführt.

Peptidsequenzen zur Immunisierung

FLASH-522 H2N- CLE KEG KPH SDK RST S -CONH2

FLASH-523 H2N- CVK IRR ATP STS SGL K -CONH2

2.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) mit 7,5-12%ige Acrylamid-Trenngelen und einem 5%igem Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. In Abhängigkeit von der erforderlichen Trennung wurden Gele mit verschiedenen Längen des Trenngels eingesetzt:

Geltyp	System	Lauflänge des Trenngels
Minigel	BioRad	5,8 cm
Maxigel	BioRad	16 cm

Die Zusammensetzungen der Gele sowie der Laufpuffer sind im Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Giessen mit 2-Propanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde Alkohol entfernt und das Sammelgel gegossen. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 99°C erhitzt. Der Lauf der Gele erfolgte bei konstanten Spannungen zwischen 60 und 130V.

2.4.3 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen, nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine polymere Membran, mittels spezifischer Antikörper. Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden dazu mit Hilfe einer „Semidry“ Transferapparatur auf eine Polyvinylidendifluoriden (PVDF)-Membran (Immobilon P) übertragen. Dazu wurden zunächst die Platinelektroden der Blotkammer mit Transferpuffer (siehe 1.2) befeuchtet. Darauf wurde ein mit Transferpuffer durchtränktes Whatman-Papier, anschließend die zuvor mit Methanol benetzte und in Transferpuffer äquilibrierte Membran, dann das Gel und ein weiteres befeuchtetes Whatman-Papier aufgebracht. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 20V für 1,5-2 Stunden. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran dann eine Stunde lang in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T (0,1 % Tween 20 in TBS) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einer Lösung des Erstantikörpers (0,1-1 µg/ml in TBS-T/1,5% Magermilchpulver) versetzt und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Im Folgenden wurde 3 Mal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20000 in TBS-T 1,5 % Magermilchpulver) für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Danach wurde die Membran wiederum dreimal gewaschen. Die Visualisierung der antikörperbeladenen Proteine erfolgte dann durch Chemilumineszenz unter Verwendung

der ECL-Kits der Firma Amersham. Dazu wurden gleiche Teile der Reagenzien 1 und 2 gemischt, die Membran darin für eine Minute inkubiert, und auf Röntgenfilmen exponiert.

2.4.4 Immunpräzipitation

Die Technik der Immunpräzipitation wurde zur Präzipitation bestimmter zellulärer Antigene, sowie zur Identifikation von kopräzipitierten Proteinen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen nach einmaligem Waschen in PBS in 600µl NP-40-Lysepuffer (siehe 1.2) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden alle unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde zunächst mit 40 µl Protein A/G-Sepharose versetzt und eine Stunde bei 4°C inkubiert, um Sepharose-bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die Sepharose-Kügelchen wurden dann durch Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 40 µl Protein A/G-Sepharose und dem präzipitierenden Antikörper (1-5 µg) gemischt. Die eigentliche Immunpräzipitation erfolgte dann für mindestens 2,5 Stunden bei 4°C auf dem Taumelmischer. Die über die Antikörper an die Sepharose gebundenen Proteine wurden danach dreimal in 1 ml Lysepuffer gewaschen und die mit einer Hamiltonspritze trockengesaugten Sepharose-Kügelchen dann mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die gebundenen Proteine wurden durch Erhitzen eluiert und anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.4.5 Immunpräzipitation von CD95-Rezeptor und Caspase-8 nach der Induzierung des CD95-vermittelten Zelltodes

Für die Induktion der CD95-vermittelten Apoptose wurden jeweils 7×10^7 HT1080-Zellen mit agonistischem anti-APO-1 Antikörper (700 ng/ml) und 1 mg/ml von Protein A (*S. aureus*, Sigma) für unterschiedliche Zeitspannen behandelt (Trauth, Klas et al. 1989).

Die Zellpellets wurden 20 min in 1 ml APO-1 Lyse-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.2) (Kischkel, Hellbardt et al. 1995) auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellreste 30 min bei 13 rpm und 4°C abzentrifugiert. Für die Präzipitation des CD95-Rezeptors wurde der Zellüberstand mit 50 µl Protein A/G-Sepharose versetzt und 2 Stunden bei 4°C auf dem

Taumelmischer inkubiert. Die, an die Sepharose-Kügelchen gebundene Proteine wurden dann durch Zentrifugieren sedimentiert und anschließend drei Mal mit 1 ml APO-1 Lyse-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 50 µl Protein A/G-Sepharose gemischt und 1 Stunde bei 4°C inkubiert, um Sepharose-bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Nach dem entfernen von Sepharose-Kügelchen erfolgte die Immunpräzipitation mit den anti-Caspase-8 Antikörpern. Dafür wurden 50 µl von Protein A/G-Sepharose und 2 µg des anti-Caspase-8-Antikörpers zum Überstand gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen drei Mal mit 1 ml Lyse-Puffer gewaschen, trockengesaugt und die gebundenen Proteine wurden durch Erhitzen im SDS-Probenpuffer eluiert. Es folgte die SDS-PAGE und Western Blot Analyse der gebundenen Proteine.

2.2.4.6 Zelluläre Fraktionierung

Für die zelluläre Fraktionierung wurden folgende Puffer benötigt:

<u>Puffer A:</u>	<u>Kern Lysepuffer</u>
20 mM Hepes-KOH, pH 7.5	50 mM Tris-HCl, pH 8,1
10mM KCl	10 mM EDTA, pH 8,0
1,5mM MgCl ₂	1%SDS
1mM Na-EDTA	Proteasen Inhibitoren
1mM Na-EGTA	
1mM DTT	
250 mM Sucrose	
Proteasen Inhibitoren	

3×10^7 HT1080-Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden 15 min in 400µl Puffer A auf Eis lysiert. Mit Hilfe eines Homogenisierers von der Firma Glas Col wurden die Zellen durch 30 Stöße aufgeschlossen. Um die Anzahl der aufgeschlossenen Zellen zu bestimmen, wurden 10 µl von homogenisierten Zellen mit 10 µl Trypanblau vermischt und mit dem Lichtmikroskop untersucht. Die Zellpellets wurden anschließend 10 min bei 700 g abzentrifugiert. Weiterhin wurden Pellet und Überstand getrennt behandelt.

1) In dem Pellet befand sich die Kern-Fraktion, die mit 200 μ l Puffer A gewaschen wurde (3 min zentrifugieren bei 1000g und 4°C). Kerne wurden anschließend in 320 μ l Kern Lysepuffer aufgenommen. Nach kurzer Beschallung, um die freigesetzte DNA zu zerkleinern, wurden die Proben im SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 99°C aufgeköcht.

2) Der Überstand wurde 15 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Die Mitochondrien-Fraktion in dem Pellet wurde mit 150 μ l Puffer A gewaschen (2 min bei 1000 g und 4°C zentrifugieren). Anschließend wurde die Fraktion in 320 μ l Puffer A aufgenommen und mit SDS-Proben Puffer 5 min bei 99°C aufgeköcht.

Nach der Abnahme der Mitochondrien-Fraktion wurde der Überstand 1 h bei 100 000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, die Zytosol-Fraktion, wurde in SDS-Probenpuffer 5 Min. bei 99°C aufgeköcht. Die Proben wurden bei 80°C gelagert.

III Ergebnisse

IDENTIFIZIERUNG VON FLASH ALS SP100 INTERAKTIONSPARTNER

Evidenz durch Analyse mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid-Systems

Im Rahmen meiner Diplomarbeit von Juni bis November 2000 wurde das Hefe 2-Hybrid System verwendet, um neue Interaktionspartner des Sp100-Proteins zu identifizieren. Mittels eines aminoterminalen Sp100-Fragmentes (Sp886) als Lockvogel („bait“) wurde damals mithilfe einer humanen Knochenmark cDNA-Bibliothek und dem Hefe 2-Hybrid (Y2H)-Assay nach zellulären Proteinen gesucht, die mit Sp100 wechselwirken. Dadurch sollten neue Erkenntnisse zur zellulären Funktion des Sp100-Proteins und von PML-Kerndomänen, wo dieses Protein in der Regel lokalisiert ist, gewonnen werden. Als potentieller Interaktionspartner von Sp100 wurde bei diesen Studien unter anderen auch ein Fragment des FLASH-Proteins (Aminosäurenbereich 1705 bis 1982) identifiziert (Milovic, Diplomarbeit 2000), von dem kurz zuvor berichtet wurde, dass es bei der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose eine Rolle spielt (Imai et al., 1999).

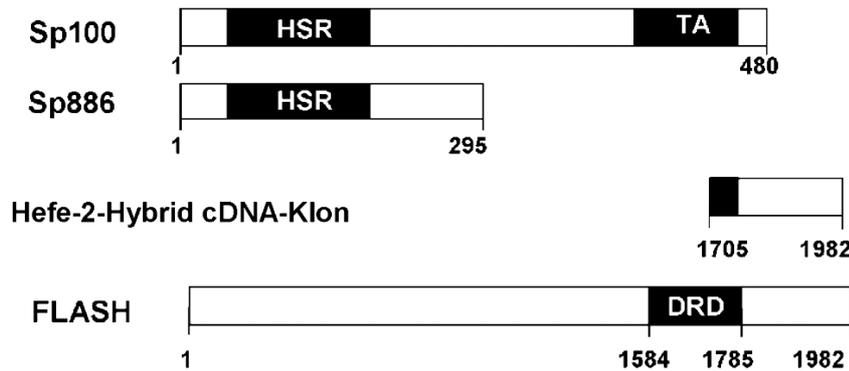


Abbildung 3.1. Ein C-terminaler Bereich des FLASH-Proteins interagiert mit einem N-terminalen Fragment von Sp100 in der Hefe. Schematische Darstellung der Sp100-Deletionsmutante (Sp886), die als Lockvogel in dem Hefe 2-Hybrid System benutzt wurde und der FLASH Teil-Sequenz (1705-1982 As.), die als Interaktionspartner in Form eines cDNA-Klons identifiziert wurde. HSR: *homogenously staining region*, TA: *transactivating domain*, DRD: *Death-effector domain (DED) recruiting domain*.

FLASH interagiert spezifisch mit Sp100 *in vivo*

Der Befund einer Interaktion von FLASH und Sp100 in der Hefe sollte auch für humane Zellen verifiziert werden. Um dies zu zeigen, wurden FLASH und Sp100 in 293T-Zellen mithilfe von Expressionsvektoren überexprimiert und anschließend Immunpräzipitationsstudien mit anti-FLASH- und anti-Sp100-Antikörpern durchgeführt. Die Analyse der Lysate durch Immunblots zeigte in beiden Fällen Kopräzipitation der jeweiligen Proteine, (Abbildung 3.2A, 3.2B). Die Kopräzipitation war spezifisch, wie Kontrollexperimenten mit unspezifischen Antikörpern zeigten.

Wichtig war als nächstes zu testen, ob die Kopräzipitation von Sp100 und FLASH eventuell vom PML-Protein abhängt, da dieses beide Proteine in einem Komplex zusammenhalten könnte, ohne dass sie direkt miteinander wechselwirken. Um zu testen, ob PML für die Interaktion zwischen FLASH und Sp100 notwendig ist, wurden FLASH-Flag und PML in 293T-Zellen überexprimiert und das FLASH-Protein mittels anti-FLAG Antikörper immunpräzipitiert. Die Analyse der Immunpräzipitate durch anti-PML Antikörper ergab keinen Hinweis für eine Kopräzipitation des PML-Proteins (Abbildung 3.2C). Dieses Ergebniss deutet auf eine vom PML-Protein unabhängige Sp100-FLASH Interaktion hin.

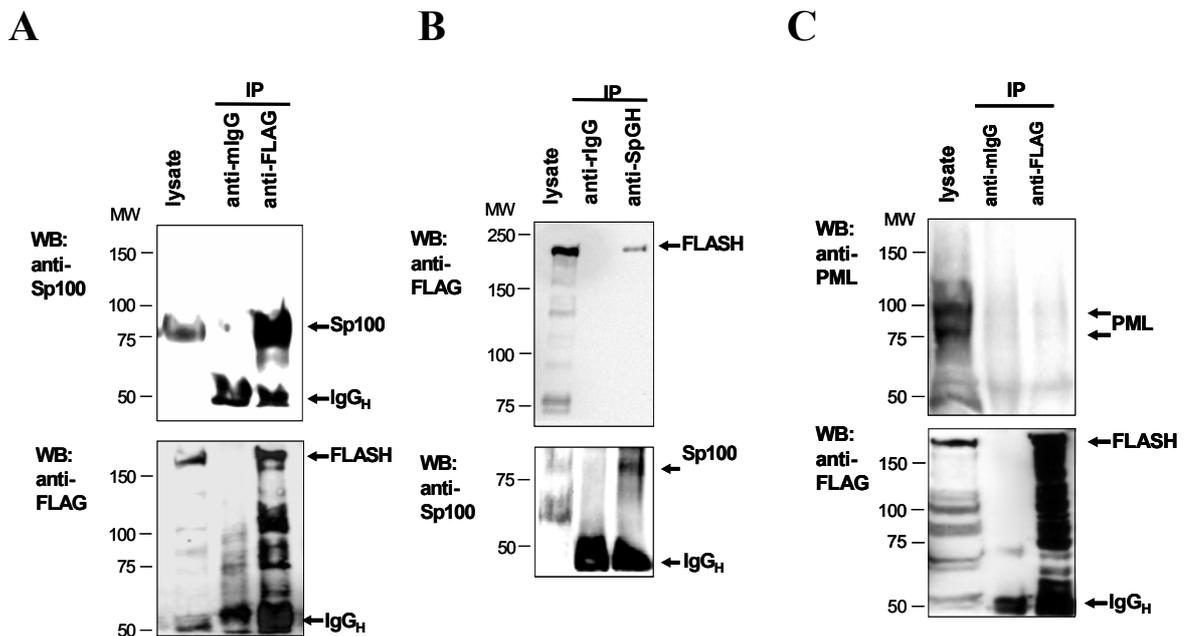


Abbildung 3.2. Evidenz für eine *in vivo* FLASH/Sp100-Protein Interaktion. (A) 293T-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und Sp100 Expressionskonstrukten transfiziert, und Proteine der Zellextrakte mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert. Koimmunpräzipitiertes Sp100 wurde mittels Western Blot (WB) mit einem anti-Sp100 Antikörper (anti-SpGH) nachgewiesen (oben). Die Expression von FLASH wurde mit anti-FLAG Antikörper nachgewiesen (unten). (B) 293T-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und Sp100 Expressionskonstrukten transfiziert. Der Immunpräzipitation mit dem anti-Sp100 Antikörper (anti-SpGH) folgte der Nachweis von koimmunpräzipitiertem FLASH mittels eines anti-FLAG Antikörpers im Western Blot (WB) (oben). Die Expression von Sp100 wurde mit anti-Sp100 Antikörpern (anti-SpGH) analysiert (unten). (C) FLASH interagiert nicht mit PML. 293T-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und PML Expressionskonstrukten transfiziert. Anti-FLAG Antikörper wurden für die Präzipitation des FLASH-Proteins verwendet. Das PML-Protein wurde mittels Western Blot (WB) mit einem anti-PML-Antikörper (Kaninchen) und das FLASH-Protein mit anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. Kontroll-Immunpräzipitationen wurden mit Maus-IgG (A, C) oder mit Kaninschen-IgG (B) gemacht. Die Positionen der schweren IgG-Ketten (IgG_H) des präzipitierten Antikörpers sind mit einem Pfeil markiert. Die Menge an aufgetragenem Lysaten entsprach 20% des Gesamtzelllysats, welches für die Immunpräzipitation verwendet wurde. MW: Molekulargewichtsmarker (in kDa).

Kartierung der Interaktionsdomäne von FLASH mit Sp100

Zur Untersuchung der Interaktionsdomäne von Sp100 mit FLASH, wurden verschiedene FLASH-Deletionsmutanten (FLAG-FLASH deltaA, FLAG-FLASH deltaC und FLAG-FLASH deltaD) und Sp100 mittels entsprechender Expressionsvektoren in 293T-Zellen koexprimiert. Anschließend wurde mittels Immunpräzipitationen untersucht, ob die beiden Proteine in den Zelllysaten komplexiert vorliegen. Die Immunpräzipitation von Proteinen

aus Lysaten von pCDNA3-Vektor-transfizierten Zellen diente zur Kontrolle der Spezifität der immunpräzipitierten Proteine.

Wie aus dem erhaltenen Bandenmuster der in Abbildung 3.3B dargestellten Immunblots der Lysate mit den entsprechenden Antikörpern zu entnehmen ist, lag ausschließlich das carboxyterminale Fragment von FLASH im Komplex mit Sp100 vor, nicht aber die beiden aminoterminalen Fragmente von FLASH. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Daten, die mithilfe des Hefe 2-Hybrid-Systems erhalten wurden (Abbildung 3.1).

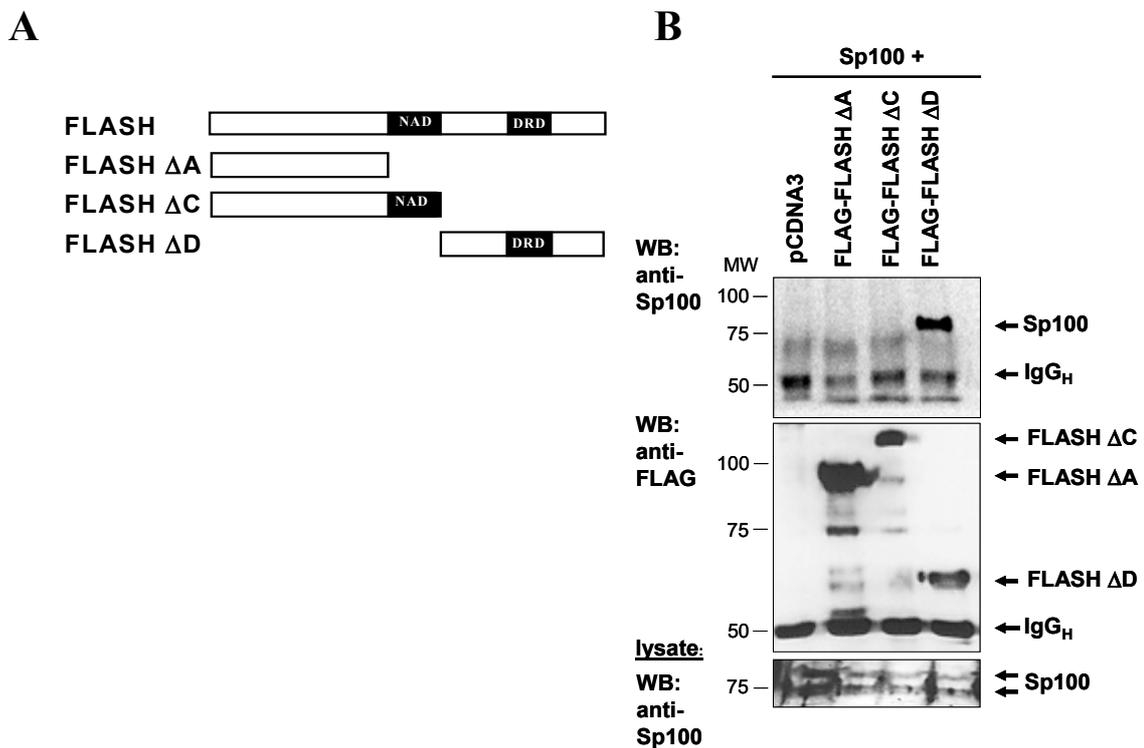


Abbildung 3.3. Das Sp100-Protein interagiert mit dem C-Terminus des FLASH-Proteins. (A) Schematische Darstellung von FLASH und FLASH-Deletionsmutanten (Delta). NAD: *NF-kB activation domain*, DRD: *death-effector domain recruiting domain*. **(B)** Für die Immunpräzipitationsstudien mit dem anti-FLAG Antikörper wurden 293T-Zellen mit Expressionsvektoren für Sp100, dem Kontrollvektor pCDNA3, oder mit Expressionskonstrukten für die angezeigten FLAG-FLASH-Deletionsmutanten (Delta) transfiziert. Auf die Präzipitierten FLAG-FLASH-Proteine wurden nach SDS-PAGE der Proteine der Lysate durch Immunblotting mit anti-FLAG-Antikörpern analysiert (Mitte). Koimmunpräzipitiertes Sp100 wurde mittels Western Blot (WB) mit dem anti-Sp100-Antikörper (anti-SpGH) nachgewiesen (oben). Als Kontrolle für die Effizienz der Immunpräzipitation wurde ein Fünftel der eingesetzten Zelllysate durch SDS-PAGE und Immunblot mit anti-Sp100 (anti-SpGH) analysiert (unten). MW: Molekulargewichtsmarker (in kDa).

SUBZELLULÄRE LOKALISATION UND EXPRESSION VON ENDOGENEM FLASH-PROTEIN

Subzelluläre Lokalisation von endogen exprimiertem FLASH in 293T- und HT1080-Zellen

Um die Expression von endogen exprimiertem FLASH in unterschiedlichen Zelllinien zu analysieren, wurden Lysate von 293T- und HT1080-Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Das FLASH-Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 220 kDa. Mit Hilfe des anti-FLASH-Antikörpers wurde eine spezifische Bande mit der erwarteten elektrophoretischen Mobilität sowie zusätzliche, langsame im Gel wandernden Banden sichtbar (siehe Abbildung 3.4A). Diese Banden mit niedrigerem als erwartetem Molekulargewicht wurden bereits beim Nachweis von überexprimiertem FLASH-Protein mit Antikörpern beobachtet (siehe Abbildung 3.2), Es könnte sich dabei um proteolytische Degradationsprodukte oder um alternativ gespleisste Formen des FLASH-Proteins handeln.

Die Interaktion mit Caspase-8 und FADD nach der Aktivierung des CD95-Todesrezeptors (Imai et al., 1999) ließ zu Beginn meiner Arbeit vermuten, dass FLASH ein zytoplasmatisches oder Zytoplasmamembran-ständiges Protein ist. Zwei auf Grund von Sequenzähnlichkeiten vorausgesagte mögliche Kernlokalisationsmotive (NLS) in der FLASH-Aminosäuresequenz sowie die kürzlich beschriebene Interaktion des FLASH-Proteins mit dem Kernprotein GRIP1 (Kino and Chrousos, 2003) deuten jedoch auch auf eine nukleäre Lokalisation des FLASH-Proteins hin.

Die von mir erhaltenen Evidenzen für eine Interaktion des FLASH-Proteins mit dem PML-Kerndomänprotein Sp100 war der Anlass, die subzelluläre Lokalisation des FLASH-Proteins in unterschiedlichen Zelllinien im Detail zu untersuchen. Für die Lokalisation von endogen exprimiertem FLASH in 293T- und HT1080-Zelllinien mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Kaninchen anti-FLASH Antikörper der Firma Santa Cruz (M300) sowie der in unserem Auftrag gegen ein spezifisches FLASH-Peptid hergestellte

Kaninchen anti-FLASH (522) Antikörper verwendet. Wie in der Abbildung 3.4B dargestellt, lokalisierte FLASH in beiden Zelllinien sowohl im Kernplasma, in Kerndomänen als auch im Zytoplasma. Besonders starke Fluoreszenzsignale gingen von den Kerndomänen aus. Der Einsatz beider anti-FLASH Antikörper führte zu einer ähnliche Lokalisation des endogen exprimiertem FLASH-Proteins und dies in beiden analysierten Zelllinien.

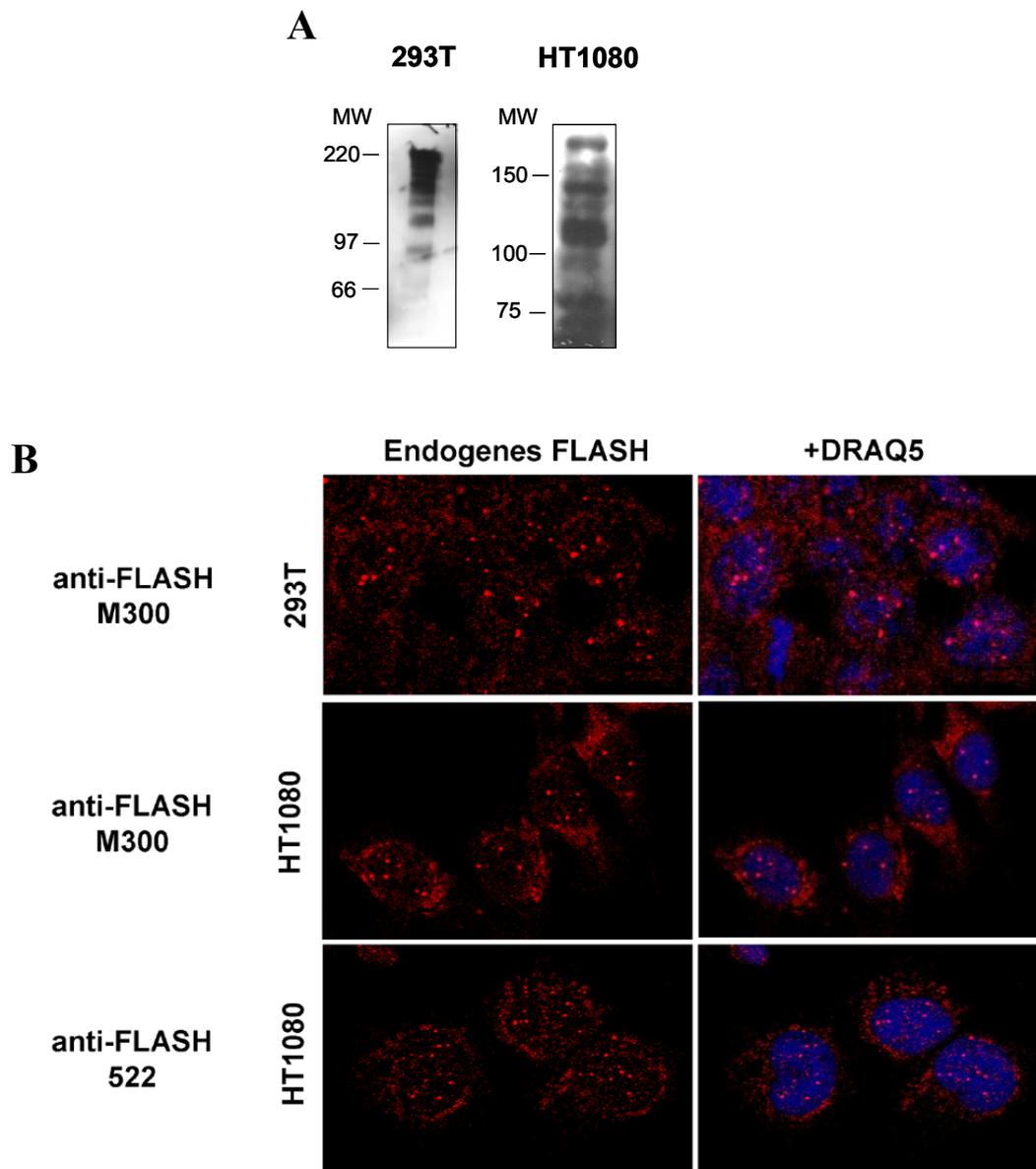


Abbildung 3.4. Expression und Lokalisation des endogen exprimiertem FLASH-Proteins. (A) 293T- und HT1080-Zellen wurden lysiert und im Western Blot bzgl. Vorhandensein von FLASH-Protein mit einem anti-FLASH Antikörper M300 untersucht. MW: Molekulargewichtsmarker (in kDa). **(B)** 293T- und HT1080-Zellen wurden auf Glassplättchen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die FLASH-Lokalisation mit dem anti-FLASH Antikörper M300 (293T- und HT1080-Zellen) oder mit dem von uns in Auftrag hergestellten anti-FLASH 522 Peptidantikörper (HT1080-Zellen) analysiert. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) sichtbar gemacht.

CHARAKTERISIERUNG DER FLASH-KERNDOMÄNEN

FLASH lokalisiert partiell in PML-Kerndomänen

Die oben genannten Studien wiesen darauf hin, dass FLASH zum Teil in diskreten Kerndomänen ist, sagen aber nichts über die Identität dieser Strukturen aus.

Um zu analysieren, ob und inwieweit FLASH-Kerndomänen mit bekannten nukleären Kompartimenten wie PML-Kerndomänen oder Cajal-Kerndomänen in einem Zusammenhang stehen, wurde FLAG-FLASH-Protein mithilfe eines Expressionsvektors in HeLa-Zellen exprimiert, und mittels indirekter Immunfluoreszenz seine Lokalisation im Vergleich zu endogenen exprimiertem PML oder Coilin untersucht (Abbildung 3.5A,B). Die Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass FLASH-Kerndomänen partiell mit PML-Kerndomänen kolokalisieren. Interessanterweise wurde zwar keinerlei Kolokalisation von Cajal-„Bodies“ in welchen prä-mRNA Spleißfaktoren lokalisieren und FLASH-Kerndomänen gefunden, aber häufig lagen beide Kerndomänen in unmittelbarer Nähe (Abbildung 3.5B).

Da HIPK2-Kerndomänen teilweise und je nach Zelltyp und Zustand mit PML-Kerndomänen identisch sind, war es interessant herauszufinden, ob ein Teil der FLASH-Domänen mit HIPK2-Kerndomänen kolokalisiert. Ein für diese Studien exprimiertes EGFP-HIPK2 Fusionsprotein zeigte eine nukleäre Verteilung in vielen punktförmigen Arealen (Abbildung 3.5C), wohingegen das zu Kontrollzwecken exprimierte EGFP wie erwartet zytoplasmatisch verteilt war (Daten nicht gezeigt). Trotz der in diesen Experimenten durch Überexpression sichtbar gemachten großen Anzahl von HIPK2-Kerndomänen konnte keine signifikante Kolokalisation mit FLASH-Kerndomänen festgestellt werden.

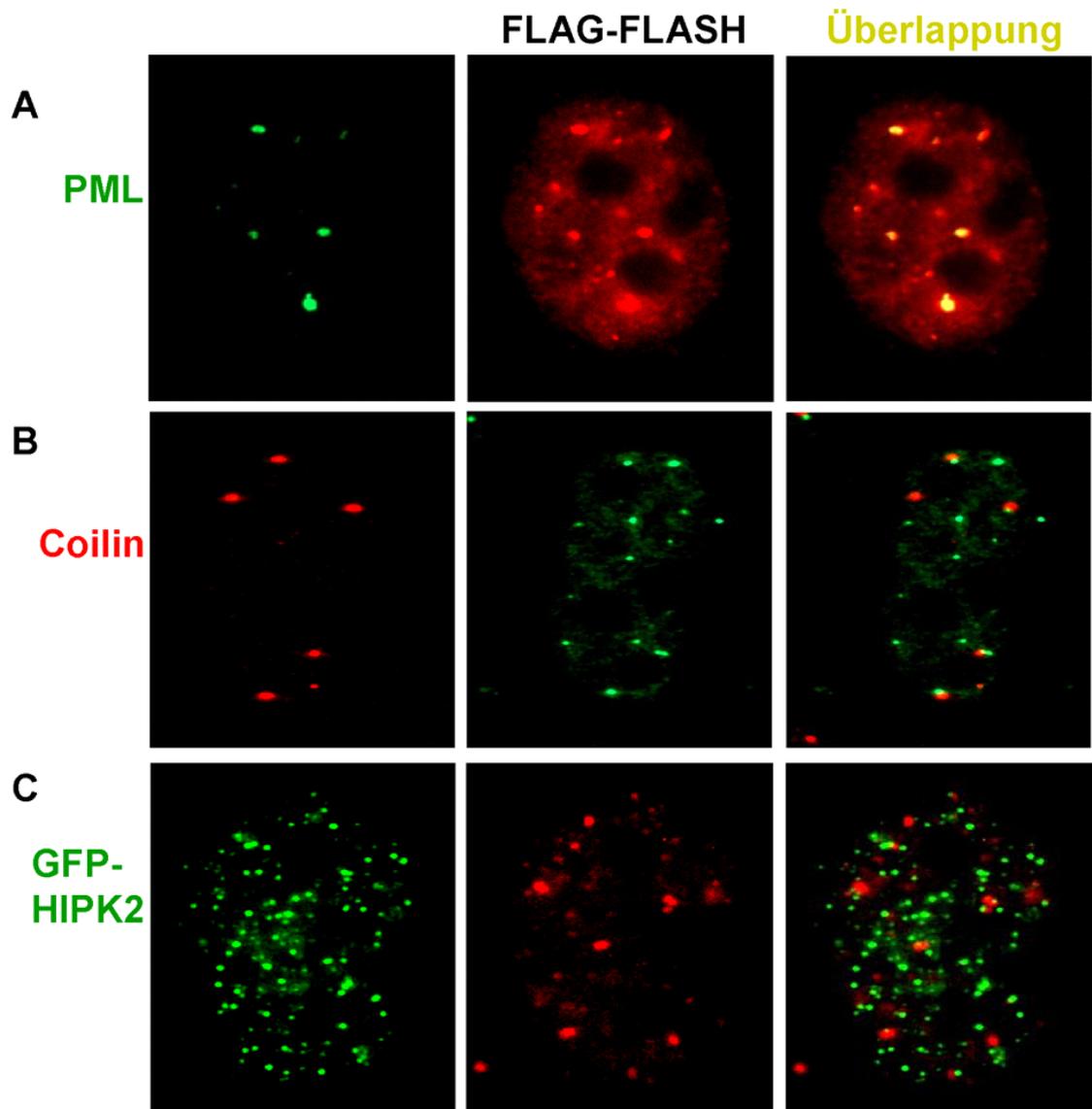


Abbildung 3.5. Lokalisation von FLASH-Kerndomänen im Vergleich mit anderen Kerndomänen. (A-B) HeLa-Zellen wurden mit einem FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert, und 24 h später wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz auf FLASH und endogenes PML oder Coilin untersucht. (C) HeLa-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und GFP-HIPK2 Expressionsvektoren transfiziert, und 24 h später wurden in den Zellen beide Proteine mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

FLASH ist eine transient mit PML-Kerndomänen assoziierte Komponente

Während der Durchführung meiner Dissertation wurde bekannt, dass Sp100 und PML nicht nur in statischen PML-Kerndomänen lokalisieren, sondern teilweise auch in mobilen Kerndomänen oder Proteinkomplexen, die eines oder beide Proteine enthalten können (Muratani et al., 2002; Wiesmeijer et al., 2002).

Eine detaillierte Untersuchung der Lokalisation von FLASH und Sp100 ergab, dass in manchen Zellen einer Zelllinie FLASH- und Sp100-Kerndomänen nahezu komplett kolokalisieren, in anderen Zellen der gleichen Zelllinie diese nur partiell oder höchst selten überlappten (Daten nicht gezeigt). Dies ließ eine dynamische, transiente Assoziation von FLASH- mit PML-Kerndomänen vermuten. Um weitere Hinweise für eine mögliche dynamische Assoziation beider Kerndomänenproteine zu erhalten, wurde das FLAG-FLASH-Fusionsprotein mithilfe eines Expressionskonstrukts in HT1080-Zellen für unterschiedliche Zeitspannen (16 h, 2 Tage oder 3 Tage) exprimiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von endogenem Sp100 und exogen exprimiertem FLAG-FLASH-Fusionsprotein analysiert. Die Mehrheit der FLASH-Kerndomänen kolokalisierte 16 h nach Transfektion mit den Sp100-Kerndomänen (Abbildung 3.6A). Eine semiquantitative Analyse des Ausmaßes der Überlappung beider Kerndomänen durch Zählen der Domänen in je 23 Zellen ergab eine Kolokalisation von 69% (Abbildung 3.6C). Zwei Tage nach Transfektion kolokalisierten diese Kerndomänen deutlich seltener (nur noch 55%), eine größere Anzahl als bei 16 h Posttransfektion (12,3% versus 6,7%) lokalisierte jedoch nahe beieinander (Abbildung 3.6B, C). Drei Tage nach Transfektion überlappten die Sp100 und FLASH-Kerndomänen mit weniger als der Hälfte noch seltener und die Anzahl der benachbarten FLASH- und Sp100-Kerndomänen nahm weiter zu auf den Wert von 23%. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass FLASH transient mit den PML-Kerndomänen assoziiert ist und konnten bisher nur aus Zeitgründen nicht noch mit kinetischer Video-Analyse weiter erhärtet werden.

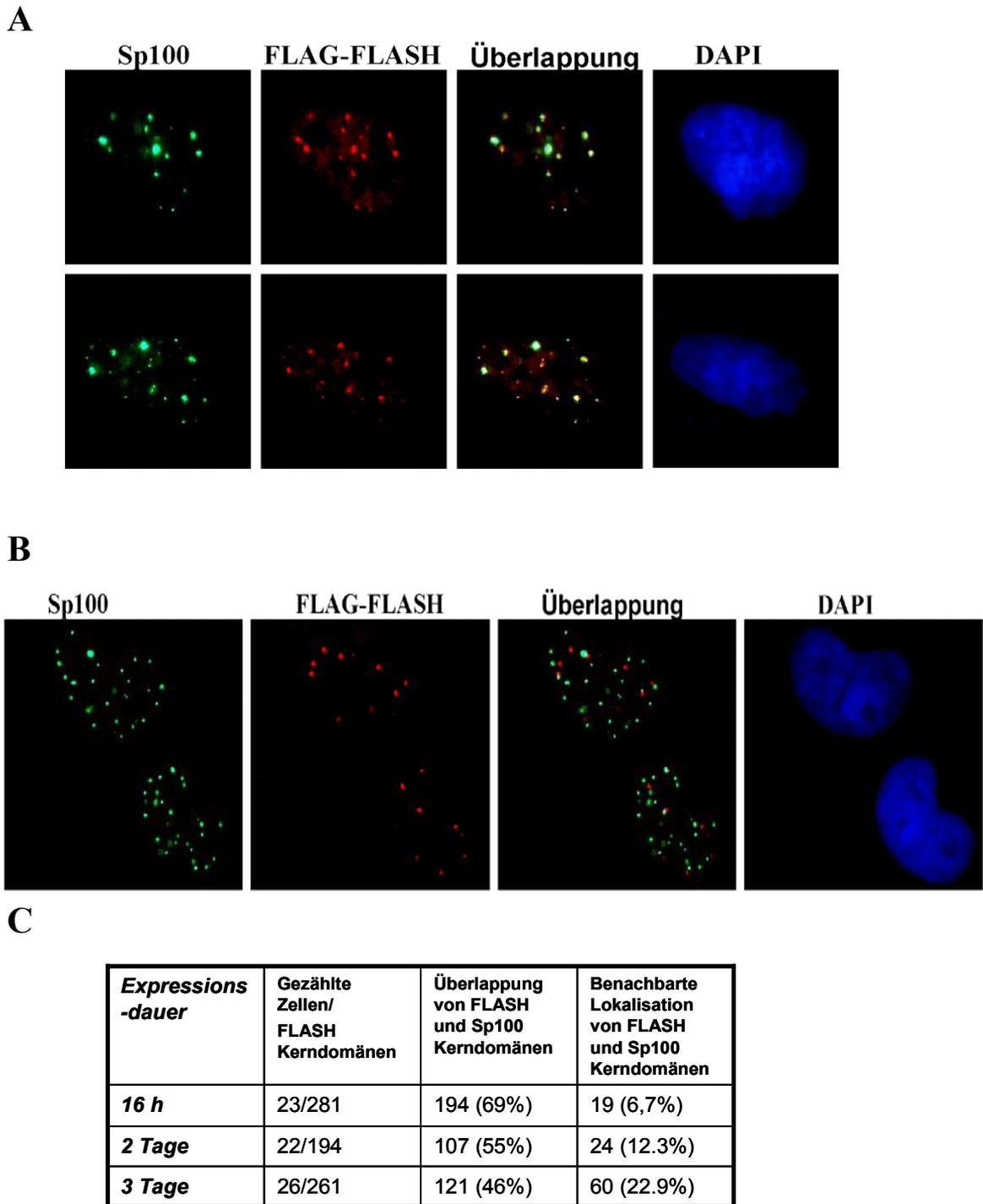


Abbildung 3.6. Lokalisation von FLAG-FLASH und Sp100 nach unterschiedlicher FLASH-Expressionsdauer. (A) HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. Sechsten h später wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie bzgl. endogenem Sp100 und exogen exprimiertem FLAG-FLASH analysiert. (B) HT1080-Zellen wurden wie in Abbildung 6A transfiziert und 48 h danach wurde die Lokalisation von endogen exprimiertem Sp100 und exogen exprimiertem FLAG-FLASH mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelt. (A,B) Das dritte Bild zeigt die Überlappung bzw. die benachbarte Lokalisation von beiden Proteinen. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. (C) Tabellarische Darstellung des Verhältnisses von FLASH- zu Sp100-Kerndomänen nach unterschiedlicher FLAG-FLASH-Expressionsdauer in HT1080-Zellen.

Die subzelluläre Lokalisation von FLASH-Deletionsmutanten

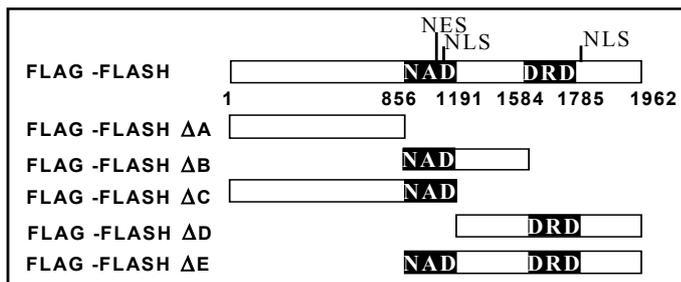
In den vorherigen Experimenten (Abbildung 3.4, 3.5) wurde gezeigt, dass FLASH sowohl im Zytoplasma, Nukleoplasma und in PML-Kerndomänen lokalisiert ist. Um zu untersuchen ob diese heterogene subzelluläre Verteilung durch unterschiedliche Domänen des FLASH-Proteins reguliert wird, wurden Fragmente verschiedener FLASH-Regionen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie bzgl. ihrer Lokalisation untersucht. Die in der Abbildung 3.7A dargestellten Deletionsmutanten von FLASH (deltaA-E) wurden in HT1080-Zellen mithilfe von Expressionvektoren überexprimiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und die einzelnen FLASH-Subfragmente mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper nachgewiesen. Wie aus Abbildung 3.7B hervorgeht, lokalisierten N-terminale Fragmente von FLASH, die C-terminal bis zum Beginn der DRD-Domäne reichten (Deletionen deltaA-C), überwiegend im Zytoplasma. Das deltaA-Fragment zeigte eine diffus zytoplasmatische Lokalisation, wobei Fragmente deltaB und deltaC überwiegend in zytoplasmatischen Filamenten lokalisieren. Die Natur dieser Filamente wurde in späteren Experimenten näher untersucht (siehe Seite 85). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Filamente eine wichtige Rolle für die Funktion des FLASH-Proteins in der Apoptose spielen. Das postulierte Kernexport Signal (NES) innerhalb der NAD-Sequenz (Imai et al., 1999) könnte für die zytoplasmatische Lokalisation der Deletionsmutanten deltaB und deltaC verantwortlich sein.

Der C-terminale Teil von FLASH zeigte eine diffuse, zytoplasmatische sowie nukleäre Lokalisation (deltaD und deltaE). Für die Kernlokalisierung spielt wahrscheinlich das vermutete C-terminale Kernlokalisierungssignal (NLS) eine entscheidende Rolle.

Der Teil der C-terminalen FLASH Sequenz, die von der Aminosäure 1702 bis 1982 reicht, wurde im Hefe 2-Hybrid System als mögliche Interaktionsdomäne für das Sp100-Protein identifiziert. Die nukleäre Lokalisation des Polypeptides mit diesem Sequenzabschnitt könnte Voraussetzung für die Interaktion zwischen FLASH und Sp100 sein.

Interessanterweise lokalisierte keines der untersuchten FLASH-Fragmente in Kerndomänen. Das legt die Vermutung nahe, dass die komplette FLASH-Aminosäuresequenz für die Lokalisation in Kerndomänen notwendig ist.

A



B

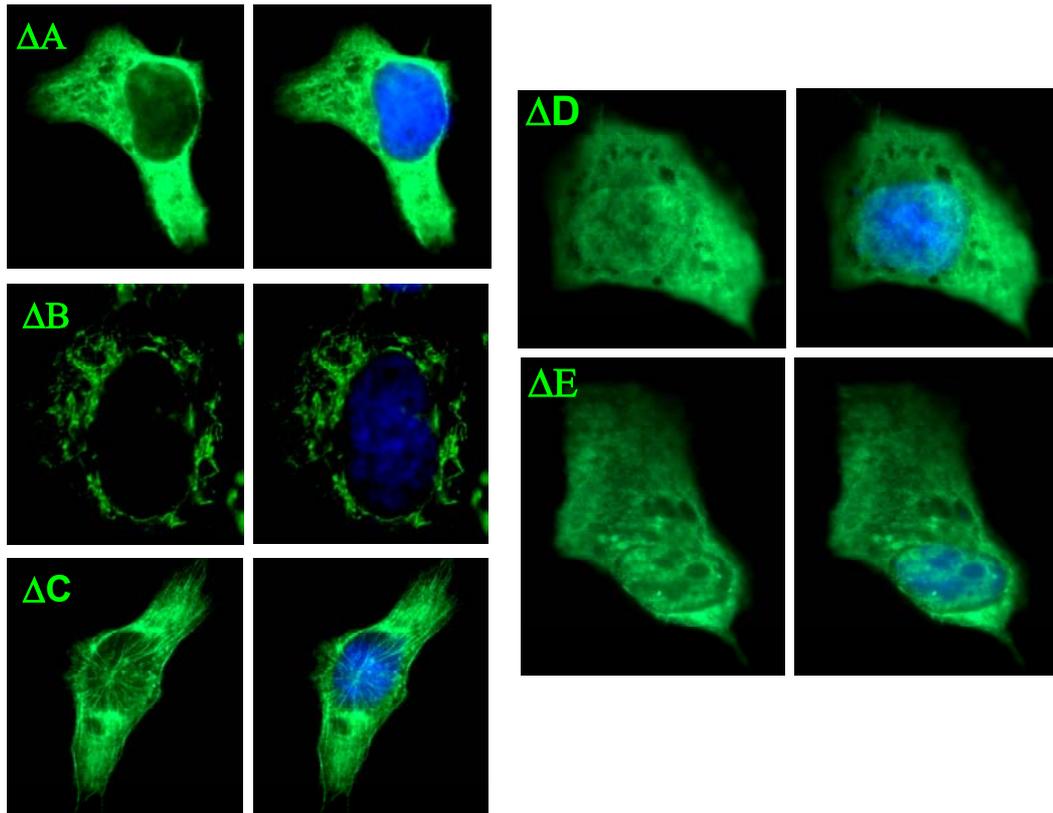


Abbildung 3.7. Subzelluläre Lokalisation von FLASH-Deletionsmutanten. (A) Schematische Darstellung des FLASH-Proteins und verschiedenen Deletionsmutanten (deltaA-E). Die Aminosäuresequenzbereiche der bisher charakterisierten Domänen NAD (*NF- κ B activation domain*) und DRD (*DED-recruiting domain*) sind abgebildet. NES (*nuclear export signal*), NLS (*nuclear localisation signal*). (B) In HT1080-Zellen wurden FLASH-Deletionsmutanten exprimiert und diese nach 24 h mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie mit einem anti-FLAG Antikörper sichtbar gemacht. Die Zellkern-DNA wurde durch Färbung mit DAPI (blau) nachgewiesen.

FLASH enthält mehrere Konsensus SUMO-1-Modifikationsmotive und kolokalisiert mit SUMO-1 in Kerndomänen

SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) ist ein 101 Aminosäuren langes Polypeptid, das über eine Thioester Bindung an bestimmte Lysinreste seiner Zielproteine angeheftet wird (SUMOylierung) (Desterro et al., 1998). Die SUMO-Modifikation findet an Konsensussequenz, Ψ KXE des Zielproteins statt, wobei Ψ eine lange hydrophobe (V,I,L) und X eine beliebige Aminosäure darstellt (Melchior, 2000).

Durch die Untersuchung der FLASH-Aminosäuresequenz wurden vier potentielle SUMO-1-Konsensusmotive gefunden (Abbildung 3.8A). Weitere Untersuchungen stehen jedoch noch aus, um feststellen ob ein oder mehrere dieser Motive *in vivo* tatsächlich kovalent mit SUMO-1 verknüpft werden. Die Analyse der Lokalisation von FLAG-FLASH- und GFP-SUMO-1-Proteinen in HeLa-Zellen exprimiert durch Transfektion mit entsprechenden Vektoren, ergab eine Kolokalisation in Kerndomänen (Abbildung 3.8B). Um zu kontrollieren, ob GFP einen Einfluss auf die Lokalisation von SUMO-1 hat, wurde GFP auch alleine mithilfe eines Expressionsvektors in HeLa-Zellen exprimiert. GFP lokalisierte wie erwartet diffus im Zytoplasma und zeigte keinerlei Akkumulation in Kerndomänen (Daten nicht gezeigt).

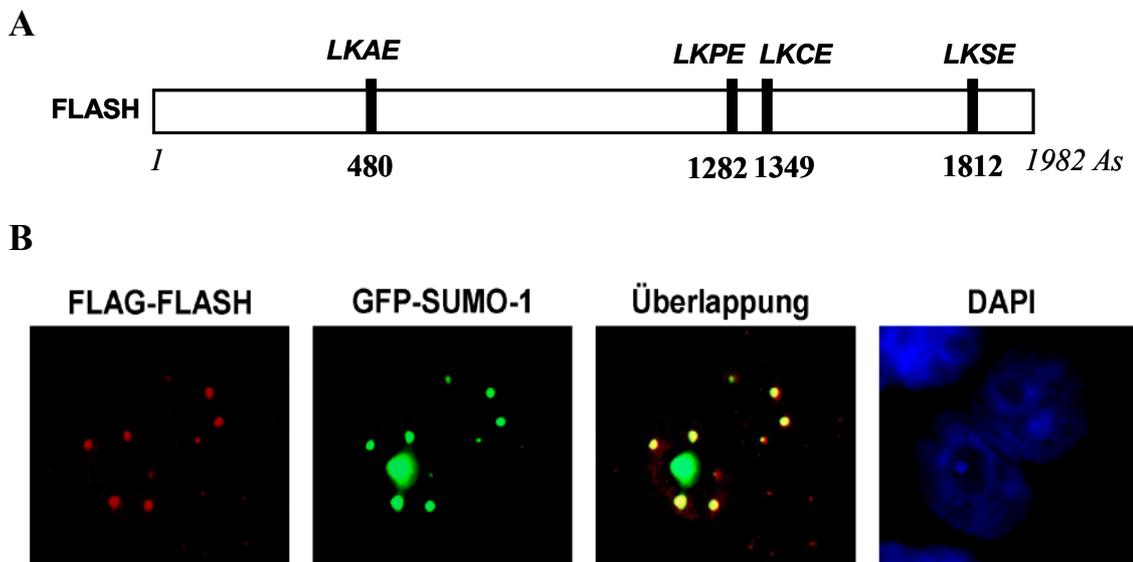


Abbildung 3.8. FLASH enthält SUMO-1 Konsensus-Modifikationsmotive und kolokalisiert mit SUMO-1 in HeLa-Zellen. (A) Schematische Darstellung der potentiellen SUMO-1 Modifikations-Motive in der FLASH-Aminosäuresequenz (As). (B) HeLa-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten GFP-SUMO-1 und FLAG-FLASH transfiziert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie. Zellkern-DNA wurde durch Färbung mit DAPI sichtbar gemacht.

DIE ROLLE VON FLASH UND SP100 IN DER CD95- VERMITTELTEN APOPTOSE

Blockierung der FLASH-Expression mit siRNA führt zur Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose

FLASH wurde kürzlich als ein Interaktionspartner von Pro-Caspase-8 beschrieben (Imai et al., 1999). Um den Einfluss des FLASH-Proteins auf die CD95-vermittelte Apoptose näher zu untersuchen, wurde der Expressionsspiegel des endogen exprimierten FLASH-Protein durch RNAi (*RNA interference*) vermindert, und der Effekt auf die CD95-vermittelte Apoptose untersucht.

RNAi ist eine geeignete Methode für die Untersuchung der Funktionen eines Proteins. Fire et al. haben im Jahr 1998 berichtet, dass die Expression von kurzen doppelsträngigen-RNAs (dsRNA) zur sequenzspezifischen Degradation der mRNA führt und dadurch die Expression des Zielproteins sehr stark vermindert werden kann (Fire et al., 1998).

Um die Expression des FLASH-Proteins zu inhibieren, wurde deshalb zunächst ein 19-Nukleotid-langes doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid in den pSUPER-Vektor (*suppression of endogenous RNA*) einkloniert, das analog wie für andere Gene beschrieben (Brummelkamp et al., 2002) nach Transkription funktionelle siRNA für FLASH ergeben sollte.

Die Wirksamkeit des pSUPER-siFLASH-Konstruktes wurde in 293T- und HT1080-Zellen, die Vektor getriebenes FLAG-FLASH-Fusionsprotein transient exprimierten, getestet. Wie in Abbildung 3.9A darstellt, führte die Transfektion von pSUPER-siFLASH zur fast kompletten Extinktion der Expression des FLAG-FLASH-Fusionsproteins in beiden getesteten Zelllinien.

Die Rolle von FLASH in der CD95-vermittelten Apoptose wurde in folgendem Experiment untersucht. Dafür wurde die Expression des endogenen FLASH-Proteins in den HT1080-Zellen mit dem pSUPER-siFLASH Expressionsvektor vermindert. In diesen

und in pSUPER-Vektor transfizierten Kontrollzellen wurde dann die Apoptose mittels des anti-APO-1 Antikörpers induziert und die Anzahl der apoptotischen Zellen gezählt. Wie in Abbildung 3.9B dargestellt, führte die verminderte FLASH-Expression zur Inhibition des CD95-vermittelten Zelltods.

Dies lässt darauf schließen, dass FLASH im CD95-vermittelten apoptotischen Signalweg eine wichtige Rolle spielt.

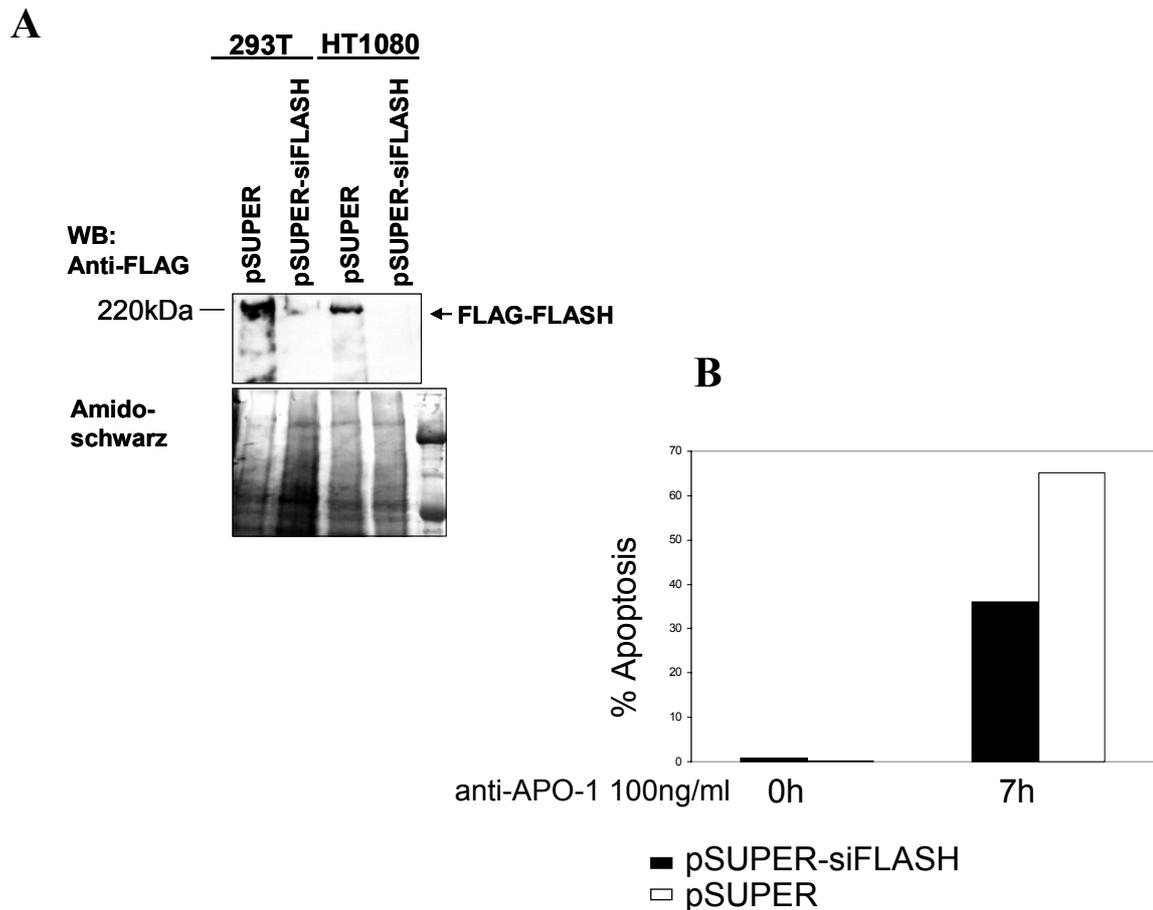


Abbildung 3.9. Verminderung der FLASH-Expression führt zur Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose. (A) 293T- und HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. Zwölf Stunden danach wurden die Zellen mit pSUPER-siFLASH, bzw. mit pSUPER Expressionsvektoren für 36 h transfiziert. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit dem anti-FLAG Antikörper bzgl. FLAG-FLASH-Expression getestet. Um die Auftragsmenge der Zellysate vergleichen zu können, wurde die Membran mit Amidoschwarz gefärbt. (B) HT1080-Zellen wurden mit pSUPER-siFLASH bzw. mit pSUPER Expressionsvektoren und je 1µg pEGFP-Vektor transfiziert. Sechsenddreißig Stunden später wurde die Apoptose mit dem anti-APO-1 Antikörper (100 ng/ml, 7 h) induziert. Zwanzig min vor der Zellzählung wurden die Zellen mit 50 nM Mitotracker Red behandelt, um die respiratorisch aktiven Mitochondrien sichtbar zu machen. Transfizierte, GFP-positive Zellen mit stark verminderter Mitochondrienaktivität wurden als apoptotisch gewertet und deren Anzahl im Vergleich zu Zellen mit normaler Mitochondrienaktivität durch Auszählen quantitativ bestimmt.

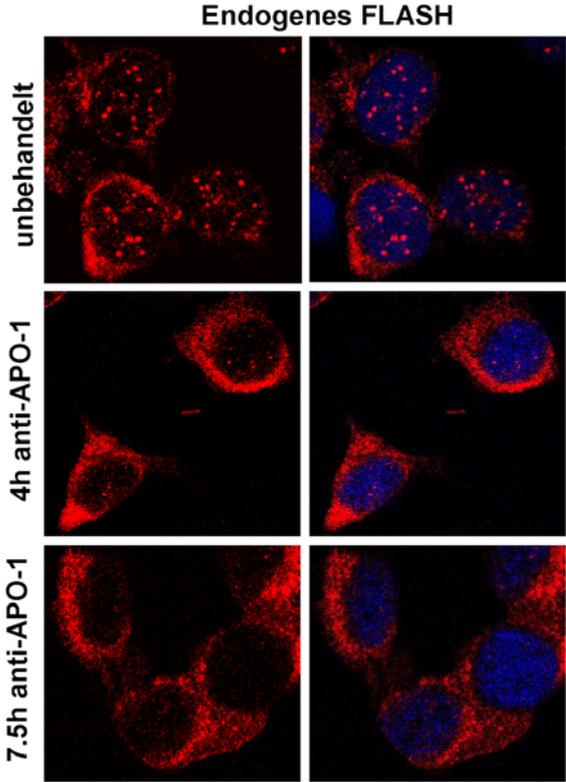
FLASH und Sp100 translozieren nach Aktivierung des CD95-Todesrezeptors aus PML-Kerndomänen und dem Zellkern in das Zytoplasma

Kürzlich wurde berichtet, dass FLASH mit Caspase-8 und FADD interagiert, und einen Einfluss auf die Aktivierung der Caspase-8 am DISC hat (Imai et al., 1999). Diese Daten legten die Frage nach der FLASH-Lokalisation im Fall der CD95-Rezeptor vermittelten Apoptose nahe. Um diese Frage zu beantworten wurden HT1080-Zellen für unterschiedliche Zeitspannen mit dem anti-APO-1 Antikörper behandelt. Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von endogenen FLASH-, Sp100- und PML-Proteine untersucht. Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop zeigten, dass FLASH nach Induktion der CD95-vermittelten Apoptose aus den Kerndomänen in das Zytoplasma transloziert wird. Siebeneinhalb Stunden nach Behandlung mit anti-APO-1 Antikörper befand sich fast sämtliches FLASH-Protein außerhalb vom Kern im Zytoplasma (Abbildung 3.10A).

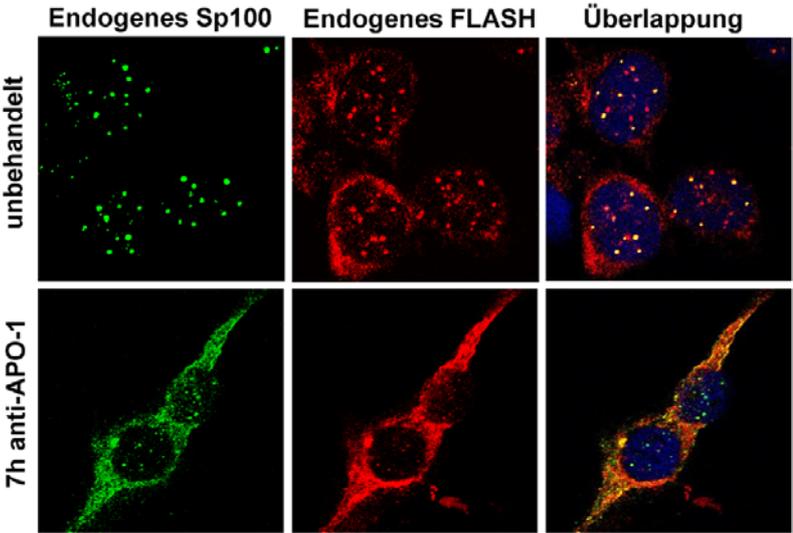
In den unbehandelten Zellen lokalisierte das Sp100-Protein ausschließlich in PML-Kerndomänen (Abbildung 3.10B, oben). Sieben Stunden nach Behandlung mit anti-APO-1 Antikörper jedoch wurde ein signifikanter Teil des Sp100-Proteins im Zytoplasma gesichtet (Abbildung 3.10B, unten). Interessanterweise kolokalisierten in einigen behandelten Zellen sowohl das Sp100- als auch FLASH-Protein teilweise in filamentösen zytoplasmatischen Strukturen (Abbildung 3.10B, unten).

Um zu testen, ob die Induktion der CD95-vermittelten Apoptose auch zu einer Verarmung von PML in den PML-Kerndomänen führt oder diese morphologisch verändert oder gar zerstört, wurde das für PML-Kerndomänen Strukturgebene PML-Protein durch Fluoreszenzmikroskopie in unbehandelten und behandelten Zellen untersucht (Abbildung 3.10C). Gleichzeitig sollten diese Studien zeigen, ob die, durch CD95-vermittelten Apoptose induzierte partielle Translokation von Sp100 in Zytoplasma ein Vorgang ist, der nicht grundsätzlich für alle anderen PML-Kerndomänenkomponenten gilt. Die Experimente zeigten, dass sich das Lokalisationsmuster des PML-Proteins nach Aktivierung des CD95-Todesrezeptors nicht ändert. Dies kann als deutlicher Hinweis für die Spezifität der FLASH- und Sp100-Translokation gewertet werden (Abbildung 3.10C).

A



B



C

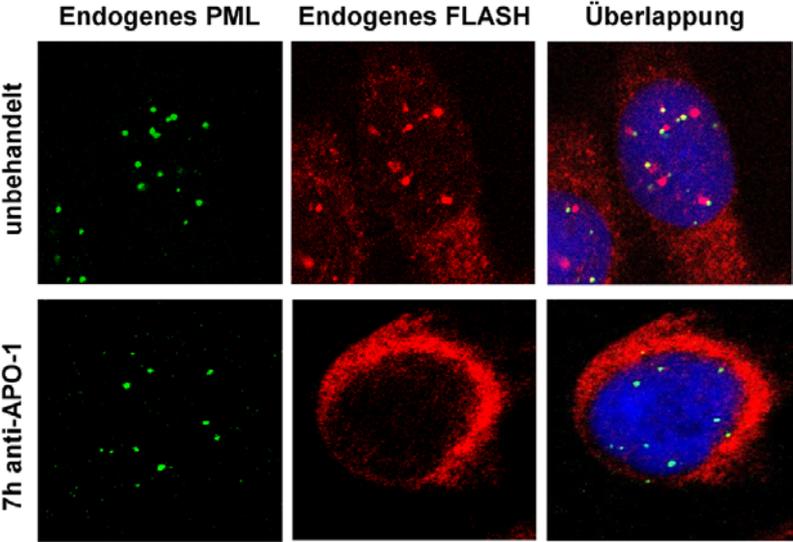


Abbildung 3.10. Lokalisation von FLASH, Sp100 und PML nach Induktion CD95-vermittelter Apoptose. (A) HT1080-Zellen wurden für 4 bzw. 7,5 Stunden mit 50 ng/ml anti-APO-1 Antikörper inkubiert. Die Lokalisation von endogenem FLASH-Protein wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelt. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) sichtbar gemacht. (B) HT1080-Zellen wurden 7 h mit 50 ng/ml anti-APO-1 Antikörper inkubiert und die Lokalisation von endogenem Sp100 und FLASH wurde wie in (A) analysiert. (C) HT1080-Zellen wurden 7 h mit 50 ng/ml anti-APO-1 Antikörper behandelt, anschließend wurden endogenes PML und FLASH subzellulär lokalisiert. (B-C) Das dritte Bild repräsentiert die Überlappung der beiden jeweils untersuchten Proteine. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) sichtbar gemacht.

Ein biochemischer Beweis für die Translokation von endogenen FLASH und Sp100 während der CD95-vermittelten Apoptose wurde durch Fraktionierung der HT1080-Zellen und den Nachweis der Proteine in den entsprechenden Fraktionen erbracht. Dafür wurden die anti-APO-1-behandelten und unbehandelten Zellen in Kerne und Zytosol fraktioniert. Zur Kontrolle der Kernfraktionen wurde im Western Blot das nukleäre PARP-Protein analysiert, während in der zytosolischen Fraktion das zytoplasmatische GAPDH-Protein nachgewiesen wurde. Die Spaltung des 116 kDa großen PARP-Proteins durch Caspase-3 nach der Zellbehandlung mit anti-APO-1 Antikörper diente außerdem zum Nachweis der Aktivierung der CD95-vermittelten Apoptose (Gianni and de Thé, 1999) (Abbildung 3.11, unten). Das endogene FLASH-Protein wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Hilfe von anti-FLASH Antikörpern in beiden Fraktionen nachgewiesen, wobei abhängig von der Dauer der CD95-vermittelten Induktion der Apoptose die Menge im Kern abnahm und die im Zytosol zunahm. Dies entspricht den Erwartungen gemäß den Ergebnissen der Lokalisierungsstudien (siehe Abbildung 3.10A).

Das Sp100-Protein wurde wie erwartet in unbehandelten HT1080-Zellen im weitgehend in PML-Kerndomänen gefunden. Wie aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalysen erwartet, führte die Induktion der CD95-vermittelten Apoptose zu einer Zunahme von Sp100, wenn auch nur leichten, im Zytosol (Abbildung 3.11 oben). Dieses Ergebnis sowie die mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie gewonnenen Daten zur Lokalisation von FLASH und Sp100 deuten darauf hin, dass FLASH, und wahrscheinlich auch Sp100 in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation unterschiedliche Funktionen ausüben. Nach der Aktivierung des CD95-Rezeptors transloziert das FLASH-Protein offensichtlich sehr effizient in das Zytoplasma, wahrscheinlich um dort eine seiner Funktionen, nämlich die bei der Aktivierung der Caspase-8, ausüben zu können.

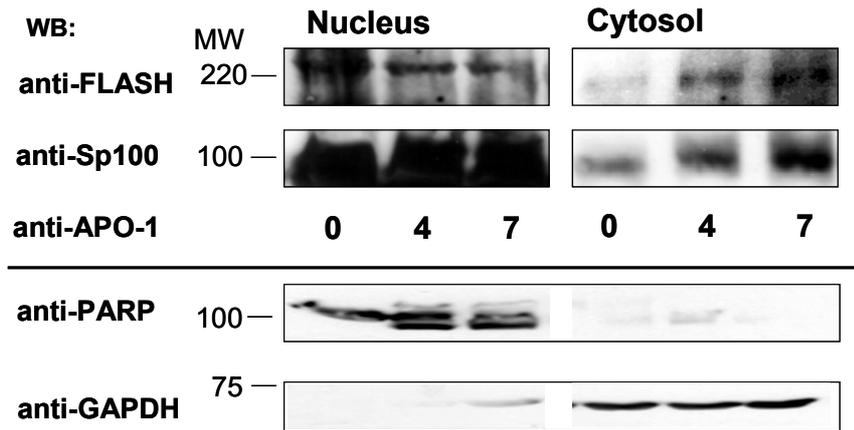


Abbildung 3.11. Anreicherung von FLASH und Sp100 im Zytosol nach Induktion der CD95-vermittelten Apoptose. Dreißig Millionen HT1080-Zellen wurde mit 100 ng/ml anti-APO-1 Antikörper für die angezeigten Zeitspannen behandelt. Anschließend wurden die Zellkern- und zytosolische Fraktion isoliert und mittels anti-PARP und anti-GAPDH Antikörpern auf Reinheit überprüft. Die Normalisierung der Lysatmengen erfolgte anhand Standardisierung der Zellzahl. FLASH wurde mittels anti-FLASH-522-Antikörpern und Sp100 mittels anti-Sp26-Antikörpern in Kern- und Zytosol-Fraktion mit Immunblotanalysen sichtbar gemacht. MW: Molekulargewichtsmarker (kDa).

FLASH transloziert nach Induktion CD95-vermittelter Apoptose an Mitochondrien und kolokalisiert dort mit Caspase-8

Um zu untersuchen, ob während der CD95-vermittelten Apoptose transloziertes FLASH diffus im Zytoplasma lokalisiert oder an bestimmte Organellen, wie z.B. die Mitochondrien, gebunden ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt. HT1080-Zellen wurden für 7 Stunden mit anti-APO-1 Antikörper behandelt und eine halbe Stunde vor der Zellfixierung die Mitochondrien mit Mitotracker Red angefärbt. In diesen Zellen wurde darüberhinaus die subzelluläre Lokalisation des endogenen FLASH-Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie subzellulär untersucht. Wie in Abbildung 3.12A darstellt, lokalisierte der Hauptteil des zytoplasmatischen FLASH-Proteins an Mitochondrien, eine kleinere Fraktion war auch diffus im Zytoplasma verteilt.

Mitochondrien spielen eine essentielle Rolle bei der Regulation der Apoptose, indem sie zahlreichen Faktoren wie Cytochrom C, AIF, Smac/DIABLO, freisetzen (Wang, 2001). Dies nährte den Verdacht, dass die Translokation von FLASH an die Mitochondrien bei der CD95-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen könnte. Darüberhinaus wurde kürzlich gezeigt, dass Caspase-8 in MCF7-Zellen an den Mitochondrien lokalisiert und dort

aktiviert werden kann (Stegh et al., 2002; Stegh et al., 2000). Aufgrund dieser Fakten und meiner Beobachtung, dass FLASH bei der CD95-vermittelten Apoptose vom Kern an die Mitochondrien transloziert, stellte sich die Frage, ob beide Proteine dort kolokalisieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden HT1080-Zellen mit anti-APO-1 Antikörper für 7 h behandelt und anschließend die Lokalisation von endogenen Proteinen Caspase-8 und FLASH mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie die Abbildung 3.12B zeigt, kolokalisierten nach der CD95-induzierten Apoptose FLASH und Caspase-8 an Mitochondrien.

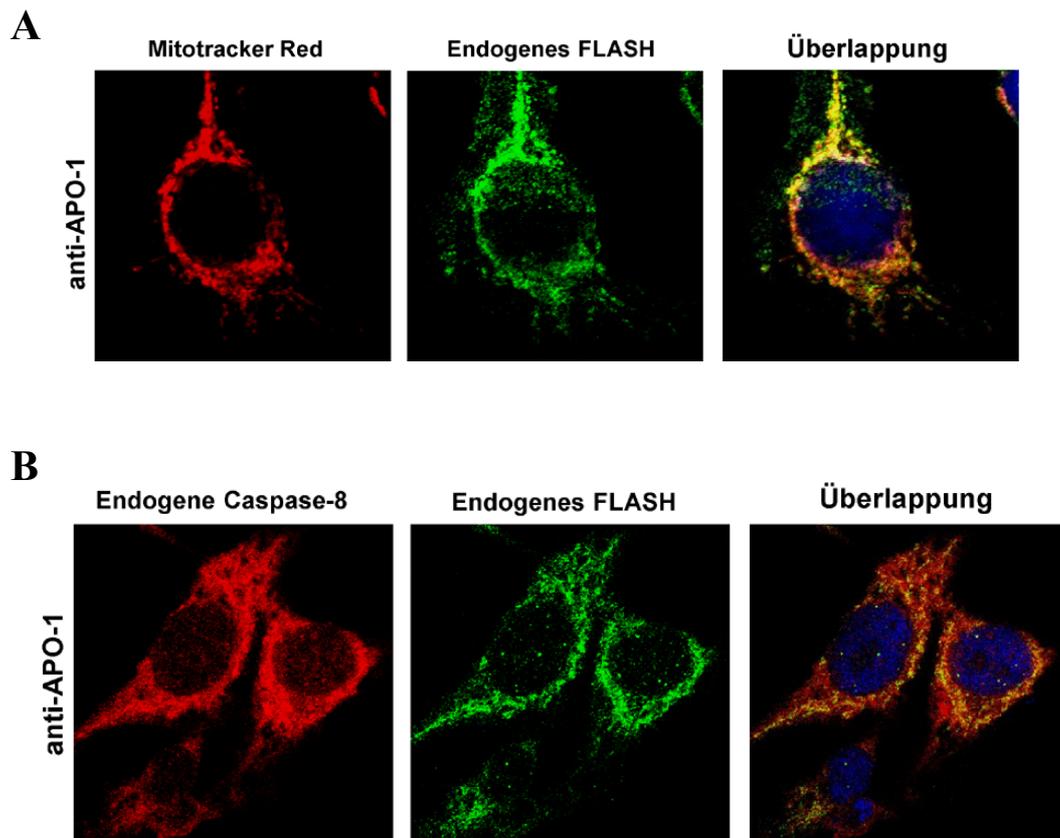


Abbildung 3.12. Lokalisation von FLASH und Caspase-8 während CD95-vermittelten Apoptose (A) HT1080-Zellen wurden 7 h mit 50 ng/ml anti-APO-1 Antikörpern stimuliert. Dreißig min vor der Zellfixierung wurden die Mitochondrien mit 50 nM Mitotracker Red angefärbt. Die Lokalisation von endogenem FLASH wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. **(B)** HT1080-Zellen wurden 7 h mit 50 ng/ml anti-APO-1 Antikörper behandelt. Die endogenen Caspase-8- und FLASH-Proteine wurden mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie mit anti-Caspase-8 (C1) und anti-FLASH (522) Antikörpern sichtbar gemacht. Das dritte Bild repräsentiert die Überlappung der beiden untersuchten Proteine **(A, B)**. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) dargestellt.

Die Translokation von FLASH nach CD95-Rezeptor Aktivierung wird durch Inhibition der Aktivierung von Caspase-8 verlangsamt

Die Tatsache, dass FLASH und Sp100 nach Induktion der CD95-vermittelten Apoptose in das Zytoplasma translozieren (Abbildung 3.9) impliziert, dass dieses Ereignis durch einen CD95-Rezeptor ausgelösten Signalweg vermittelt wird. Um zu testen, welcher der unterschiedlichen CD95-Rezeptor Signalwege dafür verantwortlich ist, wurden mit Hilfe spezifischer pharmakologischer Inhibitoren selektiv unterschiedliche CD95-Rezeptor Signalwege inhibiert.

Es wurde berichtet, dass die Ligandierung des CD95-Rezeptors zur Aktivierung einer Reihe von MAP Kinasen (MAPK) wie JNK, ERK oder p38 führt (Hofmann et al., 2001; Ichijo et al., 1997). Spezifische Inhibitionen der JNK-, ERK- und p38-Signalkaskaden (ERK1;PD98059, JNK;SB202190, p38;SB203580) hatten keinen Einfluss auf die Kinetik der FLASH- und Sp100-Translokation in CD95-Rezeptor stimulierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivierung des CD95-Rezeptors führte zur rapiden Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-8 an den Rezeptor. Die aktivierte Caspase-8 leitet das apoptotische Signal mittels Spaltung von weiteren Caspasen, wie z.B. Pro-Caspase-3, weiter. Im folgenden Experiment wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt, dass Inhibition der Caspase-8-Aktivierung durch den spezifischen Peptidinhibitor zIETD-fmk, zur Verlangsamung der FLASH- und Sp100-Translokation in CD95-Rezeptor stimulierten Zellen führt (Abbildung 3.13). Die Analyse von HT1080-Zellen nach 4 h anti-APO-1 Behandlung ergab, dass sich die Hauptfraktion von FLASH zu diesem Zeitpunkt im Zytoplasma befindet. In zIETD-fmk vorbehandelten Zellen wurde jedoch eine deutliche FLASH-Fraktion im Kern, bzw. in Kerndomänen offensichtlich. Ähnliche Unterschiede in der FLASH-Lokalisation wurden in HT1080-Zellen nach 7 h anti-APO-1-Behandlung und mit zIETD-fmk-Vorbehandlung festgestellt. Die spezifische Inhibition der Caspase-8-Aktivierung verlangsamte ebenfalls die Translokation des Sp100-Proteins in CD95-Rezeptor stimulierten Zellen wodurch die partielle Translokation von Sp100 nach 7 h Stimulierung mit anti-APO-1 in zIETD-fmk behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.13, unten, rechts).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Translokation von FLASH und Sp100 in CD95-stimulierten Zellen durch einen Signalweg, welcher die Aktivierung der Caspase-8

benötigt, ausgelöst wird. Ob Caspase-8 alleine oder auch anderen Komponente an diesem Signalweg beteiligt sind, bleibt zu untersuchen.

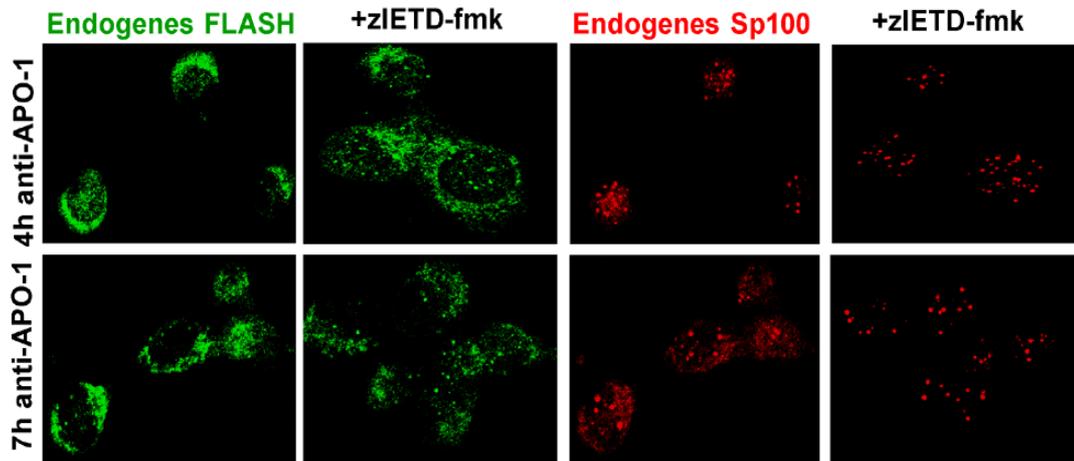


Abbildung 3.13. Lokalisation von endogenem FLASH und Sp100 in der CD95- vermittelten Apoptose nach der Inhibition der Caspase-8. HT1080-Zellen wurden 4 h bzw. 7 h mit 60 ng/ml anti-APO-1 Antikörper stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde für 1 h mit 50nM zIETD-fmk vorbehandelt. Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von endogenem FLASH mithilfe von anti-FLASH M300 Antikörpern und Sp100 mithilfe von anti-Sp26 Antikörpern ermittelt.

In HT1080^{FADD-DN}-Zellen wird die FLASH-Translokation nach der CD95-Rezeptor Aktivierung verlangsamt

Ein unabhängiger Beweis dafür, dass die Aktivierung von Caspase-8 für die Translokation von FLASH während der CD95-vermittelten Apoptose wichtig ist, wurde durch die Herstellung von stabilen HT1080 Zelllinien mit konstitutiver Expression einer dominant negativen Mutante von FADD (HT1080^{FADD-DN} Zellen) ermöglicht.

FADD ist ein Adapterprotein, welches im Fall der CD95-Rezeptor Aktivierung in den stimulierten Rezeptorkomplex, auch DISC (*Death inducing signalling complex*) genannt, rekrutiert wird. Mittels seiner C-terminalen Todesdomäne (DD) bindet FADD an den Rezeptor (Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995) und mittels seiner N-terminalen Todeseffektor-Domäne (DED) wird die Caspase-8 an den DISC rekrutiert (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Daher ist FADD-DN, eine FADD Mutante, welcher die N-terminale Todeseffektor Domäne fehlt, ein dominant-negativer Inhibitor der CD95-vermittelten Apoptose.

Um stabile HT1080^{FADD-DN} - und HT1080^{pCDNA3} -Zellen herzustellen, wurden HT1080-Zellen mit FADD-DN und dem Kontrollvektor pCDNA3 transfiziert. Einen Tag danach

wurden die Zellen der Selektion mit G418 unterzogen. Anschließend wurden HT1080^{FADD-DN} Zellen zusätzlich mit 1 µg/ml anti-APO-1 behandelt, um den Apoptose-resistenten, FADD-DN exprimierenden Zellpool zu gewinnen. Die stabilen Zellen wurden mittels Western Blot auf die Expression von FADD-DN getestet. Ein gegen den C-Terminus gerichteter anti-FADD Antikörper detektierte endogenes FADD und die stabil exprimierte FADD-DN Mutante (Abbildung 3.14A).

Um zu analysieren, ob sich die Kinetik der FLASH-Translokation in den HT1080^{FADD-DN} im Vergleich mit HT1080^{pCDNA3}-Zellen unterscheidet, wurde folgendes Experiment durchgeführt: HT1080^{FADD-DN}- und HT1080^{pCDNA3}-Zellen wurden für 7 h mit dem anti-APO-1 Antikörper behandelt. Anschließend wurde die Lokalisation von endogenem FLASH untersucht. In HT1080^{pCDNA3}-Zellen wurde nach 7 h Behandlung mit anti-APO-1 eine Translokation des FLASH-Proteins beobachtet (Abbildung 3.14B). In HT1080^{FADD-DN}-Zellen translozierte signifikant weniger FLASH unter gleichen Bedingungen und eine beachtliche Menge des FLASH-Proteins wurde nach wie vor im Kern bzw. in Kerndomänen sichtbar (Abbildung 3.14C). Demzufolge scheint die Inhibition der Caspase-8-Aktivierung mittels stabiler FADD-DN-Expression für die Verlangsamung der FLASH-Translokation in der CD95-vermittelten Apoptose verantwortlich zu sein.

Interessanterweise wurde beobachtet, dass endogenes FLASH in unbehandelten HT1080^{FADD-DN}-Zellen verstärkt im Zytoplasma lokalisiert. Der Grund dafür ist bisher nicht bekannt. Kürzlich wurde berichtet, dass FADD und FADD-DN eine Funktion im Zellzyklus ausübt (Alappat et al., 2003). Die stabile Expression der FADD-DN Mutante könnte daher Zellzyklus-Defekte verursachen, welche sich auf die Lokalisation von FLASH auswirken könnten.

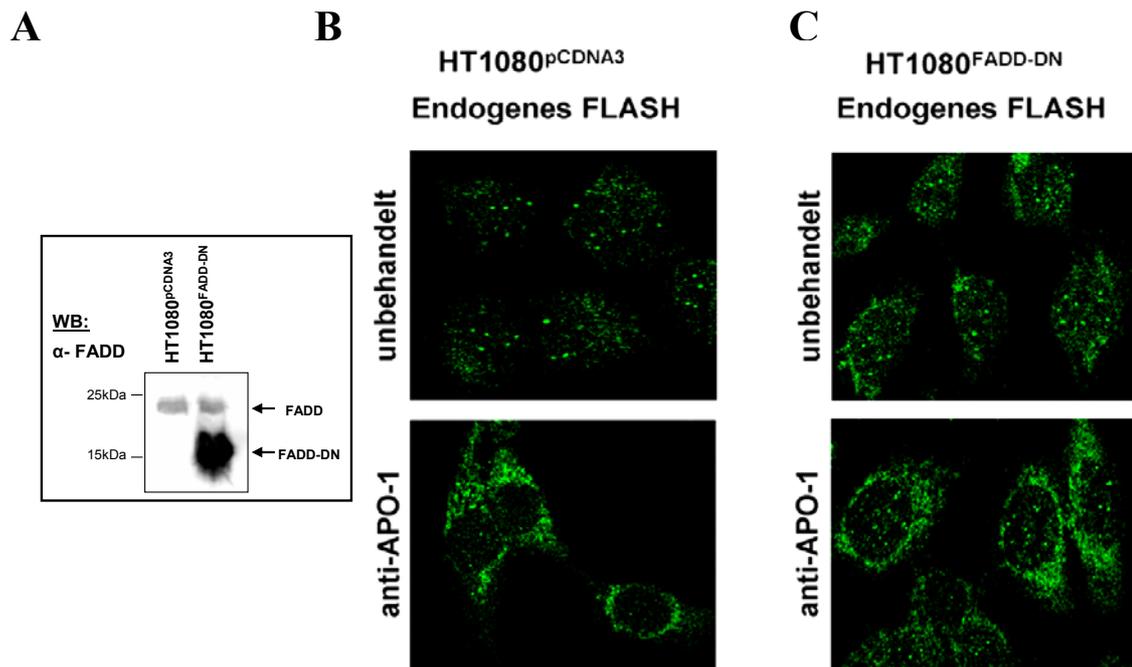


Abbildung 3.14. Lokalisation von endogenem FLASH in den HT1080^{FADD-DN}- und HT1080^{pCDNA3}-Zellen. (A) HT1080^{FADD-DN} und HT1080^{pCDNA3} wurden auf die stabile Expression von FADD-DN mittels Western Blot getestet. Dazu verwendeter anti-FADD Antikörper detektierte FADD und die FADD-DN Mutante. (B-C) HT1080^{pCDNA3} (B) und HT1080^{FADD-DN} (C) wurden 7 h mit 60 ng/ml anti-APO-1 Antikörper behandelt. Anschließend wurde die Lokalisation von endogenem FLASH mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelt.

Die Translokation von FLASH nach CD95-Rezeptor Aktivierung wird durch Leptomycin B verhindert

Das Kernexport-Signal (NES) ist eine Leuzin-reiche Sequenz, die dem entsprechenden Protein einen CRM1-abhängigen Transport vom Kern in das Zytoplasma ermöglicht. Leptomycin B (LMB) inhibiert den NES-vermittelten Transport, indem es an das CRM1-Protein bindet, und so die Interaktion zwischen CRM1 und NES antagonisiert (Fukuda et al., 1997).

Es wurde berichtet, dass der Kernexport des HIV-1 Rev-Proteins durch LMB-Behandlung erfolgreich blockiert werden kann (Wolff et al., 1997). Um die Aktivität des LMB zu testen, wurde GFP markiertes HIV-1 Rev-Protein mit entsprechendem Vektor in HT1080-Zellen exprimiert und 24 Stunden danach die Zellen mit 10 nM LMB behandelt. Die Analyse des HIV-1 Rev-Proteins in lebenden Zellen mit Hilfe seiner GFP-Marker ergab nach 90 min Behandlung mit LMB eine fast ausschließlich nukleäre Lokalisation (Abbildung 3.15A).

Das FLASH-Protein besitzt wahrscheinlich ein NES in seinem N-Terminus, welches eventuell dessen Translokation nach der CD95-Rezeptor Aktivierung ermöglicht. Um zu testen, ob die FLASH-Translokation CRM1-abhängig erfolgt, wurden HT1080-Zellen mit 10 nM LMB für 90 min vorinkubiert und anschließend für 7 h mit anti-APO-1 Antikörper behandelt. Die Untersuchung der FLASH-Lokalisation zeigte, dass FLASH in LMB behandelnden Zellen nach Induzierung der CD95-vermittelten Apoptose hauptsächlich im Zellkern bzw. Kerndomänen und nur eine kleinere Fraktion im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung 3.15B, unten). Im Gegensatz dazu wurde FLASH in anti-APO-1 behandelten Zellen ohne LMB Zugabe fast ausschließlich im Zytoplasma detektiert (Abbildung 3.15B, oben). Dieses Ergebnis deutet auf einen CRM-1-abhängigen Transport des FLASH-Proteins hin.

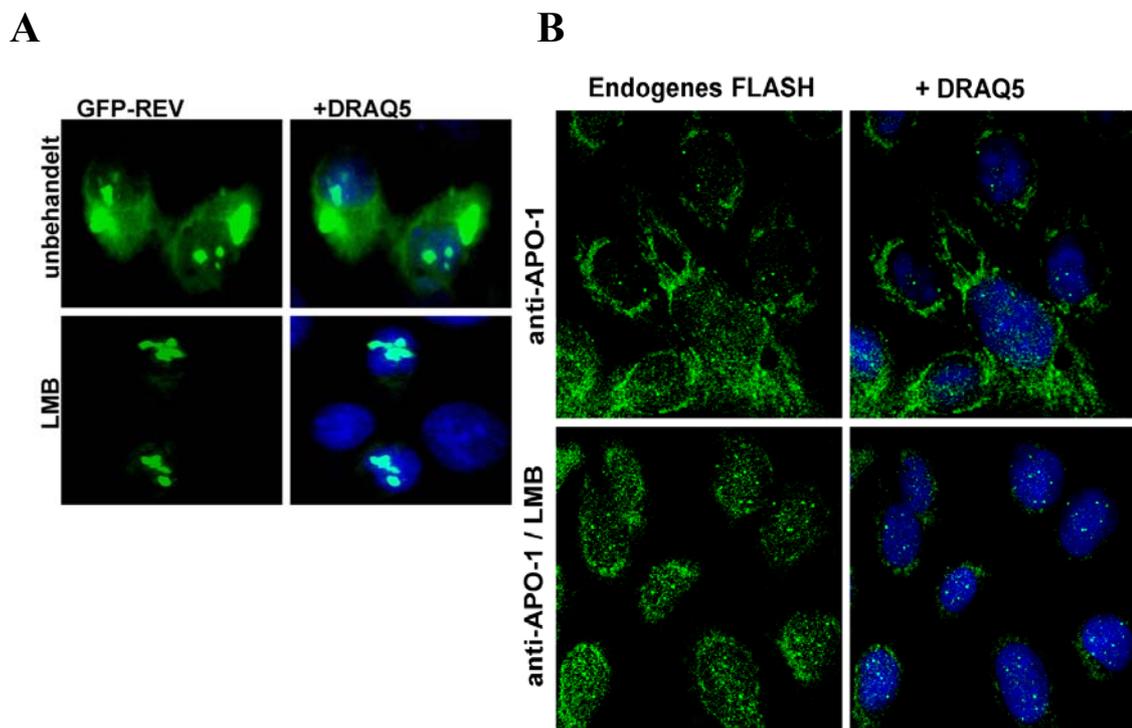


Abbildung 3.15. Die FLASH-Translokation während der CD95-Rezeptor vermittelten Apoptose ist CRM1-abhängig (A) HT1080-Zellen wurden mit GFP-Rev (HIV-1) Expressionskonstrukt transfiziert. Vierundzwanzig Stunden danach wurden die Zellen mit 10 nM LMB behandelt und mittels GFP-Marker bzgl. Lokalisation vom HIV-1 Rev-Protein mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach 90 min wurden die Zellen fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. **(B)** HT1080-Zellen wurden für 90 min mit 10 nM LMB vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 60 ng/ml anti-APO-1 Antikörper für 7 h stimuliert. Endogenes FLASH wurde durch indirekte, konfokale Immunfluoreszenz-mikroskopie nachgewiesen. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) detektiert.

FLASH interagiert mit Caspase-8 im Zytoplasma

Durch die ermittelte Translokation von FLASH in das Zytoplasma bei der CD95-vermittelten Apoptose stellte sich die die Frage nach dem Ort der Interaktion von FLASH und Caspase-8.

FLASH wurde erstmalig als Interaktionspartner der Pro-Caspase-8 durch Anwendung des Hefe 2-Hybrid Systems gefunden (Imai et al., 1999). Desweiteren wurde von der gleichen Gruppe berichtet, dass FLASH an der Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-8 an dem aktivierten CD95-Rezeptor Komplex (DISC) beteiligt ist. Um zu testen, ob FLASH in HT1080-Zellen mit der Pro-Caspase-8 am DISC oder im Zytoplasma interagiert, wurde folgendes Experiment durchgeführt. HT1080-Zellen wurden mit 700 ng/ml des anti-APO-1 Antikörpers für unterschiedliche Zeitspannen behandelt. Anschließend wurde der CD95-Rezeptor mit dem anti-APO-1 Antikörper im Zelllysat präzipitiert. Nach Abnahme der Sepharose-Kügelchen mit gebundenen Proteinen wurde aus dem Überstand die nicht an den CD95-Rezeptor gebundene Caspase-8 präzipitiert. Mittels Western Blot wurde einschließlich untersucht, ob der aktivierte CD95-Rezeptor die gesamte Pro-Caspase-8 in DISC rekrutiert und aktiviert, oder ob ein Teil der Pro-Caspase-8 nach der CD95-Rezeptor-Aktivierung im Zytoplasma aktiviert wird.

Die Pro-Caspase-8 ist in meisten Zellen in zwei Isoformen, Caspase-8A und -8B präsent. Beide Isoformen werden nach der Aktivierung des CD95-Rezeptors in die aktiven Untereinheiten p18 und p10 gespalten (Scaffidi et al., 1997).

Die Rekrutierung der Pro-Caspase-8 an den DISC findet sehr schnell, nach etwa 5-20 min, statt (Medema et al., 1997). Im Bezug auf die Menge der an dem CD95-Rezeptor aktivierten Pro-Caspase-8 wurden zwei unterschiedliche Zelltypen beschrieben (Scaffidi et al., 1998). In sogenannten Typ I-Zellen führt die Ligation des CD95-Rezeptors zur Aktivierung der fast kompletten Pro-Caspase-8 am DISC. In den sogenannten Typ II-Zellen wird nur eine geringe Menge der Pro-Caspase-8 am DISC aktiviert und der Rest im Zytoplasma. Weiterhin wurde herausgefunden, dass in Typ II-Zellen die p18 aktive Untereinheit der Caspase-8 schnell in die kleinere p16 Untereinheit prozessiert wird (Scaffidi et al., 1998). Die große Menge an der zytoplasmatischen, nicht Rezeptor gebundenen Pro-Caspase-8 nach der CD95-Rezeptor Aktivierung, sowie die schnelle Prozessierung der Pro-Caspase-8 in die kleine p16 Untereinheit lässt schließen, dass HT1080-Zellen dem Typ II Zellen zugehören (Abbildung 3.16). In Typ II Zellen kann die CD95-induzierte Apoptose durch die anti-apoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie

verhindert werden (Scaffidi et al., 1998). In unseren späteren Experimenten haben wir herausgefunden, dass die CD95-vermittelte Apoptose in HT1080-Zellen durch das adenovirale Bcl2-Homolog E1B 19K inhibiert werden kann (siehe ab Seite 80).

Weiterhin wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht, ob endogenes FLASH mit dem Rezeptorkomplex oder mit nicht-Rezeptor assoziierter Caspase-8 koimmunpräzipitiert. Nach der Induktion der CD95-vermittelten Apoptose in HT1080-Zellen konnte keine Assoziation von FLASH mit dem CD95-Rezeptor detektiert werden (Abbildung 3.16, unten). FLASH interagierte mit Pro-Caspase-8 im Zytoplasma der unbehandelten Zellen und nach einer 20-minütigen Aktivierung der CD95-vermittelten Apoptose.

Diese Ergebnisse, unterstützt durch Befunde über die Kollokalisierung von FLASH und Caspase-8 an Mitochondrien während der CD95-vermittelten Apoptose, lassen vermuten, dass die FLASH-Caspase-8 Interaktion in Typen II Zellen hauptsächlich im Zytoplasma und an Mitochondrien stattfindet.

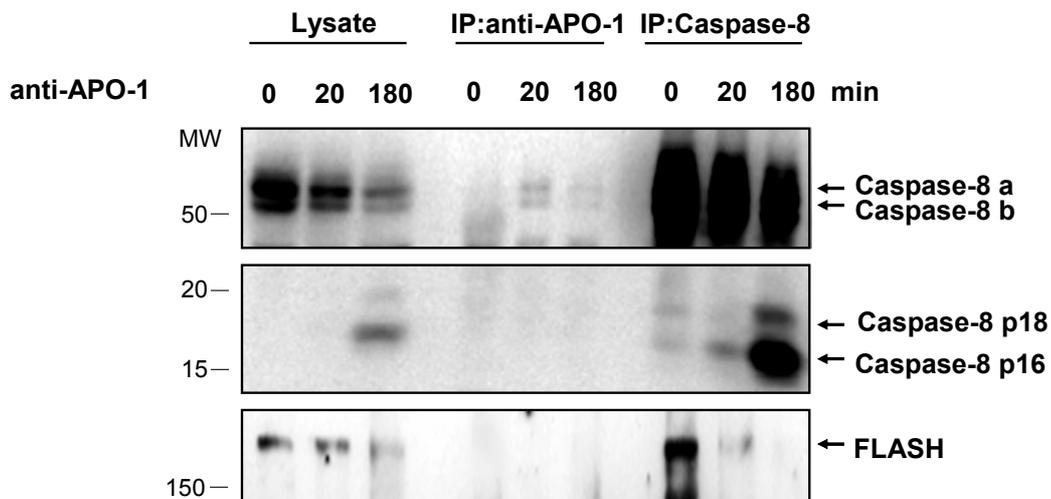


Abbildung 3.16. FLASH interagiert mit Caspase-8 im Zytoplasma. (A) Fünfunddreißig Millionen HT1080-Zellen wurden mit 700 ng/ml für 20 min oder 180 min behandelt. Zelllysate wurden im „APO-1 Puffer“ lysiert. Anschließend wurden CD95-Rezeptor mit den anti-APO-1 Antikörpern und dann die Caspase-8 mit den anti-Caspase-8 Antikörpern (C20) immunpräzipitiert (IP). Die aufgetragenen Lysate entsprechen 5% des Gesamtzelllysats, welches für die Immunpräzipitation verwendet wurde. Mittels Western Blot wurden inaktive und aktive Formen der endogenen Caspase-8 mit den anti-Caspase-8 C20 Antikörpern und FLASH mit den anti-FLASH-522 Antikörpern nachgewiesen. MW: Molekulargewichtsmarker (kDa).

Die CD95-vermittelte Apoptose induziert die Freisetzung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien

Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, rekrutiert der aktivierte CD95-Rezeptor nur eine geringe Menge an Pro-Caspase-8 in Typ II-Zellen. Diese Zellen benutzen einen alternativen, verstärkenden Signalweg, der über die Aktivierung der Pro-Caspase-8 im Zytoplasma mit nachfolgender Spaltung des Caspase-8-Substrats Bid verläuft und dessen Translokation und Eintauchen in die Mitochondrienmembran bewirkt. Dieses führt zur Veränderung der Membran-Permeabilität und zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, welche in unterschiedlichen Aspekten der Apoptose eine Rolle spielen, in das Zytosol (Deng et al., 1996).

Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung von *second mitochondria-derived activator of caspase* (Smac/DIABLO) nach der CD95-Rezeptor induzierten Apoptose. Einmal im Zytosol freigesetzt, fördert Smac/DIABLO die Caspase-Aktivierung durch Inhibition von IAPs (*inhibitor of Apoptosis*) (Sun et al., 2002)

Um zu testen, ob in HT1080-Zellen die CD95-vermittelte Aktivierung der Caspase-8 die Freisetzung von Smac/DIABLO auslösen kann, wurde folgendes Experiment gemacht. Die HT1080-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitspannen mit anti-APO-1 Antikörper induziert. Ein Teil der behandelten Zellen wurde mit dem Inhibitor der Caspase-8 zIETD-fmk vorbehandelt. Anschließend wurden die Mitochondrien und Zytosol durch differentielle Zentrifugationsschritte voneinander getrennt. Zur Kontrolle der Mitochondrienfraktion wurde im Western Blot das Mitochondrien-Protein Tim 23 detektiert, während in der zytosolischen Fraktion das zytoplasmatische GAPDH-Protein nachgewiesen wurde. Beide Fraktionen wurden auf die Anwesenheit der endogenen Caspase-8 und Smac/DIABLO getestet.

Wie aus der Abbildung 3.17 hervorgeht, wird die Caspase-8 an den Mitochondrien und im Zytosol aktiviert, wobei in beiden Fraktionen die Aktivierung mittels zIETD-fmk inhibiert wurde. In der zytosolischen Fraktion wird der Großteil der Caspase-8 in ersten 4 h der CD95-vermittelten Apoptose-Induktion aktiviert. Dagegen verläuft die Aktivierung der mitochondrialen Caspase-8 proportional zur Behandlungsdauer.

Diese fortschreitende Aktivierung der Caspase-8 induziert die Freisetzung von Smac/DIABLO in das Zytosol. Dafür spaltet die aktivierte Caspase-8 das Bid-Protein, welches mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax oder Bak interagiert und die Freisetzung von Smac/DIABLO induziert (Deng et al., 1996).

Die Tatsache, dass der Caspase-8 Inhibitor zIETD-fmk die Freisetzung von Smac/DIABLO fast vollständig verhindert, spricht dafür, dass dieser mitochondriale apoptotische Signalweg spezifisch durch die CD95-vermittelte Caspase-8-Aktivierung induziert wird.

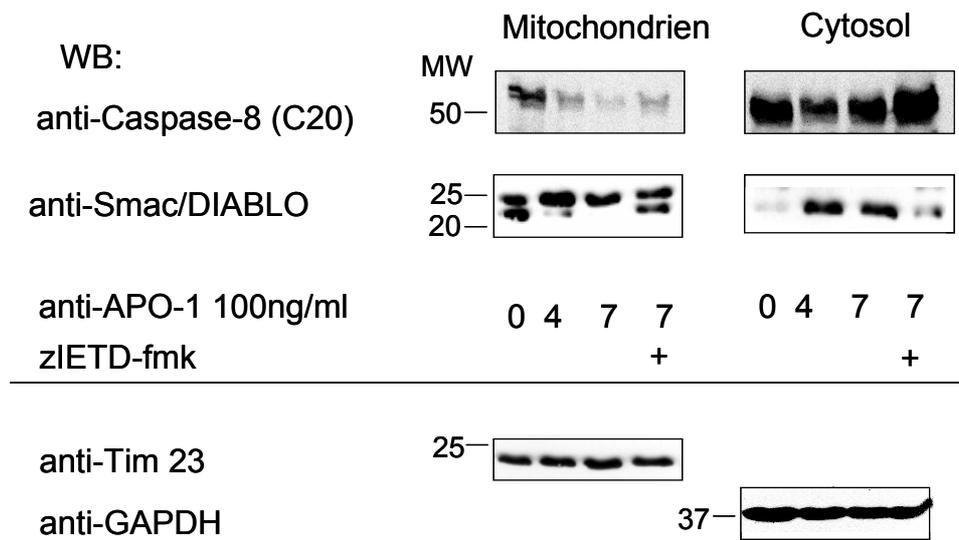


Abbildung 3.17. Freisetzung von Smac/DIABLO in das Zytosol durch CD95-Rezeptor induzierte Apoptose. HT1080-Zellen wurden mit 100 ng/ml des anti-APO-1 Antiköpers für unterschiedliche Zeitspannen stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde für 1 h mit 50nM zIETD-fmk vorbehandelt. Anschließend wurden mittels zellulärer Fraktionierung Mitochondrien und Zytosol isoliert. Durch SDS-PAGE und Western Blot wurden die endogenen Caspase-8-Proteine mittels anti-Caspase-8 C20 Antikörpern und Smac/DIABLO-Proteine mittels anti-Smac/DIABLO Antikörpern dargestellt. Nachweis von Mitochondrien-spezifischem Protein Tim23 mittels anti-Tim23 Antikörpern und Zytosol-spezifischem Protein GAPDH mittels anti-GAPDH Antikörpern diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen. MW: Molekulargewichtsmarker (kDa).

DAS ADENOVIRALE PROTEIN E1B 19K INHIBIERT CD95-VERMITTELTE APOPTOSE DURCH DIE INTERAKTION MIT FLASH AN DEN MITOCHONDRIEN

In HT1080^{E1B19K}-Zellen werden FLASH und Caspase-8 von dem adenoviralen, anti-apoptotischen E1B 19K-Protein an die Mitochondrien rekrutiert

Untersuchungen im letzten Jahrzehnt ergaben, dass eine Reihe von Viren in der Lage sind, durch die Expression von anti-apoptotischen Genen die Apoptose in der Wirtszelle zu inhibieren.

Das adenovirale E1B 19K-Protein inhibiert die CD95-vermittelte Apoptose nach der Aktivierung des Rezeptors und vor der Aktivierung der Caspase-8 (Perez and White, 1998). Vor wenigen Jahren wurde von der Interaktion zwischen FLASH und E1B 19K berichtet (Imai et al., 1999). Mittels dieser Interaktion ist E1B 19K in der Lage, die Aktivierung der Caspase-8 und so die Weiterleitung des apoptotischen Signals zu verhindern.

Meine bisherigen Experimente zeigten, dass FLASH nach der Ligation des CD95-Todesrezeptors, in der Abhängigkeit der Caspase-8-Aktivierung, in das Zytoplasma bzw. an die Mitochondrien transloziert. Die Tatsache, dass E1B 19K das FLASH-Protein bindet und die CD95-vermittelte Apoptose inhibiert, führt zur Frage nach dem Einfluss von E1B 19K auf die Lokalisation von FLASH während der Apoptose. Um dies zu untersuchen, wurden stabile Zelllinien HT1080^{E1B 19K} und HT1080^{pCDNA3} hergestellt. Dafür wurden die HT1080-Zellen mit einem E1B 19K-Expressionsvektor oder dem Vektor-pCDNA3 transfiziert und anschließend der Selektion mit G418 unterzogen. Die weiter expandierten Einzelklone wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die stabile Expression von E1B 19K untersucht. Der in der Abbildung 17A dargestellte Klon wurde für weitere Studien verwendet.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von endogenem FLASH in unbehandelten oder mit anti-APO-1 Antikörper behandelten HT1080^{E1B 19K}-Zellen untersucht. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass E1B 19K, welches perinukleär lokalisiert (Perez and White, 1998) in der Lage ist, FLASH unabhängig von der CD95-

vermittelten Apoptose Induktion zu rekrutieren (Abbildung 3.18B). Im Gegensatz dazu lokalisierte FLASH in unbehandelten HT1080^{pCDNA3}-Zellen partiell im Zytoplasma und im Zellkern bzw. in Kerndomänen (vergleiche Abbildung 3.14B, oben).

Durch die Tatsache, dass E1B 19K-homologe Mitglieder der Bcl-2-Familie an den Mitochondrien lokalisieren (Adams and Cory, 1998) stellte sich die Frage nach der eventuellen Lokalisation von E1B 19K an Mitochondrien. Um dies zu untersuchen, wurden Mitochondrien in HT1080^{E1B 19K}-Zellen mit Mitotracker Red markiert. Die Lokalisation von E1B 19K und Mitochondrien wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie aus den Abbildungen 3.18C hervorgeht, lokalisiert das adenovirale E1B 19K-Protein hauptsächlich an den Mitochondrien in den HT1080^{E1B 19K}-Zellen.

In der Veröffentlichung von Imai und Kollegen wurde gezeigt, dass E1B 19K- Protein in der Lage ist, durch die Bindung an FLASH die CD95-vermittelte Aktivierung von Caspase-8 zu verhindern (Imai et al., 1999). Weil FLASH mit der Caspase-8 interagiert, stellte sich die Frage nach der Lokalisation von der Caspase-8 in den stabilen HT1080^{E1B 19K}-Zellen. Die Untersuchung mittels indirekter Immunfluoreszenz-mikroskopie ergab, dass endogene Caspase-8, welche in HT1080-Zellen eine diffuse Verteilung im Zytoplasma aufweist (vergleiche Abbildung 3.21, oben), an die Mitochondrien rekrutiert wird (Abbildung 3.18C).

Somit kann zusammengefasst werden, dass das adenovirale E1B 19K-Protein nach der stabilen Expression in den HT1080-Zellen hauptsächlich an den Mitochondrien lokalisiert und in der Lage ist, FLASH und Caspase-8 zu rekrutieren.

Die Behandlung von HT1080^{E1B 19K}- und HT1080^{pCDNA3}-Zellen mit dem agonistischen anti-APO-1 Antikörper (100 ng/ml) für 7h ergab, dass die E1B 19K-exprimierende Zellen resistent gegen der CD95-vermittelten Apoptose sind (Daten nicht gezeigt). Weil E1B 19K die Aktivierung von Caspase-8 durch die Interaktion mit FLASH verhindert, sind die Befunde über die Lokalisierung von FLASH und Caspase-8 in E1B 19K-exprimierenden Zellen wichtig für die Aufklärung des anti-apoptotischen E1B 19K-Mechanismus. In weiterem Experiment wurde der Mechanismus der Apoptose-Inhibition durch E1B 19K biochemisch näher untersucht.

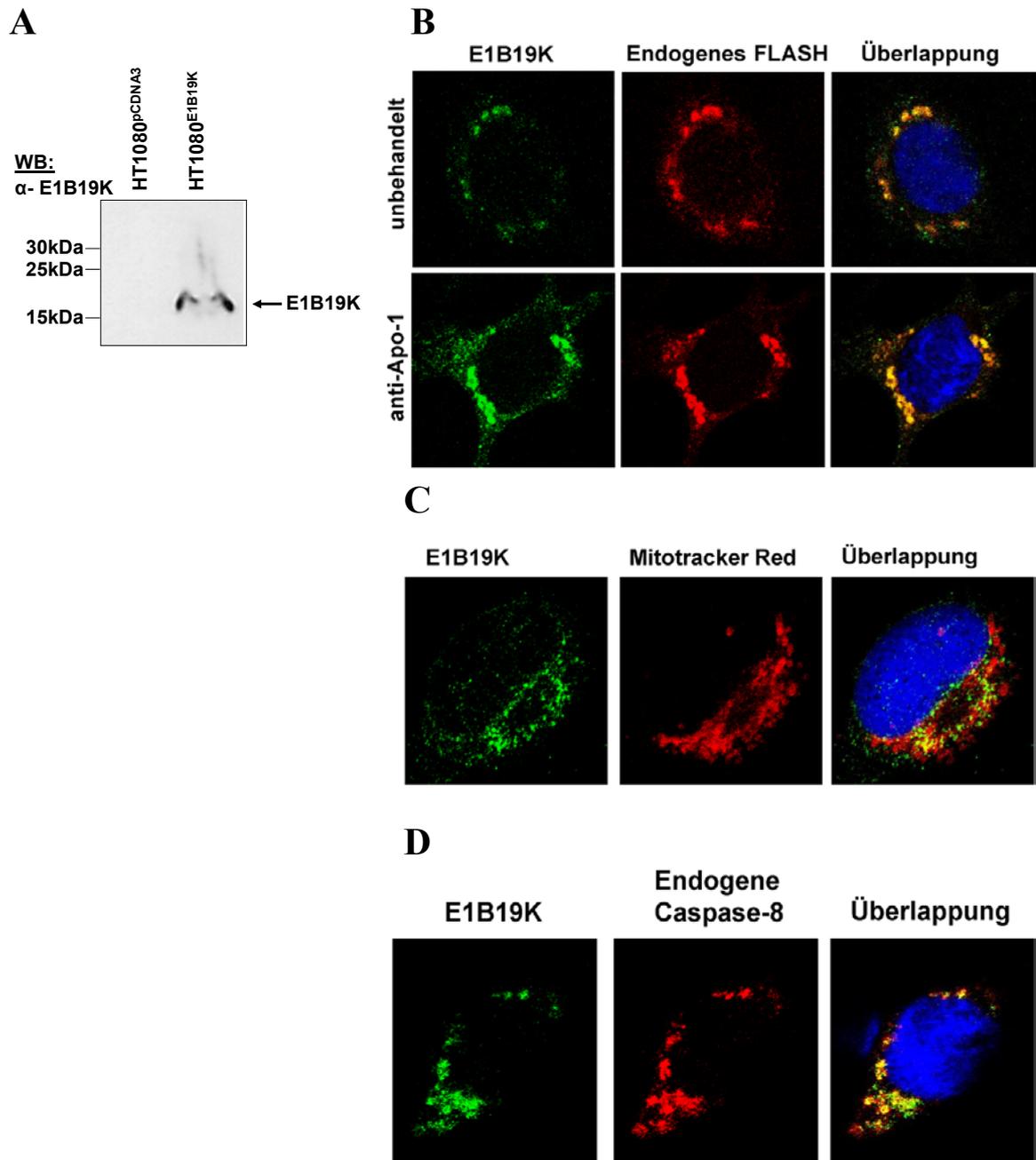


Abbildung 3.18. E1B 19K rekrutiert FLASH und Caspase-8 an die Mitochondrien in HT1080^{E1B 19K} Zellen. (A) HT1080^{pCDNA3} und HT1080^{E1B 19K}-Zellen wurden auf die Expression des E1B 19K-Proteins mittels Western Blot analysiert. (B) HT1080^{E1B 19K} Zellen wurden für 7 h mit 100 ng/ml anti-APO-1 Antikörper behandelt. Die Lokalisation von endogenem FLASH und E1B 19K in unbehandelten und behandelten Zellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. (C) Mitochondrien der HT1080^{E1B 19K}-Zellen wurden 20 min vor der Zellfixierung mit 50 nM Mitotracker Red angefärbt. Anschließend wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie die Lokalisation von E1B 19K untersucht. (D) Die Lokalisation von endogener Caspase-8 und von E1B 19K in HT1080^{E1B 19K}-Zellen. (B,C,D) Die Überlappung zweier Fluoreszenzsignale wurde im Gelb dargestellt. Die nukleäre DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) detektiert.

Die Aktivierung der Caspase-8 wird im Komplex von FLASH-E1B 19K-Caspase-8 verhindert

Die Tatsache, dass E1B 19K, FLASH und Caspase-8 an die Mitochondrien rekrutiert, warf die Frage nach dem Mechanismus der Inhibition der Apoptose durch das adenovirale E1B 19K-Protein auf. Um zu testen, ob FLASH Interaktion mit E1B 19K deren Bindung an die Caspase-8 verhindert, wurde folgendes Experiment gemacht. In 293T-Zellen wurden E1B 19K und FLAG-FLASH Expressionsvektoren und die proteolytisch-inaktive Form von GFP-Caspase-8 (C360S)-Fusionsvektor überexprimiert. Anschließend wurde FLASH immunpräzipitiert und mittels Western Blot wurde die Bindung von E1B 19K und Caspase-8 (C360S) an FLASH untersucht. Wie in Abbildung 3.19 links darstellt, bindet E1B 19K spezifisch an FLASH, wobei diese Interaktion die Caspase-8-Bindung an FLASH nicht verhindert. Um die Spezifität der Interaktion zwischen FLASH und Caspase-8 zu bestätigen, wurden die CV1-Zellen, die kein adenovirales Protein exprimieren, mit Expressionsvektoren für FLAG-FLASH und GFP-Caspase-8 (C360S) transfiziert. Das FLASH-Protein wurde mittels des FLAG-Antikörpers immunpräzipitiert, wobei Caspase-8 koimmunpräzipitiert werden konnte (Abbildung 3.19 rechts).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass E1B 19K nicht mit Caspase-8 um die Bindung an FLASH konkurriert. Dennoch ist E1B 19K in der Lage die Caspase-8-Aktivierung in der CD95-vermittelten Apoptose zu verhindern. Die Inhibition der Caspase-8-Aktivierung findet im E1B 19K-FLASH-Caspase-8-Komplex statt, in welchem es wahrscheinlich durch Konformationsänderung zur Verhinderung der Caspase-8-Aktivierung kommt.

Die Ausbildung des E1B 19K-FLASH-Caspase-8-Komplexes an den Mitochondrien ist ein neuer, wichtiger Mechanismus, durch den adenovirale Proteine, wie E1B 19K, ihre anti-apoptotische Funktionen ausüben.

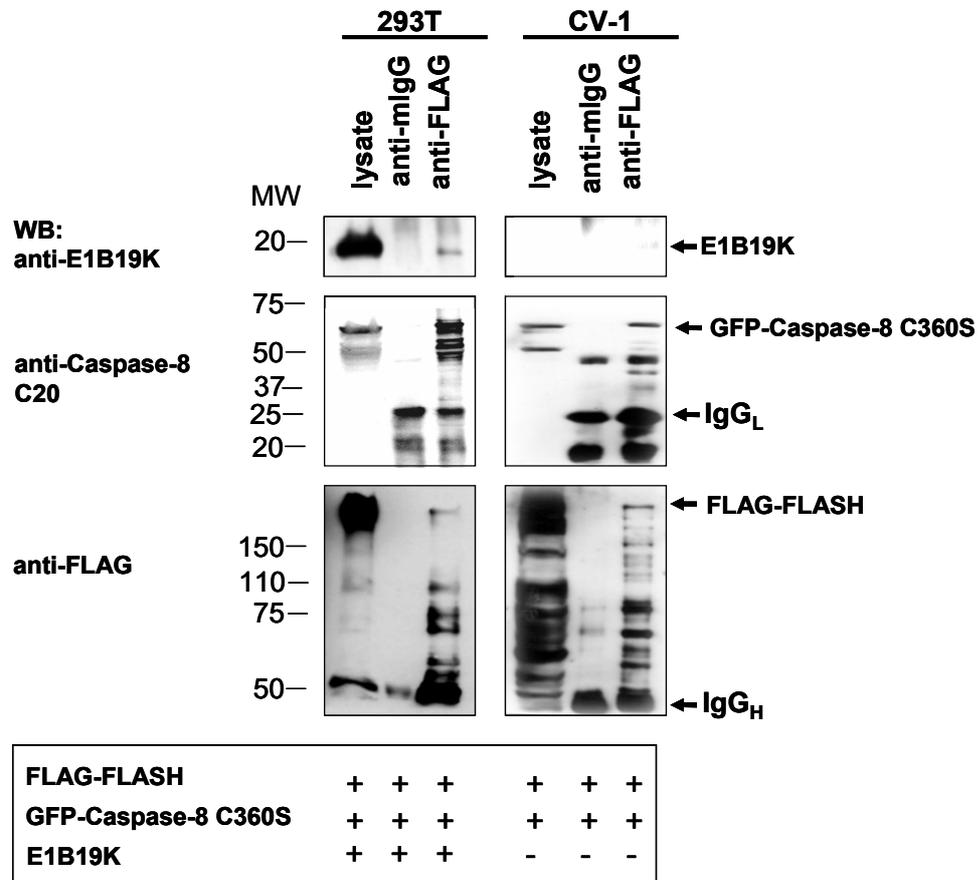


Abbildung 3.19. FLASH bildet einen Komplex mit E1B 19K und Caspase-8. (links) In 293T-Zellen wurden FLAG-FLASH-, E1B 19K- und GFP-Caspase-8 (C360S) mittels Expressionsvektoren transient exprimiert. Achtundvierzig Stunden danach wurde FLASH aus dem Zelllysate mit Hilfe der anti-FLAG-Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurde im Western Blot (WB) FLAG-FLASH mit anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen. E1B 19K wurde mit anti-E1B 19K Antikörpern und GFP-Caspase-8 (C360S) mit anti-Caspase-8 C20 Antikörpern nachgewiesen. **(rechts)** CV-1-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und GFP-Caspase-8 (C360S) Expressionsvektoren transfiziert. Anschließend wurde FLASH, wie in der Abbildung links, präzipitiert und im Western Blot detektiert. GFP-Caspase-8 (C360S) wurde, wie oben beschrieben, nachgewiesen. Kontroll-Immunpräzipitationen wurden mit Maus-IgG gemacht. Die Positionen der schweren IgG-Ketten (IgG_H) des präzipitierten Antikörpers sind mit einem Pfeil markiert. Die separat aufgetragenen Lysate entsprechen 20% des Gesamtzelllysats, welches für die Immunpräzipitation verwendet wurde. MW: Molekulargewichtsmarker (kDa).

FLASH BILDET TODESEFFEKTOR-FILAMENTE

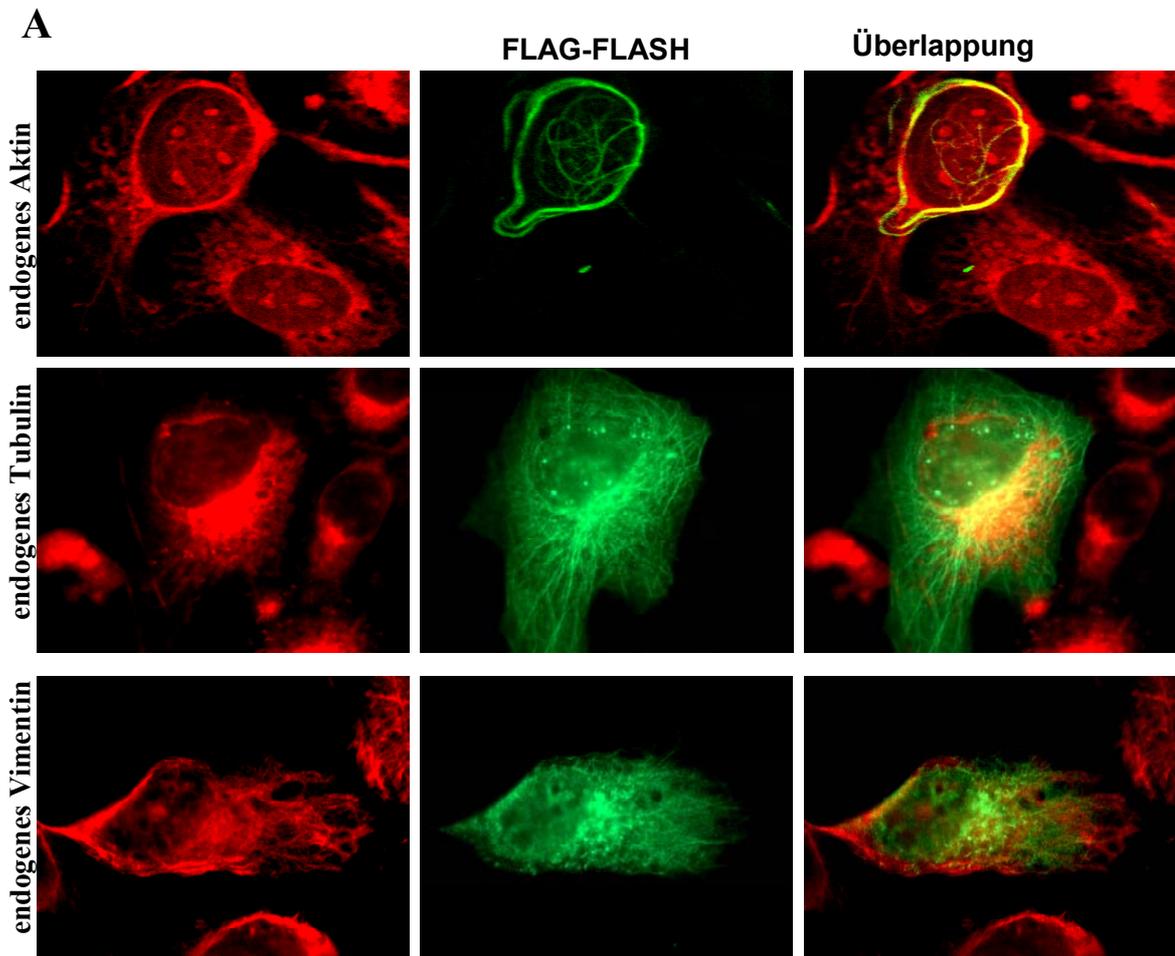
Zytoplasmatisches FLASH führt zur Ausbildung von Todeseffektor-Filamenten (*Death effector filaments, DEFs*)

Meine Untersuchung zur Lokalisation von überexprimierten FLAG-FLASH in HT1080- oder in 293T-Zellen ergab, dass FLASH in der Mehrzahl der Zellen in Kerndomänen lokalisiert. Interessanterweise jedoch lokalisierte FLASH in einer Minderzahl der Zellen in filamentösen zytoplasmatischen Strukturen. Um diese Strukturen näher zu untersuchen, wurde FLAG-FLASH mit entsprechendem Expressionsvektor in HT1080-Zellen exprimiert. Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die filamentöse Lokalisation von FLASH mit zytoskeletalen Proteinen wie Aktin, Tubulin oder einem Vertreter der intermediären Filamente, dem Vimentin, verglichen. Die Analyse ergab keine Überlappung von FLASH-Filamenten mit Aktin und Tubulin. Die Vimentin-Filamente ähnelten in ihrer Form zwar den FLASH-Filamenten, eine Kolo-kalisation könnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 3.20A).

Kürzlich wurde berichtet, dass die CARD-Domäne (*caspase recruitment domain*) des Bcl10-Proteins bei der Überexpression zytoplasmatische Filamente bildet. Die CARD-Domäne ist für die Aktivierung des NF-kB-Proteins wichtig. CARD-Filamente überlappen teilweise mit Tubulin und Aktin wobei diese Interaktion mit dem Zytoskeletton wichtig für den Aufbau der Filamente ist (Guiet and Vito, 2000). Da auch FLASH eine Rolle bei der Aktivierung von NF-kB spielt (Choi et al., 2001) wurde im folgenden Experiment getestet, ob FLASH-Filamente mit CARD-Filamenten assoziieren. Dafür wurde die CARD-Domäne des Bcl10-Proteins mit FLAG-FLASH mit Hilfe von Expressionsvektoren in HT1080-Zellen exprimiert. Eine detaillierte Untersuchung mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ergab keine Überlappung der beiden Filament-Typen (Abbildung 3.20B).

Weiterhin wurde eine Gruppe von Filamenten, die in der Apoptose eine Rolle spielen, beschrieben, die sogenannten Todeseffektor-Filamente (*Death-effector Filaments, DEFs*). Es handelt sich dabei um zytoplasmatische Strukturen, die durch Überexpression von Proteinen mit einer Todeseffektor-Domäne (DED) gebildet werden. Diese Filamente zeigen keine Überlappung mit Aktin oder Tubulin, und eine nur sehr geringe Überlappung

mit den intermediären Filamenten (Siegel et al., 1998). Die Überexpression von DED-haltigen Proteinen, wie z.B. von FADD, führt zur Rekrutierung von Pro-Caspase-8, wobei anschließend eine, vom Todesrezeptor unabhängige, Apoptose ausgelöst wird (Siegel et al., 1998). Die Tatsache, dass FLASH mittels seiner DED-ähnlichen Domäne (DRD) mit der Pro-Caspase-8 interagiert (Imai et al., 1999), war Anlass zu testen, ob FLASH-Filamente mit DEFs überlappen. Dafür wurden HT1080-Zellen mit FADD und FLAG-FLASH transfiziert. Um die Aktivierung der Apoptose durch die FADD-Expression zu verhindern, wurde das CrmA-Protein aus dem Kuhpocken Virus, welches die Aktivierung von Caspase-8 inhibiert, mit entsprechendem Expressionsvektor kotransfiziert. Anschließend wurde die Lokalisation von FADD und FLASH untersucht. Wie die Abbildung 3.20C zeigt, überlappt die Mehrheit der FLASH-Filamente mit den Todeseffektor-Filamenten von FADD.



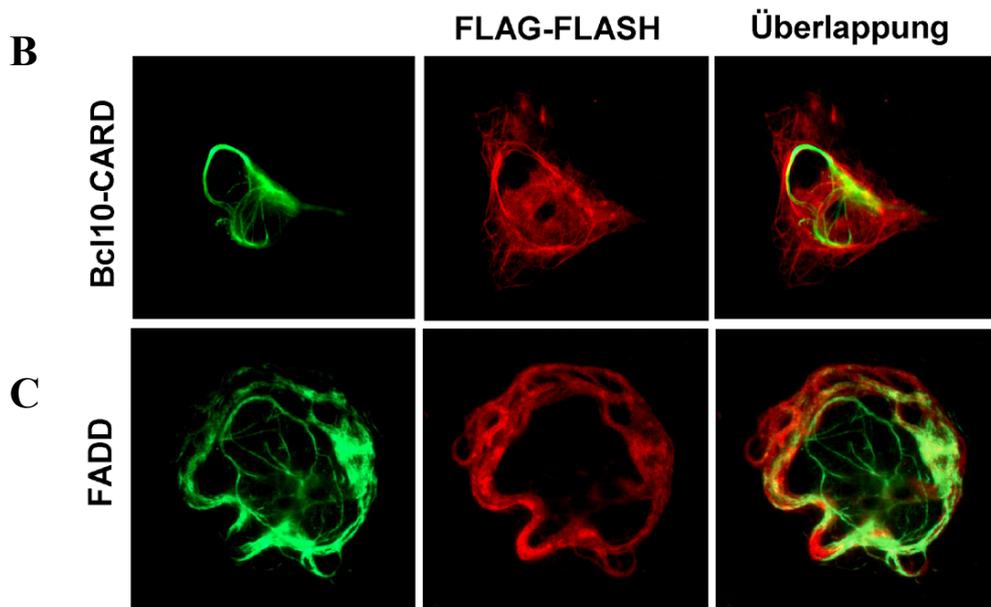


Abbildung 3.20. FLASH bildet Todeseffektor-Filamente. (A) HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. Achtundvierzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie die Lokalisation von FLAG-FLASH und endogenem Aktin (oben), endogenem Tubulin (mitte) oder endogenem Vimentin (unten) mit spezifischen Antikörpern untersucht. (B) HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH- und Bcl10-CARD-, oder (C) FADD-Expressionsvektoren transfiziert und 48 h danach wurden die jeweiligen Proteine, wie oben beschrieben, subzellulär lokalisiert.

FLASH rekrutiert endogene Pro-Caspase-8 in Todeseffektor-Filamente

Eine Reihe von Proteinen mit Todeseffektor-Domäne lokalisieren in den Todeseffektor-Filamenten und sind in der Lage, Pro-Caspase-8 zu rekrutieren und zu aktivieren (Siegel et al., 1998). Die Untersuchung der FLASH-Filamente ergab, dass FLASH-Filamente mit FADD-Filamenten bzw. mit Todeseffektor-Filamenten assoziieren (Abbildung 3.20 C). Ob auch FLASH in der Lage ist, die endogene Pro-Caspase-8 in seine Filamente zu rekrutieren, wurde im folgenden Experiment untersucht.

HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. Achtundvierzig Stunden danach wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Lokalisation von FLAG-FLASH und endogener Pro-Caspase-8 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Pro-Caspase-8, welche sonst im Zytoplasma bzw. in Mitochondrien lokalisiert, in FLASH-DEFs rekrutiert wurde (Abbildung 3.21).

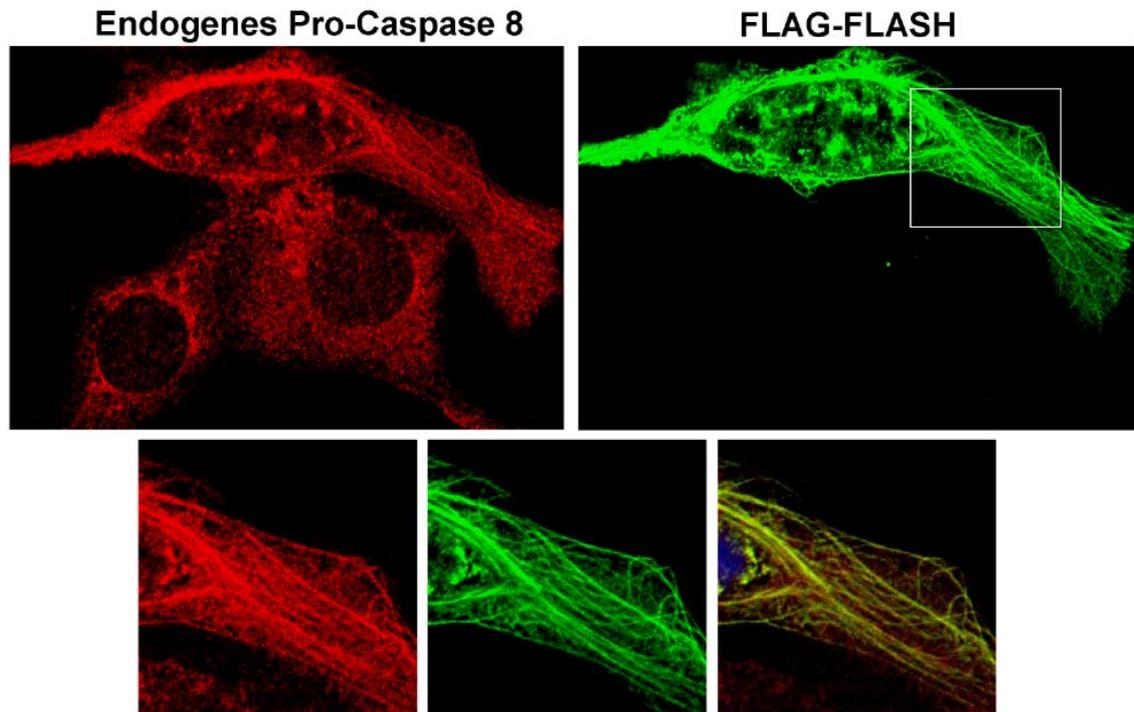


Abbildung 3.21. Lokalisation von FLASH und der endogenen Pro-Caspase-8. HT1080-Zellen wurden mit einem FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. Die Lokalisation von FLASH und der endogenen Caspase-8 wurde mit Hilfe Immunfluoreszenzmikroskopie und der anti-Caspase-8 C1 und anti-FLAG Antikörpern ermittelt. Die Abbildungen unten stellen einen Teil der FLASH- und Caspase-8-Filamente in vergrößerter Form dar.

FLASH Lokalisation in Todeseffektor-Filamenten korreliert mit dessen Funktion bei der Apoptose

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass FLASH nach der Expression in HT1080-Zellen in Kerndomänen und in Todeseffektor-Filamenten (DEFs) lokalisiert. Die unterschiedlichen Aufenthaltsorte warfen die Frage nach einer möglichen Verbindung zwischen der FLASH-Lokalisation und seinen Funktionen in der Zelle auf.

Die Todeseffektor-Filamente wurden als zytoplasmatische Strukturen beschrieben, welche eine Todesrezeptor-unabhängige Apoptose auslösen (Siegel et al., 1998). Um zu testen, ob Todeseffektor-Filamente von FLASH einen pro-apoptotischen Charakter besitzen, wurde folgendes Experiment durchgeführt.

HT1080-Zellen wurden mit einem FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert und 48 h danach die FLASH-Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Analyse ergab, dass FLASH in den meisten Zellen in Kerndomänen

lokalisiert. Weiterhin lokalisierte FLASH in einer geringeren Anzahl von Zellen in Todeseffektor-Filamenten.

Um zu untersuchen ob FLASH-DEFs eine pro-apoptotische Funktion aufweisen, wurde Mitotracker Red als pro-apoptotischer Marker verwendet. Mitotracker Red wird in lebenden Zellen nur von intakten, respiratorisch aktiven Mitochondrien aufgenommen. Als Folge der Apoptose kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und anschließend zur Hemmung der mitochondrialen Atmungskette (Liu et al., 1996). Infolgedessen werden pro-apoptotische Zellen durch eine reduzierte oder abwesende Färbung von Mitochondrien mittels Mitotracker Red detektiert. Die Analyse von FLAG-FLASH exprimierenden HT1080-Zellen zeigte, dass die Lokalisation von FLASH in DEFs zur Apoptose führte. In den Zellen mit FLASH in Kerndomänen konnten keine Apoptoseanzeichen festgestellt werden (Abbildung 3.22).

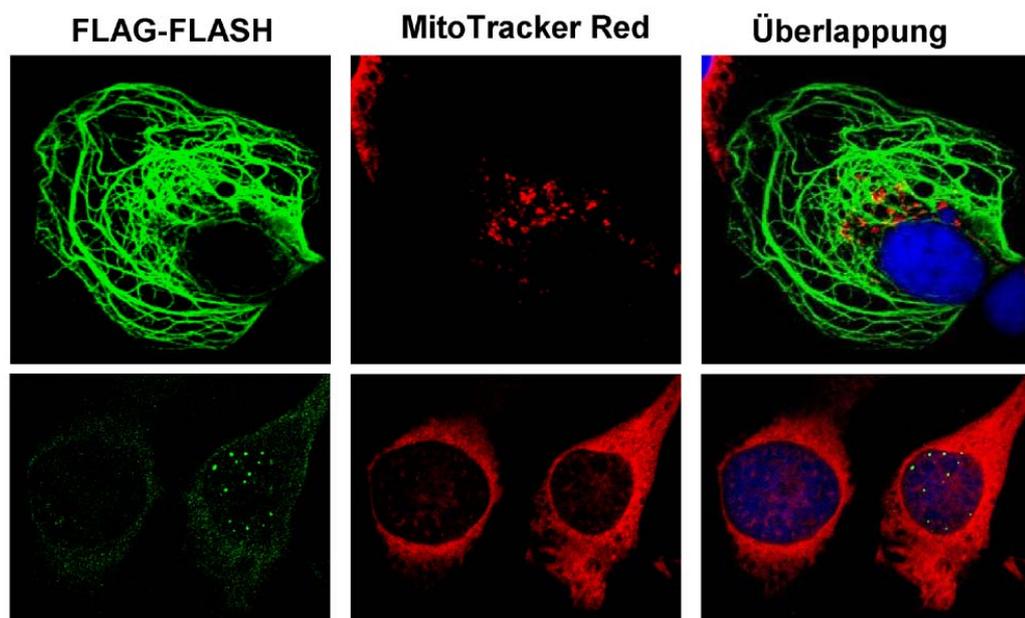


Abbildung 3.22. Effekt von FLASH-DEFs auf die mitochondriale respiratorische Aktivität. HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. Achtundvierzig Stunden danach wurden die Zellen mit 50 nM Mitotracker Red behandelt, um die respiratorisch aktiven Mitochondrien zu detektieren. Nach 20 min wurden die Zellen fixiert und anschließend wurde FLASH mittels Fluoreszenzmikroskopie und der anti-FLAG Antikörpern analysiert. Die Zellkern-DNA wurde durch Färbung mit DRAQ5 (blau) detektiert.

Exogen exprimiertes FLASH rekrutiert Mitochondrien in Todeseffektor-Filamente

Die nähere Untersuchung der Mitochondrien-Aktivität in Relation zur FLASH-Lokalisation in DEFs ergab, dass die Abnahme der mitochondrialen-respiratorischen Funktion vom Expressionsniveau der FLASH-DEFs abhängig ist. In HT1080-Zellen mit starker FLASH-DEFs-Expression konnte nur eine schwache Präsenz oder gar keine intakte Mitochondrien festgestellt werden. In diesen Zellen wurde ebenfalls die chromosomale Kondensation, ein weiteres Kennzeichen der Apoptose, mittels Kern-DNA-Färbung mit DAPI oder DRAQ5 evident gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung von Zellen mit wenigen FLASH-DEFs ergab, dass die noch intakten Mitochondrien mit Todeseffektor-Filamenten von FLASH assoziieren (Abbildung 3.23). In der Abbildung 3.23 unten dargestellte Aufnahmen zeigen einen Ausschnitt der untersuchten Zelle, in der die Rekrutierung von Mitochondrien in die FLASH-DEFs deutlich zu sehen ist.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass FLASH mittels seiner Todeseffektor-Filamente in der Lage ist, endogene Pro-Caspase-8 zu rekrutieren und zu aktivieren sowie parallel mit Mitochondrien zu assoziieren. Dieses Ergebnis deutet auf eine proapoptische Funktion von FLASH hin, in welcher FLASH an der Aktivierung von Pro-Caspase-8 und der Fortsetzung des mitochondrialen apoptotischen Signalweges beteiligt ist.

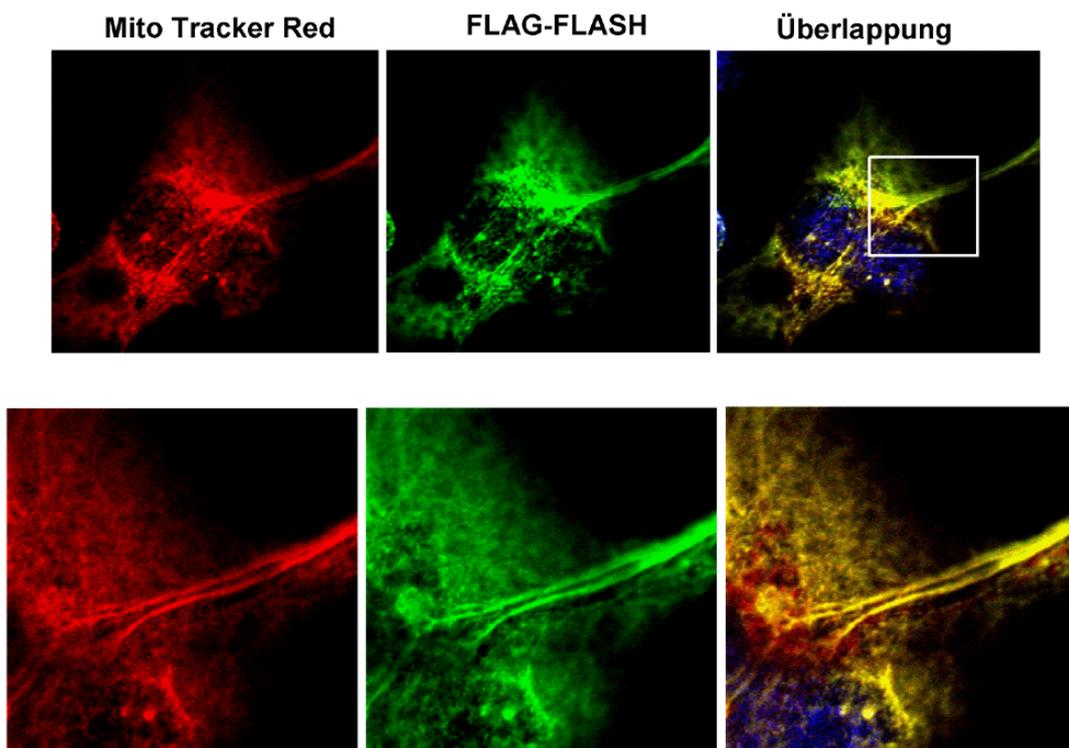


Abbildung 3.23. Assoziation zwischen FLASH-DEFs und Mitochondrien. HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor transfiziert. 20 min vor der Zellfixierung wurden die Mitochondrien mit 50 nM Mitotracker Red angefärbt und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Die nukleäre DNA wurde mit DRAQ5 (blau) nachgewiesen. Das dritte Bild zeigt die Überlappung beider Fluoreszenzfarbsignale (Gelb). Die unteren Abbildungen zeigen einen Ausschnitt der Zelle, die mit einem konfokalem Mikroskop näher untersucht wurde.

Expression des adenoviralen E1B 19K-Proteins führt zur Auflösung der FLASH-DEFs

Peres et al. berichteten im Jahr 1998, dass die Expression des adenoviralen E1B 19K-Proteins in den FADD-transfizierten Zellen zur Auflösung von FADD Todeseffektor-Filamenten führt. Demzufolge kolokalisierte das FADD-Protein mit E1B 19K in einem perinukleären Bereich (Perez and White, 1998).

Um zu untersuchen, ob das adenovirale E1B 19K-Protein einen Einfluss auf die FLASH-Lokalisation ausüben kann, wurden die HT1080-Zellen mit FLAG-FLASH- und E1B 19K mit entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Die Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ergab, dass E1B 19K, wie berichtet (Perez and White, 1998) im Zytoplasma und perinukleär lokalisiert (Abbildung 3.24). Das FLASH-Protein zeigte zwei unterschiedlichen Lokalisierungsmuster in E1B 19K-exprimierenden Zellen. In einigen Zellen überlappte FLASH teilweise mit E1B 19K im perinukleären Bereich und in anderen Zellen lokalisierte FLASH im Kern bzw. in Kerndomänen (Abbildung 3.24). Eine Lokalisation von FLASH in DEFs in E1B 19K-exprimierenden Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Expression von E1B 19K zur Auflösung der FLASH-DEFs und zur Rekrutierung von FLASH in den perinukleären Raum führt. Die Kern- und Kerndomänen-Lokalisation von FLASH wird nicht durch die Präsenz des E1B 19K-Proteins verändert. Das ist ein Hinweis dafür, dass E1B 19K möglicherweise durch Auflösung der FLASH-DEFs die Apoptose blockieren kann.

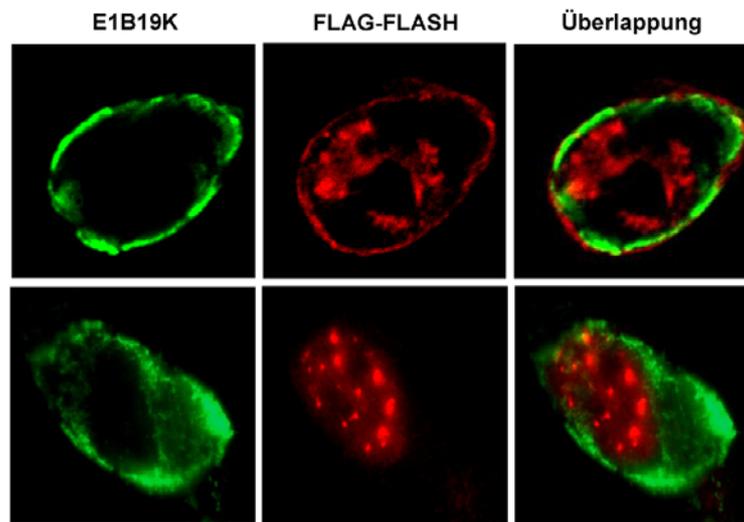


Abbildung 3.24. Expression von E1B 19K führt zur Auflösung von FLASH-DEFs. HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und E1B 19K mit entsprechenden Expressionsvektoren für 48 h transfiziert. Die Lokalisation von FLASH und E1B 19K wurde durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und den anti-FLAG Antikörpern bzw. anti-E1B 19K Antikörpern ermittelt.

FLASH-DEFs verändern die subzelluläre Lokalisation von Sp100, nicht aber die von PML

Die Tatsache, dass FLASH und Sp100 interagieren, führte zur Frage über den Einfluss von FLASH Todeseffektor-Filamenten auf die Sp100-Lokalisation. Die bisherigen Analysen ergaben, dass FLASH mit Sp100 in PML-Kerndomänen partiell kolokalisiert. Induktion der CD95-vermittelten Apoptose mittels des agonistischen anti-APO-1-Antikörpers ergab weiterhin, dass FLASH und Sp100 vom Kern in das Zytoplasma translozieren. Infolgedessen sollte die Analyse der Sp100-Lokalisation in Zellen mit FLASH Todeseffektor-Filamenten in Richtung auf eine mögliche Rolle von Sp100 in DEFs-induzierter Apoptose untersucht werden.

HT1080-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-FLASH transfiziert und anschließend auf die Lokalisation von FLASH und endogenem Sp100 bzw. PML untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass endogenes Sp100 in FLASH-DEFs-exprimierenden Zellen nicht wie in Kontrollzellen in PML-Kerndomänen lokalisiert, sondern eine schwach-detectierbare zytoplasmatische Lokalisation aufweist (Abbildung 3.25, oben). Ob Sp100 im Zytoplasma mit FLASH-DEFs assoziiert, ist aufgrund des schwachen Signals nicht eindeutig belegbar. Eine detaillierte Untersuchung ergab, dass Sp100 in einigen Zellen teilweise im Zytoplasma mit FLASH kolokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der Lokalisation von endogenem PML in Zellen mit FLASH-DEFs ergab, dass PML nach wie vor in PML-Kerndomänen lokalisiert (Abbildung 3.25, unten). Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass FLASH-Lokalisation in Todeseffektor-Filamenten spezifisch zur Veränderung der Sp100-Lokalisation führt.

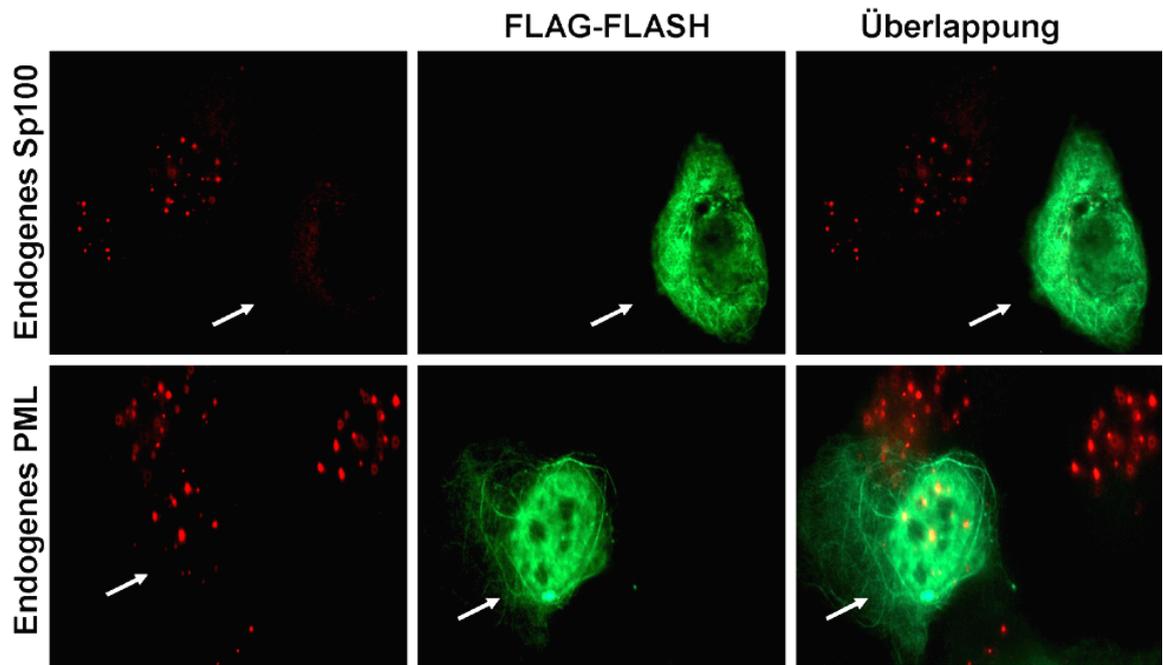


Abbildung 3.25. HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH Expressionsvektor für 48 h transfiziert. Die Lokalisationen von endogenem Sp100 (oben) bzw. endogenem PML (unten) und FLASH wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie und den anti-Sp26-, anti-PML- und anti-FLAG-Antikörpern analysiert. Die Pfeile markieren die Zellen, in welchen FLASH in DEFs lokalisiert.

SP100 REGULIERT FLASH-LOKALISATION UND CD95-VERMITTELTE APOPTOSE

Verminderte Expression des Sp100-Proteins führt zur verstärkten FLASH-Lokalisation im Zytoplasma

Meine bisherigen sowie von anderen Arbeitsgruppen berichteten Daten deuten darauf hin, dass FLASH in der CD95-vermittelten- und in der zytoplasmatischen, Rezeptor-unabhängigen Apoptose eine wesentliche Rolle spielt (Imai et al., 1999).

Durch gefundene Interaktion zwischen Sp100 und FLASH sowie der Tatsache, dass beide Proteine in den PML-Kerndomänen kolokalisieren und während der CD95-vermittelten Apoptose ins Zytoplasma translozieren, stellte sich die Frage nach einer möglichen Funktion von Sp100 bei der FLASH-vermittelten Apoptose.

Um diese Frage zu beantworten, sollte die Expression des endogenen Sp100-Proteins mittels siRNA (*small interfering RNA*) inhibiert werden. Dafür wurde eine 19-Nukleotid lange DNA-Sequenz in den pSUPER-Vektor, welcher die Synthese von siRNA-Transkripten ermöglicht, inkloniert. Anschließend wurden pSUPER-siSp100 Expressionsvektor und „leerer“ pSUPER-Vektor in HT1080-Zellen transfiziert und 48 h später die Expression des endogenen Sp100-Proteins mittels Western Blot untersucht. Wie die Abbildung 3.26A zeigt, war die Expression von Sp100 in pSUPER-Sp100- im Vergleich mit Vektor-transfizierten Zellen signifikant vermindert.

Um den Einfluss des Sp100-Proteins auf die FLASH-Lokalisation zu untersuchen, wurden pSUPER-siSp100 und FLAG-FLASH mit entsprechenden Expressionsvektoren in HT1080-Zellen transfiziert und anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Analyse ergab, dass in den Zellen, in welchen Sp100 nicht mehr detektiert werden konnte, FLASH hauptsächlich in Todeseffektor-Filamenten lokalisierte (Abbildung 3.26B). In 90 % der pSUPER-siSp100 exprimierenden Zellen lokalisierte FLASH in DEFs (Abbildung 3.26C). Zum Vergleich wurden die HT1080-Zellen mit pSUPER- und FLAG-FLASH-Expressionsvektoren transfiziert und auf die Lokalisation von FLASH und endogenem Sp100 untersucht. In diesem Experiment lokalisierte FLASH in kotransfizierten Zellen zu 35% in DEFs und zu 65 % in Kerndomänen (Abbildung 3.26C).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Präsenz von Sp100 in PML-Kerndomänen dazu führt, dass FLASH verstärkt im Kern, bzw. in den Kerndomänen lokalisiert. Im Gegensatz dazu, führte die spezifische Inhibition der Sp100-Expression zur überwiegenden FLASH-Lokalisation in den Todeseffektor-Filamenten, in welchen FLASH eine pro-apoptotische Funktion ausübt. Dies war ein erster Hinweis, dass Sp100 ein negativer Regulator der FLASH-vermittelten Apoptose sein könnte.

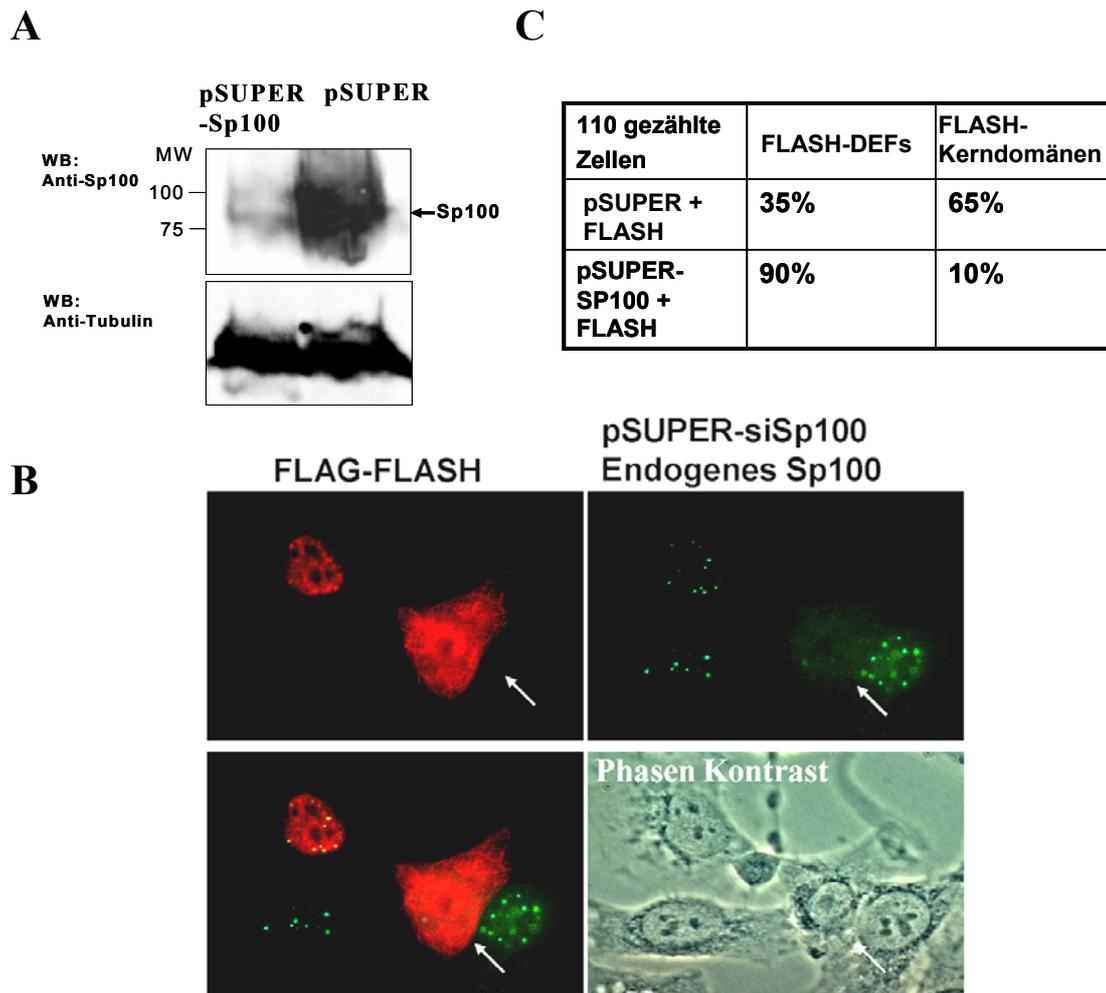


Abbildung 3.26. Lokalisation von FLASH nach Inhibition der Sp100-Expression. (A) HT1080-Zellen wurden mit pSUPER- oder pSUPER-siSp100 Expressionsvektoren transfiziert. Achtundvierzig Stunden später wurden die Zelllysate mittels Western Blot auf die Expression des endogenen Sp100 untersucht (oben). Die Expression von Tubulin (unten) wurde getestet, um die Auftragsmenge der Zelllysate zu vergleichen. MW: Molekulargewichtsmarker (kDa) (B) HT1080-Zellen wurden mit FLAG-FLASH und pSUPER-siSp100 bzw. pSUPER mit entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Achtundvierzig Stunden danach wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Lokalisation von FLASH und endogenem Sp100 untersucht. Die Pfeile zeigen eine Zelle, mit nicht-detektierbarem Sp100. (C) Tabellarische Darstellung der unterschiedlichen Lokalisationen von FLASH in HT1080-Zellen transfiziert mit pSUPER und FLAG-FLASH bzw. pSUPER-siSp100 und FLAG-FLASH Expressionsvektoren. 110 kotransfizierte Zellen wurden ausgewertet.

Verminderte Expression des Sp100-Proteins führt zum verstärkten Zelltod nach der Aktivierung des CD95-Rezeptors

Die Tatsache, dass Sp100 mit FLASH interagiert und während der CD95-vermittelten Apoptose teilweise in das Zytoplasma zusammen mit FLASH transloziert, lässt vermuten, dass Sp100 in der CD95-vermittelten Apoptose eine Rolle spielt.

Um zu testen, ob Sp100 einen Einfluss auf die CD95-vermittelte Apoptose ausübt, wurde folgendes Experiment gemacht. Mittels Transfektion des pSUPER-siSp100 Expressionsvektors wurde die Sp100-Expression in HT1080-Zellen vermindert. In diesen und in pSUPER-Vektor exprimierenden Zellen, die als Kontrolle dienten, wurde 36 h nach der Transfektion die Apoptose mittels eines anti-APO-1 Antikörpers oder durch Staurosporin ausgelöst. Der agonistische anti-APO-1 Antikörper induziert spezifisch CD95-Rezeptor vermittelte Apoptose (Trauth et al., 1989). Staurosporin dagegen induziert die Todesrezeptor-unabhängige Apoptose, die über mitochondriale Signalwege verläuft (Hsu et al., 1997). Nach 19 h Behandlung mit dem anti-APO-1 Antikörper oder Staurosporin wurden die transfizierten Zellen anhand der Kernmorphologie auf apoptotische Merkmale untersucht. Das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten ergab, dass der Expressionsblock von Sp100 zur verstärkten Induktion der CD95-vermittelten Apoptose führt (Abbildung 3.27). Dagegen hatte die Inhibition der Sp100-Expression keinen wesentlichen Einfluss auf die Staurosporin-vermittelte Apoptose. Interessanterweise wurde festgestellt, dass schon die alleinige Expression von pSUPER-siSp100 Expressionsvektor zu einem verstärkten Zelltod führt.

Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass eine Funktion von Sp100 die negative Regulation von CD95-vermittelter Apoptose ist. Die Tatsache, dass die Verminderung der Sp100-Expression keinen Einfluss auf Staurosporin-vermittelte Apoptose hat, spricht für eine spezifische Regulation der CD95-vermittelten Apoptose durch Sp100.

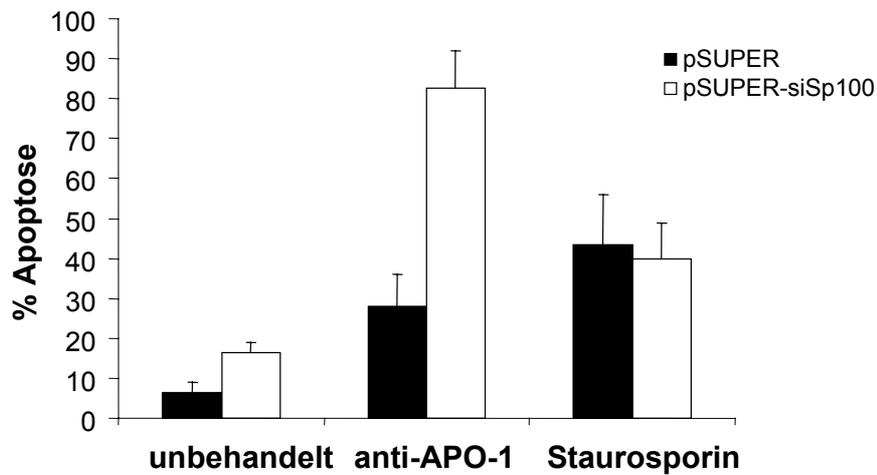


Abbildung 3.27. Sp100 reguliert CD95-vermittelte Apoptose. HT1080-Zellen wurden mit pSUPER-siSp100 oder pSUPER mit entsprechenden Expressionsvektoren für 36 h transfiziert. Die Zellen wurden zusätzlich mit pEGFP-Expressionsvektor transfiziert (1/5 des Transfektionsansatzes), um transfizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Zellen für 19 h mit 20 ng/ml anti-APO-1 Antikörper oder mit 1 μ g/ml Staurosporin behandelt. Dreißig min vor der Zell-Analyse wurden die Kerne mit DAPI gefärbt. Die Apoptose wurde in GFP-positiven Zellen anhand der Kernmorphologie bzw. Chromatinkondensation analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

IV Diskussion

Die Apoptose ist ein spezifischer Mechanismus, welcher die Eliminierung von unerwünschten oder potentiell gefährlichen Zellen während der Gewebemöostase oder Immunantwort reguliert (Ameisen, 2002; Vaux et al., 1994).

In Säugetierzellen existieren zwei apoptotische Hauptsignalwege; ein extrinsischer, über Todesrezeptoren-vermittelter, sowie ein intrinsischer, von Mitochondrien regulierter Signalweg. Für beide Signalwege ist die Aktivierung von Caspasen von essenzieller Bedeutung. Caspasen sind Aspartat-spezifische Proteasen, die durch Selbstspaltung oder Spaltung mittels anderer Caspasen oder Proteasen aktiviert werden (Salvesen and Dixit, 1999).

Der extrinsische Signalweg beinhaltet die Aktivierung von Todesrezeptoren, welche über die Bindung ihrer spezifischen Liganden oder durch agonistische Antikörper aktiviert werden (Krammer, 2000). Die am besten beschriebenen Todesrezeptoren sind der TNF-R1 (*tumour necrosis factor-receptor 1*) und CD95 (Fas/APO-1), welche durch eine intrazelluläre Todesdomäne charakterisiert sind.

Der intrinsische apoptotische Weg wird durch die Translokation der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl2-Proteinfamilie an die Mitochondrien aktiviert, was die zytosolische Freisetzung von Cytochrom C und Smac/DIABLO sowie anderer pro-apoptotischer Faktoren zur Folge hat (Puthalakath and Strasser, 2002) und so zur Aktivierung von Caspasen führt.

Mehrere unabhängige Studien haben gezeigt, dass PML-Kerndomänen und deren Komponenten an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Die Untersuchung PML-defizienter Mäuse lieferte entscheidende Hinweise dafür. PML^{-/-}-Zellen zeigen außer Defekten in der Ceramid- und durch Gamma-Strahlung-induzierten Apoptose auch eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber Todesrezeptor-vermittelten Apoptose nach der Stimulation mit CD95L oder TNF- α (Wang et al., 1998).

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Komponenten der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose in den PML-Kerndomänen gefunden. Das TRADD-Protein (*TNFR-*

l associated DD protein) transloziert zwischen Kern und Zytoplasma (Morgan et al., 2002). Im Zytoplasma ist TRADD an der Rekrutierung von FADD und Caspase-8 an den TNF-R1 Rezeptor beteiligt (Kischkel et al., 2000). Im Kernkompartiment assoziiert TRADD mit PML-Kerndomänen (Morgan et al., 2002). Die Todesdomäne (DD) von TRADD, welche die Interaktion mit TNF-R1 vermittelt, ist ebenso für die Lokalisation in PML-Kerndomänen und für die Induktion des Caspasen-unabhängigen Zelltods verantwortlich (Morgan et al., 2002). Die mittels Überexpression von TRADD-DD induzierte Apoptose kann durch die anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-Familie oder durch PML-Expression inhibiert werden (Morgan et al., 2002). Diese Daten weisen auf eine Rolle des durch Mitochondrien kontrollierten apoptotischen Signalwegs in der TRADD-vermittelten Apoptose in PML-Kerndomänen hin. Das Daxx-Protein, assoziiert ebenfalls mit PML-Kerndomänen (Torii et al., 1999). Daxx agiert als pro-apoptotisches Molekül, das zum einen CD95-vermittelte Apoptose und zum anderen die CD95-vermittelte Aktivierung des JNK-Signalwegs verstärkt (Chang et al., 1998). Es wurde postuliert, dass Daxx über die Assoziation mit PML-Kerndomänen die lymphozytäre Apoptose reguliert (Torii et al., 1999). Weiterhin wurde von verschiedenen Gruppen berichtet dass p53, ein Tumor-Suppressorprotein, welches in verschiedenen zellulären Prozessen, z.B. in der Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose, der Seneszenz und der DNA-Reparatur involviert ist, durch eine PML-Isoform, PML-IV, in PML-Kerndomänen rekrutiert wird (Ferbeyre et al., 2000; Fogal et al., 2000). Die PML-Kerndomänen Lokalisation von verschiedenen Faktoren wie CBP (*CREB binding protein*), Hdm2, HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*), Chk2 und hSir2, die in der post-translationellen Regulation von p53 involviert sind, weist auf eine wichtige Rolle von diesen Kernkompartimenten bei der Regulation von p53-Modifikationen und von p53-vermittelten Apoptose hin (D'Orazi et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Langley et al., 2002; Le et al., 1996; Louria-Hayon et al., 2003; Pearson et al., 2000; Yang et al., 2002). Obwohl die bisherigen Berichte eine Funktion von PML-Kerndomänen in der Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose zeigen, ist gegenwärtig der Mechanismus, durch den PML-Kerndomänen diesen pro-apoptotischen Signalweg beeinflussen, unbekannt.

In Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass FLASH, eine neue Komponente der CD95-vermittelten Apoptose, vorwiegend in PML-Kerndomänen lokalisiert und während der Apoptose in das Zytoplasma transloziert, um dort seine pro-apoptotische Funktion auszuüben. Die Interaktion von FLASH mit dem PML-

Kerndomänenprotein Sp100 scheint somit ein neuer, wichtiger Mechanismus der Regulation der CD95-Rezeptor-induzierten Apoptose zu sein.

FLASH-Lokalisation in PML-Kerndomänen und Interaktion mit Sp100

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass FLASH partiell in PML-Kerndomänen lokalisiert und dort mit dem Sp100-Protein interagiert. Das Sp100-Protein, welches in der Regulation der Transkription involviert ist (Lehming et al., 1998; Wasyluk et al., 2002), ist neben PML bisher die einzige bekannte Komponente, die ausschließlich in PML-Kerndomänen lokalisiert. FLASH interagiert mit Sp100 mittels seiner C-terminalen Sequenz im Hefe 2-Hybrid-Assay und in humanen Zellen. Die Existenz des vermuteten Kernlokalisierungssignals (NLS) in diesem Sequenzbereich spielt wahrscheinlich für die nukleäre Lokalisation und somit auch für die Interaktion mit Sp100 eine wichtige Rolle.

Die nähere Untersuchung der Lokalisation von endogenem FLASH-Protein in unterschiedlichen Zelllinien, wie 293T, HeLa und HT1080, sowie die Lokalisationsstudien unterschiedlicher FLASH-Deletionsmutanten ergaben, dass FLASH sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert.

Im Zellkern assoziiert FLASH mit PML-Kerndomänen. Interessanterweise ist diese Assoziation von dynamischem Charakter. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von transient exprimiertem FLASH nach einer kurzen Expressionsdauer ergab eine hohe Überlappungsrate von FLASH und Sp100 in PML-Kerndomänen. Nach verlängerter Expressionsdauer lokalisierte FLASH vorwiegend in Sp100-unabhängigen Kerndomänen. Für diese temporäre Assoziation zwischen Sp100 und FLASH könnten unter anderem die mobile Eigenschaften von Sp100, die in Form von kleineren Domänen von PML-Kerndomänen dissoziieren können, verantwortlich sein (Wiesmeijer et al., 2002). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die PML-Kerndomänenkomponente CREB-bindendes Protein (CBP) sich rasch in PML-Kerndomänen hinein und hinaus bewegen kann (Wiesmeijer et al., 2002). Die Aufklärung der Ursache der temporären Assoziation von FLASH mit PML-Kerndomänen bedarf zukünftig einer weitergehenden Untersuchung und könnte für noch unbekannt Funktionen dieses Proteins von Bedeutung sein.

Die große, stetig wachsende Anzahl von Proteinen, die mit PML-Kerndomänen assoziieren, sowie ihre Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie z.B. bei der Kontrolle der Chromatin-Architektur, Regulation der Apoptose, Transkription und Zell-Proliferation macht es experimentell sehr schwierig, eine eindeutige Antwort auf die Frage der zellulären Funktion dieser Kerndomänen abzuleiten.

Gegenwärtig werden unterschiedliche Hypothesen zur Rolle der PML-Kerndomänen diskutiert. Hierzu gehört z.B. die These von Negorev und Maul, die eine Funktion der PML-Kerndomänen bei der Regulation der Rekrutierung und Freisetzung von Proteinen zum Zwecke der Kontrolle deren Verfügbarkeit im Nukleoplasma und in PML-Kerndomänen postuliert (Negorev and Maul, 2001). Nach Ansicht dieser Autoren fungieren PML-Kerndomänen als eine Art Kerndepot (Maul et al., 2000). Weiterhin werden die PML-Kerndomänen auch als Plattformen für post-translationelle Modifikationen derer Komponenten diskutiert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese akkumuliert z.B. die Acetyltransferase CBP in den PML-Kerndomänen, um das Substrat p53 zu modifizieren (Pearson et al., 2000).

Essenziell für die Ausbildung der PML-Kerndomänen ist laut Literatur das PML-Protein und dessen kovalente Modifikation mittels SUMO-1 (*small ubiquitin-related protein 1*) (Boddy et al., 1996; Müller et al., 1998). Außer PML sind mehrere weitere Komponenten der PML-Kerndomänen wie Sp100, Daxx, p53, CBP durch SUMO-1 post-translationell modifiziert (Girdwood et al., 2003; Gostissa et al., 1999; Jang et al., 2002; Rodriguez et al., 1999; Sternsdorf et al., 1997). SUMOylierung scheint ein wichtiger Mechanismus bei der Regulation der Protein-Protein Interaktionen sowie der subzellulären Lokalisation und Aktivität zu sein. So ist z.B. die SUMOylierung von PML für die Interaktion mit Daxx und dessen Rekrutierung in PML-Kerndomänen erforderlich (Li and Chen, 2000; Li et al., 2000). Interessanterweise enthält auch FLASH mehrere potentielle SUMO-1-Konsensusmodifizierungsmotive. Weiterhin wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt, dass überexprimiertes FLASH mit dem GFP-SUMO-1 Fusionsprotein in Kerndomänen kolokalisiert. Diese Befunde deuten auf eine mögliche SUMO-1-Modifikation von FLASH hin, die für die PML-Kerndomänenlokalisation und Interaktion mit Sp100 eine wichtige Rolle spielen könnte.

Die SUMOylierung von Sp100 spielt offensichtlich für die Interaktion mit FLASH keine Rolle, da FLASH mit einer Sp100-Deletionsmutante, die nicht mehr SUMO-1-modifiziert werden kann, im Hefesystem interagiert hat.

Die Rolle von FLASH und Sp100 in der CD95-vermittelten Apoptose

Die Funktion von FLASH bei der CD95-vermittelten Aktivierung der Pro-Caspase-8 (Imai et al., 1999), stellte die Frage nach der Lokalisation von FLASH während dieses Prozesses. Fluoreszenzmikroskopische und biochemische Untersuchungen von HT1080-Zellen nach der Induktion der CD95-vermittelten Apoptose mittels des agonistischen anti-APO-1 Antikörpers für unterschiedliche Zeitspannen zeigten, dass FLASH vom Zellkern in das Zytoplasma transloziert. Überraschenderweise wurde beobachtet, dass auch Sp100 partiell transloziert und im Zytoplasma mit FLASH kolokalisiert.

Durch die Tatsache, dass die Aktivierung des CD95-Rezeptors die Translokation von FLASH und Sp100 auslöst, wurde die Frage nach dem Rezeptor-vermittelten Signalweg, welcher die Translokation der beiden Proteine auslöst, gestellt. Um dieses Signal zu charakterisieren, wurden unterschiedliche CD95-Rezeptor induzierende Signalwege selektiv inhibiert.

Die Ligation des CD95-Rezeptors führt zur Aktivierung einer Reihe von MAP Kinasen (MAPK) (Hofmann et al., 2001; Ichijo et al., 1997). MAPK besitzen wichtige Funktionen in verschiedenartigen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Abhängig vom Zelltyp und dem Zusammenspiel mit anderen Signalwegen sind sie in der Lage eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung auszuüben. Spezifische Inhibition der MAPK-Signalkaskaden JNK, ERK und p38 ergab keinen Einfluss auf die CD95-vermittelte Translokation von FLASH und Sp100 (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde die Aktivierung der Caspase-8 mittels des Peptidinhibitors zIETD-fmk spezifisch inhibiert. Die Behandlung der HT1080-Zellen mit zIETD-fmk führte nach Aktivierung des CD95-Rezeptors zur Inhibition der Apoptose (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise verlangsamte die spezifische Inhibition der Caspase-8-Aktivierung die Translokationskinetik von FLASH und Sp100 signifikant, was eine Funktion der aktiven Caspase-8 in diesem Prozess unterstreicht

Ein weiterer unabhängiger Hinweis für die Rolle der Caspase-8 bei der FLASH und Sp100 Translokation wurde durch die Herstellung der HT1080^{FADD-DN}-Zellen erhalten. Die stabile Expression einer dominant-negativen Mutante von FADD, welche keine Todeseffektordomäne besitzt, führt zur Inhibition der Caspase-8-Aktivierung und zur Blockade der Apoptose. Die Behandlung der HT1080^{FADD-DN}-Zellen, mit agonistischem anti-APO-1 Antikörper, nicht aber von HT1080^{pCDNA3}-Zellen, die zur Kontrolle dienten, führte nicht zur Apoptose (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der beiden stabilen

Zelllinien nach anti-APO-1 Behandlung ergab in den HT1080^{FADD-DN}-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine deutliche Verzögerung der Translokationskinetik von FLASH und Sp100. Daraus lässt sich schließen, dass Caspase-8-Aktivierung für die Translokation von FLASH und Sp100 eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 4.2). Es bleibt zu untersuchen, ob Caspase-8 alleine oder auch weitere durch Caspase-8 aktivierte Proteine für die Induktion der FLASH- und Sp100-Translokation notwendig sind. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Caspase-8 während der CD95-vermittelten Apoptose zur Translokation eines weiteren apoptotischen Proteins führt. Das DEDD-Protein (*DEDD-containing DNA-binding protein*) interagiert mit FADD und Caspase-8 mittels seiner Todeseffektor-Domäne. Nach der Caspase-8-Aktivierung transloziert DEDD vom Zytoplasma in den Zellkern und inhibiert im Nukleolus die Transkription der ribosomalen DNA (Stegh et al., 1998). Somit stellt das DEDD-Protein eine Verbindung zwischen der zytoplasmatischen und nukleären Apoptose dar.

Imai und Kollegen haben herausgefunden, dass die FLASH-Sequenz potenzielle Motive für die Caspase-8-Spaltung beinhaltet (Imai et al., 1999). Die spezifische Spaltung durch Caspase-8 könnte daher ein Signal auslösen, nach welchem es zur Translokation von FLASH kommt. Eigene vorläufige Experimente konnten jedoch keine Hinweise auf eine Prozessierung von FLASH oder Sp100 nach CD95-Aktivierung liefern (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus stellte sich die Frage nach der Rolle der partiellen Translokation von Sp100 während der CD95-vermittelten Apoptose. Das Sp100-Protein lokalisiert unter physiologischen Bedingungen in PML-Kerndomänen. Außer dass Sp100 in der Regulation der Transkription eine Rolle spielt (Lehming et al., 1998; Wasyluk et al., 2002), gab es bisher keine Berichte über weitere zelluläre Funktionen. Ob die Translokation von Sp100 für die CD95-vermittelte Apoptose von Bedeutung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet. Jedoch ergab die Inhibition der Sp100-Expression mittels *RNA-interference*, dass FLASH unter diesen Bedingungen verstärkt im Zytoplasma bzw. in apoptotischen Todeseffektor-Filamenten lokalisiert. Insofern scheint die Präsenz von Sp100 für die Aufrechterhaltung der FLASH-Lokalisation in PML-Kerndomänen wichtig zu sein. Auf diesem Weg kontrolliert Sp100 die FLASH-Lokalisation und damit verbundene Funktionen in der Zelle. Weitere Experimente zeigten, dass die Verminderung der Sp100 Expression mittels einer für Sp100-spezifischen siRNA zur spezifischen Verstärkung des CD95-induzierten Zelltodes führt. Diese Daten lassen den Schluss zu,

dass Sp100 unter physiologischen Bedingungen in HT1080-Zellen als negativer Regulator der FLASH-vermittelten CD95-Apoptose fungiert.

Wie Sp100 die FLASH-Lokalisation im Detail kontrolliert, ist gegenwärtig nicht klar. Es konnte aber von mir gezeigt werden, dass FLASH in der CD95-vermittelten Apoptose CRM1-abhängig transloziert. Das FLASH-Protein besitzt ein vermutetes Kernexportsignal an seinem N-Terminus, welches wahrscheinlich die Translokation nach der CD95-Aktivierung vermittelt. Deshalb wäre es möglich, dass Sp100 die FLASH-Translokation entweder durch eine Konformationsänderung oder durch Maskierung des Kernexportsignals verhindert.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass FLASH nach der Induktion der CD95-vermittelten Apoptose im Zytoplasma mit Mitochondrien assoziiert, welche zentrale Strukturen bei der Apoptoseregulation darstellen.

Wie kann nun aber FLASH die CD95-vermittelte Pro-Caspase-8-Aktivierung im Zytoplasma, bzw. an den Mitochondrien beeinflussen?

Um diese Frage zu beantworten, war es wichtig festzustellen, ob die in diesen Studien verwendeten HT1080-Zellen bezüglich des Apoptosesignalweges sich wie Typ I- oder wie Typ II-Zellen verhalten. Scaffidi et. al. haben herausgefunden, dass die Aktivierung der Pro-Caspase-8 nach CD95-Rezeptor-Aktivierung auf zwei unterschiedlichen Signalwegen erfolgt (Scaffidi et al., 1998). In Typ I-Zellen wird fast die gesamte Pro-Caspase-8 am DISC innerhalb von Sekunden aktiviert, welche dann direkt die in der Caspasen-Kaskade nächststehende Pro-Caspase-3 aktiviert. In Typ II-Zellen wird dagegen nur eine kleine Fraktion der Pro-Caspase-8 mit langsamerer Kinetik am DISC aktiviert. In diesen Zellen wird die Mehrheit der Pro-Caspase-8 während der CD95-vermittelten Apoptose im Zytoplasma aktiviert. Die Apoptose in Typ II-Zellen wird durch die Aktivierung der proapoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie an den Mitochondrien fortgesetzt (Scaffidi et al., 1998). Die Tatsache, dass in den HT1080-Zellen nach der CD95-induzierten Apoptose wenig Pro-Caspase-8 mit DISC assoziiert, sondern die Mehrheit der Pro-Caspase-8 im Zytoplasma unabhängig von der Assoziation mit dem CD95-Rezeptor aktiviert wird, spricht dafür, dass es sich hier um Typ II-Zellen handelt. Weiterhin wurde berichtet, dass in Typ II-Zellen die aktive Caspase-8 Untereinheit p18 schnell in p16 überführt (Scaffidi et al., 1998). Auch in Hinsicht auf diese Daten verhalten sich HT1080-Zellen wie Typ II-Zellen. Ein weiterer wichtiger Hinweis ergab sich daraus, dass das von Adenoviren

kodierte Bcl2-Homolog E1B 19K, welches vorwiegend an den Mitochondrien lokalisiert, in der Lage ist, CD95-vermittelte Apoptose in HT1080-Zellen zu inhibieren.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass FLASH und Caspase-8 nach der Induktion der CD95-vermittelten Apoptose an Mitochondrien kolokalisieren. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde in der Vergangenheit berichtet, dass in MCF7-Zellen, welche wie HT1080 Zellen den Typ II-Zellen angehören, die endogene Caspase-8 an Mitochondrien lokalisiert und dort auch aktiviert werden kann (Stegh et al., 2002; Stegh et al., 2000).

Demzufolge stellte sich die Frage, ob FLASH und Caspase-8 in der CD95-vermittelten Apoptose, wie zuvor berichtet, am DISC interagieren (Imai et al., 1999), oder ob die Interaktion in HT1080-Zellen im Zytoplasma bzw. an Mitochondrien stattfindet?

Um dies zu untersuchen, wurde zuerst der aktivierte CD95-Rezeptor und anschließend die nicht mit dem Rezeptor-assoziierte Caspase-8 immunpräzipitiert. Mit dem aktivierten Rezeptorkomplex kopräzipitierte nur eine geringe Menge an Caspase-8, welche durch die Interaktion mit FADD rekrutiert wurde. Es konnte aber keine Interaktion von FLASH mit dem aktivierten Rezeptor-Komplex (DISC) festgestellt werden. Der Hauptteil der Caspase-8 aber war nicht mit dem Rezeptor assoziiert, was dafür spricht, dass FLASH mit der zytoplasmatischen bzw. an den Mitochondrien lokalisierte Caspase-8-Fraktion interagiert. Anhand dieser Daten kann spekuliert werden, dass FLASH für die Aktivierung der Pro-Caspase-8 am DISC in den Typ II-Zellen eine untergeordnete Rolle spielt. Die Tatsache, dass FLASH mit der Caspase-8 in den HT1080-Zellen während der CD95-vermittelten Apoptose an Mitochondrien kolokalisiert, führt zur Vermutung, dass die Interaktion dieser Proteine an Mitochondrien stattfindet. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine kleine, in diesem Experiment nicht detektierbare Fraktion von FLASH mit der Caspase-8 am DISC assoziiert, da FLASH in Jurkat-Zellen, welche auch Typ II-Zellen sind, an den DISC rekrutiert wird (Imai et al., 1999).

Interessanterweise konnte hier gezeigt werden, dass FLASH mit der Pro-Caspase-8 auch in nicht-apoptotischen Zellen interagiert. Die mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelte zytoplasmatische Fraktion von endogenem FLASH ist anscheinend für diese Interaktion von Bedeutung. Welche funktionelle Bedeutung diese Interaktion besitzt, ist gegenwärtig noch nicht bekannt.

Welche Bedeutung könnte nun die Translokation von FLASH aus den PML-Kerndomänen an die Mitochondrien während der CD95-vermittelten Apoptose haben?

Eine mögliche Antwort dafür liefert die Studie von Imai und Kollegen, in welcher sie zeigten, dass FLASH in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren (Imai et al., 1999). Für diese Selbstassoziation scheint der mittlere Sequenzbereich von FLASH (Aminosäurebereich 939-1191) verantwortlich zu sein. Diese Oligomerisierungsdomäne des FLASH-Proteins hat eine geringe Ähnlichkeit mit der gleichnamigen Domäne des Nematodenproteins CED-4. Die Oligomerisierung von CED-4 führt zur Aktivierung der *C. elegans*-Caspase CED-3 (Chinnaiyan et al., 1997). Das CED-4 Homolog bei Säugetieren ist Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), welches die Aktivierung der Caspase-3 reguliert (Zou et al., 1997).

Genau nach dem gleichem Modell wie beim CED-4-Protein könnte die Translokation der nukleären FLASH-Fraktion zur Anhäufung und Oligomerisierung von FLASH im Zytoplasma und an den Mitochondrien führen. Dies hätte die Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-8 an den Mitochondrien zur Folge. Somit agiert FLASH möglicherweise wie ein Adaptor bzw. Chaperon, welches die Konformation und die lokale Konzentration der Pro-Caspase-8 kontrolliert und nach Induktion der CD95-vermittelten Apoptose die Pro-Caspase-8 durch seine Oligomerisierung an den Mitochondrien aktiviert.

Die dritte Komponente der apoptotischen *C. elegans* Signalkaskade ist das CED-9-Protein. CED-9 inhibiert CED-3-induzierte Apoptose, was darauf hindeutet, dass CED-9 oberhalb von CED-3 agiert (Chinnaiyan et al., 1997), wobei CED-9 die CED-3-vermittelte Apoptose durch die Interaktion mit CED-4 reguliert (Abbildung 4.1). Funktionelle Homologe des CED-9-Proteins im Säugetiersystem sind Mitglieder der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie, wie z.B. Bcl-2 oder Bcl-x_L. Darüber hinaus kodieren aber auch verschiedene Viren für Bcl-2 homologe Proteine, wie z.B. Adenoviren für das adenovirale E1B 19K-Protein (Korsmeyer et al., 1995; Perez and White, 1998), die mit verschiedenen Apoptosewegen, einschließlich dem durch CD95-vermittelten, interferieren.

Imai und Kollegen haben herausgefunden, dass das adenovirale Protein E1B 19K mit FLASH interagiert und mittels dieser Interaktion in der Lage ist, die Aktivierung der Caspase-8 zu verhindern (Imai et al., 1999). Der Mechanismus der anti-apoptotischen Wirkung von E1B 19K blieb jedoch unbekannt.

Um diesen Mechanismus näher zu untersuchen, wurden HT1080^{E1B 19K}-Zellen hergestellt, welche E1B 19K stabil exprimieren. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass die Mehrheit des stabil exprimierten E1B 19K-Proteins an Mitochondrien lokalisiert. Dieser Befund korreliert mit der Beobachtung, dass auch andere funktionell-

und Sequenz-ähnliche Mitglieder der anti-apoptotischen Bcl2-Familie, wie Bcl2 und Bcl-x_L oder auch viral kodierte Homologe, ebenfalls an Mitochondrien lokalisieren (Yang et al., 1997).

Die subzelluläre Lokalisation von endogenem FLASH in Kerndomänen und teilweise diffuser Verteilung im Zytoplasma änderte sich in den E1B 19K-exprimierenden Zellen dramatisch, wobei FLASH fast ausschließlich mit E1B 19K an den Mitochondrien kolokalisierte. Interessanterweise geschah dies unabhängig von der CD95-vermittelten Apoptose Induktion. In der Vergangenheit wurde von anderen Gruppen herausgefunden, dass exogen exprimiertes Nematoden Protein CED-4 in E1B 19K-exprimierten Zellen mit E1B 19K kolokalisiert (Han et al., 1998). Dieses unterstützt die von Imai und Kollegen vorgeschlagene These, dass FLASH im Säugetiersystem die pro-apoptotische CED-4-Funktion widerspiegelt.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden, dass auch Pro-Caspase-8 in E1B 19K stabil-exprimierenden Zellen an Mitochondrien mit E1B 19K kolokalisiert. Daraus könnte man schließen, dass die von Imai und Kollegen beschriebene Interaktion zwischen E1B 19K und FLASH wahrscheinlich an den Mitochondrien stattfindet.

Wie genau könnte nun der Mechanismus der Inhibition der Caspase-8-Aktivierung durch E1B 19K gesteuert sein?

Prinzipiell wären zwei Mechanismen denkbar. Erstens könnte die Interaktion von E1B 19K mit FLASH zur Antagonisierung der Interaktion zwischen FLASH und Pro-Caspase-8 führen. Zum anderen könnte E1B 19K mit FLASH und Caspase-8 einen trimeren Komplex bilden, welcher zwar eine Interaktion zwischen FLASH und Pro-Caspase-8 erlaubt, aber keine FLASH-vermittelte Aktivierung der Pro-Caspase-8 zulässt. Um dies näher zu untersuchen, wurde transient exprimiertes FLASH immunpräzipitiert. Anschließend wurde die Bindung von transient exprimiertem E1B 19K- und Pro-Caspase-8-Protein untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass FLASH einen Komplex mit E1B 19K und Caspase-8 eingeht. Mittels dieses Komplexes werden wahrscheinlich die Aktivierung der Caspase-8 und die Fortsetzung der apoptotischen Signalkaskade verhindert. Somit sind die Mitochondrien während der CD95-vermittelten Apoptose in Typ II Zellen nicht nur die Orte der Caspase-8-Aktivierung, sondern auch der Ort, an welchem die apoptotische Signalkaskade durch adenovirales E1B 19K-Protein blockiert werden kann.

Der anhand unterschiedlicher apoptotischer Marker mittels Mikroskopie durchgeführte Vergleich von FLASH oder FADD bzw. Caspase-8 überexprimierenden Zellen ergab, dass FADD und Caspase-8 wesentlich stärker Apoptose induzieren als FLASH (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist FLASH in der Lage, in der CD95-vermittelten Apoptose die Caspase-8-Aktivierung zu verstärken (Imai et al., 1999). Dies wird auch dadurch unterstützt, dass eine reduzierte FLASH-Expression mittels *RNA-interference* zur Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose führte. Diese Daten deuten darauf hin, dass FLASH in der CD95-vermittelten Caspase-8-Aktivierung eine modulatorische Funktion ausübt, und zwar durch die Verstärkung der Caspase-8-Aktivierung oder durch deren Inhibition mittels Interaktion mit E1B 19K. Diese Signalkaskade scheint evolutionär konserviert zu sein, da genau nach gleichem Prinzip das Nematoden Protein CED-4 die Aktivierung der Caspase CED-3 reguliert (Abbildung 4.1).

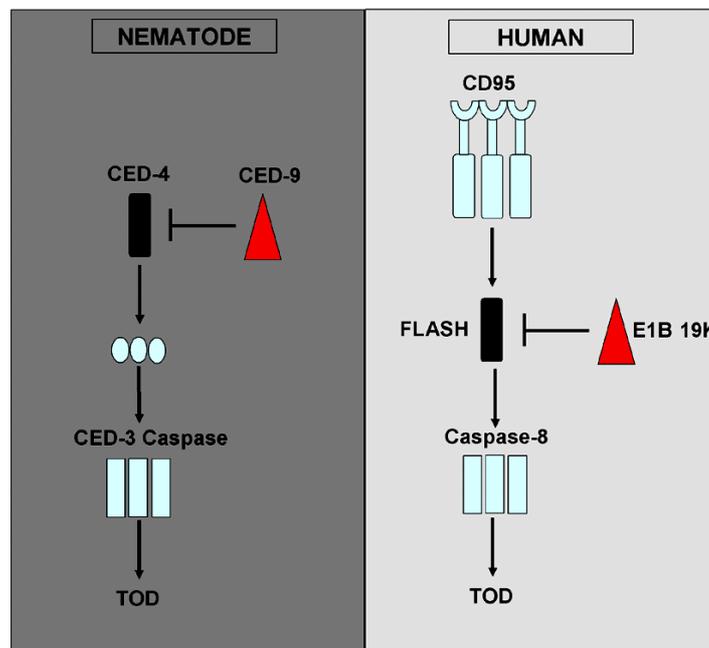


Abbildung 4.1 Apoptotische Signalkaskade bei Nematoden und Säugetieren. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Aktivierung des CD95-Rezeptors führt in Typ II Zellen zur Aktivierung der proapoptischen Mitglieder der BCL2-Familie an den Mitochondrien. (Bratton et al., 2002; Li et al., 1998; Sun et al., 2002). So wird das BID-Protein, welches diffus im Zytoplasma lokalisiert, nach der proteolytischen Spaltung durch Caspase-8 an die Mitochondrien rekrutiert (Li et al., 1998). Dies resultiert in einer Depolarisation des mitochondrialen

Transmembranpotentials, der eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien folgt (Liu et al., 1996; Shimizu et al., 1998) (Abbildung 4.2).

Smac/DIABLO wird, wie Cytochrom C, während der CD95-vermittelten Apoptose in das Zytosol freigesetzt (Sun et al., 2002). Entsprechend den publizierten Daten ergab die Fraktionierung der HT1080-Zellen eine Anreicherung des Smac/DIABLO-Proteins im Zytosol nach der Induktion der CD95-vermittelten Apoptose.

Die Freisetzung von Cytochrom-C und Smac/DIABLO führt weiterhin zur Aktivierung der Caspase-3 und so zur Vorsetzung der Apoptose.

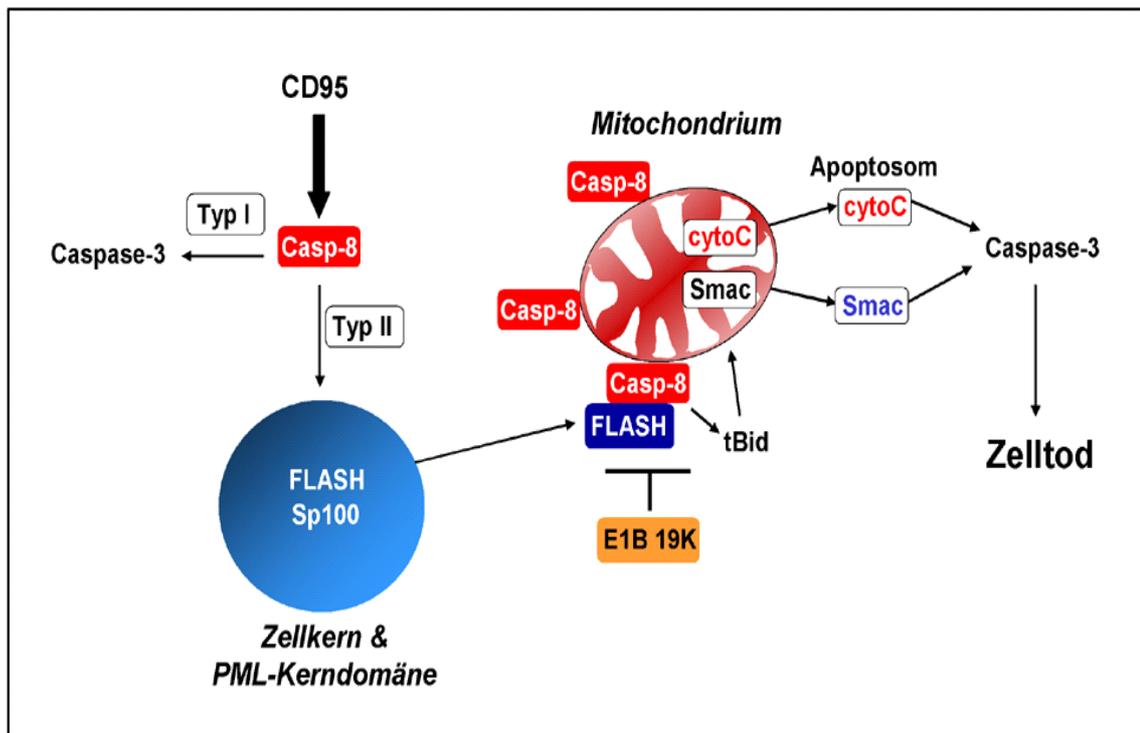


Abbildung 4.2. Model für die Rolle von FLASH in der CD95-vermittelten Apoptose. Die Aktivierung von CD95 führt in Typ I-Zellen zur rapiden Aktivierung der Pro-Caspase-8 am CD95-Rezeptorkomplex, die anschließend direkt Pro-Caspase-3 aktiviert. In Typ II-Zellen dagegen wird ein geringer Teil der Pro-Caspase-8 am Rezeptor aktiviert, wodurch die Translokation von FLASH und Sp100 von PML-Kerndomänen an die Mitochondrien induziert wird. FLASH verstärkt die Aktivierung der Caspase-8 an den Mitochondrien, die weiterhin, über BID-Spaltung, die mitochondriale apoptotische Signalkaskade fortsetzt. Die Aktivierung von Caspase-8 durch FLASH kann an Mitochondrien durch E1B 19K verhindert werden.

Die pro-apoptische Funktion von FLASH ist abhängig von seiner subzellulären Lokalisation

Überexprimiertes FLASH lokalisiert sowohl in PML-Kerndomänen als auch teilweise im Zytoplasma in filamentösen Strukturen. In unseren Studien kolokalisieren diese Filamente mit keinem der bekannten getesteten Zytoskelettfilamente. Die kürzlich berichtete Funktion von FLASH in der NF- κ B-Aktivierung (Choi et al., 2001) war Anlass zu testen, ob sogenannte CARD-Filamente, die bei der NF- κ B-Aktivierung eine Rolle spielen, mit FLASH-Filamenten überlappen. Genaue Untersuchungen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie ergaben keine Überlappung zwischen CARD- und FLASH-Filamenten. Interessanterweise überlappen die FLASH-Filamente jedoch mit Todeseffektor-Filamenten (DEFs), die durch Überexpression von pro-apoptischen Proteinen, die eine Todeseffektordomäne besitzen, wie z.B. FADD, gebildet werden (Siegel et al., 1998). Wie für das FADD-Protein beschrieben, ist FLASH in der Lage, endogene Pro-Caspase-8 in die DEFs zu rekrutieren und zu aktivieren. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen mit dem nukleären, in Kerndomänen befindlichen FLASH-Protein keinerlei Apoptosemerkmale. Diese Befunde bedeuten, dass die pro-apoptische Funktion des FLASH-Proteins durch intrazelluläre Kompartimentalisierung reguliert wird, und erst im Zytoplasma, sehr wahrscheinlich durch seine Interaktion mit Caspase-8, zur Entfaltung kommt.

Die Koexpression des anti-apoptischen adenoviralen E1B 19K-Proteins führte zur Auflösung der FLASH-DEFs und daraufhin rekrutiert fast das komplette FLASH in den perinukleären Raum zusammen mit E1B 19K. Die Interaktion zwischen E1B 19K und FLASH (Imai et al., 1999) führte wahrscheinlich, durch Rekrutierung von FLASH in den perinukleären Raum, zur Inhibition der Apoptose. Die Auflösung von FLASH-DEFs durch das adenovirale E1B 19K-Protein zeigt, dass es vermutlich die Oligomerisierung von FLASH verhindert und so seine Funktion ausübt. Die Oligomerisierung von FLASH ist essentiell für seine apoptoseauslösende Funktion (Imai et al., 1999).

Ein weiterer interessanter Befund ist, dass FLASH-DEFs mit Mitochondrien assoziieren. Wie schon vorher dargelegt, spielt sich an Mitochondrien ein wichtiger Abschnitt des intrinsischen apoptotischen Signalweges ab. Insofern ist der Kontakt zwischen DEFs, an welchen die Caspase-8 aktiviert wird, und den an den Mitochondrien lokalisierten pro-apoptischen Proteinen für die Fortsetzung des Todessignals wichtig.

Die Interaktion zwischen Sp100 und FLASH in den PML-Kerndomänen war Anlass zu testen, ob die Lokalisation von FLASH in DEFs einen Einfluss auf die PML-Kerndomänenkomponenten, insbesondere auf das Sp100-Protein hat. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass PML in Zellen, in denen FLASH in DEFs lokalisiert, sein charakteristisches, nukleäres Lokalisationsmuster behält. Sp100 dagegen konnte in den gleichen Zellen nicht in PML-Kerndomänen nachgewiesen werden. Die genaue Untersuchung ergab schwache, aber signifikante Signale für ein filamentöses zytoplasmatisches Lokalisierungsmuster des endogenen Sp100-Proteins. Anscheinend wird Sp100 von FLASH in die DEFs rekrutiert. Die Tatsache, dass FLASH-DEFs die Pro-Caspase-8 rekrutieren und aktivieren, führt wahrscheinlich, wie während der CD95-vermittelten Apoptose, zur Caspase-8 vermittelten Translokation von Sp100 in das Zytoplasma. Welche Funktion die zytoplasmatische Lokalisation von Sp100 in der FLASH-vermittelten Apoptose hat, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet. Es wäre jedoch durchaus möglich, dass das zytoplasmatisch lokalisierte Sp100-Protein eine eigenständige Rolle in der apoptotischen Signalkaskade ausübt.

V Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die vor Beginn der Arbeit durch Hefe 2-Hybridsystemanalysen gefundene Wechselwirkung zwischen dem Sp100-Protein, einer Komponente von sogenannten nukleären PML-Kerndomänen, und dem FLASH-Protein, das eine Signalkomponente der CD95-vermittelten Apoptose ist, zu erhärten sowie die Bedeutung dieser Interaktion aufzuklären. Die Arbeit sollte zum besseren Verständnis der molekularen Grundlage der Regulation der CD95-vermittelten Apoptose durch PML-Kerndomänen beitragen, über die zu Beginn der Arbeit nur sehr wenig bekannt war.

Im Rahmen dieser Studien konnte durch Immunpräzipitationsstudien gezeigt werden, dass das FLASH-Protein auch in humanen Zellen mit dem Sp100-Protein, nicht aber mit dem für PML-Kerndomänen essenziellen PML-Protein interagiert. Die an der Wechselwirkung beteiligten Domänen konnten grob eingegrenzt werden. Immunzytochemisch konnte FLASH zum Teil in PML-Kerndomänen, aber auch in anderen Kerndomänen sowie teilweise im Nukleoplasma und in extranukleären Kompartimenten lokalisiert werden.

Nach Auslösen CD95-vermittelter Apoptose wurde beobachtet, dass FLASH und ein Teil des Sp100-Proteins aus den nukleären PML-Kerndomänen in das Zytoplasma translozieren. Dort akkumulierte FLASH dann an Mitochondrien, die von zentraler Bedeutung innerhalb der Apoptoseregulation sind. Die Translokation des FLASH- und des Sp100-Proteins konnte durch Inhibition des Crm1-abhängigen Kernexports verhindert werden. Dies weist auf die Induktion eines aktiven Transports beider Proteine in das Zytoplasma nach CD95-Rezeptor Aktivierung hin. Dass dieser Kernexport durch einen Signalweg vermittelt wird, der durch die am CD95-Rezeptor aktivierte Caspase-8 ausgelöst wird, konnte durch den Nachweis der Inhibition der CD95-induzierten Translokation von FLASH und Sp100 in das Zytoplasma mittels des Caspase-8 spezifischen Inhibitors zIETD-fmk sowie durch stabile Expression einer transdominant negativen Deletionsmutante des FADD-Proteins gezeigt werden.

Detaillierte subzelluläre Lokalisationsanalysen ergaben, dass das nach Aktivierung des CD95-Rezeptors im Zytoplasma vorgefundene FLASH-Protein an den Mitochondrien akkumuliert und dort mit der endogen exprimierten Caspase-8 kolokalisiert. Immunpräzipitationsstudien zeigten darüberhinaus, dass FLASH während der CD95-Rezeptor vermittelten Apoptose an die nicht Rezeptor-gebundene Caspase-8 bindet. Diese

Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass FLASH mit Caspase-8 an Mitochondrien interagiert.

Um die molekularen Grundlagen für die Regulation der CD95-vermittelten Apoptose durch FLASH näher zu charakterisieren, wurden auch Studien mit dem anti-apoptotisch wirkenden adenoviralen E1B 19K-Protein, welches als Interaktionspartner des FLASH-Proteins bekannt war, durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in eigens dafür hergestellten HT1080-Zellen mit stabiler E1B 19K-Proteinexpression das E1B 19K-Protein vor allem an Mitochondrien lokalisiert und das endogene FLASH-Protein aus den PML-Kerndomänen an die Mitochondrien transloziert war. Desweiteren konnte durch Koimmunpräzipitationsexperimente demonstriert werden, dass FLASH einen trimeren Komplex mit E1B 19K und Pro-Caspase-8 bildet. Hierdurch kommt es wahrscheinlich zu Konformationsänderungen einer oder beider Komponenten des Pro-Caspase-8/FLASH-Proteinkomplexes, wodurch die Pro-Caspase-8-Aktivierung inhibiert werden könnte.

Bei der exogenen Expression von FLASH durch Vektoren wurde gefunden, dass in einer Reihe von Zellen ein erheblicher Teil des Proteins in filamentösen Strukturen im Zytoplasma lokalisierte. Diese Strukturen kolokalisierten mit sogenannten Todeseffektor-Filamenten, deren Bildung bekannt ist für die Überexpression von Proteinen mit sogenannten Todeseffektordomänen. Das Vorhandensein einer Todeseffektor-ähnlichen Domäne im FLASH-Protein ist konsistent mit diesem Befund. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass zytoplasmatisches FLASH-Protein Pro-Caspase-8 in diese Filamente rekrutiert und hierdurch Apoptose auslöst, wohingegen PML-Kerndomänen-assoziiertes FLASH keine pro-apoptotische Aktivität offenbarte. Die Reduktion der Sp100-Expression mittels einer spezifischen siRNA konnte mit einer zunehmenden zytoplasmatischen Lokalisation von FLASH und einer damit einhergehenden Sensibilisierung für CD95-vermittelte Apoptose korreliert werden. Dies spricht für eine negative Regulatorfunktion des Sp100-Proteins bei der FLASH-vermittelten Apoptose.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse auf eine bisher nicht bekannte regulatorische Rolle von Sp100 in der CD95-vermittelten Apoptose schließen. Das FLASH-Protein wurde erstmals als ein mögliches molekulares Bindeglied zwischen PML-Kerndomänen und dem Signalübertragungsweg des CD95-Todesrezeptors identifiziert. Der Export von spezifischen Kernproteinen in das Zytoplasma als Modulator von apoptotischen Prozessen stellt einen neuen, bisher nicht beschriebenen biologischen Signalübertragungsweg dar.

VI Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Apaf-1	„apoptosis activating factor 1“
APL	Akute promyelozytische Leukämie
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bright	„B-cell regulator of IgH transcription“
CARD	„caspase recruitment domain“
CBP	„CREB binding protein“
caspase	„cystein aspartase“
cDNA	komplementäre DNA
CD95L	CD95-Ligand
CED	„cell death defective“
cIAP	„cellular inhibitor of apoptosis“
DD	„death domain“
DED	„death-effector domain“
DEDD	„death-effector domain containing DNA-binding protein“
DEF	„death-effector filament“
DISC	„death-inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negative
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRD	„death effector domain related domain“
ECL	„enhanced chemiluminescence“

E.coli	Escherichia Coli
FADD	“Fas-associated death domain protein“
FLASH	„FLICE associated huge protein“
FLICE	„FADD-like ICE“ = Caspase-8
c,vFLIP	“cellular (viral) FLICE inhibitory protein”
GAS	„IFN- γ activation site“
FCS	fötales Kälberserum
GMP1	„GAP modifying protein“
GR	Glukokortikoid Rezeptor
GRIP1	„glucocorticoid receptor interacting protein 1“
Hdm2	“human Mdm2”
HIPK2	„homeodomain-interacting protein kinase-2“
HMG	„high mobility group“
HP1	Heterochromatinprotein 1
HRPO	„horse radish peroxides“
hSir2	„human NAD-dependent histone deacetylase“
HSR	„homogenously staining region“
IAP	„inhibitor of apoptosis“
ICE	„interleukin-1-beta-converting-enzyme“
ISRE	„interferon-stimulated response element“
JNK	„cJun-N-terminal kinase“
kDa	Kilodalton
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
NBS	„Nijmegen breakage syndrome“
NF-kB	„nuclear factor kappa B“
ND10	nukleäre Domänen 10
NLS	„nuclear localization signal“
PARP	poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PBC	Primäre Biliäre Zirrhose
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“
PIC	„PML interacting clone 1“
PML	Promyelozytisches Leukämie-Protein
pSUPER	„suppression of endogenous RNA“

RAR-alpha	Retinsäurerezeptor-alpha
RING-Finger	C ₃ HC ₄ -Zink-Finger
RNA	Ribonukleinsäure
SAND	„Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	“small interfering RNA”
Smac/DIABLO	„second mitochondria-derived activator of caspase“
snRNP	“small nuclear ribonucleoprotein particles”
Sp100	„speckled protein 100kDa“
SUMO-1	„small ubiquitin-related modifier 1“
SRC-1	„steroid receptor coactivator 1“
STS	Staurosporin
TGF-beta-R1	“transforming growth factor beta receptor-1”
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-1
TRADD	„TNF-alpha receptor-associated death domain protein“
TRAF2	„TNF alpha receptor-associated factor 2“
TRAIL	„TNF-alpha related apoptosis inducing ligand“
Ubc9	„ubiquitin-like protein conjugating enzyme 9“
UbH	Ubiquitin-homolog
UBL-1	„Ubiquitin-like 1“
zIETD-fmk	Benzoxycarbonyl-Ille-Glu-Thr-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon
zVAD-fmk	Benzoxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(O-Methyl)-Fluoromethylketon
wt	wild-typ

VII Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Agulnik, S., Plass, C., Traut, W., and Winking, H. (1993). Evolution of a long-range repeat family in chromosome 1 of the genus *Mus*. *Mamm Genome* 4, 704-710.
- Alappat, E. C., Volkland, J., and Peter, M. E. (2003). Cell Cycle Effects by C-FADD Depend on Its C-terminal Phosphorylation Site. *J Biol Chem* 278, 41585-41588.
- Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9, 367-393.
- Antonia, S. J., Extermann, M., and Flavell, R. A. (1998). Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog* 9, 35-41.
- Ascoli, C. A., and Maul, G. G. (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 112, 785-795.
- Bischof, O., Kim, S. H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N. A., and Campisi, J. (2001). Regulation and localization of the bloom syndrome protein in response to dna damage. *J Cell Biol* 153, 367-380.
- Boddy, M. N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E., and Freemont, P. S. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971-982.
- Boisvert, F. M., Kruhlak, M. J., Box, A. K., Hendzel, M. J., and Bazett-Jones, D. P. (2001). The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* 152, 1099-1106.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Borden, K. L., Boddy, M. N., Lally, J., O'Reilly, N. J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., and Freemont, P. S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo J* 14, 1532-1541.
-

- Borden, K. L., Campbell-Dwyer, E. J., and Salvato, M. S. (1997). The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *Febs Lett* 418, 30-34.
- Bottomley, M. J., Collard, M. W., Huggenvik, J. I., Liu, Z., Gibson, T. J., and Sattler, M. (2001). The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol* 8, 626-633.
- Bratton, S. B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C. S., and Cohen, G. M. (2002). XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 881-892.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Burke, A. C. (2000). Hox genes and the global patterning of the somitic mesoderm. *Curr Top Dev Biol* 47, 155-181.
- Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2002). PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* 21, 1633-1640.
- Carvalho, T., Seeler, J. S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M., and Dejean, A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* 131, 45-56.
- Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., and Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-1863.
- Chelbi-Alix, M. K., and de The, H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18, 935-941.
- Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E. V., and Dixit, V. M. (1997). Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 388, 728-729.
- Chiou, S. K., Tseng, C. C., Rao, L., and White, E. (1994). Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol* 68, 6553-6566.
- Choi, Y. H., Kim, K. B., Kim, H. H., Hong, G. S., Kwon, Y. K., Chung, C. W., Park, Y. M., Shen, Z. J., Kim, B. J., Lee, S. Y., and Jung, Y. K. (2001). FLASH coordinates NF-kappa B activity via TRAF2. *J Biol Chem* 276, 25073-25077.
- Chun, H. J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C. K., Siegel, R. M., Dale, J. K., Puck, J., Davis, J., Hall, C. G., *et al.* (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.
- Conradt, B., and Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- Deng, Y., Lin, Y., and Wu, X. (2002). TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 16, 33-45.
-

- Deng, J. S., Benedict, L., Deng, D. H., Oddis, C. V., and Fratto, J. (1996). Significance of anti-nuclear matrix antibodies in patients with in vivo speckled antinuclear antibody staining. *Arthritis Rheum* *39*, 1300-1307.
- Dent, A. L., Yewdell, J., Puvionduilleul, F., Koken, M. H. M., de Thé, H., and Staudt, L. M. (1996). LYSP100-associated nuclear domains (LANDs): Description of a new class of subnuclear structures and their relationship to PML nuclear bodies. *Blood* *88*, 1423-1436.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998a). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* *2*, 233-239.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., *et al.* (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* *4*, 11-19.
- Doucas, V., Tini, M., Egan, D. A., and Evans, R. M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2627-2632.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. J., Chen, J. D., Kakizuka, A., and Evans, R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* *76*, 333-343.
- Esikiw, C. H., Dellaire, G., Mymryk, J. S., and Bazett-Jones, D. P. (2003). Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci* *116*, 4455-4466.
- Everett, R. D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1998). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* *72*, 6581-6591.
- Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* *16*, 566-577.
- Fagioli, M., Alcalay, M., Tomassoni, L., Ferrucci, P. F., Mencarelli, A., Riganelli, D., Grignani, F., Pozzan, T., Nicoletti, I., Grignani, F., and Pelicci, P. G. (1998). Cooperation between the RING + B1-B2 and coiled-coil domains of PML is necessary for its effects on cell survival. *Oncogene* *16*, 2905-2913.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S. W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* *14*, 2015-2027.
- Fesus, L., Tarcsa, E., Kedei, N., Autuori, F., and Piacentini, M. (1991). Degradation of cells dying by apoptosis leads to accumulation of epsilon(gamma-glutamyl)lysine isodipeptide in culture fluid and blood. *FEBS Lett* *284*, 109-112.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* *19*, 6185-6195.
-

- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* *390*, 308-311.
- Gianni, M., and de Thé, H. (1999). In acute promyelocytic leukemia NB4 cells, the synthetic retinoid CD437 induces contemporaneously apoptosis, a caspase-3-mediated degradation of PML/RARalpha protein and the PML retargeting on PML-nuclear bodies. *Leukemia* *13*, 739-749.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). p300 Transcriptional Repression Is Mediated by SUMO Modification. *Mol Cell* *11*, 1043-1054.
- Goddard, A. D., Borrow, J., Freemont, P. S., and Solomon, E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* *254*, 1371-1374.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* *18*, 6462-6471.
- Grötzinger, T., Jensen, K., Guldner, H. H., Sternsdorf, T., Szostecki, C., Schwab, M., Savelyeva, L., Reich, B., and Will, H. (1996). A highly amplified mouse gene is homologous to the human interferon-responsive Sp100 gene encoding an autoantigen associated with nuclear dots. *Mol Cell Biol* *16*, 1150-1156.
- Grötzinger, T., Jensen, K., and Will, H. (1996a). The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility. *J Biol Chem* *271*, 25253-25260.
- Grötzinger, T., Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1996b). Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML). *Eur J Biochem* *238*, 554-560.
- Guldner, H. H., Szostecki, C., Grötzinger, T., and Will, H. (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* *149*, 4067-4073.
- Guldner, H. H., Szostecki, C., Schröder, P., Matschl, U., Jensen, K., Lüders, C., Will, H., and Sternsdorf, T. (1999). Splice variants of the nuclear dot-associated Sp100 protein contain homologies to HMG-1 and a human nuclear phosphoprotein-box motif. *J Cell Sci* *112*, 733-747.
- Guiet, C., and Vito, P. (2000). Caspase recruitment domain (CARD)-dependent cytoplasmic filaments mediate bcl10-induced NF-kappaB activation. *J Cell Biol* *148*, 1131-1140.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Pandolfi, P. P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* *2*, 730-736.
- Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H. R., and Tschopp, J. (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur J Immunol* *26*, 721-724.
- Han, J., Wallen, H. D., Nunez, G., and White, E. (1998). E1B 19,000-molecular-weight protein interacts with and inhibits CED-4-dependent, FLICE-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* *18*, 6052-6062.
- Han, J., Modha, D., and White, E. (1998). Interaction of E1B 19K with Bax is required to block Bax-induced loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Oncogene* *17*, 2993-3005.
- Hengartner, M. (1998). Apoptosis. Death by crowd control. *Science* *281*, 1298-1299.
-

- Henkart, P. A. (1996). ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 4, 195-201.
- Hess, J. L., and Korsmeyer, S. J. (1998). Life, death and nuclear spots. *Nat Genet* 20, 220-222.
- Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D., and Freemont, P. S. (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet* 63, 297-304.
- Hofmann, T. G., Moller, A., Hehner, S. P., Welsch, D., Droge, W., and Schmitz, M. L. (2001). CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int J Cancer* 93, 185-191.
- Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4, 1-10.
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3668-3672.
- Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhao, L., Gu, L. J., and Wang, Z. Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567-572.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90-94.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., and Yonehara, S. (1999). The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398, 777-785.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd, and Maul, G. G. (1999). PML Is Critical for ND10 Formation and Recruits the PML-interacting Protein Daxx to this Nuclear Structure When Modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-234.
- Jang, M. S., Ryu, S. W., and Kim, E. (2002). Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 495-500.
- Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.
- Kakizuka, A., Miller, W. H., Jr., Umesono, K., Warrell, R. P., Jr., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E., and Evans, R. M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66, 663-674.
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R., and Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J* 11, 629-642.
- Kino, T., and Chrousos, G. P. (2003). Tumor Necrosis Factor alpha Receptor- and Fas-associated FLASH Inhibit Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor by Binding to and Interfering with Its Interaction with p160 Type Nuclear Receptor Coactivators. *J Biol Chem* 278, 3023-3029.
-

- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* *14*, 5579-5588.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* *12*, 611-620.
- Koken, M. H. M., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M. K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., and de Thé, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* *10*, 1315-1324.
- Koken, M. H. M., Puvion, D. F., Guillemain, M. C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szostecki, C., Calvo, F., Chomienne, C., *et al.* (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J* *13*, 1073-1083.
- Korsmeyer, S. J. (1995). Regulators of cell death. *Trends Genet* *11*, 101-105.
- Korsmeyer, S. J., Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack, D. J., and Linette, G. P. (1995). Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta* *1271*, 63-66.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* *407*, 789-795.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., and de The, H. (2001). Role of Promyelocytic Leukemia (PML) Sumolation in Nuclear Body Formation, 11S Proteasome Recruitment, and As(2)O(3)-induced PML or PML/Retinoic Acid Receptor alpha Degradation. *J Exp Med* *193*, 1361-1372.
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* *21*, 2383-2396.
- Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P. P., Pelicci, P. G., and Dejean, A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* *11*, 871-878.
- Le, X. F., Yang, P., and Chang, K. S. (1996). Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J Biol Chem* *271*, 130-135.
- Lehming, N., Le Saux, A., Schuller, J., and Ptashne, M. (1998). Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7322-7326.
- Li, B., and Dou, Q. P. (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3850-3855.
- Li, H., and Chen, J. D. (2000). PML and the oncogenic nuclear domains in regulating transcriptional repression. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 641-644.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J., and Chen, J. D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* *20*, 1784-1796.
-

- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* *416*, 648-653.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147-157.
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P. P., and Haupt, Y. (2003). PML protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *J Biol Chem* *278*, 16.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* *88*, 97-107.
- Martin, S. J., Finucane, D. M., Amarante-Mendes, G. P., O'Brien, G. A., and Green, D. R. (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* *271*, 28753-28756.
- Matera, A. G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* *9*, 302-309.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* *135*, 1457-1470.
- Matunis, M. J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 Modification and Its Role in Targeting the Ran GTPase-activating Protein, RanGAP1, to the Nuclear Pore Complex. *J Cell Biol* *140*, 499-509.
- Maul, G. G., Ishov, A. M., and Everett, R. D. (1996). Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* *217*, 67-75.
- Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A. M. (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* *129*, 278-287.
- Maul, G. G., Yu, E., Ishov, A. M., and Epstein, A. L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem* *59*, 498-513.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* *16*, 2794-2804.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 591-626.
- Melnick, A., and Licht, J. D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* *93*, 3167-3215.
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* *291*, 843-847.
- Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T. G., Rueffer, S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L. (2003a). PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Res* *63*, 4310-4314.
-

- Morgan, M., Thorburn, J., Pandolfi, P. P., and Thorburn, A. (2002). Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J Cell Biol* 157, 975-984.
- Morgan, R., Nalliah, A., and Morsi El-Kadi, A. S. (2004). FLASH, a component of the FAS-CAPSASE8 apoptotic pathway, is directly regulated by Hoxb4 in the notochord. *Dev Biol* 265, 105-112.
- Müller, S., Matunis, M. J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61-70.
- Muratani, M., Gerlich, D., Janicki, S. M., Gebhard, M., Eils, R., and Spector, D. L. (2002). Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol* 4, 106-110.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., *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, 817-827.
- Naka, K., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2002). Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with SP100 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 863-871.
- Nicotera, P., Leist, M., and Ferrando-May, E. (1999). Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* 66, 69-73.
- Negorev, D., and Maul, G. G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234-7242.
- Oberhammer, F., Fritsch, G., Schmied, M., Pavelka, M., Printz, D., Purchio, T., Lassmann, H., and Schulte-Hermann, R. (1993). Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J Cell Sci* 104 (Pt 2), 317-326.
- Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C. F., Chang, H. M., and Yeh, E. T. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* 157, 4277-4281.
- Pandolfi, P. P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F., and Pelicci, P. G. (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* 6, 1285-1292.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A., and Ruberti, G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274, 38241-38250.
- Pearse, M. J., O'Bryan, M., Fisicaro, N., Rogers, L., Murphy, B., and d'Apice, A. J. (1992). Differential expression of clusterin in inducible models of apoptosis. *Int Immunol* 4, 1225-1231.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
- Perez, D., and White, E. (1998). E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE. *J Cell Biol* 141, 1255-1266.
- Peter, M. E., Scaffidi, C., Medema, J. P., Kischkel, F., and Krammer, P. H. (1999). The death receptors. *Results Probl Cell Differ* 23, 25-63
-

- Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9, 505-512.
- Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J. C., and de Thé, H. (1998). PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* 20, 259-265.
- Reed, J. C. (1995). Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 7, 541-546.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 18, 6455-6461.
- Saitoh, H., Pu, R. T., and Dasso, M. (1997). SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* 22, 374-376.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P. Y., Berry, D. M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., *et al.* (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.
- Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108, 165-170.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 272, 26953-26958.
- Seeler, J. S., and Dejean, A. (1999). The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* 9, 362-367.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., and Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: A link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7316-7321.
- Shen, Z., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K., and Chen, D. J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36, 271-279.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1455-1459.
- Siegel, R. M., Martin, D. A., Zheng, L., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J., and Lenardo, M. J. (1998). Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol* 141, 1243-1253.
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Smith, R. A., and Baglioni, C. (1992). Characterization of TNF receptors. *Immunol Ser* 56, 131-147.
-

- Stadler, M., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M. H. M., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M. C., Schindler, C., and de Thé, H. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene 11*, 2565-2573.
- Stegh, A. H., Barnhart, B. C., Volkland, J., Algeciras-Schimmich, A., Ke, N., Reed, J. C., and Peter, M. E. (2002). Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. *J Biol Chem 277*, 4351-4360.
- Stegh, A. H., Herrmann, H., Lampel, S., Weisenberger, D., Andra, K., Seper, M., Wiche, G., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (2000). Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol 20*, 5665-5679.
- Stegh, A. H., Schickling, O., Ehret, A., Scaffidi, C., Peterhansel, C., Hofmann, T. G., Grummt, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *Embo J 17*, 5974-5986.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science 267*, 1445-1449.
- Stennicke, H. R., Jurgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., *et al.* (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem 273*, 27084-27090.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B., and Will, H. (1999). The nuclear dot protein Sp100: Characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem 274*, 12555-12566.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol 139*, 1621-1634.
- Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med 2*, 1361-1366.
- Sun, X. M., Bratton, S. B., Butterworth, M., MacFarlane, M., and Cohen, G. M. (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem 277*, 11345-11351.
- Szostecki, C., Guldner, H. H., Netter, H. J., and Will, H. (1990). Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol 145*, 4338-4347.
- Szostecki, C., Krippner, H., Penner, E., and Bautz, F. A. (1987). Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (Sp100). *Clin Exp Immunol 68*, 108-116.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science 267*, 1456-1462.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science 245*, 301-305.
- Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., and Reed, J. C. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J 18*, 6037-6049.
-

- Vaux, D. L., Haecker, G., and Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-779.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149-159.
- Wang, Z. G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P. P. (1998). PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20, 266-272.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Wasylyk, C., Schlumberger, S. E., Criqui-Filipe, P., and Wasylyk, B. (2002). Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 22, 2687-2702.
- Weemaes, C. M., Smeets, D. F., and van der Burgt, C. J. (1994). Nijmegen Breakage syndrome: a progress report. *Int J Radiat Biol* 66, S185-188.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Wiesmeijer, K., Molenaar, C., Bekeer, I. M., Tanke, H. J., and Dirks, R. W. (2002). Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not. *J Struct Biol* 140, 180-188.
- Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* 4, 139-147.
- Wu, D., Wallen, H. D., and Nunez, G. (1997). Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* 275, 1126-1129.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xie, K., Lambie, E. J., and Snyder, M. (1993). Nuclear dot antigens may specify transcriptional domains in the nucleus. *Mol Cell Biol* 13, 6170-6179.
- Xie, T., and Ding, D. F. (2000). Conservation and Evolution of the "Core Apoptotic Engine" Lesson from the Genome Comparison of *Drosophila*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 32, 637-639.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., and Kim, M. K. (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol* 4, 865-870.
- Yang, X., Chang, H. Y., and Baltimore, D. (1998). Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355-1357.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., and Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
-

- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., and Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* *400*, 886-891.
- Zakeri, Z., and Lockshin, R. A. (1994). Physiological cell death during development and its relationship to aging. *Ann N Y Acad Sci* *719*, 212-229.
- Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z., Stan, R., Ellis, N. A., and Pandolfi, P. P. (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* *18*, 7941-7947.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P. (2000a). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* *95*, 2748-2752.
- Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2000b). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* *2*, E85-E90.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2000c). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* *191*, 631-640.
- Zong, R. T., Das, C., and Tucker, P. W. (2000). Regulation of matrix attachment region-dependent, lymphocyte-restricted transcription through differential localization within promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Embo J* *19*, 4123-4133.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* *90*, 405-413.
-

VIII Anhang

Teilnahme an Kongressen:

- 1) 01.05.-06.05. 2001: Teilnahme an dem Kongress: „*PML nuclear bodies*“ in Trieste, Italien
- 2) 03.06.- 06.06.2003: Teilnahme an dem Kongress: „*PML- and related nuclear bodies*“ in Perugia, Italien

Publikation:

Milovic K., Jensen K., Will H., Hofmann T.G. (2004) FLASH couples CD95 (Fas/APO-1) signalling to a nuclear, PML-body-associated apoptosis pathway. Zur Publikation eingereicht.
