

Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

**Regulation und Funktion von Mitgliedern der TNF α -Familie
bei Doxorubicin-induzierter Apoptose und bei einem Patienten
mit einem lymphoproliferativen Syndrom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von Stefan Pfister

aus Tübingen

2002

Dekan: Prof. Dr. C. D. Claussen

1. Berichtstatter: Prof. Dr. G. Bruchelt

2. Berichtstatter: PD Dr. S. Wesselborg

**Für meine geliebte Martina,
mit der ich mein weiteres Leben teilen möchte
und für meine Eltern,
denen ich sehr viel zu verdanken habe.**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	APOPTOSE UND NEKROSE	1
1.2	APOPTOSE-INDUKTION	3
1.3	APOPTOSE-INDUKTION DURCH MITGLIEDER DER TNF-FAMILIE	4
1.4	INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE	7
1.5	DAS TNF-SYSTEM	11
1.6	DAS CD95-SYSTEM	12
1.7	DAS TRAIL-SYSTEM	15
1.8	TRAMP	18
1.9	DAS RANKL-SYSTEM	19
1.10	APOPTOSE-INDUKTION DURCH CHEMOTHERAPEUTIKA	21
1.11	ANTHRAZYKLINE	24
1.12	AUTOIMMUNES LYMPHOPROLIFERATIVES SYNDROM (ALPS)	25
1.14	X-CHROMOSOMAL VERERBTES LYMPHOPROLIFERATIVES SYNDROM	27
2	ZIELSETZUNG	28
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	REAGENZIEN	29
3.2	OLIGONUKLEOTIDPRIMER	35
3.3	ZELLEN UND ZELLKULTUR	36
3.4	INKUBATION MIT DOXORUBICIN	37
3.5	ISOLIERUNG VON PBMC	38
3.6	ISOLIERUNG VON RNA	38
3.7	CDNA-SYNTHESE	39
3.8	POLYMERASEKETTENREAKTION	40
3.9	SDS-POLYACRYLAMIDELEKTROPHORESE	42
3.10	WESTERN BLOT	43
3.11	ANNEXIN-V-FÄRBUNG ZUR FACS-ANALYSE	44

3.12	FACS-MARKIERUNG OHNE LYSEFIXIERUNG	45
3.13	MTT TEST	46
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	47
4.1	EXPRESSION VON TNF-HOMOLOGEN IN CEM	47
4.2.	EXPRESSION VON TNF-HOMOLOGEN IN PBMC	48
4.3.	EXPRESSION VON TNF-HOMOLOGEN IN JM-3A5	49
4.4.	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG VON CEM INKUBATION MIT DOXORUBICIN UND ANDEREN STIMULI	50
4.5	QUANTIFIZIERUNG ÜBERLEBENDER ZELLEN MIT MTT	56
4.6	VORSTELLUNG EINES SIEBENJÄHRIGEN PATIENTEN MIT LYMPHOPROLIFERATIVEN SYNDROM⁵⁷	
4.7	EXPRESSION VON TNF-HOMOLOGEN IN DEN PBMC DES PATIENTEN	59
4.8	AUSBLICK	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	ANHANG	85
7.1	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYNONYME	85
7.2	DANKSAGUNG	88
7.3	LEBENS LAUF	89

1 Einleitung

1.1 Apoptose und Nekrose

Die Aufrechterhaltung der Homöostase, d. h. eines Fließgleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Zelluntergang, ist eine wesentliche Voraussetzung für die Lebensfähigkeit vielzelliger Organismen (siehe Abb. 1 und Kapitel 6) [1]. In der Vergangenheit konzentrierte sich die Forschung hauptsächlich auf die physiologischen und pathologischen Formen der Zellproliferation (v. a. Hyperplasie und Dysplasie). Über die verschiedenen Mechanismen des Zelltodes ist dagegen weniger bekannt.

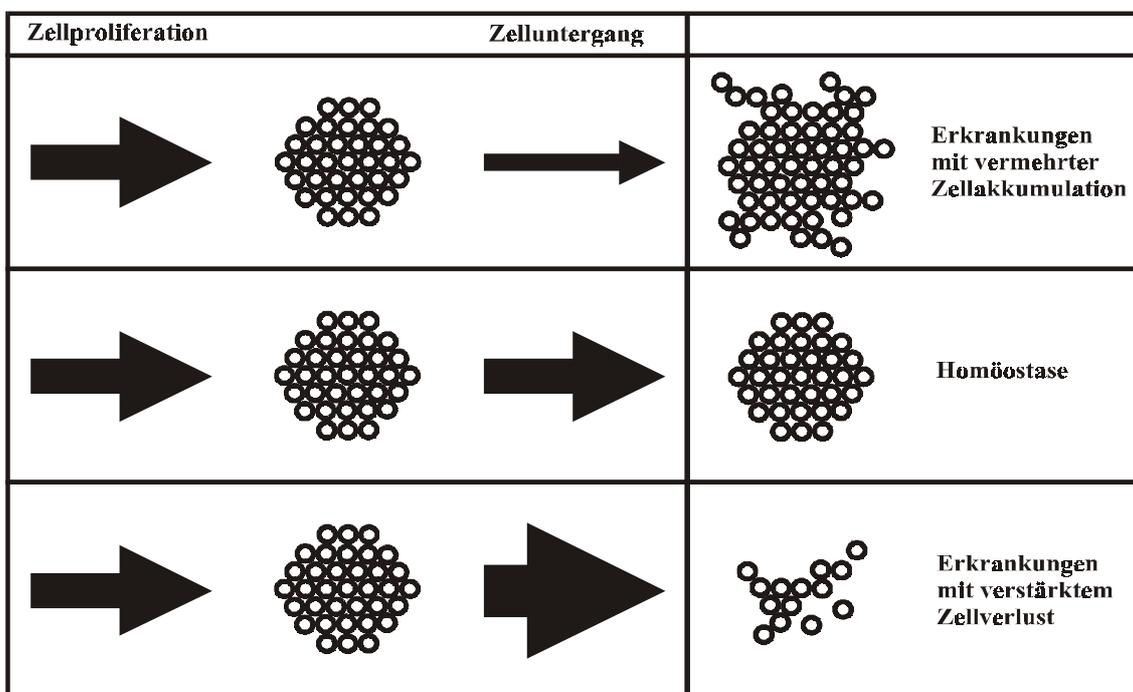


Abbildung 1: Homöostase

Die wichtigste Form des physiologischen Zellunterganges wird als Apoptose bezeichnet. Dieser Begriff wurde 1975 von Currie et al. [2] eingeführt und bezog sich zunächst rein deskriptiv auf die lichtmikroskopisch nachvollziehbaren Veränderungen der zugrunde gehenden Zelle. Jahre später wurde beschrieben, daß es sich hierbei um eine entwicklungsgeschichtlich hochkonservierte Form des Zellunterganges handelt, die sich durch typische biochemische Veränderungen auszeichnet [3; 4]. Fortan wurde, hauptsächlich in

entwicklungsbiologischen Zusammenhängen, auch vom programmierten Zelltod gesprochen. Alle biologisch-biochemischen Prozesse, welche die Entfernung überzähliger, gealterter, fremder, dysplastischer, infizierter oder auf andere Weise dysfunktioneller Zellen zum Ziel haben, bedienen sich dieses für die übrigen, lebensfähigen Zellen höchst schonenden Vorganges [5]. Immunregulation, Immuntoleranz, Gewebsumbildung, Tumorregression, Transplantatabstoßung, aber auch Transplantattoleranz sind nur einige Beispiele hierfür. Der programmierte Zelltod spielt ferner in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle [6]. Fehlgesteuerte oder unzureichende Apoptose trägt zur Pathogenese zahlreicher Erkrankungen bei. Dazu zählen neben Malignomen [7-9] auch virale Infektionen wie Virushepatitis [10] und HIV [11-16], Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus Erythematoses [17; 18], rheumatoide Arthritis [19-21], chronische Glomerulonephritis [21; 22], Autoimmun-Diabetes [23], Enzephalomyelitis [24-26] und ALPS (Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom [27; 28]), der endotoxische Schock [29], Colitis ulcerosa [30], Hashimoto Thyreoiditis [31] sowie einige neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Spinale Muskelatrophie, Amyotrophe Lateralsklerose) [32-36].

Zellen, die im Begriff sind Apoptose zu begehen, weisen charakteristische morphologische und biochemische Eigenschaften auf, welche sie von nekrotischen Zellen unterscheiden. Morphologische Charakteristika des apoptotischen Zelltodes sind Membran-„blebbing“ (blebbing, engl. brodeln), Zellschrumpfung und Chromatin-Kondensation. Außerdem sind apoptotische Zellen durch den Verlust adhäsiver Eigenschaften, den Verlust der Mitochondrien-Funktion sowie den aktiven Abbau des Zytoskeletts gekennzeichnet. Biochemisch gehen diese Veränderungen in der Mehrzahl bisher untersuchter Zelltypen mit der Translokation von Phosphatidylserin in die äußere Oberfläche der Zellmembran (sog. „Flip-Flop“), der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie der Aktivierung von Endonukleasen einher. Aktivierte Endonukleasen sind für die internukleosomale Fragmentierung der genomischen DNA verantwortlich.

Die Merkmale des apoptotischen Zelltodes müssen von denen des nekrotischen Zelluntergangs unterschieden werden. Nekrose ist eine pathologische Form des Zelluntergangs, welche aus einer akuten traumatischen Verletzung der Zelle oder der Einwirkung hochkonzentrierter Noxen resultiert. Der nekrotische Zelltod ist durch rasche Schwel-

lung der Zelle und ihrer Organellen, frühe Schädigung der Plasmamembran und konsekutive Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren gekennzeichnet. Die durch die Schädigung der Plasmamembran induzierte Zellyse provoziert typischer Weise eine Entzündungsreaktion.

	APOPTOSE	NEKROSE
Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> * Membrane blebbing * Zellschrumpfung * Chromatinkondensation * Abbau des Zytoskeletts 	<ul style="list-style-type: none"> * Schädigung der Plasmamembran * Zellschwellung * Lyse des Zellkerns
Biochemie	<ul style="list-style-type: none"> * Flip-Flop von Phosphatidylserin * Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien * Aktivierung von Endonucleasen 	<ul style="list-style-type: none"> * Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren * Osmotische Zellyse

Abbildung 2: Apoptose und Nekrose

Im Gegensatz dazu findet beim apoptotischen Zelluntergang eine kontrollierte Autodigestion statt. Veränderungen in der Plasmamembran apoptotischer Zellen (z. B. Flip-Flop von Phosphatidyl-L-Serin, s. o.) geben benachbarten Phagozyten ein Signal zur Phagozytose [37; 38]. Zellen, die nicht sofort phagozytiert werden, zerfallen nach dem aktiven Abbau des Zytoskeletts zunächst in kleinere, membranbegrenzte Fragmente. Diese werden als apoptotische Körperchen (engl. apoptotic bodies) bezeichnet. Auch sie werden letztendlich phagozytiert, teils von benachbarten Zellen des Gewebsverbandes, teils durch Granulozyten und Makrophagen. Eine klassische Entzündungsreaktion findet in der Regel nicht statt.

1.2 Apoptose-Induktion

Apoptose kann durch sehr verschiedene Stimuli hervorgerufen werden. Extrinsische Induktoren sind unter anderem verschiedene Chemotherapeutika (z. B. Anthracycline, cis-

Platin, Methotrexat und Vincristin) sowie Gamma- und UV-Strahlen. Daneben gelten Hitze, virale Infektionen, bakterielle Toxine, einige Onkogene (z. B. *myc*), Tumor-Suppressorgene (z. B. *p53*), Oxidantien, freie Radikale, Antimetaboliten und Toxine (z. B. Alkohol) als adäquate Stimuli. Für die körpereigenen Mechanismen spielen Liganden und Rezeptoren der wachsenden TNF α -Familie (Tumor-Nekrose-Faktor α) eine entscheidende Rolle. Desweiteren lösen TGF β , Stickstoffmonoxid, einige Neurotransmitter (z. B. Glutamat und Dopamin), Calcium, Glukocorticoide, Verlust des Zellverbandes und Wachstumsfaktor-Entzug Apoptose aus [39-42].

Trotz der Vielzahl verschiedener Stimuli kann davon ausgegangen werden, daß die Aktivierung von Mitgliedern der TNF α -Superfamilie und die sich anschließenden intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen zumindest für einige der genannten Induktoren eine gemeinsame Endstrecke darstellen.

1.3 Apoptose-Induktion durch Mitglieder der TNF-Familie

Rezeptoren der TNF α -Superfamilie besitzen die Eigenschaft, zytotoxische Signale in das Zytoplasma weiterzuleiten. Daneben erfüllen die meisten dieser Rezeptoren noch weitere Funktionen, die nicht direkt an der Induktion und Regulation des Zellunterganges beteiligt sind, z. B. Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Zellproliferation. Zu dieser Gruppe pleiotroper Rezeptoren zählen unter anderem TNF-R1, TNF-R2, CD27, CD30, CD40, NGF-R, GITR, TRAMP und RANK (siehe auch Kapitel 7.1, Verzeichnis der Abkürzungen und Synonyme). In allen Fällen handelt es sich um Typ I-Transmembranproteine, d. h. membrandurchspannende Proteine, deren C-Terminus, im Gegensatz zu den sehr viel selteneren Typ II-Transmembranproteinen (s. u.), auf der zytoplasmatischen Seite der Membran liegt. Außerdem weisen alle genannten Rezeptoren strukturelle Ähnlichkeiten im Bereich der extrazellulären Domänen auf, in den zytoplasmatischen Abschnitten finden sich keine relevanten Sequenzhomologien [9; 43; 44].

Das im Jahr 1991 entdeckte und klonierte CD95 war der erste Vertreter der TNF-Rezeptor-Familie, dem hauptsächlich Apoptose-induzierende Eigenschaften zugeschrieben werden konnten [45; 46]. Der zugehörige Ligand CD95L ist ein Transmembranprotein, das neben seiner Hauptfunktion als membranständiges Zytokin

(mCD95L) auch proteolytisch aktiviert und als löslicher sCD95L freigesetzt werden kann [47; 48]. Die Aktivierung von CD95L führt zur Trimerisierung des Liganden und schließlich auch zur Trimerisierung des Rezeptors [49]. Der Vergleich der intrazellulären Domänen von CD95 und TNF-R1 ergab in diesem Fall große Ähnlichkeit innerhalb eines ca. 80 Aminosäuren langen Fragments. Diese Sequenz konnte als Todesdomäne (engl. death domain, DD) identifiziert werden und ist für die Weiterleitung des zyto-toxischen Signals in beiden Signaltransduktionswegen verantwortlich [50]. Mit TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) wurde 1995 von Wiley et al. [51] sowie Pitti et al. [52] ein weiterer Apoptose-induzierender Ligand kloniert. Dieses Zytokin zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeit zu CD95L und TNF α . Für TRAIL konnten bisher fünf Rezeptoren nachgewiesen werden, von denen nur drei (TRAIL-R1, TRAIL-R2 und Osteoprotegerin) Todesdomänen besitzen, Osteoprotegerin sogar deren zwei. Zwei weitere, sogenannte Decoy-Rezeptoren (decoy, engl. locken), weisen hingegen keine bzw. verkürzte Todesdomänen auf. Sie sind aufgrund der Homologie im Bereich der extrazellulären Abschnitte zwar in der Lage TRAIL zu binden, können das zytotoxische Signal jedoch nicht ins Zytoplasma weitergeben [53-55]. Die biologischen Funktionen des TRAIL-Systems werden in Kapitel 1.7 eingehender diskutiert. Osteoprotegerin ist auch ein Rezeptor für RANKL (Receptor activator of NF- κ B Ligand), einen TNF-homologen Liganden, dessen Rolle als Apoptose-Induktor noch nicht ausreichend untersucht ist (s. Kapitel 1.9). RANK (Receptor activator of NF- κ B) wurde als ein weiterer Rezeptor für RANKL identifiziert. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle auch noch TWEAK erwähnt, ein weiterer TNF-homologer Ligand, der eine ähnlich breite Expression in physiologischen Geweben zeigt wie TRAIL. Im Gegensatz zu diesem induziert TWEAK jedoch nur schwach Apoptose. Außerdem sind nur wenige Zellpopulationen TWEAK-sensibel [56]. Daher spielt dieser Ligand für die weiteren Überlegungen nur eine untergeordnete Rolle. TRAMP (TNF receptor-related apoptosis-mediating protein) ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie mit großer struktureller und funktioneller Ähnlichkeit zu TNF-R1. TRAMP ist ein membrangebundener Rezeptor und besitzt in seinem zytoplasmatischen Anteil eine Todesdomäne. Ob es sich bei dem korrespondierenden Liganden um TWEAK handelt, ist noch nicht zweifelsfrei geklärt [57; 58].

Zusammenfassend weisen sieben der bisher identifizierten Rezeptoren der TNF-Familie eine funktionsfähige Todesdomäne auf: TNF-R1, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, OPG und TRAMP. TRAIL-R4 besitzt eine verkürzte Todesdomäne.

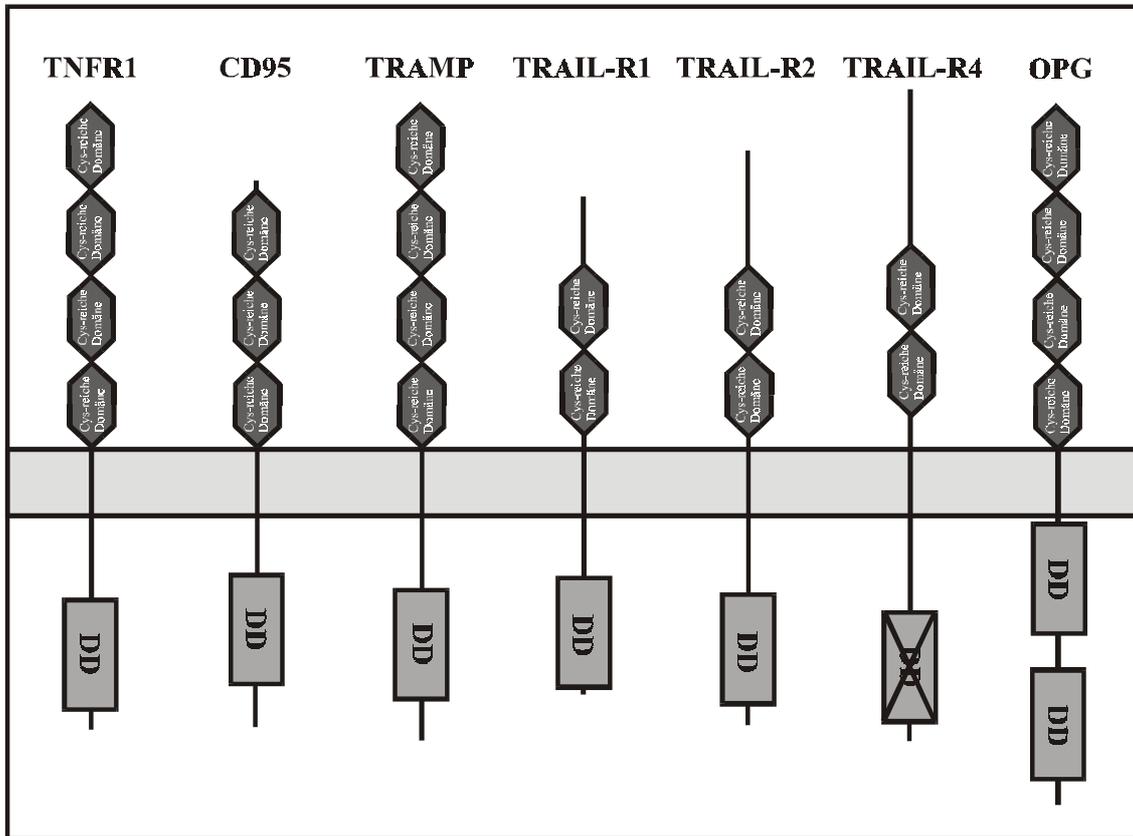


Abbildung 3: TNF-Rezeptoren mit zyttoplasmatischer Todesdomäne

Neben den oben erwähnten Liganden TRAIL und CD95L binden auch $\text{TNF}\alpha$ und Lymphotoxin α ($\text{LT}\alpha$) an Rezeptoren mit Todesdomäne. Mit Ausnahme von $\text{LT}\alpha$ werden alle Liganden als Typ II Transmembranproteine synthetisiert. $\text{LT}\alpha$ wird als lösliches Protein sezerniert, bindet aber an membranständiges $\text{LT}\beta$, um seine Wirkung schließlich ebenfalls als zellgebundenes Protein zu entfalten. Wie oben bereits exemplarisch beschrieben trimerisieren aktivierte Liganden, um die zugehörigen Rezeptoren dadurch ihrerseits zu trimerisieren [49; 59]. Die Rezeptorerkennung erfolgt in allen Fällen über eine hochhomologe antiparallele β -Faltblatt-Struktur.

1.4 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

Die intrazelluläre Signaltransduktion involviert verschiedene Todesrezeptor-assoziierte Proteine (Adapter-Proteine), die dann in den meisten Fällen eine Kaskade von Caspasen (Interleukin 1 β -Converting Enzyme Like Proteases) aktivieren. Die zwei am besten untersuchten Adapter-Proteine sind FADD (Fas-associated death domain protein; [60]) und TRADD (TNF receptor-associated death domain protein; [61]). Beide besitzen eine Todesdomäne. Die Bindung eines Liganden an den zugehörigen Todesrezeptor führt über elektrostatische Wechselwirkungen zur Ankopplung der Todesdomäne des Rezeptors an die Todesdomäne des jeweiligen Adapterproteins [62]. Dadurch wird die sog. Todes-Effektor-Domäne (death effector domain, DED) freigegeben, welche ihrerseits an die DED bestimmter Caspasen bindet. Die als DED angesprochene Sequenz im N-terminalen Bereich der Adapterproteine ist bei Überexpression in Transfektionsexperimenten für sich allein in der Lage, Apoptose hervorzurufen [60]. FLICE (Caspase 8) besitzt zum Beispiel zwei DEDs, die nach Rezeptor-Aktivierung und Bindung von FADD an den Rezeptor mit dessen DED in Wechselwirkung treten. Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung von FLICE und resultiert schließlich in einer autoproteolytischen Aktivierung der Protease [63]. FLICE stellt somit die Verbindung zwischen Todesrezeptor und Adapter-Protein einerseits und Caspasen-Kaskade andererseits dar (s. u.).

Die Aktivierung von CD95, um das am besten untersuchte Beispiel zu nennen, führt zur Assoziierung von insgesamt vier Proteinen, die als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet werden [64]. Neben dem Rezeptor handelt es sich dabei um zwei unterschiedlich phosphorylierte Formen von FADD sowie um FLICE [65].

RIP und RAIDD bilden ein funktionelles Paar von Adapterproteinen, das ebenfalls von CD95 aktiviert werden kann und über die jeweilige DD interagiert. RAIDD (RIP-associated ICH/CED-3-homologous protein with a death domain) besitzt an seinem aminoterminalen Ende eine Sequenzhomologie zu einigen Caspasen. Diese Sequenz wird als CARD (Caspase Recruitment Domain) bezeichnet. Über homophile Wechselwirkungen wird auf diesem Wege möglicherweise eine Regulationsfunktion wahrgenommen [66].

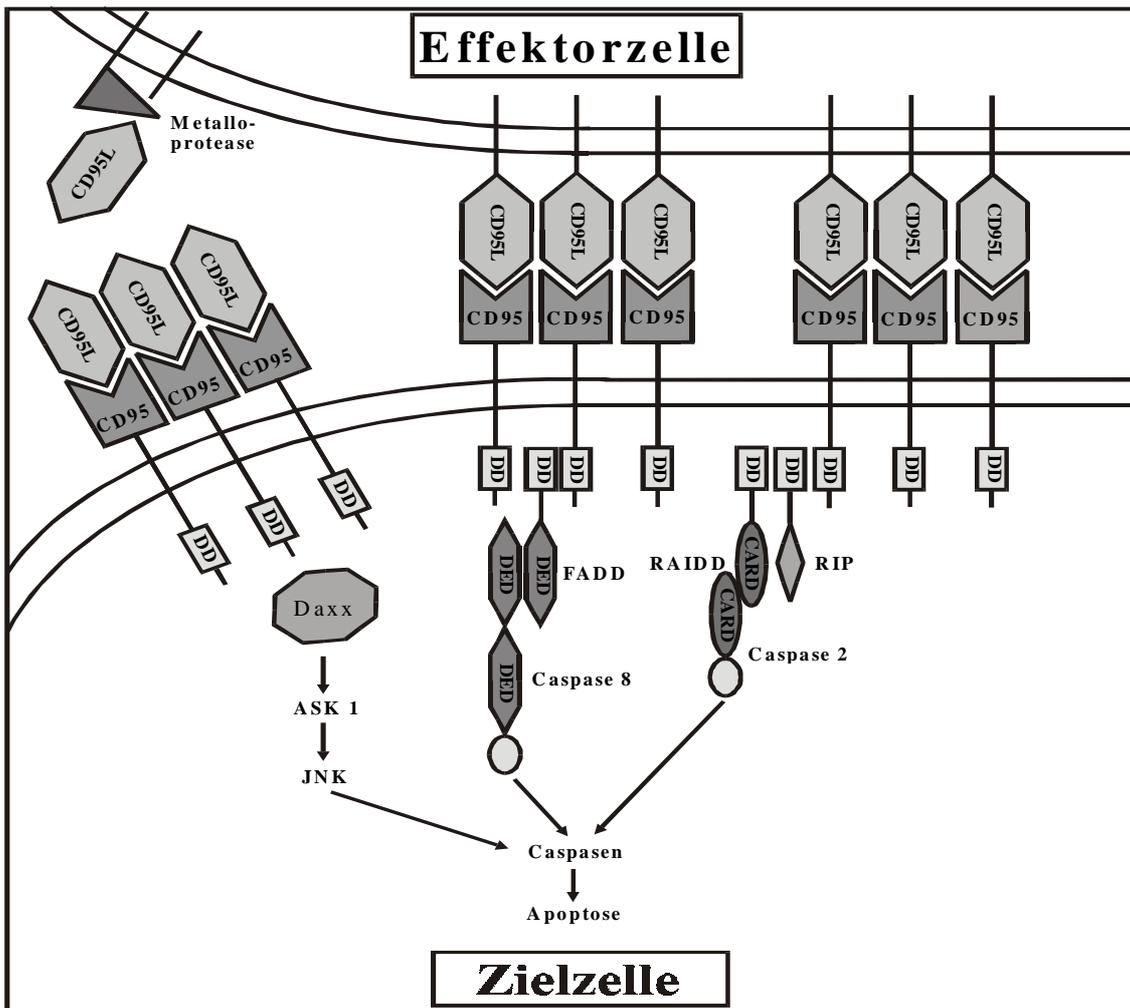


Abbildung 4: CD95-induzierte Apoptosesignale

Das eingangs bereits erwähnte TRADD [61; 67] wird dagegen vor allem nach Aktivierung von TNF-R1 rekrutiert. Es vermittelt vermutlich die Anlagerung und Aktivierung von FADD, RIP (receptor-interacting protein) und TRAF2 (TNF receptor-associated factor) an den Rezeptor. TRADD und RIP induzieren Apoptose, können aber auch NF- κ B aktivieren [67; 68]. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl durch TNF als auch durch TRAIL, TRAMP und RANKL (s. u.), nicht aber durch CD95L aktiviert werden kann [43; 68-72]. Die Aktivierung von NF- κ B ist möglicherweise ein Schutzmechanismus gegen den apoptotischen Zelluntergang [73]. Welche anti-apoptotischen Gene dabei von NF- κ B aktiviert werden, ist im Detail nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung eine Erhöhung der Apoptose-

Sensitivität bewirkt [74]. Dieser Effekt kann möglicherweise in Zukunft im Rahmen anti-neoplastischer Therapien ausgenutzt werden [75; 76]. Außerdem spielt NF- κ B eine wesentliche Rolle in der Vermittlung proinflammatorischer Aktivität (s. u.). Die über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 initiierte Signaltransduktion ähnelt der beschriebenen CD95-Signalkaskade, ist aber nicht identisch mit dieser [77]. TRAIL aktiviert, im Gegensatz zu CD95L, in erster Linie Caspase 10 (FLICE 2). Außerdem wird kontrovers über die Beteiligung von FADD an der durch TRAIL initiierten Apoptose diskutiert, obwohl Schneider et al. [71], Preet et al. [68] sowie Wajant et al. [65] gezeigt haben, daß FADD beteiligt ist.

Neben den hier beschriebenen Apoptose-Signalkaskaden mit Beteiligung eines Adapter-Proteins spielt möglicherweise auch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie die Sphingomyelinase-abhängige Generierung des second messengers Ceramid aus Sphingomyelin in der Aktivierung verschiedener Caspasen eine Rolle [78-82]. Ob dies unabhängig von den beschriebenen Adapter-Proteinen stattfindet und in welcher Form das apoptotische Signal die Mitochondrien erreicht, ist bisher nicht aufgeklärt.

Caspasen sind Schlüsselenzyme für die meisten apoptotischen Signale und unmittelbar in den Vollzug des Zellunterganges involviert. Alle Caspasen sind Cystein-Proteasen und schneiden an Aspartat-Resten, was zur Namensgebung führte [84]. Sie werden als Zymogene synthetisiert und müssen daher durch Proteolyse aktiviert werden. Aufgrund ihrer Funktion innerhalb der Kaskade werden Caspasen in Initiatoren (z. B. FLICE oder FLICE 2) und Vollstrecker (z. B. CAD, s. u.) eingeteilt. Vollstrecker werden von Initiatoren proteolytisch aktiviert und können sich wahrscheinlich nicht selbst durch Autoproteolyse aktivieren [85; 86]. Die genaue Abfolge der Caspasen-Kaskade bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Substrate für aktivierte (Vollstrecker-) Caspasen sind unter anderem Strukturproteine (z. B. Gas2, Gelsolin, β -Catenin und Keratin 18), diverse Regulatoren des Zellzyklus (z. B. das Retinoblastom-Protein, der p53-Regulator MDM2 und einige Kinasen) sowie einige Proteine, die für die Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen Genoms unerlässlich sind (z. B. DNA-Reparaturenzyme wie Poly-ADP-Ribose Polymerase oder DNA-Polymerase Kinase) [87]. Das von Enari et al. [88, 89] 1998 klonierte Enzym Caspase-activated DNase (CAD), welches unter Apoptoseinduktion von

Caspase 3 aktiviert wird, stellt somit die erste direkte Verbindung zwischen Caspase-Aktivierung und dem Auftreten der für apoptotische Zellen charakteristischen internukleosomalen DNA-Fragmentierung dar.

Neben der hier im Detail beschriebenen, zytokinvermittelten Apoptose-Induktion über Caspase-Kaskaden wird über dieselben Rezeptoren, jedoch unter Rekrutierung anderer Adaptermoleküle (z. B. Daxx und MADD, s. u.) auch die mitogen-aktivierte Protease (MAP) Kinase JNK (c-Jun-N-terminal Kinase; syn. SAPK) aktiviert. Daxx (Fas death domain associated protein) interagiert mit der DD von CD95, während MADD (mitogen-activated kinase activating death domain protein) als Adapterprotein von TNF-R1 identifiziert wurde, welches, neben RIP und TRAF, zur TNF-abhängigen JNK-Aktivierung benötigt wird [90-93]. Daxx bindet direkt an die DD von CD95, Überexpression führt zur Aktivierung von JNK. Dominant-negative Hemmung von Daxx oder dessen Effektor-domäne blockt die CD95-abhängige JNK-Aktivierung [87]. Auch TRAIL ist über seine DD-tragenden Rezeptoren (TRAIL-R1 und TRAIL-R2) in der Lage JNK zu aktivieren. Es handelt sich um einen FADD-unabhängigen Mechanismus. Ein alternatives Adapterprotein konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden [94; 95]. Der kurz angesprochene second messenger Ceramid aktiviert JNK über TAK1 und JNK Kinasen [96].

Welche Rolle die Aktivierung von JNK im Rahmen des Zelluntergangs und Zellwachstums spielt, wird kontrovers diskutiert. Dominant-negative JNK-Mutanten weisen eine Beeinträchtigung der TNF- und Streß (Sauerstoff-Radikale, Strahlung, Ischämie)-induzierten Apoptose auf [90; 96]. Überexpression von Daxx potenziert die Apoptoseinduktion via CD95 [90]. Die JNK-aktivierende Kinase ASK1 (Apoptosis Signaling-Regulating Kinase 1) scheint eine für die TNF und CD95-vermittelte Apoptose notwendige Komponente zu sein. Kinase-defiziente Mutanten zeigen stark reduzierte Apoptose und verminderte JNK-Aktivierung [90; 91]. Die Aktivierung von JNK kann durch Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 geblockt werden, nicht aber durch Caspase-Inhibitoren [97]. Eine Hemmung der Caspasen vermag aber den Daxx-induzierten Zelltod zu verhindern. Außerdem fanden Huang et al. [98] in Jurkat T-Zellen, daß MAP Kinase Kinase 6b, ein weiteres Mitglied der Familie von MAP-Kinasen, eine der Caspasen-Kaskade vorgeschaltete Komponente des über CD95 indu-

zierten Apoptosepfades darstellt. Dies spricht dafür, daß Caspasen an diesem Signaltransduktionsweg distal von JNK beteiligt sind. Andererseits sind MAP-Kinasen (v. a. JNK) über die Aktivierung des Protoonkogens c-Jun und der konsekutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 aber auch an der Zellproliferation beteiligt [99]. Verschiedene Arbeiten lassen einen vom Zelltyp und vom Induktor abhängigen Beitrag von JNK zum Zelluntergang einerseits, aber auch zur Zellaktivierung und Zellproliferation vermuten [97; 100-102].

1.5 Das TNF-System

Der bereits im Jahre 1975 isolierte Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) war das erste Mitglied und damit Namensgeber für die hier besprochene Familie von Zytokinen und deren Rezeptoren [103]. Neben seinen zytotoxischen Eigenschaften besitzt TNF α vor allem proinflammatorische Aktivität. Die zugehörigen Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 binden neben TNF α auch LT α -Homotrimere. LT α /LT β -Heterotrimere haben dagegen einen eigenen Rezeptor (LT β -Rezeptor). Beide TNF-Rezeptoren werden ubiquitär exprimiert. Einzige Ausnahme sind Erythrozyten. TNF α selbst wird vor allem von aktivierten Makrophagen, aber auch von Neutrophilen, NK-Zellen, Lymphozyten, Keratinozyten, glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert. Die zytotoxische Wirkung von TNF α auf Tumorzellen *in vitro* sowie die Induktion hämorrhagischer Nekrosen in transplantierten Tumoren im Tierversuch weckte zunächst die Hoffnung, eine neue Tumorthherapie gefunden zu haben. Die hohe Toxizität auch für gesunde Gewebe, die ubiquitäre Expression der zugehörigen Rezeptoren sowie vielfältige andere biologische Effekte ließen bald erkennen, daß TNF α die zunächst geweckten Erwartungen nicht erfüllen würde. Stattdessen wurde TNF α aufgrund seiner Wirkungen auf das Endothel mit der Pathogenese des endotoxischen Schocks in Verbindung gebracht [29; 104]. TNF α bewirkt hier die Freisetzung von Platelet Aggregating Factor (PAF), Adhäsionsmolekülen sowie diversen Zytokinen. Direkte Folgen davon sind eine erhöhte Gefäßpermeabilität, antikoagulierende Aktivität und Leukozytenadhäsion. Eine signifikant verminderte TNF α -Expression in aktivierten T-Zellen von Patienten mit SLE lassen eine Beteiligung an der als AICD (ac-

tivation induced cell death, siehe Kapitel 1.6) bezeichneten Aufrechterhaltung der lymphozyten-Homöostase vermuten. Ein Defekt könnte zu der erhöhten Anzahl von aktivierten autoreaktiven T-Lymphozyten bei SLE-Patienten beitragen [105]. Daneben spielt TNF α bei der Aktivierung von Makrophagen, der Organisation von lymphatischen Organen und der Pathogenese der rheumatischen Arthritis eine wichtige Rolle [106-108]. Viele der beschriebenen proinflammatorischen Wirkungen von TNF α gehen mit einer vermehrten Expression des oben angesprochenen Transkriptionsfaktors NF- κ B einher [29].

1.6 Das CD95-System

CD95 und der zugehörige Ligand CD95L bilden das am besten untersuchte Paar von TNF α -Homologen [45; 46]. CD95L wird vor allem von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen, aber beispielsweise auch von Sertoli-Zellen des Hodens, Epithelzellen der vorderen Augenkammer und folliculären Zellen der Schilddrüse exprimiert [31; 109; 110]. Wie in Kapitel 1.3 bereits angesprochen, kann CD95L in einer membrangebundenen Form (mCD95L) und in einer löslichen Form (sCD95L) vorliegen [47; 48]. Die Abspaltung des extrazellulären Anteils von mCD95L und damit die Freisetzung von sCD95L erfolgt durch eine membranständige Metalloproteinase. Es handelt sich also höchstwahrscheinlich nicht um Splicevarianten. Tanaka et al. [47] weisen darauf hin, daß sCD95L eine weitaus schwächere apoptoseinduzierende Potenz besitzt als mCD95L. Dies kann möglicherweise damit erklärt werden, daß die Ligand-Rezeptor-Bindung im Falle von mCD95L sehr viel fester und dauerhafter ist. Diese Wechselwirkung ist Voraussetzung für eine wirkungsvolle Rekrutierung der Adapterproteine FADD, RIP oder RAIDD an die DD von CD95. sCD95L:CD95-Komplexe dagegen werden scheinbar viel schneller internalisiert und aktivieren vermutlich überwiegend den JNK-Pfad, welcher per se weniger effizient Apoptose induziert (vgl. Abb. 4) [117].

Zu den wichtigsten biologischen Funktionen des CD95-Systems zählen die Beteiligung an der zellulären Immunantwort einerseits und die Eliminierung lange aktivierter oder autoreaktiver Lymphozyten andererseits (Activation-induced cell death; AICD). Aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimieren vermehrt CD95L und

werden dadurch in die Lage versetzt, an das auf der Oberfläche von Zielzellen konstitutiv vorhandene CD95 zu binden und deren Untergang einzuleiten (siehe dazu auch Kapitel 1.12 und [111; 112]).

Diese Interaktion stellt, neben der „klassischen“, über Perforin und Granzym B vermittelten (sog. Exozytose-abhängigen) Elimination, einen alternativen zytotoxischen Effektormechanismus dar (s. Abb. 5).

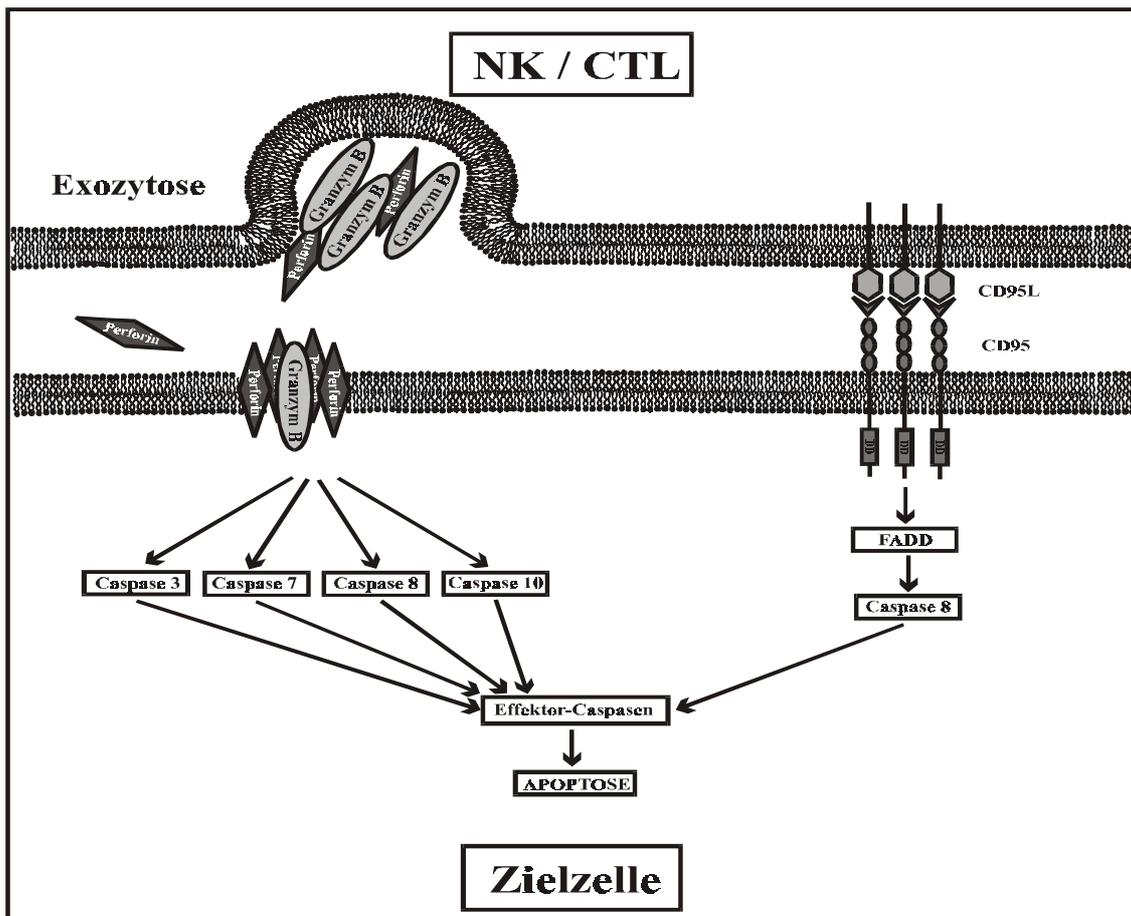


Abbildung 5: Zytotoxische Effektormechanismen

Die T-Zell- und NK-Zell-vermittelte Lyse von Zielzellen repräsentiert den primären körpereigenen Mechanismus zur Bekämpfung virusinfizierter und transformierter Zellen [113]. Bei der Exozytose-abhängigen Eliminierung werden Vesikel mit zytotoxischen Proteasen (v. a. Granzym B) und Perforin zielgerichtet exozytiert (sog. „lethal hit“; [114]). Das Ca^{2+} -abhängige, Poren-erzeugende Perforin bahnt dann der Serinprotease Granzym B gleichsam den Weg in die Zielzelle. Granzym B seinerseits ist in der Lage,

spezifische Proteine an deren Aspartat-Resten zu spalten, so auch ICE und ICE-ähnliche Proteasen, die dabei katalytisch aktiviert werden. Die intrazelluläre Übermittlung des Apoptose-Signals erfolgt also auch im Fall des Perforin/Granzym B-Systems über Caspasen. Medema et al. [115] konnten zeigen, daß Granzyme B in der Lage ist, FLICE (Caspase 8) direkt zu aktivieren, dieselbe Caspase also, die auch maßgeblich an der CD95-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist.

Der sogenannte Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) ist eine Form der Apoptose, welche in erster Linie dafür verantwortlich ist, ein Überschießen oder inadäquates Persistieren einer Immunreaktion zu verhindern [116]. Es gibt viele Anhaltspunkte dafür, daß CD95L der wichtigste Mediator für diesen autokrinen (d. h. auf die Zelle selbst wirkenden) Mechanismus ist. Um Autoreaktivität zu vermeiden, exprimieren T-Zellen nach der Eliminierung des Antigens und der dann nur noch unspezifischen Aktivierung durch costimulatorische und akzessorische Moleküle vermehrt CD95L so daß sie damit ihren eigenen Untergang einleiten. In der Regulation des AICD könnte möglicherweise eine physiologische Bedeutung von sCD95L liegen. Um eine Selbstzerstörung zu umgehen, könnten zytotoxische T-Zellen in der frühen Phase ihrer Aktivierung zur Desensibilisierung des zelleigenen CD95 zunächst vermehrt das schwächer apoptotisch wirksame sCD95L sezernieren (z. B. durch eine Mehrexpression der entsprechenden Metalloprotease). Nach längerer Aktivierung schließlich müßte die mCD95L-Expression zunehmen (und/oder die Expression der Metalloprotease abnehmen), um die zytolytische Aktivität gegen Zielzellen zu erhöhen [48; 117]. Denkbar wäre allerdings auch, daß mCD95L vornehmlich gegen Zielzellen gerichtet ist, während sCD95L durch autokrine Wirkung hauptsächlich für den AICD relevant ist.

Daneben scheint CD95 auch an der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen beteiligt zu sein. Es gibt dagegen keine Hinweise, daß CD95 an der negativen Selektion beteiligt ist [118]. Die hohe Expression von CD95L in den Epithelien der vorderen Augenkammer erklärt möglicherweise die Toleranz gegenüber Cornea-Transplantaten, die keinem „Matching“ unterzogen wurden [119]. Diese selektive Überexpression von CD95L in bestimmten Geweben bietet andererseits auch eine Erklärung für die Resistenz mancher Tumorzelllinien gegen die körpereigene Abwehr [7-9]. Viele Erkenntnisse über die Funktion des CD95-Systems erbrachten Untersuchungen mit Mäusen, die entweder ein

defektes Gen für CD95 oder für CD95L aufweisen, sog. „Knock-out“-Mäusen [120; 121]. Entsprechend veränderte Gene wurden auch in Patienten mit Autoimmunem Lymphoproliferativem Syndrom (ALPS; Canale-Smith Syndrom) gefunden [27; 28]. Diese Mutationen gehen unter anderem mit massiver nicht-maligner Lymphoproliferation, Hepatosplenomegalie, veränderten T-Zell-Populationen und der Bildung von Autoantikörpern einher (zur näheren Diskussion siehe Kapitel 1.12).

Darüber hinaus spielt CD95 in der Pathogenese zahlreicher anderer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Die isolierte Expression des löslichen extrazellulären Anteils von CD95 durch alternative Spleißmechanismen oder proteolytische Prozessierung bietet möglicherweise eine Erklärung für den Apoptosedefekt, der für die Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses verantwortlich ist [17; 18; 122]. Außerdem scheint CD95L (v. a. in seiner löslichen Form), wie auch TRAIL, am Auftreten massiver Apoptose im Rahmen einiger viraler Prozesse beteiligt zu sein (z. B. HIV- und Hepatitis B-Infektion [123]). Im Falle der HIV-Infektion konnte eine vermehrte Expression von CD95 auf nichtinfizierten Zellen nachgewiesen werden. Daneben bewirken viral kodierte Proteine möglicherweise eine erhöhte Expression des Liganden [11-15]. Auch in der Pathogenese der Alkohol-induzierten Hepatitis [123], GVHD [124] und einiger Autoimmunerkrankungen (z. B. Diabetes mellitus Typ 1, Enzephalomyelitis) spielt CD95 eine Rolle [23-26]. Die mögliche Aktivierung des CD95-Systems unter antineoplastischer Chemotherapie wird in Kapitel 1.10 eingehender diskutiert.

1.7 Das TRAIL-System

TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) ist ein Typ II-Transmembranprotein mit hoher Homologie zu CD95L und TNF α im Bereich der C-terminalen extrazellulären Domäne. Das TRAIL-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 3q26 lokalisiert und befindet sich damit nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu Genen anderer Mitglieder der TNF α -Familie [51; 52]. Das zugehörige Genprodukt wird selektiv exprimiert, u. a. in Milz, Lunge, Prostata und aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten [51; 125; 126]. Außerdem wird TRAIL von diversen transformierten Zelllinien exprimiert [126-128]. Neben der Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, ist TRAIL, im Gegensatz zu

CD95L, auch in der Lage NF- κ B zu aktivieren [68; 71]. Die ersten Zeichen apoptotischer Veränderung lassen sich bereits wenige Minuten nach der Inkubation von Zellkulturen mit TRAIL nachweisen [129]. Wie eingangs bereits erwähnt, wurden für TRAIL bisher fünf verschiedene Rezeptoren identifiziert (s. Abb. 6).

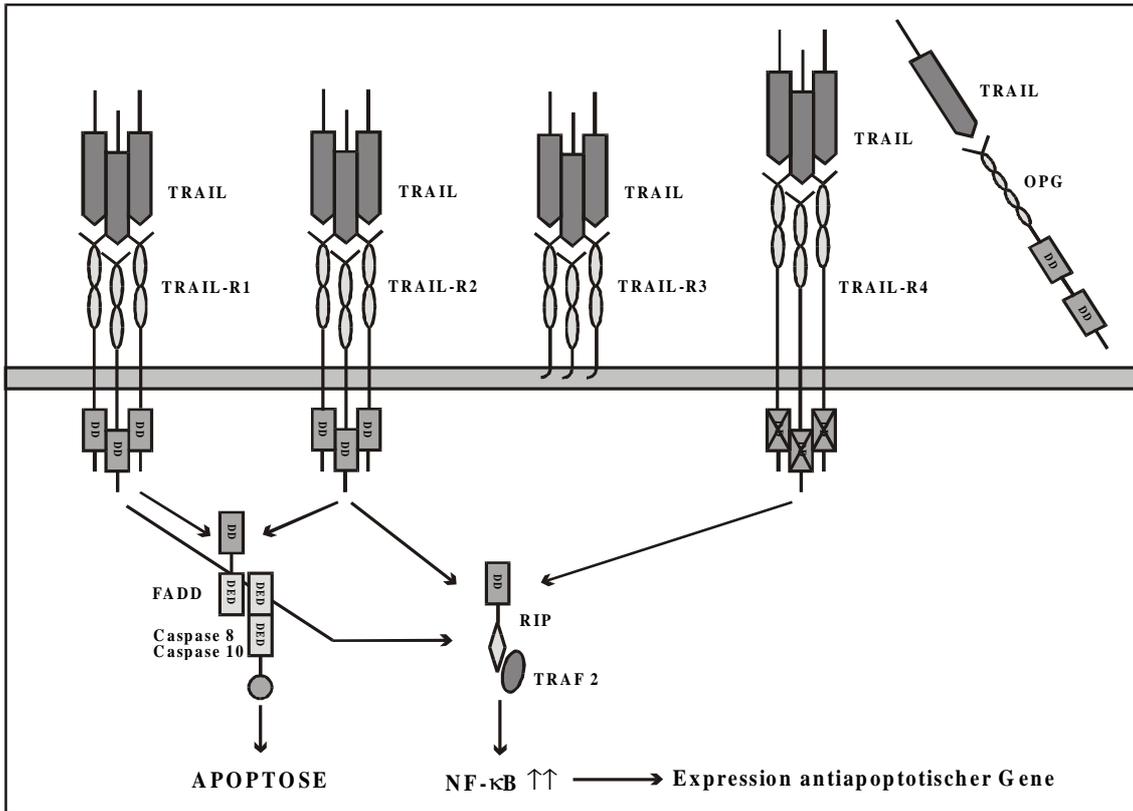


Abbildung 6: TRAIL und seine Rezeptoren

TRAIL-R1 und TRAIL-R2 besitzen eine zytosolische Todesdomäne und werden von fast allen normalen und transformierten Geweben exprimiert [55; 68; 71; 130-134]. Warum es zwei Rezeptoren gibt, die das Todessignal weiterleiten, und ob es sich um verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege handelt, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Tschopp [71; 135] konnten zeigen, daß beide Signaltransduktionswege sowohl durch dominant-negatives FADD (s. o.) als auch durch FLICE-inhibitory protein (FLIP) geblockt werden können. Dies wiederum bedeutet, daß sowohl FADD als auch Caspase 8 an der durch TRAIL initiierten Apoptose-Kaskade beteiligt sind. Außerdem scheinen beide Rezeptoren NF- κ B in TRADD-abhängiger Weise zu aktivieren [68]. Da TRAIL-R1 sich an TRAIL-R2 anlagern kann [71], entstand die

Hypothese, daß TRAIL sein Signal möglicherweise auch durch Heterotrimere beider Rezeptoren weitergeben kann. TRAIL-R2 liegt, im Gegensatz zu TRAIL-R1, in zwei Spleiß-Varianten vor (TRICK 2A und TRICK 2B; [134]) und wird nach Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 (z. B. unter Chemotherapie) vermehrt exprimiert [136]. Die beiden Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 weisen im Bereich der extrazellulären Domänen hohe Homologie zu TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf. TRAIL-R3, das über einen Phosphatidylinositol-Anker in die Zellmembran integriert ist, besitzt keine Todesdomäne und kann weder Apoptose-Signale weitergeben noch NF- κ B aktivieren [54; 132; 137; 138]. Die verkürzte Todesdomäne von TRAIL-R4 ist zwar funktionell ungeeignet für die Vermittlung des Apoptose-Signales, ist jedoch im Stande NF- κ B zu aktivieren [55; 139; 140]. TRAIL-R4 wird, wie TRAIL-R1 und TRAIL-R2, von den meisten physiologischen Geweben exprimiert [55,140]. Beide Decoy-Rezeptoren werden nicht oder nur in geringem Maße von transformierten Zelllinien exprimiert [53; 55]. Jeder der vier genannten TRAIL-Rezeptoren besitzt zwei charakteristische Cysteine-reiche extrazelluläre Abschnitte. Beim Menschen sind alle vier Rezeptorgene auf Chromosom 8 lokalisiert [10]. Der fünfte bekannte TRAIL-Rezeptor, Osteo-protegerin (OPG), wird wohl in erster Linie sezerniert [141]. Deshalb werden seine beiden DD-homologen Domänen womöglich nicht immer wirksam [142]. Verschiedene Gewebe exprimieren aber auch membranständiges OPG (s. Kapitel 1.9) [155]. OPG verhindert in vivo die Differenzierung von Osteoclasten und inhibiert TRAIL-induzierte Apoptose von transformierten T-Zellen in vitro [141].

Die weitreichenden biologischen Effekte von TRAIL sind erst fragmentarisch untersucht. TRAIL kann auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nachgewiesen werden, was für die Beteiligung von TRAIL an der zellulären Immunantwort spricht [16]. Jeremias et al. [16] haben beschrieben, daß TRAIL, im Gegensatz zu CD95L, auf aktivierte T-Zellen keine Apoptose-induzierende Wirkung hat, was eine Beteiligung des TRAIL-Systems an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (AICD) zunächst einmal unwahrscheinlich machte. Martinez-Lorenzo et al. [143] gelang jedoch der Nachweis, daß Vorinkubation mit neutralisierendem TRAIL-Antikörper die AICD-Rate signifikant senkt. Daneben ist TRAIL, nicht aber CD95L oder TNF α , maßgeblich an der Eliminierung dendritischer Zellen beteiligt. Die Signalübermittlung erfolgt in diesem Fall vorzugsweise über Caspase 10. Pa-

tienten mit Mutationen im Bereich des für Caspase 10 kodierenden Gens zeigen eine gestörte Homöostase von dendritischen Zellen aber auch von Lymphozyten. Außerdem besteht bei Caspase 10-Defizienz eine Neigung zur Auto-immunität [144]. Das zugehörige klinische Syndrom wird als ALPS Typ II bezeichnet (vgl. Kapitel 1.12).

In HIV-infizierten Individuen wird die T-Zelldepletion überwiegend TRAIL-induzierter Apoptose zugeschrieben [11]. Ob TRAIL in der Lage ist, Tumorzellen unter Schonung physiologischer Zellen selektiv abzutöten, ist nicht zweifelsfrei geklärt. Die Monozytenvermittelte Apoptose von Tumorzellen kann mit neutralisierendem TRAIL-Antikörper komplett blockiert werden, was eine spezifische Rolle von TRAIL wahrscheinlich macht [125]. Eine protektive Rolle von Decoy-Rezeptoren für gesunde Gewebe *in vivo* ist Gegenstand aktueller Forschung. *In vitro* besteht keine Korrelation.

Walczak et al. [59] weisen darauf hin, daß systemische Therapie mit löslichen TRAIL-Trimeren im Mausmodell zur Regression verschiedenartiger Tumorgewebe führt und dabei, im Gegensatz zur systemischen Therapie mit löslichem CD95L oder TNF α , weder fulminante Hepatotoxizität noch andere gravierende Nebeneffekte auftreten. Mögliche Erklärungen für die Schonung gesunder Zellen sind die Expression von Decoy-Rezeptoren einerseits und die Aktivierung des anti-apoptotisch wirksamen NF- κ B andererseits. Der Nachweis von Decoy-Rezeptoren auch auf Tumorzellen zeigt jedoch, daß das vorgeschlagene „Decoy-Modell“ [53; 145] nicht die einzige Erklärung für die Schonung gesunder Gewebe sein kann [127].

Weiterhin wurde beschrieben, daß TRAIL, neben CD95L, an Graft-Versus-Tumor Reaktionen beteiligt ist, nicht jedoch an der Pathogenese der Graft-Versus-Host-Disease [128]. Schließlich bleibt zu klären, inwieweit TRAIL möglicherweise in die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose involviert ist (s. Kapitel 1.10)

1.8 TRAMP

TRAMP ist ein weiterer Vertreter der TNF-Rezeptorfamilie, der vor allem zu TNF-R1 hohe Homologie aufweist. Die Expression beschränkt sich weitgehend auf Thymozyten und Lymphozyten. Aktivierung (Überexpression) von TRAMP führt über die Rekrutierung von FADD zum apoptotischen Zelltod. Dieser kann durch Cytokine Response

Modifier A (CrmA) vollständig gehemmt werden, was für die Beteiligung einer Caspasen-Kaskade an dem durch TRAMP vermittelten apoptotischen Pfad spricht. Überexpression von TRAMP bewirkt ferner eine Aktivierung von NF- κ B. Ein korrespondierender Ligand konnte bisher nicht zweifelsfrei identifiziert werden. TRAIL, TNF α , CD95L und RANKL binden nicht spezifisch an TRAMP [43; 146]. Ob mit TWEAK (vgl. Kap. 1.3) der lange gesuchte Ligand gefunden wurde, ist noch nicht eindeutig bewiesen [57; 58].

1.9 Das RANKL-System

RANKL (Receptor Activator of NF- κ B ligand; [44]), ein weiterer Ligand aus der TNF α -Familie, ist identisch mit TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine), ODF (Osteoclast Differentiation Factor; [147]) und OPGL (Osteoprotegerin-Ligand; [148]) und wird als Typ II-Transmembranprotein synthetisiert [149]. Das für RANKL kodierende Gen ist beim Menschen auf Chromosom 13q14 lokalisiert und wird vor allem von aktivierten T-Lymphozyten, Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten exprimiert [149; 150]. Das Genprodukt hat eine Größe von 316 Aminosäuren (ca. 35 kDa) und entfaltet seine parakrine Wirkung womöglich erst nach Abspaltung der extrazellulären Domäne (sRANKL) durch die Metalloprotease TACE (TNF α -Convertase) [151]. sRANKL weist hohe Sequenzhomologie zu TRAIL (20%), CD95L (19%) und TNF α (17%) auf [146]. Für RANKL sind bisher zwei Rezeptoren bekannt: RANK [44] und Osteoprotegerin [152-155]. RANK, ein membranständiger Rezeptor, besitzt keine zytoplasmatische Todesdomäne [70], während OPG zwar zwei DD-homologe Domänen aufweist, jedoch als sezerniertes Protein keinen Kontakt zu der intrazellulären Apoptose-Maschinerie hat [142]. RANK wird vor allem von dendritischen Zellen und Osteoclasten exprimiert, aber auch von aktivierten B- und T-Zellen [156]. Die Bindung von RANK aktiviert den bereits mehrfach angesprochenen Transkriptionsfaktor NF- κ B über eine Signalkaskade, an der unter anderem verschiedene Mitglieder der TRAF-Familie (TNF Receptor-Associated Factors) beteiligt sind [70; 150; 157].

In früheren Kapiteln wurde die Rolle von NF- κ B als Entzündungsmediator und als antiapoptotisches Agens diskutiert. Eine über RANKL vermittelte antiapoptotische Wirkung

wurde in dendritischen Zellen [156; 158] und Osteoclasten [159] nachgewiesen. Daneben ist NF- κ B, nach Aktivierung über den RANK-Pfad, aber auch an der Differenzierung und Aktivierung von Osteoclasten beteiligt [149]. Untersuchungen mit rekombinantem RANKL ergaben, neben der TRAF-abhängigen Aktivierung von NF- κ B, eine TRAF-unabhängige Aktivierung von JNK in T-Zellen, nicht aber in B-Zellen [146]. Wie in früheren Kapiteln bereits diskutiert, wird JNK eine Rolle im Rahmen der über TNF α -Homologe induzierten Apoptose zugeschrieben. Auf diesem Wege könnte RANKL möglicherweise an der T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt sein. Untersuchungen von Kog et al. [160] zeigen, daß RANKL auch an der Lymphozytenreifung und der Organogenese von Lymphknoten beteiligt ist. Der zweite bekannte RANKL-Rezeptor, OPG, ist identisch mit OCIF (osteoclastogenesis inhibitory factor, [154]) und mit FDCR-1 (follicular dendritic cell receptor 1, [155]) und wirkt, wie der Name sagt, der über RANK induzierten Osteoclasten-Differenzierung entgegen. Überexpression von OPG führt in Versuchstieren zu Osteopetrose [161], während „Knock-out“-Mäuse schwere Osteoporose und vaskuläre Kalzifikationen aufweisen [161-163]. Das Verhältnis zwischen RANKL und OPG könnte eine wichtige Determinante für die Kalzium- und Phosphatkonzentration im Blut darstellen.

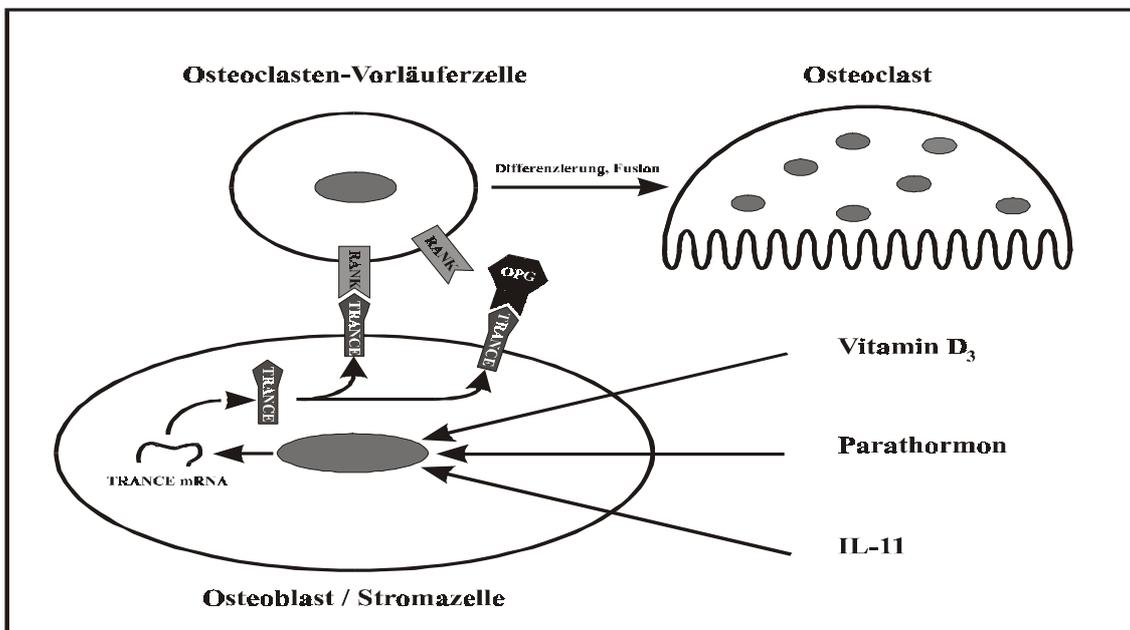


Abbildung 7: Osteoclastogenese

Parathormon, Vitamin D3 (1,25,-Dihydroxycholecalciferol), IL-11 und Calcitonin entfalten ihre Wirkung möglicherweise über die Beeinflussung der OPG:RANKL-Ratio [161; 164-167].

Bei den hier beschriebenen inhibitorischen Effekten von OPG wird davon ausgegangen, daß es sich um eine sezernierte Form des Rezeptors handelt. Akatsu et al. [168] konnten aber zeigen, daß OPG gegenüber Osteoclasten auch als Apoptose-Induktor in Erscheinung tritt. Untersuchungen von Yamaguchi et al. [169] bestätigten die Funktionsfähigkeit der DD-homologen Regionen von OPG, Yun et al. [155] fanden die Expression von membrangebundenen OPG auf Babyhamster-Nierenzellen, auf folliculären dendritischen Zellen, aber auch auf lymphatischen Zellen (dabei v.a. auf B-Zellen). Die angesprochene Apoptose-Induktion bei Osteoclasten könnte also möglicherweise über membrangebundenes OPG (und damit über dessen DD) vermittelt werden. Dafür spricht auch, daß der Untergang von Osteoclasten durch die Hemmung von Caspase 3 verhindert werden kann. [168].

1.10 Apoptose-Induktion durch Chemotherapeutika

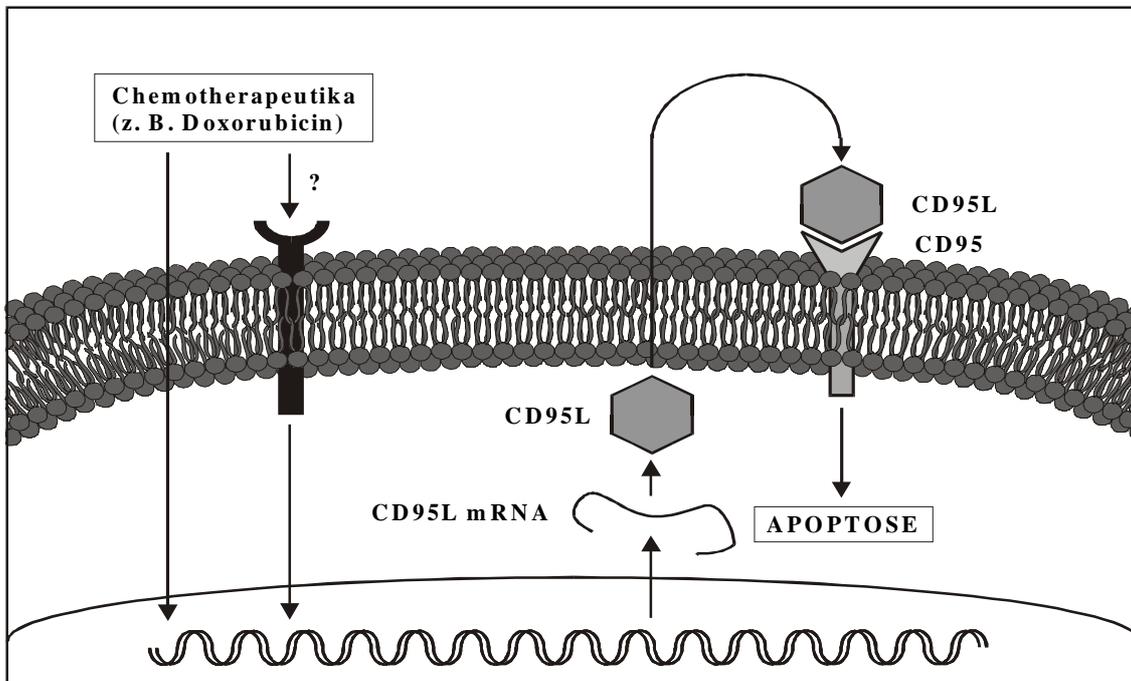


Abbildung 8: Postulierter Mechanismus der Apoptoseinduktion mit Doxorubicin

Es gilt mittlerweile als gesichert, daß verschiedene Klassen von Chemotherapeutika (z. B. Anthrazykline, Antimetaboliten, Topoisomerase-II-Antagonisten oder Alkylantien) in therapeutischen Dosen Apoptose induzieren (siehe dazu auch Kapitel 2). Inwieweit Liganden und Rezeptoren der TNF α -Familie an dieser Apoptose-Induktion beteiligt sind, ist dagegen noch nicht abschließend geklärt.

Verschiedene Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Debatin [170-174] postulieren eine maßgebliche Beteiligung des CD95/CD95L-Systems an der durch Doxorubicin und cis-platin induzierten Apoptose in ALL- und Neuroblastomzelllinien sowie einigen anderen soliden Tumoren (z. B. M. Hodgkin, Ewing-Sarkom, Kolonkarzinom und kleinzelliges Bronchiolalkarzinom) und ZNS-Tumoren (z. B. Medulloblastom oder Glioblastom; vgl. Abb. 8).

Diese Hypothese stützt sich auf vier Hauptergebnisse:

Erstens scheint eine Inkubation mit den oben genannten Substanzen die Expression von CD95 und CD95L mRNA in diversen Tumorzelllinien zu erhöhen. Diese Hochregulation von CD95 und CD95L kann durch Cyclosporin inhibiert und die Apoptose-Rate damit deutlich gesenkt werden. Zweitens kann die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose durch Caspase-Inhibitoren vollständig geblockt werden, ebenso die Prozessierung des Caspase-Substrates PARP. Zellen mit dominant-negativem FADD zeigen ebenfalls eine komplette Inhibition. Drittens wurden in einigen CD95-resistenten Zelllinien Kreuzresistenzen zu Chemotherapeutika gefunden und umgekehrt. Viertens scheint eine Vorinkubation mit neutralisierendem CD95-Antikörper auch auf diesem Induktionsweg eine signifikante Apoptoseinhibition zu bewirken.

Müller et al. [175] fanden eine Hochregulation von CD95 und CD95L auf Translations-ebene sowie eine Blockade der Apoptose-Kaskade durch neutralisierenden CD95-Antikörper nach Inkubation von Hepatom-Zelllinien mit Bleomycin.

Eine Hochregulation von CD95 und CD95L auf Ebene der Transkription wurde von mehreren Autoren beobachtet, während dies auf Proteinebene nicht der Fall zu sein scheint [176-179]. Micheau et al. [180] fanden eine Mehrexpression von CD95, nicht aber von CD95L, Villunger et al. [181] wiederum konnten eine vermehrte Expression von CD95L nachweisen. Was die Beteiligung von Caspasen an der Apoptose-Exekution beider Signaltransduktionswege angeht (d. h. Chemotherapie versus CD95), besteht

weitgehende Einigkeit unter verschiedenen Autoren. Beide können durch Caspase-Inhibitoren wie CrmA, z-VAD-fmk, B-VAA-fmk oder z-Asp komplett blockiert werden [182-184]. Die einzige Ausnahme bildet hier ebenfalls eine Publikation von Villunger et al. [181], bei der unter Überexpression von CrmA in der ALL-Zelllinie CEM keine Beeinträchtigung der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose festgestellt werden konnte. Juo et al. [185] fanden in Caspase 8-defizienten Zellen eine partielle Apoptose-Defizienz auf Induktion durch Doxorubicin und Etoposid.

Weiterhin zeigten Untersuchungen mit dominant-negativen FADD-Mutanten eine deutliche Verminderung der Apoptose-Rate unter chemotherapeutischer Behandlung [176; 180]. Diese Ergebnisse sind freilich kein Beweis für die postulierte Rolle des CD95-Systems unter Chemotherapie-Induktion. Sie weisen vielmehr darauf hin, daß beide Wege in eine gemeinsame Endstrecke einmünden, an welcher möglicherweise FADD und einige Caspasen beteiligt sind. In diesem Kontext sind vielleicht auch die widersprüchlichen Publikationen bezüglich der Existenz von Kreuzresistenzen zwischen CD95 und einigen Chemotherapeutika zu verstehen [176; 179; 183; 186-189].

Erfolgt die Resistenzbildung auf der Höhe von FADD oder distal davon (z. B. innerhalb der Caspasen-Kaskade), sind Kreuzresistenzen durchaus mit zwei unterschiedlichen Induktionswegen vereinbar. Läge dagegen eine Mutation von CD95 selbst vor, müßte bei einer nachweislichen Reduktion der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose tatsächlich von einer wichtigen Rolle des CD95-Systems ausgegangen werden. Auch der Effekt einer Vorinkubation mit neutralisierendem CD95-Antikörper (z. B. ZB4) wurde von mehreren Arbeitsgruppen nachuntersucht [176; 180; 181; 184]. Übereinstimmend kommen diese zu dem Ergebnis, daß keine signifikante Hemmung der Apoptose erzielt wird. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß zum gegenwärtigen Zeitpunkt einige Zweifel an der Rolle des CD95/CD95L-Systems im Rahmen der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose angebracht sind. Auch zwei Publikationen aus der Arbeitsgruppe Debatin [190; 191], in denen TCR⁺ T-Zell-Leukämien bzw. Osteosarkom-Zelllinien untersucht wurden, beschreiben eine Apoptose-Induktion, die zumindest teilweise unabhängig vom CD95-System abläuft. Scaffidi et al. [192] sowie Varadhachary et al. [193] postulieren die Existenz von Typ I und Typ II Zellen mit unterschiedlicher Apoptose-Sensitivität auf CD95-Induktion. In Typ I Zellen erfolgt nach CD95-Induktion die Bildung großer Men-

gen von aktiver Caspase 8 am DISC und die anschließende Aktivierung (Proteolyse) von Caspase 3. In Typ II-Zellen hingegen wird Caspase 8 inkomplett prozessiert und damit in weit geringerer Quantität aktiviert. Dies geschieht möglicherweise durch die Aktivierung von Phosphatidylinositol 3'-Kinase, welche ihrerseits die Aktivierung von Caspase 8 am DISC blockiert [193]. In Typ II-Zellen erfolgt die apoptotische Signaltransduktion wohl eher über den Mitochondrien-abhängigen Pfad und die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom c.

Eine Beteiligung von TRAIL wurde in diesem Zusammenhang bisher wenig untersucht. Herr et al. [174] fanden eine leichte Hochregulation von TRAIL mRNA in CEM-Zelllinien unter Doxorubicin-Inkubation, Jeremias et al. [16] konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Keane et al. [194] konnten zeigen, daß die Inkubation von Brustkrebs-Zelllinien mit Doxorubicin oder Fluoruracil die Sensitivität dieser Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose erhöht.

1.11 Anthrazykline

Die in der vorliegenden Arbeit zur Apoptoseinduktion verwendeten Anthrazykline gehören in die Gruppe der antineoplastisch wirksamen Antibiotika. Neben dem Hauptvertreter Doxorubicin (Adriamycin, Adriblastin) sind im klinischen Alltag weitere Anthrazyklinderivate wie Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin in Gebrauch. Anthrazyklinderivate sind Bestandteil zahlreicher Chemotherapie-Schemata. In verschiedenen Kombinationen kommen sie bei Neoplasien im Kindesalter wie akuten Leukämien, Hodgkin-Lymphomen, hochmalignen NHL, Neuroblastomen, Wilms-Tumoren, Ewing-Sarkomen, Osteoblastomen und Weichteilsarkomen zum Einsatz. Daneben spielen sie in der Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie der Therapie von Mesotheliom, Magen-Karzinom, Harnblasen-Karzinom, hepatozellulärem Karzinom, Endometriums-Karzinom, Mamma-Karzinom und Kaposi-Sarkom eine Rolle. Zur Behandlung intrazerebraler Tumoren werden Anthrazykline wegen ihrer schlechten Liquor-gängigkeit dagegen nicht verwendet [195].

Vermutete Wirkungsmechanismen sind unter anderem Interkalation der Substanz in die DNA, Enzyminhibition (z. B. Topoisomerase II), Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen und schließlich Apoptose-Induktion.

Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen zählen, neben den häufig unter antineoplastischer Chemotherapie auftretenden Symptomen (Myelosuppression, Nausea, Emesis, Alopezie, Mukositis/Stomatitis, hepatotoxische Effekte, Sekundärmalignome), vor allem kardiotoxische Effekte [196]. Über die Häufigkeit des Auftretens kardiotoxischer Effekte gibt es sehr unterschiedliche Einschätzungen. Trotz der Erfassung in mehreren großen Studien schwanken die Zahlen für das Vorliegen einer (mindestens subklinischen) dilatativen Kardiomyopathie zwischen 5 und 50% im Langzeitverlauf. Auch über die Risikofaktoren besteht keine letzte Klarheit. Kummulative Dosen über 500 mg/m² Körperoberfläche und die Höhe der Einzeldosen scheinen wichtige Determinanten zu sein [197; 198]. Als weitere Risikofaktoren werden unter anderem niedriges Alter bei Therapiebeginn und weibliches Geschlecht genannt [197]. Die Langzeit-Überlebensrate scheint indes nicht signifikant beeinflusst zu werden.

Was den Pathomechanismus der kardiotoxischen Effekte von Anthrazyklinderivaten angeht, könnte es sich um eine Störung der Ca²⁺-vermittelten Exzitations-Kontraktions-Kopplung zu handeln [199]. Nohl et al. [200] postulieren dagegen die Einlagerung der Anthrazycline in die Membran der Herzmitochondrien und eine konsekutive Generierung von Sauerstoffradikalen. Dabei dient das Vierringsystem der Anthrazycline als Substrat für eine Isoform der Cytochrom c Oxidase.

1.12 Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom (ALPS)

Der Lebenszyklus eines reifen Lymphozyten beginnt mit der Aktivierung, gipfelt in der Funktion als Effektorzelle des Immunsystems und endet im apoptotischen Zelltod. Dieser abschließende Schritt ist wichtig, um eine Akkumulation von Lymphozyten zu unterbinden. Wie in Kapitel 1.6 bereits dargelegt, ist das CD95-System an diesem Regulationsprinzip, das man auch als Immunhomöostase bezeichnet, entscheidend beteiligt.

Versuche mit Mäusen, die entweder eine Mutation im Bereich des CD95-Gens (lpr-Mäuse) oder im Bereich des Gens für CD95L (gld-Mäuse) aufweisen, haben diese bereits

in vitro gewonnenen Erkenntnisse bestätigt [120; 121]. Die Mausstämme sind nach dem jeweils resultierenden Syndrom benannt, dabei steht *lpr* für „lymphoproliferation“ und *gld* für „generalized lymphoproliferative disease“. Beide Mutationen führen in den entsprechenden Mausstämmen zur Bildung von Autoantikörpern und zur Akkumulation von T-Lymphozyten, die weder CD4 noch CD8 exprimieren, kurz $CD3^+ CD4^- CD8^-$ Lymphozyten. Beide Mutanten weisen deutliche Zeichen der Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie auf [200].

Bereits im Jahr 1967 hatten Canale und Smith bei mehreren Patienten ein Krankheitsbild beobachtet, welches sie mit den Symptomen hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, massive nicht-maligne Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie beschrieben [202]. Fast 20 Jahre später (1995) gelang es zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, die oben beschriebenen klinischen Merkmale mit einer heterozygoten Mutation des humanen Gens für CD95 (oder CD95L) in Verbindung zu bringen [27; 28]. Seither werden alle Syndrome, die mit Gendefekten im Bereich von CD95, CD95L oder einem in die CD95-Kaskade involvierten Protein assoziiert sind, als ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome) bzw. Canale-Smith Syndrom bezeichnet. Die meisten bisher nachweisbaren Mutationen liegen im Bereich der DD von CD95 [203]. Patienten mit ALPS zeigen, wie die entsprechenden Mäuse, massive Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie. Auch die Bildung von Autoantikörpern, Hypergammaglobulinämie, B-Zell-Lymphozytose und die Akkumulation von $CD3^+ CD4^- CD8^-$ T-Zellen sind gemeinsame Merkmale [204; 205]. Weitere mögliche Veränderungen bei Patienten mit ALPS sind hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, Panniculitis und Guillain-Barré-Syndrom [27; 206]. Hierbei handelt es sich vermutlich um autoimmune Manifestationen der Erkrankung. Sie persistieren in den meisten Fällen bis in die Adoleszenz. Im Falle von Mutationen im Bereich des CD95L-Gens steht ein Lupus-ähnliches Krankheitsbild im Vordergrund [207]. Die allen Patienten gemeinsame Lymphadenopathie bessert sich in der Regel bis zum Erreichen des Erwachsenenalters, kann aber intermittierend wieder auftreten [27; 208]. Erwachsene Patienten weisen eine erhöhte Rate maligner Neoplasien auf, einige ALPS-Patienten entwickelten bereits in jüngerem Alter maligne Lymphome [200]. In einem der beschriebenen Fälle führte eine Stammzelltransplantation zur Heilung [209]. In den Familien der Patienten werden zu einem hohen Prozentsatz nicht-befallene Träger

der entsprechenden Mutation identifiziert, was für einen autosomal-dominanten Erbgang mit sehr variabler Penetranz spricht [210].

Martin et al. [203], Sneller et al. [204] und Dianzani et al. [211] haben in ihren Arbeiten bereits darauf hingewiesen, daß sich bei einigen Patienten trotz typischer ALPS-Symptomatik kein Anhalt für eine Mutation im Bereich des CD95 oder CD95L-Gens finden ließ. Daraus folgerten sie, daß es sich hier vermutlich um Mutationen handelt, die entweder im weiteren Verlauf der CD95-Signalkaskade liegen (z. B. Adapter-Proteine, Capasen, Ceramid) oder ein anderer Pfad der Apoptoseinduktion betroffen ist. Wang et al. [144] berichten über zwei Familien mit ALPS Typ II, einem eigenen Krankheitsbild, dem eine Mutation im Bereich von FLICE II (Caspase 10) zugrunde liegt. Pathogenetisch handelt es sich hier um Störungen der Homöostase von Lymphozyten und dendritischen Zellen (vgl. Kapitel 1.7). In diesem kombinierten Defekt von Lymphozyten und APC liegt der Hauptunterschied zum ALPS Typ I.

1.14 X-chromosomal vererbtes Lymphoproliferatives Syndrom

Das X-chromosomal vererbte lymphoproliferative Syndrom (XLP) ist eine vererbte Immundefizienz, bei der befallene Jungen eine gestörte Abwehr gegen Infektion mit EBV aufweisen. Das defekte Gen bei XLP wurde identifiziert und als SH2D1A angesprochen. Dieses Gen kodiert für ein Protein namens SLAM-assoziiertes Protein (SAP). Genetische Analysen haben ergeben, daß nur 60% der Träger des Gendefektes typische Merkmale der Krankheit aufweisen. Die klinischen Manifestationen variieren und zeigen sich unter anderem durch schwere infektiöse Mononukleose, Dysgammaglobulinämie, B-Zell-Lymphome, seltener durch aplastische Anämie, lymphomatoide Granulomatose oder nekrotisierende Vaskulitiden.

2 Zielsetzung

Müller et al. [213] konnten zeigen, daß Doxorubicin (DOXO) in therapeutischen Konzentrationen (1 μM) vor allem Apoptose induziert. Die DOXO-induzierte Apoptose konnte durch Inhibition der Proteinbiosynthese blockiert werden.

In Anknüpfung an dieses Ergebnis sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, inwiefern Mitglieder der TNF α -Familie in der durch Doxorubicin induzierten Apoptose eine Rolle spielen.

Aus klinischem Interesse wurde ein siebenjähriger Patient mit einem nicht-malignen lymphoproliferativen Syndrom auf die Expression von Mitgliedern der TNF α -Familie untersucht. Einige klinische Merkmale (Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie) stimmen mit den in ALPS-Patienten beschriebenen Symptomen überein, andere (signifikante Wachstumsretardierung, Thrombozyten und CD4⁻CD8⁻ T-Zellen im Normbereich, IgA und IgG₂-Defizienz) jedoch nicht. Die Lymphadenopathie in dem hier beschriebenen Fall ist, im Gegensatz zu den meisten ALPS-Patienten, progredient.

Die konkreten Zielsetzungen im einzelnen:

- 1.) Untersuchung der Expression von Mitgliedern der TNF α -Familie in mononukleären Zellen des Peripherblutes (PBMC), in einer transformierten lymphatischen Zelllinie (CEM) sowie in einer CD95-resistenten Jurkat-Subzelllinie (JM-3A5).
- 2.) Regulation von Liganden und Rezeptoren der TNF α -Familie unter Apoptose-Induktion mit Doxorubicin in den oben genannten Zellpopulationen.
- 3.) Quantifizierung der apoptotischen Zellen unter Inkubation mit Doxorubicin, aktivierendem αCD95 -Antikörper, rekombinantem TRAIL und rekombinantem RANKL.
- 4.) Apoptose-Induktion mit Doxorubicin nach Vorinkubation mit neutralisierendem αCD95L -, αTRAIL - bzw. αRANKL -Antikörper.
- 5.) Molekularbiologische Untersuchung der Expression von TNF α -Homologen in einem Patienten mit nicht-malignem lymphoproliferativem Syndrom.

ä

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Boehringer Mannheim in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

3.1.1 High Pure RNA Isolation Kit

- a) Lyse/Bindepuffer
 - 4,5 M Guanidin Hydrochlorid
 - 50 mM Tris-HCl
 - 30% Triton[®] X-100 (w/v)
 - pH 6,6

- b) DNase-Inkubations-Puffer
 - 1 M NaCl
 - 20 mM Tris-HCl
 - pH 7,0

- c) DNase I (18100 U/ml)

- d) Waschpuffer 1
 - 5 M Guanidin Hydrochlorid
 - 20 mM Tris-HCl
 - Ethanol absolut (LM)
 - pH 6,6

- e) Waschpuffer 2
 - 20 mM NaCl
 - 2 mM Tris-HCl
 - Ethanol absolut (LM)
 - pH 6,6

- f) Elutionspuffer
 - Nuklease-freies bidest. H₂O

3.1.2 cDNA-Synthese

a) dH₂O (15 min entgast)

b) Reverse Transkriptase-Puffer (Amersham, Buckinghamshire, England)

250 mM Tris-HCl

375 mM KCl

40 mM MgCl₂

50 mM DTT

c) Desoxyribonukleotidtriphosphate

d) Hexanukleotid-Mix, 10fach

0,5 M Tris-HCl

0,1 M MgCl₂

1 mM Dithioerythrit

2 mg/ml Rinderserumalbumin

Hexanukleotide

pH 7,2

e) Reverse Transkriptase (Amersham, Buckinghamshire, England)

28 units/μl

3.1.3 PCR

a) Oligonukleotidprimer (siehe Kapitel 3.2)

b) 10 x Taq DNA Polymerase-Puffer (Stratagene, Almenda, USA)

100 mM Tris-HCl

500 mM KCl

15 mM MgCl₂

0,01% (w/v) Gelatine

Stabilisatoren

c) Desoxynukleotidtriphosphate

d) Taq DNA-Polymerase (Stratagene, Almenda, USA)

5 U/ml Taq DNA-Polymerase

20 mM Tris-HCl

100 mM KCl

10 mM Dithiothreitol

0,1mM EDTA

50% (v/v) Glycerol

Stabilisatoren

3.1.4 Aufbereitung der PCR-Produkte

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

3.1.5 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

3.1.5.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese von PCR-Produkten

a) SDS-Polyacrylamidgel (Standardgel, 8%)

13,3 ml Acrylamid

5 ml 10-fach TBE

31,5 ml dH₂O

350 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat

60 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

b) Probenpuffer

10% (v/v) Glycerol

5% (w/v) SDS

625 mM Tris-Puffer (pH 6,8)

0,02% (w/v) Bromphenolblau

5% Mercaptoethanol

c) Molekulargewichtsmarker

0,25 µg/ml Molekulargewichtsmarker

10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA
 pH 8.8

d) Laufpuffer

30 g/l Trisbase
 144 g/l Glycin
 10 g/l SDS
 dH₂O (LM) ad 1 l
 pH 8,3

e) Ethidiumbromidlösung

1 mg Ethidiumbromid
 ad 1 l dH₂O (= 1 µg/ml)

3.1.5.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese von Proteinen

a) Trenngel (12%)

6,0 ml 30% (w/v) Acrylamid / 0.8% (w/v) Bisacryl
 5.6 ml 1M Tris (pH 8.8)
 150 µl 10% (w/v) SDS
 3.2 ml dH₂O
 50 µl 20% (w/v) Ammoniumpersulfat
 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

b) Sammelgel

840 µl 30% (w/v) Acrylamid/0.8% (w/v) Bisacryl
 630 µl 1M Tris (pH 6.8)
 50 µl 10% (w/v) SDS
 3.46 ml dH₂O
 30 µl 20% (w/v) Ammoniumpersulfat
 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

c) Probenpuffer

20 ml Glycerol

5 ml SDS

62,5 ml 1 M Tris (pH 6.8)

0.02 ml Bromphenolblau

5 ml Mercaptoethanol

d) 10 x Laufpuffer

30 g / 1 Tris

144 g / 1 Glycin

10 g / 1 SDS

mit ddH₂O ad 1 l auffüllen

pH-Wert stellt sich von selbst auf etwa 8.3 ein.

Vor Gebrauch 1:10 mit ddH₂O verdünnen.

3.1.6 Western Blot

a) Transferpuffer

3.03 g Tris

14.4 g Glycin

200 ml Methanol

mit ddH₂O ad 1 l auffüllen

b) 10 x TBST-Puffer

100 ml 1 M Tris, pH 8.0

100 ml 4.5 M NaCl

5 ml Tween 20

mit ddH₂O ad 1 l auffüllen

Vor Gebrauch 1:10 mit ddH₂O verdünnen

3.1.7 Annexin-V-FLUOS-Färbung zur FACS-Analyse

- a) HEPES-Puffer (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Boehringer, Mannheim)
- b) Annexin-V-FLUOS, FITC-konjugiert
- c) Propidium-Iodid

3.1.8 FACS-Markierung ohne Lysefixierung

- a) IF Puffer 1
0,1% (w/v) NaN_3
0,5% (w/v) Polyglobulin[®] N (Troponwerke, Köln)
PBS pH 7,2 (LM)
- b) G α M IgG (H+L) F_{ab}-Fragment, FITC-konjugiert (Dianova, Hamburg)
0,01 M Natriumphosphat
0,25 M NaCl
0,01% (w/v) Thimerosal
0,05% (w/v) NaN_3
15 mg/ml Rinderserumalbumin
pH 7,6
- c) G α R-FITC IgG F_{ab}-Fragment, FITC-konjugiert (Dianova, Hamburg)

3.1.9 Unmarkierte Antikörper

- a) α -CD95L Antikörper 4H9 (Immunotech, Marseilles, Frankreich)
100 μ g Antikörper
0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (LM)
0,1% (w/v) NaN_3
0,2% (w/v) Gelatine
- b) α -CD95 Antikörper DX2 (Calbiochem, Cambridge, USA)
100 μ g Antikörper

0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (LM)

0,1% (w/v) NaN₃

0,2% (w/v) Gelatine

c) α -TRAIL Antikörper (Alexis Corporation, Läufelingen, Schweiz)

Polyklonaler Antikörper gegen humanes TRAIL (Serum)

d) α -Phosphotyrosin-Antikörper (Pharmingen, San Jose, USA)

100 μ g Antikörper

0,05 M TRSI-HCl, pH 8,0 (LM)

0,15 M NaCl

0,09% (w/v) NaN₃

3.2 *Oligonukleotidprimer*

Sämtliche Primer wurden von Pharmacia Biotech (Freiburg) FPLC-gereinigt in einem Synthesemaßstab von 0,2 μ mol bezogen.

GAP-DH

links: 5' CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG 3'

rechts: 5' GGC AGT GAT GGC ATG GAC TG 3' Produktgröße: 356 bp

TRAIL

links: 5' GGA ACC CAA GGT GGG TAG AT 3'

rechts: 5' GCT GGA GTG TAG TGG CAT GA 3' Produktgröße: 212 bp

TRAIL R₁

links: 5' AGA GAG AAG TCC CTG CAC CA 3'

rechts: 5' GTC ACT CCA GGG CGT ACA AT 3' Produktgröße: 154 bp

TRAIL R₂, beide Splicevarianten

links: 5' GAG CTA AGT CCC TGC ACC AC 3'

rechts: 5' TAC GGC TGC AAC TGT GAC TC 3' Produktgröße: 210bp / 298 bp

TRAIL-R₃ /TRID

links: 5' AAC GCT TCC AAC AAT GAA CC 3'
 rechts: 5' TGG CAC CAA ATT CTT CAA CA 3' Produktgröße: 238 bp

TRAMP

links: 5' CAA GAA AAG CAC CAA GAG CC 3'
 rechts: 5' GTT CTT CTG TTG CTG GGA GG 3' Produktgröße: 182 bp

RANKL

links: 5' TCA TCT GAA GGG GCA AAT TC 3'
 rechts: 5' GTG GCC AAC ATC CTG CTT AT 3' Produktgröße: 428 bp

CD95

links: 5' CCAAGTGACTGACATCAACTCC 3'
 rechts: 5' TCCATGTTACATCATGTCC 3' Produktgröße: 278 bp

CD95 L

links: 5' TGGCCTTGTGATCAATGAAA 3'
 rechts: 5' TAAGATTGAACACTGCCCCC 3' Produktgröße: 218 bp

3.3 Zellen und Zellkultur

3.3.1 Verwendete Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden sämtlich von ATCC (Manassas, USA) bezogen. CCRF-CEM ist eine humane T-lymphoblastische ALL-Zelllinie (ATCC-Nummer: CCL-119). Im Falle der Jurkat-Subzelllinie JM-3A5 handelt es sich um eine CD95-resistente Zelllinie, die uns freundlicherweise von Eischen et al. [186] zur Verfügung gestellt wurde.

3.3.2 Zellkultur mit kryokonservierten Zellen

Ein in flüssigem Stickstoff gekühltes Aliquot von 1 ml mit 5×10^6 Zellen wird im Wasserbad bei 37°C erhitzt bis nur noch ein kleines Eisstück sichtbar ist. Der Inhalt des Einfrierröhrchens wird in ein 15 ml-Zellkulturröhrchen überführt (Falcon, Becton-Dickinson,

San Jose, USA), bevor man 1 ml RPMI 1640 Medium mit 10% (w/v) fötalem Kälberse-
rum, 0,45 mM L-Glutamin, 90 I.E./ml Penicillin und 90 µg/ml Streptomycin (alle Be-
standteile von seromed[®], Biochrom, Berlin) zugibt. Nach einer kurzen Inkubation von 5
min bei Raumtemperatur pipettiert man weitere 2 ml des Kulturmediums hinzu und
zentrifugiert bei 350 x g für 10 min ab. Das entstandene Zellpellet wird in Kulturmedium
resuspendiert und mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml bei 37°C, 5% (v/v) CO₂ in
wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Je nach benötigter Zellzahl erfolgt die Kultur in Gewebekulturschalen mit 6 oder 24 Ka-
vitäten bzw. in Gewebekulturflaschen. Die Zelldichte wird unter 5×10^5 Zellen/ml gehal-
ten.

3.3.3 Kryokonservierung von Zellen aus Suspensionskulturen

Zur Sicherung werden Zellen aus allen verwendeten Zelllinien in Aliquots zu 5×10^6 Zel-
len kryokonserviert, indem 10^7 Zellen in 500 µl RPMI 1640-Medium mit 40% (v/v) FCS
aufgenommen werden. Nachdem 250 µl RPMI 1640-Medium mit 20% (v/v) DMSO zu-
gegeben wurden, wartet man 5 min, bevor erneut 250 µl RPMI 1640-Medium mit 20%
(v/v) DMSO hinzugefügt werden. Umgehend lagert man die Einfrierröhrchen bei -70°C,
bis sie frühestens nach vier Stunden, spätestens nach einer Woche in flüssigen Stickstoff
überführt werden.

3.4 Inkubation mit Doxorubicin

Für die RNA-Isolierung werden 10^6 Zellen unter sterilen Bedingungen in 5 ml komplet-
tem RPMI 1640 Medium resuspendiert und in eine Zellkulturplatte mit 6 Kavitäten vor-
gelegt. Zu der Zellsuspension wird, je nach geplanter Inkubationsdauer, 100 µl 50 µM
Doxorubicin gegeben, was einer Endkonzentration von 1 µM Doxorubicin entspricht.
Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmo-
sphäre).

3.5 Isolierung von PBMC

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen aus dem Peripherblut wird gesunden Probanden venöses Blut entnommen und mit 200 I.E./50 ml Heparin (Vetren[®] 200; Chemische Fabrik Promonta, Hamburg) an der Gerinnung gehindert. Anschließend wird das Blut unter sterilen Bedingungen mit Hank's Salt Solution, pH 7,4 (seromed[®], Biochrom KG, Berlin) 1:1 verdünnt. In ein 50 ml fassendes Zellkulturröhrchen werden 15 ml Lymphoprep[®] (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen) vorgelegt und mit 35 ml des verdünnten Peripherblutes überschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 800 x g für 20 min können die mononukleären Zellen an der Phasengrenze zwischen Serum und Lymphoprep[™] (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen) mit einer Pipette abgenommen werden. Anschließend werden die Zellen zweimal mit Hank's Salt Solution, pH 7,4 (seromed[®], Biochrom KG, Berlin) gewaschen und gezählt. Dazu werden 25 µl Zellsuspension mit 25 µl 0,4% (w/v) Trypanblaulösung vereinigt und die Anzahl derjenigen Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt, die aufgrund einer integren Membran den Farbstoff ausschließen können. Dieses Ergebnis stimmt mit dem des Blutzellanalysegerätes COBAS Minos[®] STE (Hofmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) überein, so daß weitere Zählungen auf diese Weise erfolgen können.

3.6 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung wird mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kits (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Das Standardprotokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen wurde dabei an einigen Stellen abgeändert.

Eine Zellsuspension von 10^6 Zellen in 5 ml RPMI Medium 1640 (seromed[®]; Biochrom KG, Berlin) wird in einem 15 ml Zellkulturröhrchen (Falcon, Becton-Dickinson, Hamburg) vorgelegt und bei 350 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet wird in 200 µl PBS, pH 7,4 (GIBCO BRL, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland) resuspendiert. Nach der Zugabe von 400 µl Lyse/Bindepuffer (Boehringer, Mannheim) und kräftigem Vortexen wird die Probe in das obere Reservoir des Filter-Tubes pipettiert. Daran schließt sich eine Zentrifugation von 15 s bei 8000 x g in einer Standard-Tischzentrifuge an (Hettich Tischzentrifuge Typ 1110, Tuttlingen). Der

Durchlauf wird verworfen und das Filter-Tube wird wieder in das bereits benutzte Auffanggefäß eingesetzt.

Zur Vorbereitung der DNase-Reaktion werden pro Ansatz 90 μl DNase Inkubationspuffer mit 10 μl DNase in einem autoklavierten Reaktionsgefäß durch Vortexen gemischt. Je 100 μl der so entstandenen Lösung werden direkt auf das Glasvlies in das obere Reservoir des Filter-Tubes pipettiert. Es folgt eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. Der Deckel des Filter-Tubes wird dazu verschlossen.

Auf den DNase-Verdau folgen drei Waschschrte. Im ersten Schritt gibt man 500 μl Waschpuffer 1 in das obere Reservoir des Filter-Tubes und zentrifugiert für 10 Sekunden bei 8000 x g ab. Der Durchlauf wird verworfen, das Filter-Tube wird wieder in das bereits benutzte Auffanggefäß eingesetzt. Anschließend werden 500 μl Waschpuffer 2 in das obere Reservoir gegeben. Die Zentrifugation erfolgt für 15 Sekunden bei 8000 x g, der Durchlauf wird verworfen und das Filter-Tube wieder verwendet. In einem letzten Waschschrte werden 200 μl Waschpuffer zugegeben, um dann für 2 min bei 13000 x g abzentrifugieren. Auf diese Weise werden Reste des Waschpuffers entfernt.

Das Auffanggefäß wird nun verworfen, während das Filter-Tube in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf Röhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) eingesetzt wird.

Zur Elution der RNA werden 40 μl Elutionspuffer in das obere Reservoir gegeben und für 3 min bei 8000 x g zentrifugiert. Mit diesem Protokoll wird aus 10^6 Zellen eine durchschnittliche Ausbeute von ca. 10 μg RNA erzielt. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgt mittels photometrischer Messung. Dazu werden 10 μl der eluierten RNA mit 90 μl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und in eine 100 μl -Küvette pipettiert. Die Extinktion wird bei 260 nm ermittelt ($E_{260} = 1 \cong 40\mu\text{g/ml RNA}$).

3.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wird mit speziell dafür vorgesehenen Pipetten durchgeführt, die verwendeten Pipettenspitzen werden vorher autoklaviert. Zunächst wird 1 μg RNA in

einem autoklavierten Eppendorf-Cup vorgelegt und ad 5 μl mit DEPC-behandeltem Wasser ergänzt. Die Probe wird für 5 min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Währenddessen wird ein Master-Mix wie folgt angesetzt:

- 2 μl Reverse Transkriptase-Puffer
- 4 μl Desoxynukleotidtriphosphat
- 1,5 μl Hexanukleotid-Mix
- x μl DEPC-Wasser (ad 15 μl , hängt von der RT ab)
- 9 U/ μg RNA Reverse Transkriptase

Die Durchmischung der Komponenten wird durch kurzes Vortexen erreicht. Daraufhin wird 15 μl Master-Mix zur RNA gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die so gewonnene cDNA kann bei -20°C wenige Tage, bei -70°C unbegrenzt aufbewahrt werden.

3.8 Polymerasekettenreaktion

3.8.1 Probenvorbereitung

Es wird grundsätzlich auf Eis gearbeitet und es werden speziell für die PCR vorgesehene Pipetten verwendet, welche zu keinem anderen Zweck benutzt werden. Die Pipettenspitzen werden vorher autoklaviert. Die ausgewählten Primer werden zunächst in TE-Puffer auf 50 μM vorverdünnt. Dann werden gleiche Mengen beider Oligomere vereinigt und für das Standardprotokoll mit TE-Puffer 1:10 verdünnt. Pro Ansatz werden damit 125 pmol jedes Oligomers eingesetzt.

100 ng cDNA (entspricht 1 μl , wenn nach Standardprotokoll verfahren wurde) werden in einem autoklavierten 200 μl -PCR-Gefäß (Perkin Elmer, Weiterstadt) vorgelegt. Es folgt die Zugabe von 5 μl Primer, wobei die interne Kontrolle (GAP-DH) als gesonderte Probe betrachtet und erst als PCR-Produkt mit der Probe vereinigt wird (s. 3.7.3). Nun wird folgender Master-Mix angesetzt (Angaben gelten pro Probe):

- 5 μl 10 x Taq DNA-Polymerase-Puffer
- 4 μl dNTP
- 33,75 μl dH₂O
- 0,25 μl Taq DNA-Polymerase (=1,25 U)

Nach kurzem Vortexen wird je 43 μ l Master-Mix zu den Proben gegeben. Die PCR-Gefäße werden mit den dafür vorgesehenen Deckeln fest verschlossen. Anschließend werden die Proben durch leichtes Schütteln gemischt. Nach einer kurzen Zentrifugation für 2 min bei 340 x g können die Proben in den PCR-Cycler (Gene Amp® PCR System 9700, Perkin Elmer, Weiterstadt) eingesetzt werden.

3.8.2 Reaktionsbedingungen

Zunächst werden die Proben für 3 min bei 95°C denaturiert. Für den internen Standard (GAP-DH) werden 24 Zyklen, für die apoptotischen Signalmoleküle 27 Zyklen folgender Abfolge zur optimalen Auswertbarkeit benötigt:

Separation: 30 s bei 95° C

Annealing: 30 s bei 60° C

Extension: 90 s bei 72° C

Nach dem 24. Zyklus werden alle Proben, welche den internen Standard als Primer enthalten, aus dem Cycler genommen ("Pause"-Taste) und sofort auf 4°C abgekühlt. Dasselbe geschieht mit den übrigen Proben nach dem 27. Zyklus.

3.8.3 Aufbereitung der PCR-Produkte

Von den abgekühlten Proben werden jeweils gleiche Volumina des internen Standards (GAP-DH) und des PCR-Produktes eines anderen Primers in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) vereinigt (z. B. jeweils 43 μ l). Zum Ausfällen der DNA wird 1/10 des Volumens 3 M NaAc-Lösung, pH 6,0 (z. B. 9 μ l), sowie das 2,5-fache Volumen EtOH p.a. (z. B. 250 μ l) zugegeben und kräftig gevortext. Die Proben werden dann bei -20°C über Nacht inkubiert (mindestens sechs Stunden).

Danach wird für 15 min bei 14000 x g zentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge Typ 1110, Hettich, Tuttlingen). Das Zentrifugat wird verworfen. Daran schließt sich eine 15-minütige Vakuumzentrifugation zum Trocknen des Pellets an (Christ Vakuumzentrifuge, Christ AG, Osterode).

Das getrocknete Pellet wird in 12 μ l TE-Puffer resuspendiert. Um eine vollständige Lösung des Pellets zu erreichen wird zunächst gevortext und dann ggf. für 5 min auf 65° C erhitzt. Anschließend wird 4 μ l Bromphenolblau-Glycerin-Probenpuffer zupipettiert und

erneut gevortext. Nach einer kurzen Zentrifugation zum Sammeln der Proben werden jeweils 15 μl auf ein 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen.

3.9 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

3.9.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese von PCR-Produkten

Zwei passende Glasplatten (eine muß ca. 3 cm höher sein) werden mit dH_2O gereinigt, bevor sie, von Spacern an den seitlichen und am unteren Rand getrennt, durch 4 Klammern (Life Technologies, Gaithersburg, USA) aneinander fixiert werden. Die Lösung für das 8%-Standardgel wird angesetzt und mit Hilfe einer 25 ml-Pipette ohne Luftblasen zwischen die beiden Glasplatten eingefüllt, bis der Flüssigkeitsspiegel 2 mm vom oberen Rand der kleineren Glasplatte entfernt ist. Dann wird zügig der Kamm eingesetzt, welcher die Probestaschen bildet. Die vollständige Polymerisation dauert bei Raumtemperatur etwa 45 min. Danach wird der Kamm und der Spacer am Unterrand entfernt und das Gel wird mit zwei Klemmen in die Elektrophorese-Apparatur (Life Technologies, Gaithersburg, USA) eingespannt. Nun wird zunächst das obere Laufpuffer-Reservoir mit Laufpuffer beschickt und abgewartet, ob dieses gut abgedichtet ist. Ist dies der Fall, kann auch die untere Kammer mit Laufpuffer gefüllt werden. Luftblasen, v. a. am Unterrand des Gels, welcher nun in den Laufpuffer eintaucht, werden mit einer Kanüle entfernt. Die Probestaschen werden mit Laufpuffer gespült.

Nach einem Vorlauf von ca. 30 min können die gemäß Kapitel 3.8.3 aufbereiteten Proben in den Taschen des Gels aufgetragen werden. Der Molekulargewichtsmarker wird in der Regel in die erste befüllte Tasche auf der linken Seite des Gels aufgetragen. Man wählt eine konstante Spannung von 150 V, was einer Stromstärke von ca. 40 mA entspricht. Die Elektrophoresedauer beträgt ca. vier Stunden und hängt von der gewählten Spannung und der Länge des Gels ab. Nachdem der Elektrophoreselauf beendet ist, wird das Gel von den Spacern und Glasplatten befreit und für 7 min in 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromidlösung gefärbt. Aufgrund der Kanzerogenität von Ethidiumbromid sollte unter dem Abzug gearbeitet werden. Das gefärbte Gel wird anschließend über einem UV-Transilluminator (Rall, Reutlingen) photographiert.

3.9.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese von Proteinen

Zur Analyse von Proteinen wurde die Minigel-Apparatur Mini-Protean® II (Biorad, Richmond, USA) verwendet. Zunächst werden die Glasplatten mit Ethanol gründlich gereinigt und, unter Verwendung der Spacer, in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Es muß darauf geachtet werden, daß der Unterrand der Platten so tief in die Schaumstoffdichtung eingedrückt ist, daß anschließend beim Gießen des Gels nichts auslaufen kann. Nun kann das Trenngel wie beschrieben angesetzt und bis etwa 2.5 cm unterhalb des oberen Plattenrandes zwischen die vorbereiteten Platten gefüllt werden. Das Trenngel wird zügig mit Ethanol überschichtet und soll bei Raumtemperatur mindestens 45 min polymerisieren. Nach stattgehabter Polymerisation wird das Ethanol entfernt und das Gel zwei mal mit H₂O gewaschen. Nach dem Ansetzen des Sammelgels wird dieses bis etwa 0.5 cm unterhalb der Plattenränder über das Trenngel geschichtet und der Kamm eingesetzt. Die Polymerisation des Sammelgels ist innerhalb von 30 min abgeschlossen. Danach wird der Kamm vorsichtig entfernt, die Taschen des Gels mit Laufpuffer gespült und die beiden Kammern der Elektrophorese-Apparatur mit Laufpuffer befüllt. Neben 5 µl Molekulargewichtsmarker (Full Range Rainbow Marker RPN 800, Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England), den man in die erste Proben tasche aufträgt, werden 12 µl der jeweiligen Proben aufgetragen, nachdem diese 1:1 mit dem Probenpuffer gemischt worden sind. Nun wird eine Spannung von 150 V angelegt, was einer Stromstärke von etwa 290 A entspricht. Die Elektrophorese dauert etwa 1 Stunde und sollte bei 4° C durchgeführt werden.

3.10 Western Blot

Zur Immobilisierung werden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Dazu wird die Membran (Hybond, Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und anschließend, wie auch vier Lagen Filterpapier (Biorad, Richmond, USA) und zwei Faserplatten (Biorad, Richmond, USA) in Transferpuffer equilibriert. Nun wird das Gel, unter Vermeidung von Luftblasen, auf die Nitrozellulose aufgebracht. Der Rest des so entstehenden Sandwiches besteht aus je zwei Lagen Filterpapier auf beiden Seiten und je einer Faser-

platte. Das Sandwich wird nun in die Blot-Apparatur eingerastet, so daß die Nitrozellulose-Membran in Richtung Pluspol weist. Die Apparatur wird mit Transferpuffer gefüllt. Wird über Nacht geblottet, so wählt man eine Spannung von 30 V (entspricht etwa 90 mA), alternativ kann auch bei 100 V für eine Stunde geblottet werden (entspricht etwa 300 mA). Der Transfer findet in jedem Fall bei 4° C statt.

Nachdem man Filterpapier und Gel entfernt hat, wird die Membran kurz mit 0.2% (w/v) Poncoeau-Rot in 0.6% (w/v) TCA gefärbt, um die Qualität und Effizienz des Transfers zu beurteilen. Durch wiederholtes Waschen der Membran in TBST wird der Farbstoff wieder entfernt. Nun werden die Banden des Markers noch einmal mit Bleistift nachgezeichnet und die Bahnen auf der Membran beschriftet. Unspezifische Bindungsstellen der Membran werden anschließend durch Inkubation in 2% (w/v) Gelatine in dH₂O für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wird die Membran drei mal für jeweils 10 min in TBST gewaschen. Danach wird die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert, welcher zu diesem Zweck mit TBST auf eine Konzentration von 1.5 µg/ml verdünnt wurde. Es folgen vier Waschstschritte mit TBST für jeweils mindestens 5 min, um unspezifisch gebundenen Antikörper möglichst weitgehend zu eliminieren, bevor für eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert wird. Als solcher dient ein Peroxidase-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper (Becton Dickinson, San Jose, USA). Erneut wird vier mal gewaschen, bevor die Membran schließlich von überschüssigem TBST befreit und für 5 min mit ECL (ECL plus, Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) inkubiert wird. Zum Schluß wird die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und in eine Belichtungskassette eingebracht. Die Belichtungszeit wird der Schwärzung eines ersten Probefilmes (Hyperfilm® ECL, Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) angepaßt.

3.11 Annexin-V-Färbung zur FACS-Analyse

Zur Detektion und Quantifizierung von Apoptose und Nekrose wird das Annexin-V-FLUOS-Staining Kit (Boehringer, Mannheim) herangezogen. Für die Färbeprozedur werden 10⁶ Zellen für 6 min bei 350 x g in einem konkav zulaufenden Polystyren-FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson, San Jose, USA) pelletiert. Der Überstand wird verworfen.

Die Zellen werden in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 6 min bei 350 x g abzentrifugiert. Währenddessen kann bereits die Markierungslösung angesetzt werden. Für 10 Tests werden hierfür 1 ml HEPES-Puffer mit 20 µl Annexin-V-Fluorescein und 20 µl Propidium-Iodid vereinigt.

Nun wird das Zellpellet in 100 µl Markierungslösung resuspendiert und für 15 min unter Lichtabschluß auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe mit 400 µl HEPES-Puffer versetzt. Sollte diese Verdünnung sich beim Messen im Durchflußzytometer als zu gering herausstellen, kann mit HEPES-Puffer weiter verdünnt werden.

Die Analyse erfolgt mit dem FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, USA) unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 488 nm und eines 515 nm Bandpaßfilters zur Fluorescein-Detektion, sowie eines Filters > 600 nm zur Propidium-Iodid-Detektion. Die elektronische Kompensation des Gerätes ist dabei so einzustellen, daß die beiden Emissionsspektren nicht überlappen.

3.12 FACS-Markierung ohne Lysefixierung

In einem konkav zulaufenden Polystyren-FACS-Röhrchen wird eine Suspension von 5×10^5 Zellen vorgelegt und mit 2 ml PBS verdünnt. Die Zellen werden für 6 min bei 350 x g abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen, das Sediment läßt man auf saugfähigem Papier sorgfältig abtropfen. Die Resuspension erfolgt in 50 µl IF-Puffer 1. Nach der Zugabe von je 20 µl Antikörper und kräftigem Vortexen wird für 30 min unter Lichtabschluß bei 4°C inkubiert.

Die Inkubation wird durch die Zugabe von 2 ml PBS beendet. Nach kräftigem Vortexen werden die Zellen bei 350 x g in 6 min pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS und kurzem Abtropfen auf saugfähigem Papier wird das Sediment im zurückbleibenden Flüssigkeitstropfen resuspendiert und mit dem FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, USA) wie bereits in 3.10 beschrieben analysiert. Sollte eine sofortige Messung nicht möglich sein, werden die Ansätze bei 4° C auf Eis inkubiert.

Handelt es sich bei dem Primärantikörper um einen unmarkierten Antikörper, so wird die Markierungsprozedur mit einem Fluorescein-markierten Sekundärantikörper wiederholt.

3.13 MTT Test

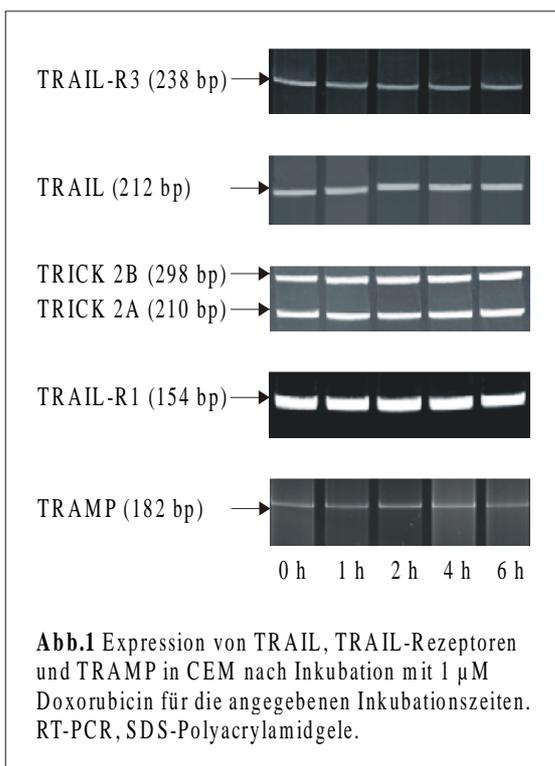
MTT ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch Dehydrogenasen aus intakten Mitochondrien in blau gefärbte Formazane umgewandelt wird. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl vitaler Zellen und dem Anteil an MTT, der in Formazane umgewandelt wird. Um diese Kristalle einer photometrischen Messung zugänglich zu machen, müssen sie in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. DMSO) gelöst werden. Nach Inkubation mit dem gewünschten Stimulus werden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen. Anschließend werden jeweils 10^5 Zellen in 100 μ l Zellkulturmedium aufgenommen und in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Für jede Probe werden drei Vertiefungen vorgesehen. Es erfolgt eine Inkubation über 48 Stunden im Brutschrank. Nach drei Tagen werden die Zellen mit 25 μ l MTT-Stammlösung (2 mg/ml in PBS) versetzt und für weitere drei bis vier Stunden bei 37° C inkubiert. Danach wird die Platte bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen, ohne dabei die entstandenen Formazane zu zerstören. Durch Zugabe von 150 μ l DMSO und vorsichtiges Schütteln werden die Kristalle aufgelöst. Die optische Dichte wird mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 560 nm bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Bei sämtlichen hier vorgestellten Ergebnissen handelt es sich um ein repräsentatives Experiment von mindestens drei Wiederholungen.

4.1 Expression von TNF-Homologen in CEM

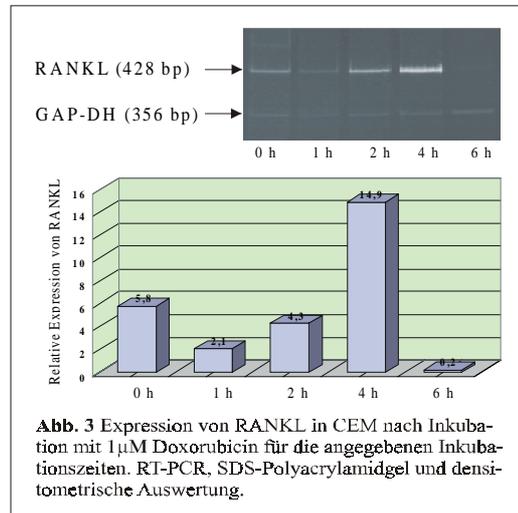
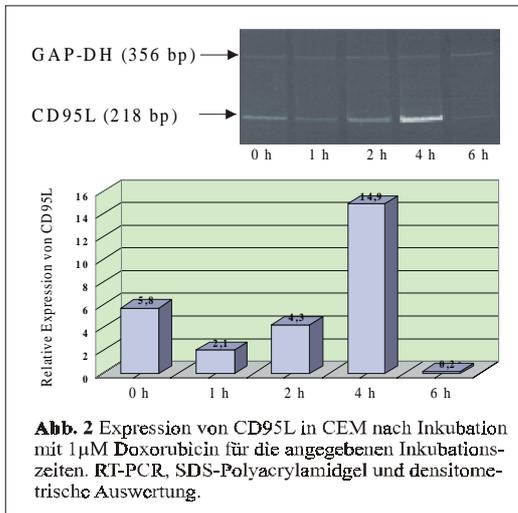
CEM-Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 /ml für verschiedene Zeitspannen mit $1 \mu\text{M}$ Doxorubicin inkubiert. Die anschließende Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte für alle Proben zum selben Zeitpunkt. Die RNA-Ausbeute wurde durch photometrische Messung bei 260 nm quantifiziert. Für die cDNA-Synthese wurden gleiche Mengen an RNA eingesetzt. Dieses Vorgehen war die Grundlage für eine semi-quantitative Auswertung der Daten. Von der gewonnenen cDNA wurden jeweils 200 ng in die PCR eingesetzt, wobei die Vervielfältigung der TNF-Homologen sowie der GAP-DH als



interne Kontrolle in zwei verschiedenen Ansätzen erfolgte. Hiermit konnte die Zahl und Intensität der Nebenbanden gegenüber einer Multiplex-PCR deutlich verringert werden. Die PCR-Produkte der jeweiligen Reaktionsansätze wurden nach der PCR 1:1 gemischt und gemeinsam einer Alkohol-fällung unterzogen. Die ausgefällte und in TE-Puffer resuspendierte DNA wurde durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese getrennt und densitometrisch ausgewertet. Im Falle von CEM ergab sich dabei typischerweise eine gleichbleibende Expression von

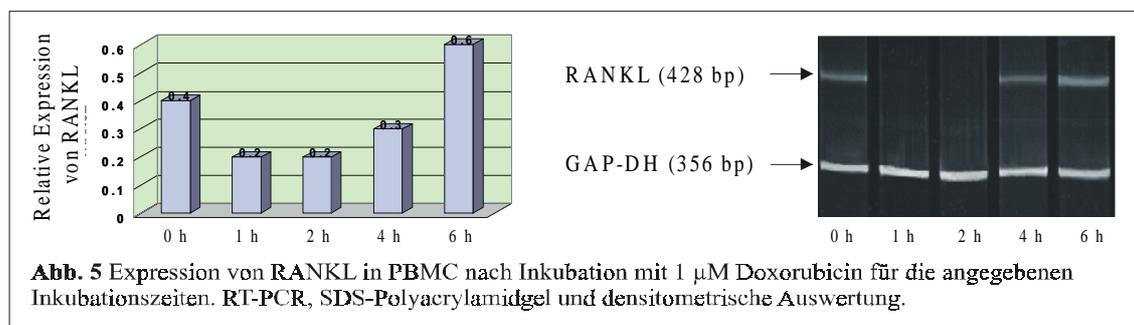
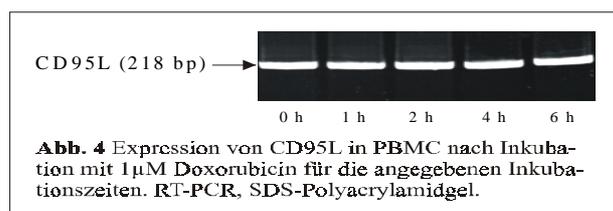
TRAIL und dessen Rezeptoren sowie für TRAMP über den Beobachtungszeitraum von sechs bis acht Stunden (Abb. 1). Für CD95L konnte ein Expressionsmaximum nach 4-stündiger Inkubation mit Doxorubicin festgestellt werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle fand sich dabei eine Hochregulation um etwa 150% (Abb. 2).

Für RANKL ließ sich reproduzierbar eine Hochregulation um 400 bis 600% mit einem Expressionsmaximum bei vier Stunden nachweisen. Daher wurde die Funktion von RANKL in lymphatischen Zellen in der Folge genauer untersucht.



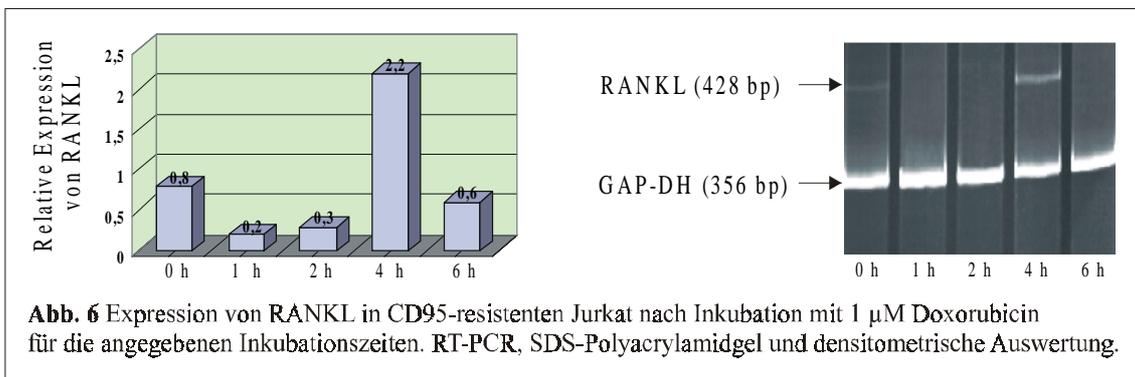
4.2. Expression von TNF-Homologen in PBMC

PBMC wurden aus dem Peripherblut gesunder Probanden über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Die anschließenden Arbeitsschritte waren exakt die selben wie die in Kapitel 4.1. beschrieben. Die Expression von TRAIL und dessen Rezeptoren wie auch von TRAMP ändert sich, wie in CEM, im Verlauf nicht. Auch für CD95L zeigte sich in PBMC keine Expressionsänderung nach Inkubation mit Doxorubicin (s. Abb. 4). Für RANKL ließ sich auch in PBMC eine Hochregulation mit einem Maximum bei sechs Stunden nachweisen, wenn auch nur um 50% (Abb. 5).

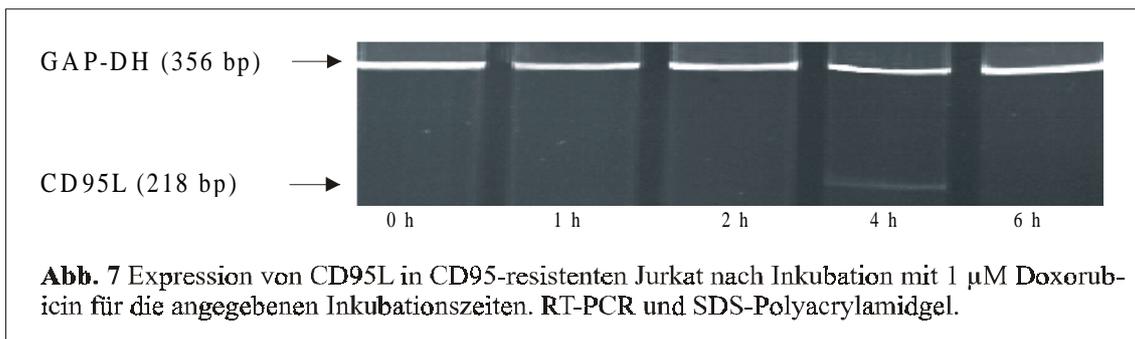


4.3. Expression von TNF-Homologen in JM-3A5

In JM-3A5, einer CD95-resistenten Zelllinie, fällt die Hochregulation von RANKL bzw. CD95L wesentlich geringer aus als beim Wildtyp. Im Falle von RANKL beträgt die Expressionssteigerung ca. 250% (Abb. 6). Dieses Ergebnis bestätigt, daß in der Tat die Inkubation mit Doxorubicin in therapeutisch relevanter Konzentration die Hochregulation von RANKL bedingt und die Resistenz gegenüber CD95 möglicherweise (auch) durch die verminderte Expression von RANKL zu erklären ist.



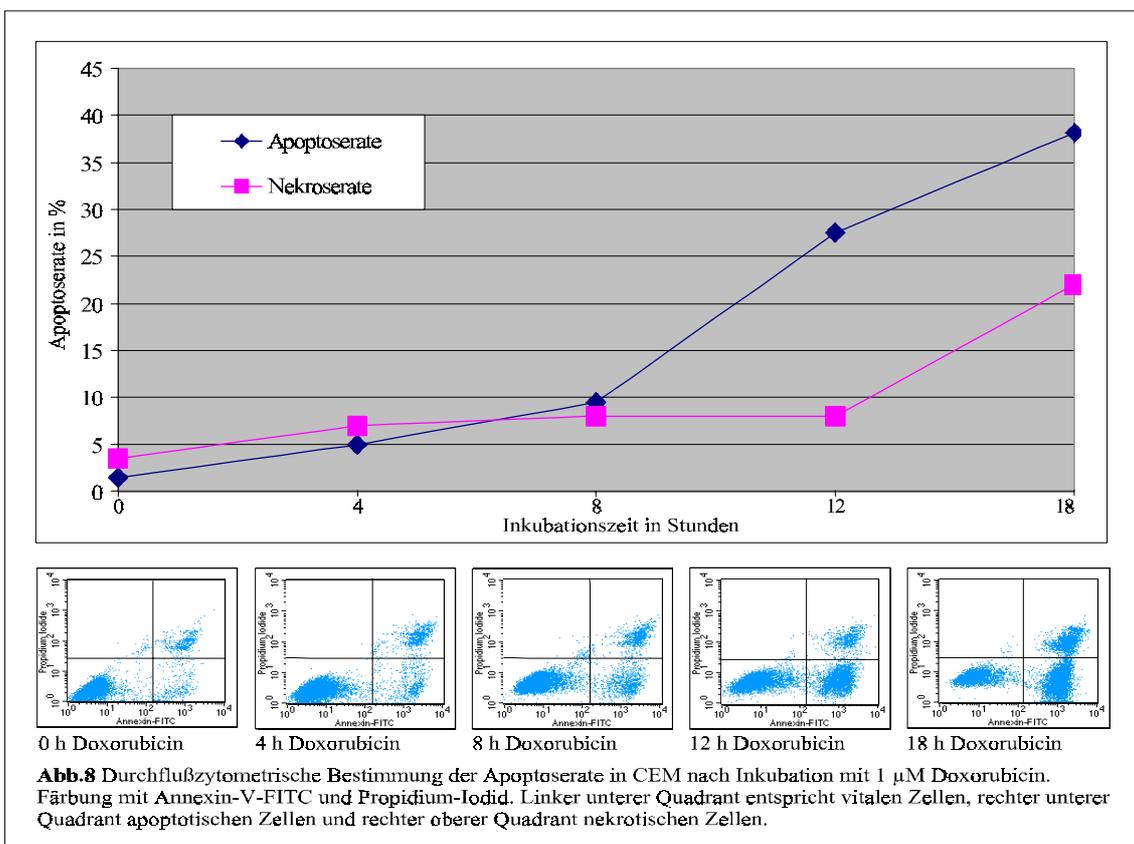
CD95L konnte in der unbehandelten Kontrolle in Doxorubicin-resistenten Zellen auch nach bis zu 35 PCR-Zyklen nicht nachgewiesen werden. Erst nach vier Stunden ist eine schwache Bande für CD95L erkennbar. Aufgrund dieses Ergebnisses mußte hier auf die densitometrische Auswertung verzichtet werden (Abb. 7).



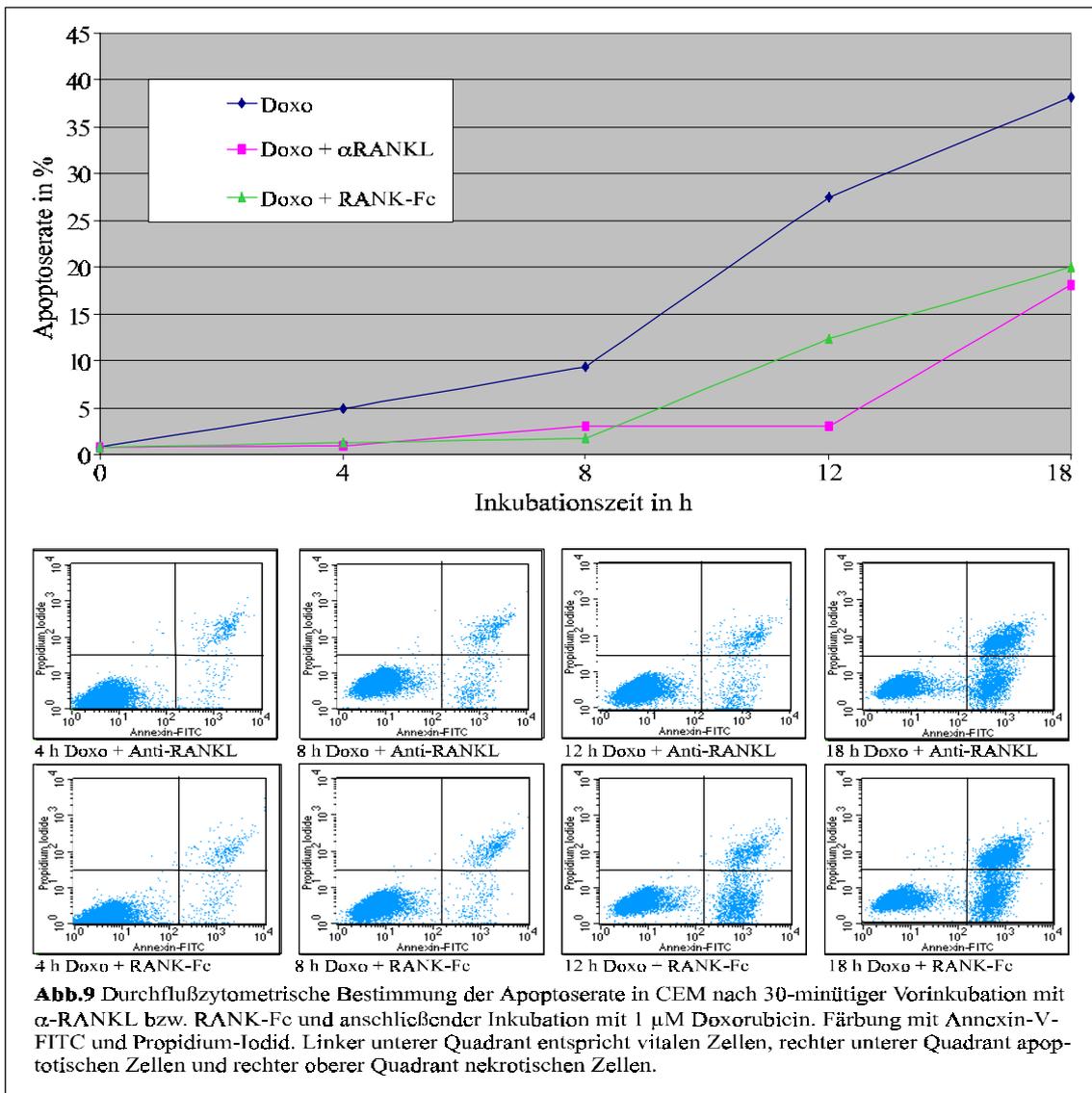
Es ist demzufolge nicht auszuschließen, daß auch die Regulation von CD95L alleine für die Resistenzbildung eine Rolle spielt.

4.4. Durchflußzytometrische Untersuchung von CEM nach Inkubation mit Doxorubicin und anderen Stimuli

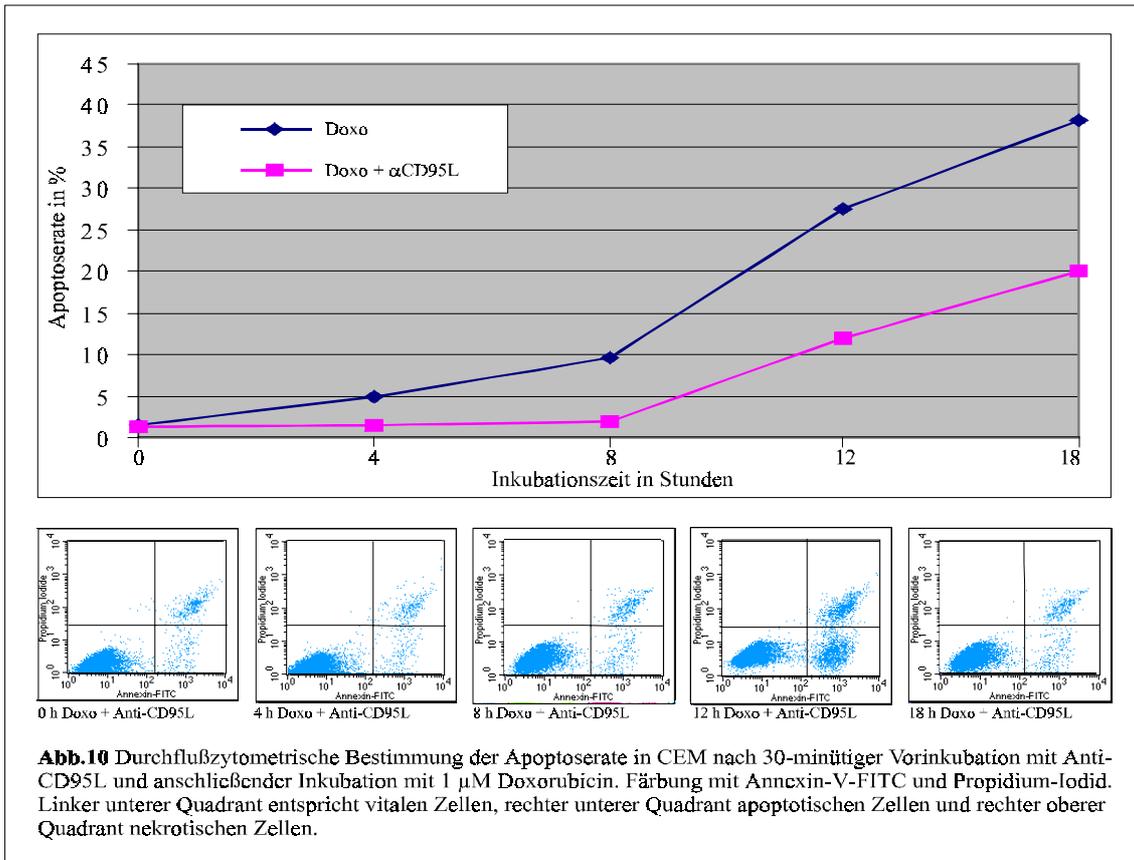
Zur Quantifizierung der Apoptoserate in den hier untersuchten Zelllinien wurde eine Annexin-V-Färbung vorgenommen, welche anschließend durchflußzytometrisch analysiert wurde. Zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde mit Propidium-Iodid gegengefärbt. Dieses wird nur von nekrotischen Zellen mit nicht mehr intakter Plasmamembran aufgenommen. Die FACS-Messung aller Proben erfolgte in einer möglichst kurz gehaltenen Zeitspanne. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen eines Cell-Death Detection ELISA überein, der im Rahmen einer anderen Dissertation bei identischem Versuchsaufbau angewendet wurde. Zunächst wurde die Apoptoserate für CEM nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin bestimmt. Es wurden Kinetiken bis zu 48 Stunden durchgeführt, wobei sich nach 12 bis 18 Stunden ein Maximum an apoptotischen (Annexin-V-FITC)-positiven Zellen ergab. Bei Inkubationszeiten über 18 Stunden begannen die nekrotischen (Propidium-Iodid)-positiven Zellen zu überwiegen (Abb. 8).



Aufgrund der in Kapitel 4.1 vorgestellten Ergebnisse der untersuchten Expressions-Kinetiken lag es nahe, als nächsten Schritt zu untersuchen, ob sich die Apoptoseinduktion durch Doxorubicin mit Antikörpern gegen RANKL hemmen läßt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vor der Zugabe von 1 μM Doxorubicin zunächst mit 3 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen Antikörpers für 30 Minuten vorbehandelt. In entsprechender Weise wurde das F_c- Fragment des RANKL-Rezeptors RANK (RANK-F_c) als Apoptose-Hemmer getestet. Sowohl nach Vorinkubation mit dem Antikörper wie auch mit RANK-F_c ließ sich reproduzierbar eine Reduktion der Apoptoserate um ca. 50-60% nach 18 Stunden erzielen (vgl. Abb. 9). Auch dieses Ergebnis wurde in unserem Labor mit Hilfe des Cell Death Detection ELISAs überprüft und bestätigt.

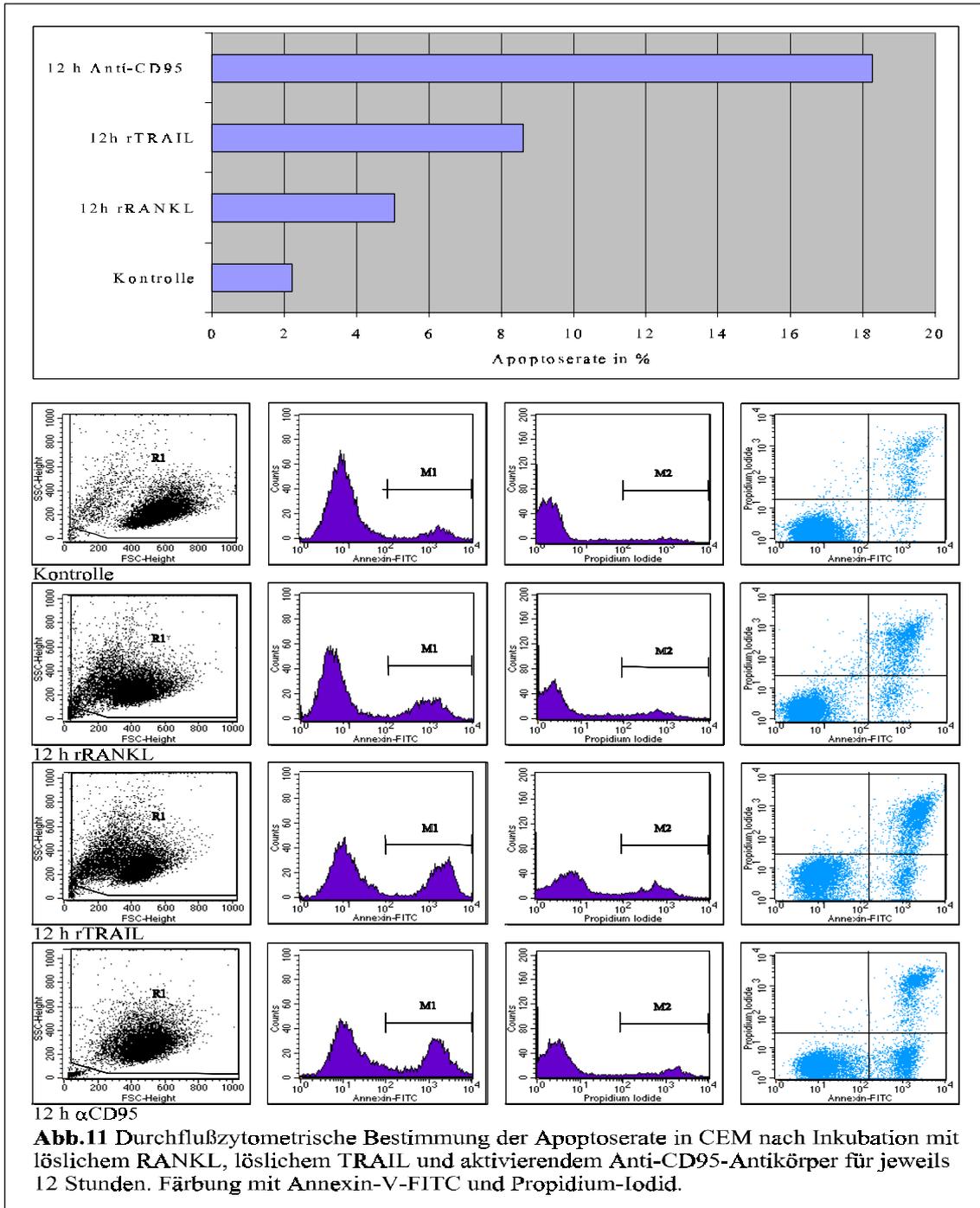


Nachdem unter Inkubation mit Doxorubicin auch für CD95L eine Hochregulation nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Hemmung der Apoptoseinduktion mit einem Antikörper gegen CD95L untersucht. Nach 30-minütiger Vorinkubation mit einem entsprechenden monoklonalen Antikörper vor der Zugabe von 1 μM Doxorubicin zeigte sich eine Reduktion der Apoptoserate, die der für $\alpha\text{-RANKL}$ bzw. RANK-F_c in etwa entsprach (Abb. 10). Leider stand für CD95L kein entsprechendes F_c -Fragment zu Verfügung, so daß hier keine zusätzliche Überprüfung der Spezifität erfolgen konnte.

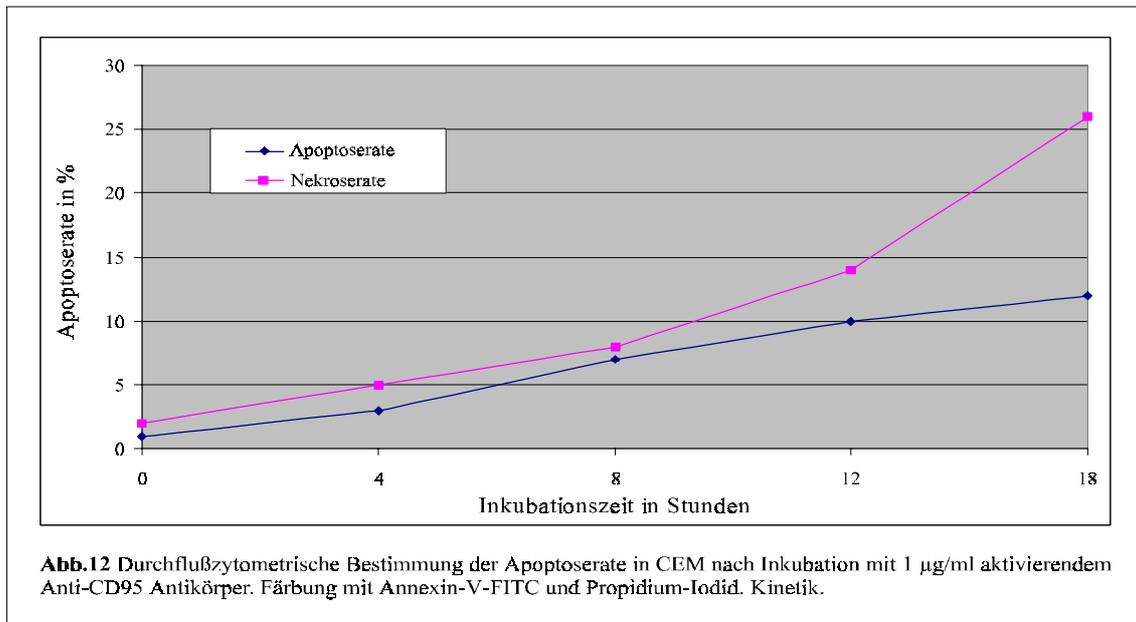


Vorinkubation mit polyklonalem $\alpha\text{-TRAIL}$ ergab keine signifikante Reduktion der Apoptoserate in CEM. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß die Hochregulation von RANKL und CD95L auf RNA-Ebene bei der Doxorubicin-induzierten Apoptose eine wesentliche Rolle spielt. Dieser Effekt beruht möglicherweise auf der in Kapitel 1.10 vorgestellten autokrinen bzw. parakrinen Sekretion der entsprechenden Genprodukte. Um zu zeigen, daß alle untersuchten Mediatoren (RANKL, CD95L und TRAIL) in der Lage sind, in CEM Apoptose zu induzieren wurden Zellen für jeweils 12 Stunden mit löslichem RANKL, löslichem TRAIL und einem aktivierenden CD95 Antikörper inku-

biert. Alle drei Mediatoren waren in der Lage, Apoptose zu induzieren (Abb. 11), wobei die Apoptoseraten für rTRAIL und rRANKL nur im Bereich zwischen fünf und zehn Prozent lagen. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß die beiden TNF-Homologen RANKL und TRAIL nicht, wie in vivo anzunehmen, membrangebunden, sondern gelöst vorlagen und dass die Bioaktivität und Konzentration des rekombinanten Proteins nicht der Situation in vivo entspricht.

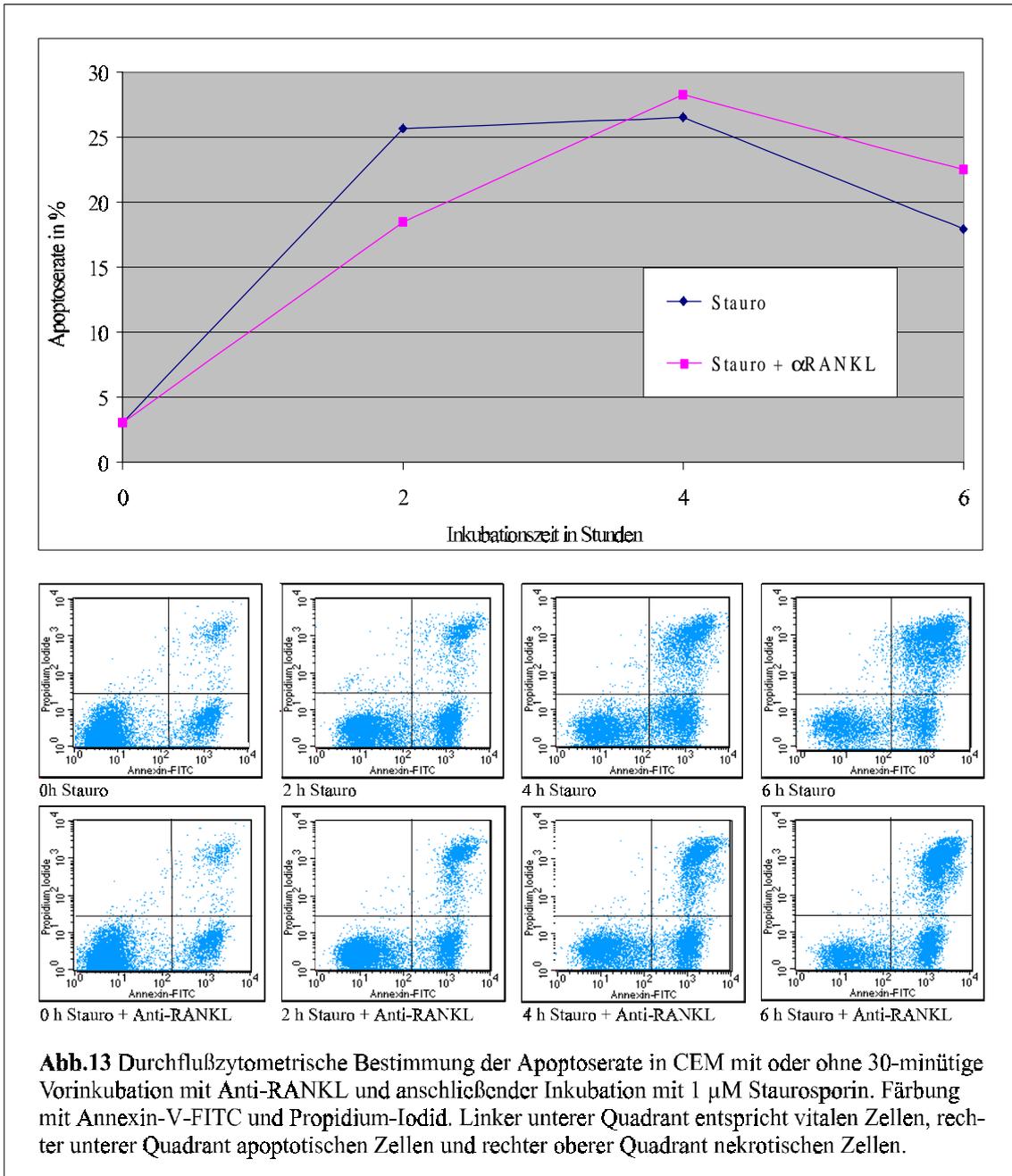


Da sich von den oben genannten der aktivierende Antikörper gegen CD95 als bester Apoptoseinduktor erwiesen hatte, wurde auch für diesen eine Kinetik angefertigt (s. Abb. 12). Sie zeigt, daß bei Aktivierung von CD95 sehr schnell Apoptose eintritt und in Nekrose übergeht.



Viele Publikationen gehen davon aus, daß der Apoptoseinduktion durch verschiedene Stimuli ein einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt. Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Apoptoseinduktion durch DOXO als Repräsentant der Anthrazyklinderivate. Zur Untersuchung der Spezifität des hier dargestellten Mechanismus über die Hochregulation von RANKL und evtl. von CD95L haben wir die oben vorgestellten durchflußzytometrischen Versuche auch mit Staurosporin (Stauro) als Stimulus durchgeführt.

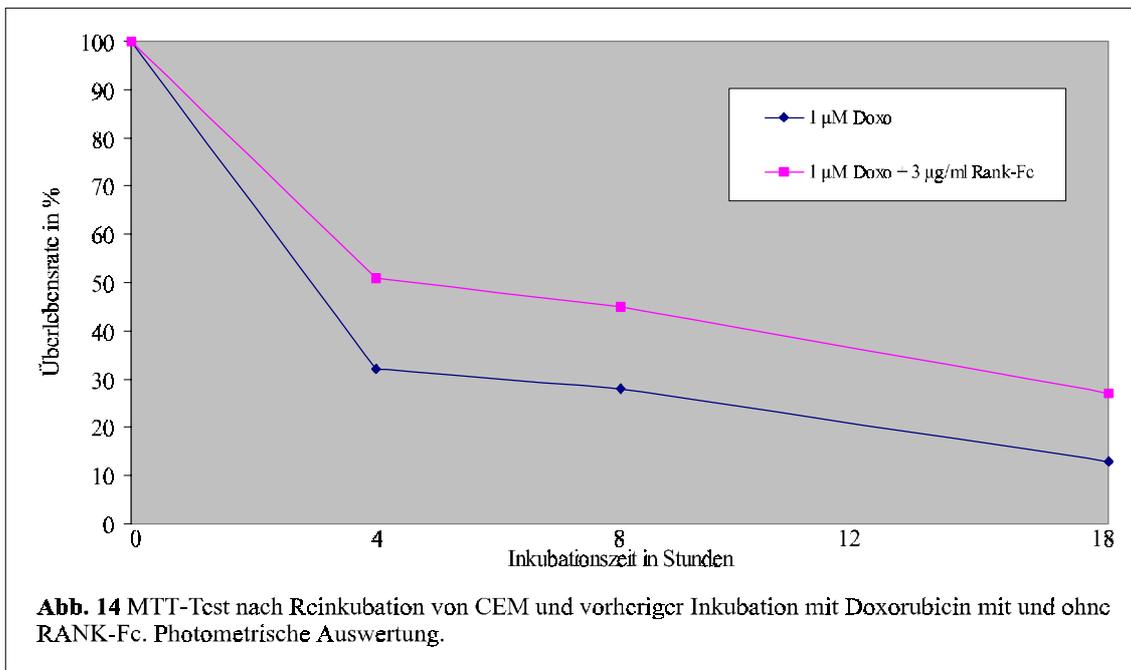
Die Ergebnisse unterscheiden sich wesentlich von denen mit Doxorubicin als Apoptose-Induktor. Einerseits zeigt Staurosporin eine völlig verschiedene Kinetik mit einem Apoptose-Maximum bereits nach vier Stunden. Andererseits war es nicht möglich, die Apoptose-Induktion mit Staurosporin durch Vorinkubation mit α RANKL zu hemmen (s. Abb. 13). Dieses Ergebnis zeigt, daß selbst verschiedene Klassen von Zytostatika verschiedene Mechanismen zur Apoptose-Induktion in Gang setzen und womöglich lediglich über eine gemeinsame Endstrecke in Verbindung stehen.



Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen der durchflußzytometrischen Untersuchungen ersichtlich, daß RANKL selbst in gelöster (nicht membrangebundener) Form in der Lage ist, Apoptose zu induzieren. Doxorubicin zeigt in der Kinetik ein Maximum an apoptotischen Zellen nach 18 Stunden von ca. 40%. Die Doxorubicin-induzierte Apoptose konnte in CEM durch Antikörper gegen RANKL und CD95L sowie durch RANK-F_c jeweils um ca. 50% reduziert werden. Der hier angenommene Mechanismus der Apoptose-Induktion scheint im Falle von Staurosporin nicht zugrunde zu liegen.

4.5 Quantifizierung überlebender Zellen mit MTT

Um nachzuweisen, daß Zellen, welche die Annexin-V-Methode, wie auch der Cell Death Detection-ELISA, als apoptotisch detektiert, tatsächlich den unumkehrbaren Weg des Zelluntergangs beschritten haben, wurden Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin mehrfach gewaschen, gezählt, in einer Konzentration von 10^5 in 6 Loch-Platten ausgesät und schließlich für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurde ein MTT-Test mit photometrischer Auswertung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß von den mit Doxorubicin inkubierten Zellen tatsächlich ein Großteil nicht mehr in der Lage war zu proliferieren. Die mit RANK-F_c vorbehandelten Zellen wiesen eine deutlich höhere Proliferationsrate auf (Abb. 14).



Nach diesen grundlegenden Experimenten zur apoptotischen Signaltransduktion widmet sich der zweite Teil der Dissertation der molekularbiologischen und biochemischen Untersuchung eines Patienten mit einem unklaren lymphoproliferativen Syndrom. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.6 und 4.7 dargestellt.

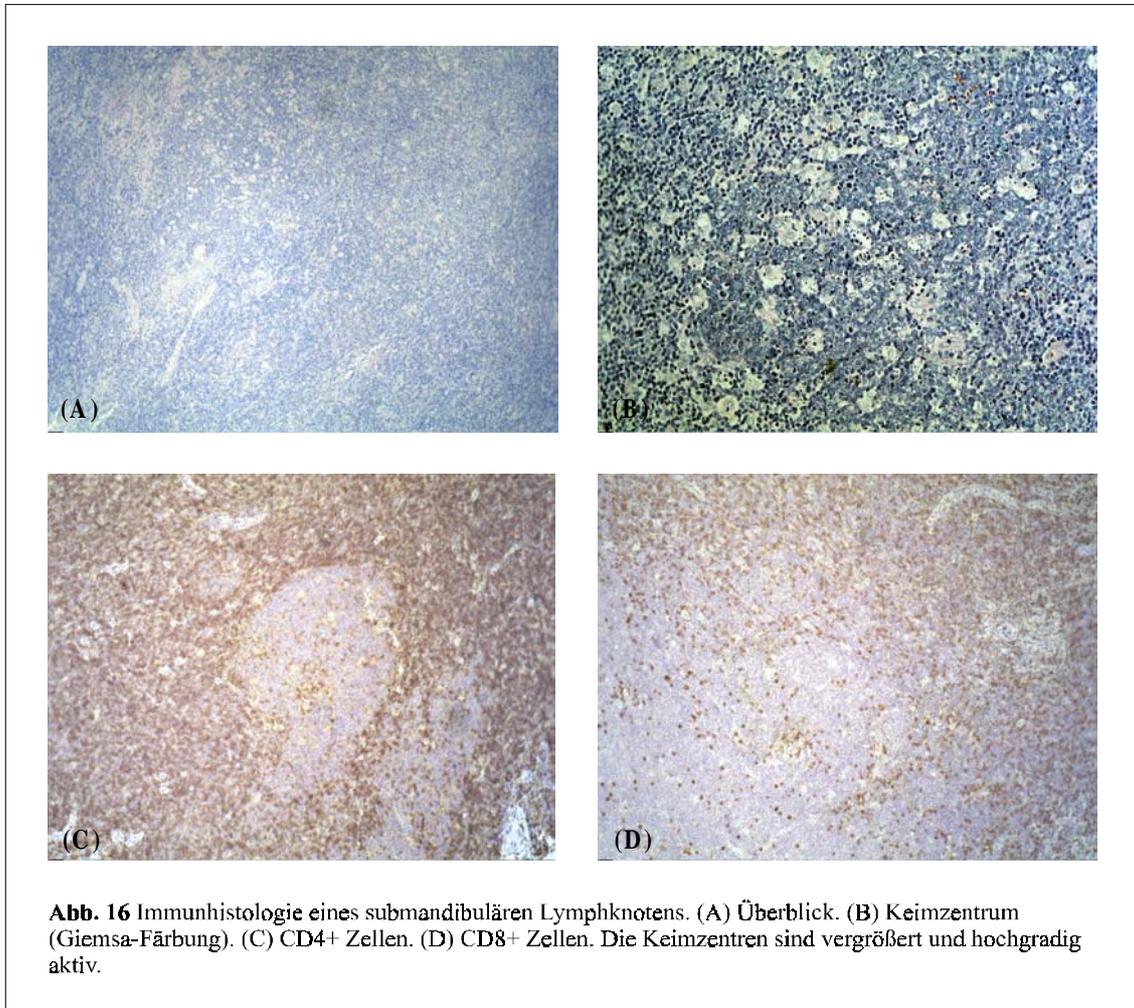
4.6 Vorstellung eines siebenjährigen Patienten mit einem lymphoproliferativen Syndrom

Im Alter von 18 Monaten trat bei dem Patienten erstmals eine retroaurikuläre Lymphknoten-Schwellung auf. Im Verlauf zeigten sich Vergrößerungen weiterer Lymphknotenregionen, ohne daß zunächst eine Hepatosplenomegalie bestand. Vor allem inguinal, axillär und intrathorakal imponierten hühnereigroße Konglomerate, zusätzlich waren submandibuläre, zervikale und nuchale Lymphknoten betroffen (s. Abb. 15). Bedingt durch die massiven intrathorakalen Lymphknotenvergrößerungen kam es wiederholt zur Bildung von Atelektasen, zur Ausbildung von Pneumonien und schließlich auch zu einem Pneumothorax. Im späteren Verlauf stellte sich eine Ateminsuffizienz ein, die durch maschinelle Beatmung nicht zu beherrschen war und schließlich zum Tod des Patienten im Alter von acht Jahren führte.

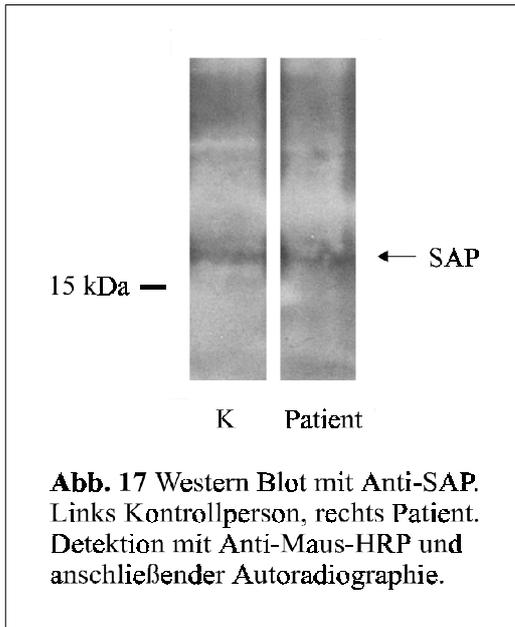


Laborchemisch fiel ein IgG- und IgA-Mangel auf, eine Leukozytose bei unauffälligem Differentialblutbild und eine hypochrome Anämie. Die Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen variierte während des Therapieverlaufs. Gelegentlich wurde eine erniedrigte Fraktion von B-Lymphozyten gemessen, das CD4:CD8-Verhältnis war meistens normal, im Verlauf jedoch teilweise durch eine Vermehrung der CD8⁺-Zellen auf 1:10 verschoben. Eine Erhöhung der CD3⁺CD4⁻CD8⁻-Population fand sich nicht, so daß immunphänotypisch keine Anzeichen für einen CD95/CD95L-Defekt vorlagen. Auch für

einen CD152 (CTLA-4)-Mangel gab es im FACS keinen Hinweis. Ein 1999 entnommener submandibulärer Lymphknoten zeigte erwartungsgemäß überaktive Keimzentren (vgl. Abb. 16). Es fanden sich keine Malignitätszeichen.



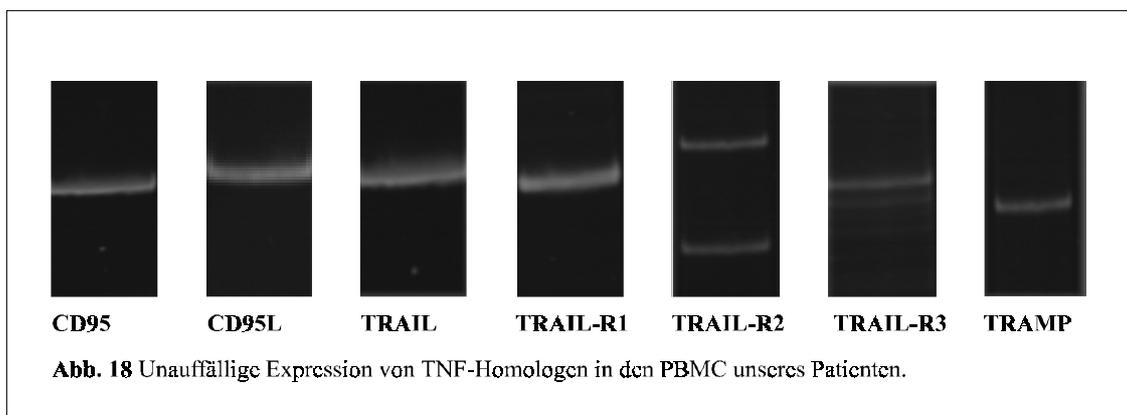
In unterschiedlicher Quantität wurde bei jeder Untersuchung EBV- und CMV-DNA nachgewiesen. Es bestand jedoch histologisch kein Anhaltspunkt für ein EBV-typisches Lymphom. Sequenzierungen der Exons und flankierenden Intron-Regionen von SH2D1A, PTEN und SMAD4 waren unauffällig. Da bei der Sequenzierung Mutationen in der Promotorregion nicht miterfaßt werden, wurde zum endgültigen Ausschluß eines XLP-Syndroms ein Western Blot mit α SAP durchgeführt, der eine ähnliche Expression von SAP bei unserem Patienten wie bei der Kontrollperson ergab (s. Abb. 17).



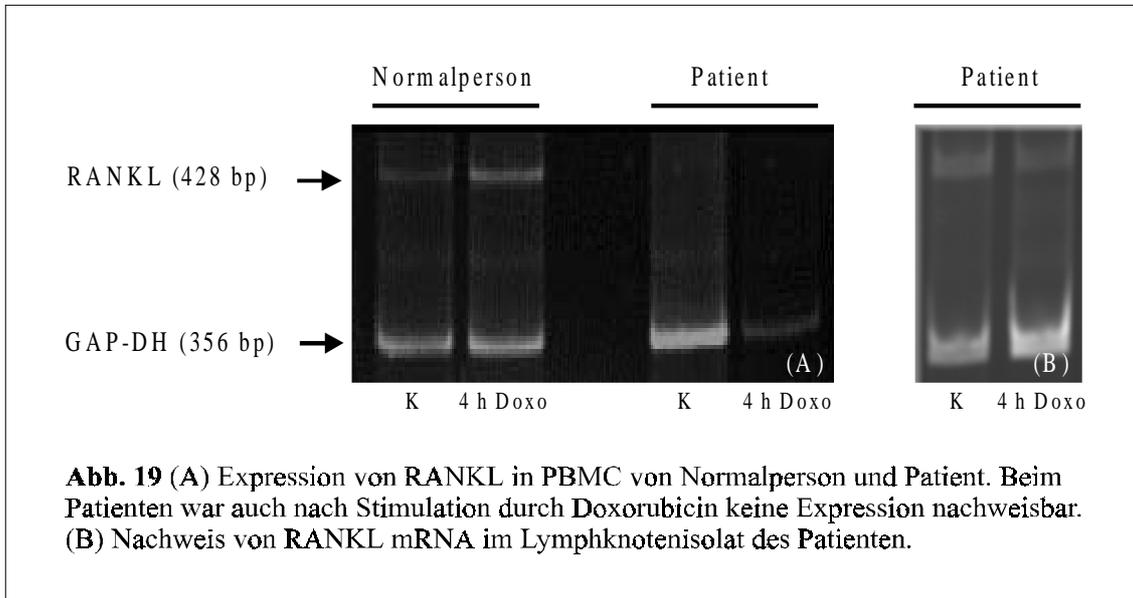
Bei funktionellen Lymphozyten-Tests konnte wiederholt eine unauffällige Zytotoxizität der PBMC des Patienten gegen K562 nachgewiesen werden. Subpopulationen wurden hierbei nicht untersucht. Eine Klonalität konnte nie nachgewiesen werden, ein weiteres Indiz gegen eine maligne Transformation.

4.7 Expression von TNF-Homologen im Peripherblut des Patienten

Zum endgültigen Ausschluß eines ALPS wurde die Expression von Liganden und Rezeptoren der TNF-Familie in den PBMC des Patienten durch PCR untersucht. Dabei ergaben sich für CD95 und CD95L sowie für TRAIL und dessen Rezeptoren keine Auffälligkeiten (s. Abb. 18). Dieses Ergebnis und die fehlende Population von $CD3^+ CD4^- CD8^-$ Zellen bei unserem Patienten schließt ein ALPS sowie einen Defekt im Bereich des TRAIL-Systems weitgehend aus.



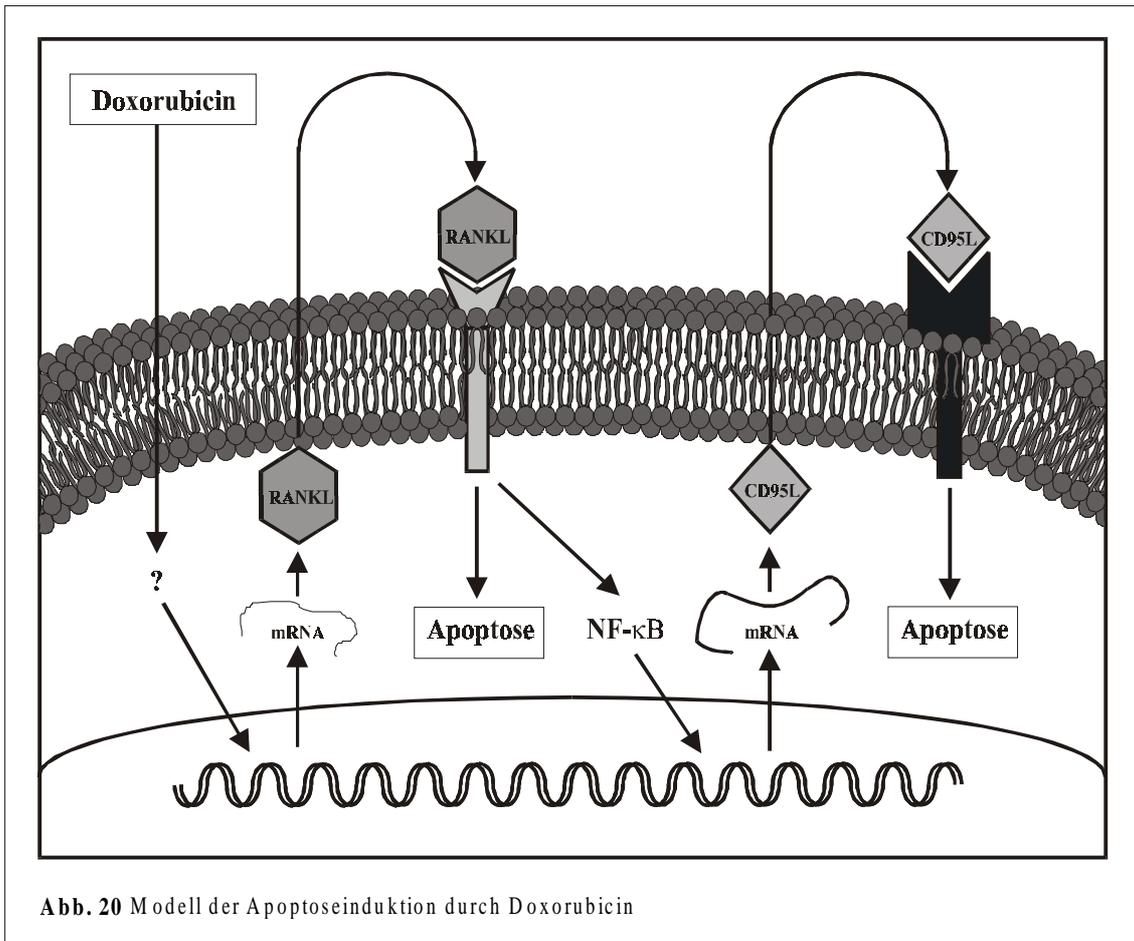
RANKL war in den PBMC des Patienten auch nach Stimulation mit Doxorubicin nicht nachweisbar (Abb. 19a), im Gegensatz zu mononukleären Zellen eines submandibulären Lymphknotens, in denen RANKL auch unstimuliert nachweisbar war (Abb. 19b).



Die funktionelle Bedeutung der anormalen Expression von RANKL in PBMC ist noch unklar.

4.8 Ausblick

Die in diesem Kapitel zusammengefaßten Ergebnisse legen nahe, ein von dem in Kapitel 1.10 abweichendes Modell für den Wirkungsmechanismus der Anthrazyklin-induzierten Apoptose vorzuschlagen. Zum Verständnis des in Abbildung 20 vorgestellten Modells ist es wichtig zu wissen, daß im Bereich der Promotor-Region von CD95L zwei NF- κ B-responsive Sequenzen liegen. Aus diesem Grund gehen kann man davon aus, daß die Aktivierung von RANK nicht nur direkt zur Apoptose führt, sondern daß die parallel stattfindende Aktivierung von NF- κ B möglicherweise die Transkription von CD95L induziert und dadurch den apoptoseinduzierenden Effekt verstärkt. Dieses Modell wird gegenwärtig weiter untersucht.



Die Entschlüsselung der Vorgänge, die während des Apoptose-Prozesses an der Zellmembran wie auch intrazellulär ablaufen, ist nicht nur für das Verständnis der Homöostase essentiell, sondern hat möglicherweise auch einschneidende Auswirkungen auf die therapeutischen Möglichkeiten der Chemotherapie von Malignomen und lymphoproliferativen Syndromen. Ein Eingreifen in die Signaltransduktion weiter „downstream“ könnte möglicherweise zur Reduktion von Nebenwirkungen beitragen und gleichzeitig die gewünschte Wirkung verbessern.

5 Zusammenfassung

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein physiologischer Prozeß, der unter anderem für die embryonale Entwicklung, das Gleichgewicht von Zellwachstum und Zelluntergang, die Immunregulation und die Tumorregression von zentraler Bedeutung ist. Bei der Induktion von Apoptose spielen diverse Mitglieder der TNF α -Familie eine zentrale Rolle. Fünf der bisher bekannten Rezeptoren (TNF-R, TRAIL-R1, TRAIL R2, TRAMP und CD95/Apo-1) sind durch eine intrazelluläre „Todes-Domäne“ charakterisiert, welche für die Weiterleitung des Apoptose-Signals notwendig ist. Zwei weitere Rezeptoren (TRAIL-R3 und TRAIL-R4) weisen keine bzw. verkürzte „Todes-Domänen“ auf, so daß ihnen eine protektive Funktion zugeschrieben wird. RANK, der membrangebundene Rezeptor für RANKL, besitzt keine Todesdomäne und aktiviert NF- κ B.

Anthrazyklin-Derivate wie Doxorubicin sind häufig eingesetzte Medikamente in der Chemotherapie von Leukämien und soliden Tumoren. In vivo erreichte Konzentrationen von Anthrazyklinen und anderen Zytostatika wirken hauptsächlich über die Induktion von Apoptose. Der exakte molekulare Mechanismus und die Mediatoren dieses Prozesses sind Gegenstand aktueller Forschung und wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß RANKL eine Schlüsselrolle bei der Doxorubicin-induzierten Apoptose spielt. Das TNF-homologe RANKL wird hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten, Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten exprimiert. RANKL-defiziente Mäuse zeigen Symptome von Osteopetrose und besitzen keine Lymphknoten. RANKL stimuliert dendritische Zellen und Osteoklasten und kann unter bestimmten Bedingungen Apoptose induzieren. Auf RNA-Ebene konnten in der T-Zell-Lymphom-Linie CEM wie auch in PBMC sowohl TRAIL als auch TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRID, TRAMP, CD95, CD95-L und TRANCE nachgewiesen werden. Während sich weder bei den Rezeptoren noch bei TRAIL unter Inkubation mit Doxorubicin eine Veränderung der Expression zeigte, unterlagen CD95L und RANKL einer Hochregulation mit einem Maximum nach vier bis sechs Stunden. Interessanterweise ließ sich der Regulationseffekt bei PBMC nur für RANKL nachweisen, CD95L blieb dagegen konstant. Der um die intrazelluläre Domäne verkürzte Rezeptor TRID ließ sich, entgegen anderen

Veröffentlichungen, auch auf malignen Zellen nachweisen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde in PBMC und in CEM mit 1 μ M Doxorubicin Apoptose induziert. Darüber hinaus waren auch rekombinantes RANKL und TRAIL sowie α CD95 mAb und Staurosporin in der Lage Apoptose zu bewirken. Unter verschiedenen neutralisierenden Antikörpern verminderten interessanterweise bei diesen Bedingungen nur α CD95L, α -RANKL und RANK-Fc die Doxorubicin-induzierte Apoptose um durchschnittlich 50%.

Mutationen in einigen der hier genannten Moleküle wurden als pathoäthiologischer Mechanismus für verschiedene lymphoproliferative Syndrome identifiziert. Deshalb wurden PBMC eines siebenjährigen Patienten, der an einem trotz umfangreicher Diagnostik unklaren lymphoproliferativen Syndrom erkrankt war, auf die oben genannten Moleküle hin untersucht. Seit dem zweiten Lebensjahr litt der Patient an einer langsam progredienten Schwellung aller Lymphknoten sowie der Milz. Darüber hinaus bestand ein IgA- und IgG2-Subklassen-Mangel, chronische CMV- und EBV-Infektionen sowie eine Wachstumsretardierung. Der Patient verstarb im Alter von 8 Jahren an einer nicht beherrschbaren Ateminsuffizienz. Die mRNA-Expression in PBMC des Patienten war für CD95L, TRAIL, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRID und TRAMP unauffällig, wohingegen RANKL mit RT-PCR nicht detektierbar war. Im Gegensatz dazu war RANKL in monozytären Zellen eines Lymphknotens eindeutig nachweisbar. Die Einschätzung der funktionellen Bedeutung der anormalen Expression von RANKL in den PBMC des Patienten ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich und bedarf einer eingehenderen Untersuchung der intrazellulären Transduktions-Mechanismen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] C. B. Thompson. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1457-1462 (1995).
- [2] J. F. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
- [3] M. C. Raff. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397-400 (1992).
- [4] M. D. Jacobsen, J. F. Burne and M. C. Raff. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* **13**, 1899-1910 (1994).
- [5] M. D. Jacobsen, M. Weil and M. C. Raff. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997).
- [6] D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer. Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254 (1999).
- [7] M. Hahne, D. Rimoldi, M. Schroter, P. Romero, M. Schreier, L. E. French, P. Schneider, T. Bornand, A. Fontana, D. Lienard, J. Cerottini and J. Tschopp. Melanoma cell expression of Fas ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**, 1363-1366 (1996).
- [8] S. Strand, W. J. Hofmann, H. Hug, M. Müller, G. Otto, D. Strand, S. M. Mariani, W. Stremmel, P. H. Krammer and P.R. Galle. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 ligand expressing tumor cells. A mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* **2**, 1361-1366 (1996).
- [9] J. O'Connell, G. C. O'Sullivan, J. K. Collins and F. Shanahan. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* **184**, 1075-1082 (1996).
- [10] K. Schulze-Osthoff, D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459 (1998).
- [11] P. D. Katsikis, M. E. Garcia-Ojeda, J. F. Torres-Roca, I. M. Tijoe, C. A. Smith and L. A. Herzenberg. Interleukin-1 β converting enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection. *J. Exp. Med.* **186**, 1365-1372 (1997).

- [12] F. Silvestris, C. Cafforio, M. A. Frassanito, M. Tucci, A. Romito, S. Nagata and F. Dammacco. Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. *AIDS* **10**, 131-141 (1996).
- [13] E. M. Sloand, N. S. Young, P. Kumar, F. F. Weichold, T. Sato and J. P. Maciejewski. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T cell depletion in AIDS: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* **89**, 1357-1363 (1997).
- [14] K. M. Debatin, A. Fahrig-Faissner, S. Enenkel-Stoodt, W. Kreuz, A. Benner and P. H. Krammer. High expression of APO-1 (CD95) on T-lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* **83**, 3101-3103 (1994).
- [15] C. J. Li, D. J. Friedmann, C. Wang, V. Metelev and A. B. Pardee. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* **268**, 429-431 (1995).
- [16] I. Jeremias, I. Herr, T. Böhler and K. M. Debatin. TRAIL/AP32 ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 143-152 (1998).
- [17] B. P. Tsao, R. M. Cantor, J. M. Grossmann, N. Shen, N. T. Teophilov, D. J. Wallace, F. C. Arnett, K. Hartung, R. Goldstein, K. C. Kalunian, B. H. Hahn and J. I. Rotter. PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **103**, 1135-1149 (1999).
- [18] R. Mehrjan, F. P. Quismorio, G. Strassmann, M. M. Stimmler, D. A. Horwitz, R. C. Kitridou, W. J. Gaudermann, J. Morrison, C. Brautbar and C. O. Jacob. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **41**, 596-602 (1998).
- [19] H. Asahara, T. Hasumuna, T. Kobata, H. Yagita, K. Okumura, H. Inoue, S. Gay, T. Sumida and K. Nishioka. Expression of Fas antigen and Fas ligand in the rheumatoid synovial tissue. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**, 27-34 (1996).
- [20] T. Sumida, T. T. Hoa, H. Asahara, T. Hasumuna and K. Nishioka. T cell receptor of Fas-sensitive T cells in rheumatoid synovium. *J. Immunol.* **158**, 1965-1970 (1997).
- [21] M. R. Ito, S. Terasaki, J. Itoh, H. Katoh, S. Yonehara and M. Nose. Rheumatic diseases in an MRL strain of mice with a deficit in the functional Fas ligand. *Arthritis Rheum.* **40**, 1054-1063 (1997).

- [22] H. Sano, K. Asano, S. Minatoguchi, J. Hiraoka, K. Fujisawa, K. Nishigaki, N. Yasuda, H. Kumada, M. Takemura, H. Ohashi, M. Seishima, T. Fujiwara, and H. Fujiwara. Plasma soluble Fas and soluble Fas ligand in chronic glomerulonephritis. *Nephron* **80**, 153-161 (1998).
- [23] A. V. Chervonsky, Y. Wang, F. S. Wong, I. Visintin, R. A. Flavell, C. A. Janeway and L. A. Matis. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* **89**, 17-24 (1997).
- [24] C. A. White, P. A. McCombe and M. P. Pender. The roles of Fas, Fas ligand and Bcl-2 in T cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **82**, 47-55 (1998).
- [25] K. A. Sabelko, K. A. Kelly, M. H. Nahm, A. H. Cross and J. H. Russel. Fas and Fas ligand enhance the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis but are not essential for the immune privilege in the central nervous system. *J. Immunol.* **159**, 3096-3099 (1997).
- [26] H. Waldner, R. A. Sobel, E. Howard and V. K. Kuchroo. Fas and FasL deficient mice are resistant to induction of autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **159**, 3100-3103 (1997).
- [27] J. Drappa, A. K. Vaishnaw, K. E. Sullivan, J. L. Chu and K. B. Elkon. Fas gene mutations in the Canale-Smith Syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *New Eng. J. Med.* **335**, 1643-1649 (1996).
- [28] G. H. Fischer, F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo and J. M. Puck. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946 (1995).
- [29] P. Vassalli. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 411-452 (1992).
- [30] M. Iwamoto, T. Koji, M. Makiyama, N. Kobayashi and P. K. Nakane. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J. Pathol.* **180**, 152-159 (1996).
- [31] C. Giordano, G. Stassi, R. De Maria, M. Todaro, P. Richiusa, G. Papoff, G. Ruberti, M. Bagnasco, R. Testi and A. Galluzzo. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* **275**, 960-963 (1997).
- [32] O. Isacson. On neuronal health. *Trends Neurosci.* **16**, 306-308 (1993).

- [33] N. Roy, R. S. Mahadevan, M. McLean, G. Shutler, Z. Yaraghi R. Farahani, S. Baird, A. Besner-Johnston, C. Lefebvre and X. Kang. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy *Cell* **80**, 167-178 (1995).
- [34] N. Heintz. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem. Sci.* **18**, 157-159 (1993).
- [35] D. W. Choi. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261-1276 (1992).
- [36] I. Ziv, E. Melamed, N. Nardi, D. Luria, A. Achiron, D. Offen and A. Barzilai. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons - a possible novel pathogenic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **170**, 136-140 (1994).
- [37] B. Verhoven, R. A. Schlegel and P. Williamson. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 1597-1601 (1995).
- [38] V. A. Fadok, D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson. Exposure of Phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216 (1992).
- [39] L. Sachs and J. Lotem. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* **82**, 15-21 (1993).
- [40] T. M. Buttke and P. A. Sandström. Oxidative stress as a mediator of apoptosis *Immunol. Today* **15**, 7-10 (1994).
- [41] J. C. Reed. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **124**, 1-6 (1994).
- [42] D. L. Vaux, I. L. Weissman and S. K. Kim. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2. *Science* **258**, 1955-1957 (1992).
- [43] J. L. Bodmer, K. Burns, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, M. Thome, T. Bornand, M. Hahne, M. Schröter, K. Becker, A. Wilson, L. E. French, J. L. Browning, H. R. MacDonald and J. Tschopp. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas. *Immunity* **6**, 79-88 (1997).

- [44] D. M. Anderson, E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-179 (1997).
- [45] A. Öhm, I. Behrmann, W. Falk, M. Pawlita, G. Maier, C. Klas, M. Li-Weber, S. Richards, J. Dhein, B. C. Trauth, I. K. Pansting and P. H. Krammer. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 10709-10715 (1992).
- [46] N. Itoh, S. I. A. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S. Nagata. The poypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243 (1991).
- [47] M. Tanaka, T. Itai, M. Adachi and S. Nagata. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* **4**, 31-36 (1998).
- [48] P. Schneider, N. Holler, J. L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana and J. Tschopp. Conversion of membrane-bound Fas ligand into its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* **187**, 1205-1213 (1998).
- [49] J. Dhein, P. T. Daniel, B. C. Trauth, A. Öhm, P. Möller and P. H. Krammer. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* **149**, 3166-3173 (1992).
- [50] N. Itoh and S. Nagata. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**, 10932-10933 (1993).
- [51] S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C.-P. Huang, J. N. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith and R. G. Goodwin. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**, 673-682 (1995).
- [52] R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore and A. Ashkenazi. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the TNF cytokine family. *J. Biol. Chem.* **271**, 12687-12690 (1996).
- [53] T. Gura. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* **277**, 768 (1997).
- [54] G. Pan, J. Ni, Y.-F. Wei, G.-I. Yu, R. Gentz and V. M. Dixit. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**, 815-818 (1997).

- [55] M. A. Degli-Eposti, W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith and R. G. Goodwin. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7**, 813-820 (1997).
- [56] Y. Chicheportiche, P. R. Bourdon, H. Xu, Y. M. Hsu, H. Scott, C. Hession, I. Garcia and J. L. Browning. TWEAK, a novel secreted ligand in the TNF family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 32401-32410 (1997).
- [57] S. A. Marsters, J. P. Sheridan, R. M. Pitti, J. Brush, A. Goddard and A. Ashkenazi. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr. Biol.* **8**, 525-528 (1998).
- [58] P. Schneider, R. Schwenzler, E. Haas, F. Mühlenbeck, G. Schubert, P. Scheurich, J. Tschopp and H. Wajant. TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1785-1792 (1999).
- [59] H. Walczak, R.E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. L. Schuh and D. H. Lynch. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **5**, 157-163 (1999).
- [60] A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari and V. M. Dixit. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
- [61] H. Hsu, J. Xiong and D. V. Goeddel. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* **81**, 495-504 (1995).
- [62] M. P. Boldin, E. E. Varfolommeev, Z. Pancer, I. L. Mett, J. H. Camonis and D. Wallach. A novel protein that interacts with the death domain of Fas contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 7795-7798 (1995).
- [63] M. Muzio, A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Kramer, M. E. Peter and V. M. Dixit. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827 (1996).
- [64] F. C. Kischkel, S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Kramer and M. E. Peter. Cytotoxicity-dependent APO-1-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579-5588 (1995).

- [65] H. Wajant, F. J. Johannes, E. Haas, K. Siemienski, R. Schwenzer, G. Schubert, T. Weiss, M. Grell and P. Scheurich. Dominant-negative FADD inhibits TNFR60-, CD95- and TRAIL-mediated cell death but not gene induction. *Curr. Biol.* **8**, 113-116 (1998).
- [66] H. Duan and V. M. Dixit. RAIDD is a new death adaptor molecule. *Nature* **385**, 86-89 (1997).
- [67] A. Park and V. R. Baichwal. Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J. Biol. Chem.* **271**, 9858-9862 (1996).
- [68] A. T. Ting, F. X. Pimentel-Muinos and B. Seed. RIP mediates tumor necrosis factor 1 activation of NF- κ B but not CD95-initiated apoptosis. *EMBO J.* **15**, 6189-6196 (1996).
- [69] P. M. Chaudhary, M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray and L. Hood. Death receptor 5, a new member of the TNFR family and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B pathway. *Immunity* **7**, 821-830 (1997).
- [70] B. G. Dornay, V. Haridas, J. Ni, P. A. Moore and B. B. Aggarwal. Characterization of the intracellular domain of Receptor Activator of NF- κ B (RANK). *J. Biol. Chem.* **273**, 20551-20555 (1998).
- [71] P. Schneider, M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler and J. Tschopp. TRAIL receptors 1 and 2 signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* **7**, 831-836 (1997).
- [72] P. A. B auerle and D. Baltimore. NF-kappa B: Ten years after. *Cell* **87**, 13-20 (1996).
- [73] D. J. Van Antwerp, S. J. Martin, T. Kafri, D. R. Green and I. M. Verma. Suppression of TNF α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* **274**, 787-789 (1996).
- [74] M. Wu, H. Y. Lee, R. E. Bellas, S. L. Schauer, M. Arsura, D. Katz, M. J. Fitzgerald, T. L. Rothstein, D. H. Sherr and G. E. Sonenschein. Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* **15**, 4682-4690 (1996).
- [75] A. A. Beg and D. Baltimore. An essential role for NF- κ B in preventing TNF α -induced cell death. *Science* **274**, 782-784 (1996).
- [76] C. Y. Wang, M. W. Mayo and A. S. Baldwin. TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* **274**, 784-787 (1996).

- [77] S. M. Mariani, B. Matiba, E. A. Armandola and P. H. Krammer. Interleukin 1 β -converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J. Cell. Biol.* **137**, 221-229 (1997).
- [78] P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489 (1997).
- [79] K. Hofmann, P. Bucher and J. Tschopp. The CARD domain: a new apoptotic signal motif. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 155-156 (1997).
- [80] D. Ferrari, A. Stepczynska, M. Los, S. Wesselborg and K. Schulze-Osthoff. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **188**, 979-984 (1998).
- [81] K. Hofmann and P. Bucher. The CARD domain: A new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 155-156 (1997).
- [82] R. Bose, M. Verheij, A. Haimovitz-Friedman, K. Scotto, Z. Fuks and R. Kolesnick. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative pathway for generating death signals. *Cell* **82**, 405-414 (1995).
- [83] E. Gulbins, R. Bissonnette, A. Mahboubi, S. Martin, W. Nishioka, T. Brunner, G. Baier, G. Baier-Bitterlich, C. Byrd and F. Lang. Fas-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity* **2**, 341-351 (1995).
- [84] E. S. Alnemri, D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Y. Yuan. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171 (1996).
- [85] M. Muzio, G. S. Salvesen and V. M. Dixit. FLICE induced apoptosis in a cell-free system - Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.* **272**, 2952-2956 (1997).
- [86] K. Orth, K. O'Rourke, G. S. Salvesen and V. M. Dixit. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* **271**, 20977-20980 (1996).
- [87] M. Tewari, L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen and V. M. Dixit. Yama/CPP 32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a Crm A-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809 (1995).

- [88] M. Enari, H. Sakahira, H. Yokohama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
- [89] M. Mukae, M. Enari, H. Sakahira, Y. Fukuda, J. Inazawa, H. Toh and S. Nagata. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9123-9128 (1998).
- [90] X. Yang, R. Khosravi-Far, H. Y. Chang and D. Baltimore. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-1076 (1997).
- [91] A. R. Schievella, J. H. Chen, J. R. Graham and L. L. Lin. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 12069-12075 (1997).
- [92] H. Y. Chang, H. Nishitoh, X. Yang, H. Ichijo and D. Baltimore. Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* **281**, 1860-1863 (1998).
- [93] J. A. Herberg, S. Beck and J. Trowsdale. TAPASIN, DAXX, RGL2, HKE2 and four new genes (BING 1, 3 to 5) form a dense cluster at the centromeric end of the MHC. *J. Mol. Biol.* **277**, 839-857 (1998).
- [94] F. Mühlenbeck, E. Haas, R. Schwenzler, G. Schubert, M. Grell, C. Smith, P. Scheurich and H. Wajant. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 33091-33098 (1998).
- [95] I. Herr, D. Wilhelm, E. Meyer, I. Jeremias, P. Angel and K. M. Debatin. JNK/ SAPK activity contributes to TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 130-135 (1999).
- [96] M. Verheji, R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedmann, Z. Fuks and R. N. Kolesnick. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress induced apoptosis. *Nature* **380**, 75-79 (1996).
- [97] P. Pandey, S. Avraham, A. Place, V. Kumar, P. K. Majumder, K. Cheng, A. Nakazawa, S. Saxena and S. Kharbanda. Bcl-x_L blocks activation of Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase/Proline-rich Tyrosine Kinase 2 and Stress-activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Protein Kinase in the cellular response to methylmethane sulfonate. *J. Biol. Chem.* **274**, 8618-8623 (1999).

- [98] S. Huang, Y. Jiang, Z. Li, E. Nishida, P. Mathias, S. Lin, R. J. Ulevitch, G. R. Nemerow and J. Han. Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/CED-3 family proteases and Map Kinase Kinase 6b. *Immunity* **6**, 739-749 (1997).
- [99] J. C. Rathmell, S. E. Townsend, J. C. C. Xu, R. A. Flavell and C. C. Goodnow. Expansion or elimination of B cells in vivo: Dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* **87**, 319-329 (1996).
- [100] J. M. Lenczowski, L. Dominguez, A. M. Eder, L. B. King, C. M. Zacharchuk and J. D. Ashwell. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 170-181 (1997).
- [101] E. Goillot, J. Raingeaud, A. Ranger, R. I. Tepper, R. J. Davis, E. Harlow and E. Sanchez. Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3302-3307 (1997).
- [102] R. A. Salmon, I. N. Foltz, P. R. Young and J. W. Schrader. The p38 mitogen-activated protein kinase is activated by ligation of the T or B lymphocyte antigen receptors, Fas or CD40, but suppression of kinase activity does not inhibit apoptosis induced by antigen receptors. *J. Immunol.* **159**, 5309-5317 (1997).
- [103] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson. An endotoxin-induced factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3666-3670 (1975).
- [104] K. J. Tracey and A. Cerami. TNF, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**, 317-343 (1993).
- [105] B. Kovacs, D. Vassilopoulos, S. A. Vogelsang and G. C. Tsokos. Defective CD3-mediated cell death in activated T cell from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**, 293-302 (1996).
- [106] M. Pasparakis, L. Alexopoulou, V. Episkopou and G. Kollias. Immune and inflammatory responses in TNF α -deficient mice: a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* **184**, 1397-1411 (1996).
- [107] M. Pasparakis, L. Alexopoulou, M. Grell, K. Pfizenmaier, H. Blüthmann and G. Kollias. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for TNF and its 55-kDa receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6319-6323 (1997).

- [108] M. Hayward and C. Fiedler-Nagy. Mechanisms of bone loss: rheumatoid arthritis, periodontal disease and osteoporosis. *Agents Actions* **22**, 251-254 (1987).
- [109] T. S. Griffith, X. H. Yu, J. M. Herndon, D. R. Green and T. A. Ferguson. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* **5**, 7-16 (1996).
- [110] T. S. Griffith, T. Brunner, S. M. Fletcher, D. R. Green and T. A. Ferguson. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**, 1189-1192 (1995).
- [111] S. T. Ju, D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. El Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger, A. Marshak and A. Rothstein. Fas/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**, 444-448 (1995).
- [112] E. Rouvier, M. F. Luciani and P. Golstein. Fas involvement in Ca²⁺-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **177**, 195-200 (1993).
- [113] J. A. Trapani. Dual Mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. *Int. Rev. Cytol.* **182**, 111-192 (1998).
- [114] A. J. Darmon and R. C. Bleackley. Proteases and cell-mediated cytotoxicity. *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 255-273 (1998).
- [115] J. P. Medema, R. E. M. Toes, C. Scaffidi, T. S. Zheng, R. A. Flavell, C. J. M. Melief, M. E. Peter, R. Offringa and P. H. Krammer. Cleavage of FLICE (caspase 8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3492-3498 (1997).
- [116] J. Dhein, H. Walczak, C. Bäumler, K. M. Debatin and P. H. Krammer. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1 (Fas/CD95). *Nature* **373**, 438-441 (1995).
- [117] A. Strasser and L. O'Connor. Fas ligand-caught between Scylla and Charybdis. *Nat. Med.* **4**, 21-22 (1998).
- [118] P. H. Krammer, J. Dhein, H. Walczak, I. Behrmann, S. Mariani, B. Matiba, M. Fath, P. T. Daniel, E. Knipping, M. O. Westendorp, K. Stricker, C. Bäumler, S. Hellbardt, M. Germer and K. M. Debatin. The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol. Rev.* **142**, 175-191 (1994).
- [119] P. M. Stuart, T. S. Griffith, N. Usui, J. Pepose, X. Yu and T. A. Ferguson. CD95 ligand (FasL) -induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J. Clin. Invest.* **99**, 396-402 (1997).
- [120] R. Watanabe-Fukunaga, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-317 (1992).

- [121] T. Takahashi, M. Tanaka, C. I. Brannan, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, T. Suda and S. Nagata. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-976 (1994).
- [122] B. C. Yang, Y. S. Wang, L. C. Lin and M. F. Liu. Induction of apoptosis and cytokine gene expression in T-cell lines by sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **45**, 96-102 (1997).
- [123] P. R. Galle, W. J. Hofmann, H. Walczak, H. Schaller, G. Otto, W. Stremmel, P. H. Krammer and L. Runkel. Involvement of the CD95 receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.* **182**, 1223-1230 (1995).
- [124] M. Y. Braun, B. Lowin, L. French, H. Acha-Orbea and J. Tschopp. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **183**, 657-661 (1996).
- [125] T. S. Griffith, S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski and N.A. Fanger. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine TRAIL. *J. Exp. Med.* **189**, 1343-1353 (1999).
- [126] S. M. Mariani and P. H. Krammer. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1492-1498 (1998).
- [127] S. Frank, U. Kohler, G. Schackert and H. K. Schackert. Expression of TRAIL and its receptors in human brain tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 454-459 (1999).
- [128] V. Snell, K. Clodi, S. Zhao, R. Goodwin, E. K. Thomas, S. W. Morris, M. E. Kadin, F. Cabanillas, M. Andreff and A. Younes. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* **99**, 618-624 (1997).
- [129] S. A. Marsters, R. M. Pitti, C. J. Donahue, S. Ruppert, K. D. Bauer and A. Ashkenazi. Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr. Biol.* **6**, 750-752 (1996).
- [130] G. Pan, K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V. M. Dixit. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**, 111-113 (1997).

- [131] M. MacFarlane, M. Ahmad, S. M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G. M. Cohen and E. S. Alnemri. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **272**, 25417-25420 (1997).
- [132] P. Schneider, J. L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler and J. Tschopp. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett.* **416**, 329-334 (1997).
- [133] H. Walczak, M. A. Degli-Eposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith and C. T. Rauch. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16**, 5386-5397 (1997).
- [134] G. R. Screaton, J. Mongkolsapaya, X. N. Xu, A. E. Cowper, A. J. McMichael and J. I. Bell. TRICK 2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Biol.* **7**, 693-696 (1997).
- [135] M. Thome, P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter and J. Tschopp. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-521 (1997).
- [136] M. S. Sheikh, T. F. Burns, Y. Huang, G. S. Wu, S. Amundson, K. S. Brooks, A. J. Fornace and W. S. El-Deiry. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and TNF α . *Cancer Res.* **58**, 1593-1598 (1998).
- [137] M. A. Degli-Eposti, P. J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C. P. Huang, R. F. DuBose, R. G. Goodwin and C. A. Smith. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* **186**, 1165-1170 (1997).
- [138] J. P. Sheridan, S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Guerny, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. M. Godowski and A. Ashkenazi. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**, 818-821 (1997).
- [139] S. A. Marsters, J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr. Biol.* **7**, 1003-1006 (1997).
- [140] G. Pan, J. Ni, G. Yu, Y. F. Wei and V. M. Dixit. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. *FEBS Lett.* **424**, 41-45 (1998).

- [141] J. G. Emery, P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichmann, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee and P. R. Young. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **273**, 14363-14367 (1998).
- [142] A. Mizuno, A. Murakami, N. Nakagawa, H. Yasuda, E. Tsuda, T. Morinaga and K. Higashio. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor gene and its expression in embryogenesis. *Gene* **215**, 339-343 (1998).
- [143] M. J. Martinez-Lorenzo, M. A. Alva, S. Gamen, K. J. Kim, A. Chuntharapai, A. Pineiro, J. Naval and A. Anel. Involvement of Apo2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2714-2725 (1998).
- [144] J. Wang, L. Zheng, A. Lobito, F. Ka-Ming, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J. M. Puck, S. E. Straus and M. J. Lenardo. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome type II. *Cell* **98**, 47-58 (1999).
- [145] L. E. French and J. Tschopp. The TRAIL to selective tumor death. *Nat. Med.* **5**, 146-147 (1999).
- [146] A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, G. L. Yu, R. H. Lyons, M. Garg, D. R. Duan, L. Xian, R. Gentz, J. Ni and V. M. Dixit. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNF-R1 and CD95. *Science* **274**, 990-992 (1996).
- [147] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S.-I. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, N. Takahashi and T. Suda. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3597-3602 (1998).
- [148] D. L. Lacey, E. Timmes, H.-L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliot, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.-X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W. J. Boyle. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-178 (1998).
- [149] B. R. Wong, J. Rho, J. Arron, E. Robinson, J. Orlinick, M. Chao, S. Kalachikov, E. Cayani, F. S. Bartlett, W. N. Frankel, S. Y. Lee and Y. Choi. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T Cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25190-25194 (1997).

- [150] B. R. Wong, R. Josien, S. Y. Lee, M. Vologodskaja, R. M. Steinmann and Y. Choi. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 28355-28359 (1998).
- [151] L. Lum, B. R. Wong, R. Josien, J. D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlondorff, P. Tempst, Y. Choi and C. P. Blobel. Evidence for a role of tumor necrosis factor- α -converting enzyme-like proteases in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* **274**, 13613-13618 (1999).
- [152] W. S. Simonet, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M.-S. Chang, R. Lüthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennet, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.-L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
- [153] T. Morinaga, N. Nakagawa, H. Yasuda, E. Tsuda and K. Higashio. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur. J. Biochem.* **254**, 685-691 (1998).
- [154] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, S. I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga and K. Higashio. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139**, 1329-1337 (1998).
- [155] T. J. Yun, P. M. Chaudhary, G. L. Shu, J. K. Frazer, M. K. Ewings, S. M. Schwartz, V. Pascual, L. E. Hood and E. A. Clark. OPG/FDCR-1, a TNF-Receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J. Immunol.* **161**, 6113-6121 (1998).
- [156] R. Josien, B. R. Wong, H. L. Li, R. M. Steinman and Y. W. Choi. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.* **162**, 2562-2568 (1999).
- [157] L. Galibert, M. E. Tometsko, D. M. Anderson, D. Cosman and W. C. Dougall. The involvement of multiple TNF-Receptor-associated factors in the signaling mechanisms of Receptor Activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 34120-34127 (1998).
- [158] B. R. Wong, R. Josien, S. Y. Lee, B. Sauter, H.-L. Li, R. M. Steinmann and Y. Choi. TRANCE, a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* **186**, 2075-2080 (1997).

- [159] K. Fuller, B. Wong, S. Fox, Y. Choi and T. J. Chambers. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J. Exp. Med.* **188**, 997-1001 (1998).
- [160] Y. Y. Kong, H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timmes, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliviera-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle and J. M. Penninger. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323 (1999).
- [161] L. C. Hofbauer, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs and S. Khosla. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 776-781 (1998).
- [162] A. Mizuno, N. Amizuka, K. Irie, A. Murakami, N. Fujise, T. Kanno, Y. Sato, N. Nakagawa, H. Yasuda, S.-I. Mochizuki, T. Gomibuchi, K. Yano, N. Shima, N. Washida, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio and H. Ozawa. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 610-615 (1998).
- [163] N. Bucay, I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle and W. S. Simonet. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Devel.* **12**, 1260-1268 (1998).
- [164] N. J. Horwood, J. Elliott, T. J. Martin and M. T. Gillespie. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* **139**, 4743-4746 (1998).
- [165] M. Yamamoto, T. Murakami, M. Nishikawa, E. Tsuda, S. Mochizuki, K. Higashio, T. Akatsu, K. Motoyoshi and N. Nagata. Hypocalcemic effect of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* **139**, 4012-4015 (1998).
- [166] R. Kitazawa, S. Kitazawa and S. Maeda. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim. Biophys. Acta.* **1445**, 134-141 (1999).
- [167] S. K. Lee and J. A. Lorenzo. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger RNA expression in murine bone marrow cultures: Correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* **140**, 3552-3561 (1999).

- [168] T. Akatsu, T. Murakami, M. Nishikawa, K. Ono, N. Shinomiya, E. Tsuda, S.-I. Mochizuki, K. Yamaguchi, K. Motoyoshi and N. Nagata. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 229-234 (1998).
- [169] K. Yamaguchi, M. Kinoshita, M. Goto, F. Kobayashi, E. Tsuda, T. Morinaga, and K. Higashio. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 5117-5123 (1998).
- [170] C. Friesen, I. Herr, P. H. Krammer and K. M. Debatin. Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* **2**, 574-577 (1996).
- [171] S. Fulda, H. Sieverts, C. Friesen, I. Herr and K. M. Debatin. The CD95 (Apo-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **57**, 3823-3829 (1997).
- [172] S. Fulda, M. Los, C. Friesen and K. M. Debatin. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int. J. Cancer* **76**, 105-114 (1998).
- [173] S. Fulda, C. Scaffidi, T. Pietsch, P. H. Krammer, M. E. Peter and K. M. Debatin. Activation of the CD95 (Apo-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* **5**, 884-893 (1998).
- [174] I. Herr, D. Wilhelm, T. Böhler, P. Angel and K. M. Debatin. JNK/SAPK activity is not sufficient for anticancer therapy-induced apoptosis involving CD95L, TRAIL and TNF α . *Int. J. Cancer* **80**, 417-424 (1999).
- [175] M. Müller, S. Strand, H. Hug, E. M. Heinemann, H. Walczak, W. J. Hofmann, W. Stremmel, P. H. Krammer and P. R. Galle. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* **99**, 403-413 (1997).
- [176] S. Gamen, A. Anel, P. Laserra, M. A. Alva, M. J. Martinez-Lorenzo, A. Pineiro and J. Naval. Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett.* **417**, 360-364 (1997).
- [177] A. J. McGahon, A. P. Costa Pereira, L. Daly and T. G. Cotter. Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukemia cells is independent of the Fas (Apo-1/CD95) receptor/ligand system. *Br. J. Haematol.* **101**, 539-547 (1998).

- [178] M. Müller, C. A. Scaffidi, P. R. Galle, W. Stremmel and P. H. Kramer. The role of p53 and the CD95 (Apo-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis. *Eur. Cytokine Network* **9**, 685-686 (1998).
- [179] S. Jian, M. J. Song, E. C. Shin, M. O. Lee, S. J. Kim and J. H. Park. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Hepatol.* **29**, 101-110 (1999).
- [180] O. Micheau, E. Solary, A. Hammann, M. T. Dimanche-Boitrel. Fas ligand- independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* **274**, 7987-7992 (1999).
- [181] A. Villunger, A. Egle, M. Kos, B. L. Hartmann, S. Geley, R. Kofler and R. Greil. Drug-induced apoptosis is associated with enhanced FasL (Apo-1L/Fas ligand) expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res.* **57**, 3331-3334 (1997).
- [182] M. Los, I. Herr, C. Friesen, S. Fulda, K. Schulze-Osthoff and K. M. Debatin. Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* **90**, 3118-3129 (1997).
- [183] S. Wesselborg, I. H. Engels, E. Rossmann, M. Los and K. Schulze-Osthoff. Anti-cancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* **93**, 3053-3063 (1999).
- [184] H. Seimiya, T. Mashima, M. Toho and T. Tsuruo. c-Jun NH₂-terminal Kinase mediated activation of interleukin-1 β converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 4631-4636 (1997).
- [185] P. Juo, C. J. Kuo, J. Yuan and J. Blenis. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* **8**, 1001-1008 (1998).
- [186] C. M. Eischen, T. J. Kottke, L. M. Martins, G. S. Basi, J. S. Tung, W. C. Earnshaw, P. J. Leibson and S. H. Kaufmann. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: Chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* **90**, 935-943 (1997).
- [187] T. H. Landowski, K. H. Shain, M. M. Oshiro, I. Buyuksal, J. S. Painter and W. S. Dalton. Myeloma cells selected for resistance to CD95-mediated apoptosis are not cross-resistant to cytotoxic drug: Evidence for independent mechanisms of caspase activation. *Blood* **94**, 265-274 (1999).

- [188] M. J. Martinez-Lorenzo, S. Gamen, J. Etxeberria, P. Lasierra, L. Larrad, A. Pineiro, A. Anel, J. Naval and M. A. Alava. Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of Fas and CPP 32 (caspase 3) expression in human leukemia cells. *Int. J. Cancer* **75**, 473-481 (1998).
- [189] M. Tolomeo, L. Dusonchet, M. Meli, S. Grimaudo, N. D'Alessandro, G. Papoff and G. Ruberti. The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anti-cancer drug-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* **5**, 735-742 (1998).
- [190] S. Fulda, G. Strauss, E. Meyer and K. M. Debatin. Functional CD95 Ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* **95**, 301-308 (2000).
- [191] J. Fellenberg, H. Mau, S. Nedel, V. Ewebeck and K. M. Debatin. Drug-induced apoptosis in osteosarcoma cell lines is mediated by caspase activation independent of CD95-receptor/ligand interaction. *J. Ortho. Res.* **18**, 10-17 (2000).
- [192] C. Scaffidi, I. Schmitz, J. P. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer and M. E. Peter. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 22532-22538 (1999).
- [193] A. S. Varadhachary, M. E. Peter, S. N. Pedrow, P. H. Krammer and P. Salgame. Selective up-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in Th2 cells inhibits caspase-8 cleavage at the death-inducing complex: a mechanism for Th2 resistance from Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **163**, 4772-4779 (1999).
- [194] M. M. Keane, S. A. Ettenberg, M. M. Nau, E. K. Russell and S. Lipkowitz. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.* **59**, 734-741 (1999).
- [195] S. Seeber und J. Schütte (Hrsg.). Therapiekonzepte Onkologie. 2. Auflage (1996). Springer Verlag.
- [196] D. S. Richardson and S. A. Johnson. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Blood Rev.* **11**, 201-223 (1997).
- [197] K. Nysom, S. D. Colan and S. E. Lipshultz. Late cardiotoxicity following anthracycline therapy for childhood cancer. *Prog. Ped. Cardiol.* **8**, 121-138 (1998).
- [198] N. G. Fisher and A. J. Marshall. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Postgrad. Med. J.* **75**, 265-268 (1999).
- [199] R. J. Boucek, D. A. Dodd, J. B. Atkinson, N. Oquist and R. D. Olson. Contractile failure in chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 2631-2640 (1997).

- [200] Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Rad. Biol. Med.* **23**, 775-782 (1997).
- [201] D. Brugnoni, P. Airo, A. Malagoli, R. Cattaneo, M. Pennacchio and F. Porta. Rapid regeneration of normally functional naive CD4+ T cells after bone marrow transplantation from unrelated donors for combined immunodeficiency. *Blood* **92**, 3484-3485 (1998).
- [202] V. C. Canale and C. H. Smith. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J. Pediatr.* **70**, 891-899 (1967).
- [203] F. Rieux-Laucat, F. Le-Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer and J. P. de Villartay. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347-1349 (1995).
- [204] D. A. Martin, B. Combadiere, F. Hornung, D. Jiang, H. McFarland, R. Siegel, C. Trageser, J. Wang, L. Zheng and M. J. Lenardo. Molecular genetic studies in lymphocyte apoptosis and human autoimmunity. *Novartis Found. Symp.* **215**, 73-82 (1998).
- [205] M. C. Sneller, J. Wang, J. K. Dale, W. Strober, L. A. Middleton, Y. Choi, T. A. Fleisher, M. S. Lim, E. S. Jaffe, J. M. Puck, M. J. Lenardo and S. E. Straus. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* **4**, 1341-1348 (1997).
- [206] M. S. Lim, S. E. Straus, J. K. Dale, T. A. Fleisher, M. Stetler-Stevenson, W. Strober, M. C. Sneller, J. M. Puck, M. J. Lenardo, K. S. J. Elenitoba-Johnson, A. Y. Lin, M. Raffeld and E. S. Jaffe. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Pathol.* **153**, 1541-1550 (1998).
- [207] S. E. Straus, M. Lenardo and J. M. Puck. The Canale-Smith Syndrome. *New Engl. J. Med.* **336**, 1457 (1997).
- [208] J. G. Wu, J. Wilson, J. He, L. B. Xiang, P. H. Schur and J. D. Mountz. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest.* **98**, 1107-1113 (1996).
- [209] A. J. Infante, H. A. Britton, T. DeNapoli, L. A. Middleton, M. J. Lenardo, C. E. Jackson, J. Wang, T. Fleisher, S. E. Straus and J. M. Puck. The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis. *J. Ped.* **133**, 629-633 (1998).
- [210] B. J. Sleight, V. S. Prasad, C. DeLaat, E. Ballard, A. J. Arceci and C. L. Sidman. Correction of autoimmune lymphoproliferative syndrome by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **22**, 375-380 (1998).

- [211] U. Dianzani, M. Bragardo, D. DiFranco, C. Alliaudi, P. Scagni, D. Buonfiglio, V. Redoglia, S. Bonisconi, A. Corraera, I. Dianzani and U. Ramenghi. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity / lymphoproliferation. *Blood* **89**, 2871-2879 (1997).
- [212] K. C. Gilmour, T. Cranston, A. Jones, E. G. Davies, D. Goldblatt, A. Thrasher, C. Kinnon, K. E. Nichols and H. B. Gaspar. Diagnosis of X-linked lymphoproliferative disease by analysis of SLAM-associated protein expression. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1691-1697 (2000).
- [213] I. Müller, A. Jenner, G. Bruchelt, D. Niethammer and B. Halliwell. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin - apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 254-257 (1997).

7 Anhang

7.1 *Verzeichnis der Abkürzungen und Synonyme*

Abb.	Abbildung
AICD	Activation Induced Cell Death
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALPS	Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen Presenting Cell
ASK 1	Apoptosis Signaling-Regulating Kinase 1
bp	Basenpaare
CAD	Caspase-Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	Interleukin 1 β -Converting Enzyme Like Proteases
CD	Cluster of Differentiation
CD95	Synonym: Fas, Apo-1
CD95L	CD95-Ligand, Synonym: FasL, Apo-1L
cDNA	complementary DNA
CrmA	Cytokine response modifier A
Daxx	Fas Death Domain associated protein
DcR	Decoy Receptor
DD	Death Domain (Todesdomäne)
ddH ₂ O	Deionisiertes, destilliertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DED	Death Effector Domain (Todeseffektordomäne)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	Death Receptor (Todesrezeptor)
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein-Barr Virus
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FADD	Fas-Associated Death Domain Protein

FDCR-1	Follicular Dendritic Cell Receptor 1, Synonym: OPG, OCIF
FLICE	Synonym: Caspase 8
FLICE 2	Synonym: Caspase 10
FLIP	Flice-Inhibitory Protein
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein
GVHD	Graft-Versus-Host Disease
GVT	Graft-Versus-Tumor
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICE	Interleukin-converting enzyme
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase, Synonym: SAPK
K	Kontrolle
kb	Kilobasen (entspricht 1000 Basen)
LM	Lösungsmittel
LT	Lymphotoxin
mAb	monoklonaler Antikörper
MADD	Mitogen-Activated Kinase Activating DD Protein
mCD95L	membrangebundenes CD95L
NF	Nuclear Factor
NGF-R	Nerve Growth Factor Receptor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OCIF	Osteoclastogenesis Inhibitory Factor, Synonym: OPG, FDCR-1
ODF	Osteoclast Differentiation Factor, Synonym: RANKL, TRANCE, OPGL
OPG	Osteoprotegerin, Synonym: OCIF, FDCR-1
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand, Synonym: RANKL, TRANCE, ODF
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAIDD	RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous Protein with a Death Domain
RANK	Receptor Activator of NF- κ B, Synonym: TRANCE-R

RIP	Receptor-Interacting Protein
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
SAP	SLAM-associated protein
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase, Synonym: JNK
sCD95L	soluble CD95L
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SLAM	Signaling lymphocyte-activating protein
Tab.	Tabelle
TACE	TNF α -Convertase
TCR	T-Zell Rezeptor
TE	Tris-Ethanol
TGF β	Transdermal Growth Factor β
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tumornekrosefaktor)
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor-Receptor 1
TNF-R2	Tumor Necrosis Factor-Receptor 2
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain Protein
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRAMP	Synonym: DR3, Apo-3, LARD
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand, Synonym: Apo-2L
TRAIL-R1	TRAIL-Rezeptor 1, Synonym: DR4
TRAIL-R2	TRAIL-Rezeptor 2, Synonym: DR5, TRICK2, KILLER
TRAIL-R3	TRAIL-Rezeptor 3, Synonym: DcR1, TRID
TRAIL-R4	TRAIL-Rezeptor 4, Synonym: DcR2, TRUNDD
TRANCE	TNF Related Activation-Induced Cytokine, Synonym: RANKL, ODF, OPGL
TRICK	TRAIL Receptor Inducer of Cell Killing
TRID	TRAIL receptor without an intracellular domain, Synonym: TRAIL-R3
TWEAK	TNF-Related Weakly Apoptosis-Inducing Ligand
XLP	X-linked lymphoproliferative disease

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Hämatologischen Forschungslabor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen (Ärztl. Direktor: Prof. Dr. med. D. Niethammer) in der Arbeitsgruppe Bruchelt erstellt. Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. med. Ingo Müller für die Einführung in theoretische und praktische Grundlagen und die hervorragende Betreuung der praktischen Arbeit im Labor. Allen Mitarbeitern des ehemaligen Hämatologischen Forschungslabors 1 der Universitätskinderklinik Tübingen danke ich für deren freundliche Kooperativität. PD Dr. med. Rupert Handgretinger war in der Kommunikation zu anderen Bereichen der Klinik und Kollegen der Pathologie sehr hilfsbereit. Bei Martina und Gerhard Nagel möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen bedanken.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich selbstverständlich auch bei Prof. Dr. rer. nat. Gernot Bruchelt für die Annahme als Doktoranden, die aufmerksame Verfolgung der Arbeit im Labor und die Begutachtung der Dissertation.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden derzeit veröffentlicht.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Pfister
Geburtsdatum: 07.06. 1974 in Tübingen

Schulausbildung

8/1980-6/1984 Grundschule Pfrondorf
8/1984-6/1993 Kepler-Gymnasium Tübingen

Zivildienst

8/1993-7/1994 Abteilung für Kinder-und Jugendpsychiatrie der Universitätsklinik Tübingen, anschließend feste Anstellung als Pflegehelfer bis 1999

Hochschulausbildung

10/1994-7/1996 Vorklinisches Studium an der Universität Hamburg
8/1996 Ärztliche Vorprüfung
10/1996 Studienortswechsel, Immatrikulation an der Universität Tübingen
8/1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
3/1998 – 12/2000 Abfassung der vorliegenden Arbeit
2/99 – 4/99 Studienaufenthalt an der University of New South Wales, Sydney, Australien
7/1999 – 8/2000 Forschungsaufenthalt am Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA
3/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/2001 – 4/2002 Praktisches Jahr in Basel, Schweiz, (Chirurgie) und Reutlingen (Innere Medizin und Pädiatrie)
23.4. 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung