

c-FLIP-Proteine – von der Struktur zur Funktion in Immunantwort und Tumorgenese

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von
Nana Ueffing
aus Düsseldorf

Oktober 2008

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Heinrich-Heine-Universität

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Ingo Schmitz
Institut für Molekulare Medizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Koreferent: Prof. Dr. W. Martin
Abt. Ökologische Pflanzenphysiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2009

Für meine Eltern und Matthias

1. Einleitung	1
1.1. Apoptotische und nicht-apoptotische Zelltodmechanismen.....	1
1.2. Apoptose und Apoptosemediatoren.....	4
1.2.1. Caspasen	4
1.2.2. Bcl-2-Proteine	7
1.2.3. Die intrinsische Apoptose.....	9
1.2.4. Todesrezeptoren	11
1.2.5. Die extrinsische Apoptose.....	12
1.2.6. CD95-vermittelte Apoptose und ihre Bedeutung im Immunsystem	14
1.3. Apoptose-Regulation durch <i>FLICE-inhibitory Proteins (FLIP)</i>	16
1.3.1 Strukturelle Aufbau der viralen und zellulären FLIP-Proteine.....	16
1.3.2. Apoptose-Inhibition durch FLIP-Proteine.....	18
1.3.3. Funktion von FLIP in der Zellaktivierung und -proliferation	20
1.3.4. Apoptose-Regulation durch FLIP während der T-Zell-Immunantwort.....	22
1.3.5. Funktion von FLIP in der B-Zell-Immunantwort	24
1.4. Pathogenese Follikulärer Lymphome.....	28
2. Zielsetzung	30
3. Ergebnisse und Diskussion.....	32
3.1. Mutationsanalysen von c-FLIP _R , der einzigen murinen kurzen FLIP-Isoform, offenbaren Voraussetzungen für die DISC-Rekrutierung.....	32
3.2. Die Hochregulation von c-FLIP _{short} durch NFAT unterstützt die Apoptose- Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen	42
3.3. Ein SNP im zellulären <i>FLICE-inhibitory protein (c-FLIP)</i> Gen entscheidet über die Produktion der Protein-Isoform und korreliert mit einem Risiko für Follikuläre Lymphome im Menschen	51
4. Zusammenfassung	61
5. Summary	63
6. Literaturverzeichnis	65
7. Abkürzungen	82
8. Publikationen.....	87
9. Anhang	88

1. Einleitung

1.1. Apoptotische und nicht-apoptotische Zelltodmechanismen

Die Deletion überflüssiger Zellen während der embryonalen Morphogenese und der zellulären Homöostase sowie die Beseitigung potentiell schädigender und verletzter Zellen sind essentielle Prozesse, die über ein kontrolliertes Absterben von Zellen reguliert werden. Im Laufe der Evolution haben multizelluläre Organismen verschiedene Zelltodmechanismen entwickelt, die je nach Stimulus und Zelltyp induziert werden können und so eine Feinabstimmung der Zellantwort auf externe Umwelteinflüsse erlauben (Degterev and Yuan, 2008).

Einer der wichtigsten Zelltodmechanismen in eukaryotischen Zellen ist die Apoptose. Apoptose-induzierende Faktoren sind beispielsweise ionisierende Bestrahlung, der Entzug von Wachstumsfaktoren, die Behandlung mit Chemotherapeutika, Hypoxie oder die Stimulation sogenannter Todesrezeptoren. Im Gegensatz zur Nekrose, einer weiteren Form des Zelltodes, wird bei der Apoptose die Integrität der Plasmamembran der absterbenden Zelle gewahrt und so eine Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und damit eine Überaktivierung des Immunsystems verhindert (Taylor et al., 2008). Der Begriff „Apoptose“ wurde erstmals 1972 durch Kerr, Wyllie und Currie geprägt und beschreibt eine Reihe charakteristischer morphologischer und biochemischer Veränderungen, die durch die Initiierung apoptotischer Signalwege in der Zelle ausgelöst werden (Kerr et al., 1972). Apoptotische Zellen runden sich ab und schrumpfen. Morphologisch besonders auffällig sind die Blasenbildung der Plasmamembran (*membrane blebbing*) und der Zerfall apoptotischer Zellen durch die Abschnürung kleiner Membran-umhüllter Vesikel, die als apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) bezeichnet werden (Abb. 1). Im Inneren der Zelle kondensiert das Chromatin (Pyknose), der Zellkern wird fragmentiert (Karyorrhexis) und die DNA in oligonukleosomale Fragmente von 180 bp und Vielfachen davon gespalten (Kroemer et al., 2005). Ein besonderes Merkmal der Apoptose ist die Eliminierung apoptotischer Zellen durch Phagozyten, bevor entzündliche Zellinhalte freigesetzt werden. Der Zerfall der Zellen in apoptotische Körperchen erleichtert hierbei die Aufnahme der Zellen über Makrophagen oder dendritische Zellen (Taylor et al., 2008). Die Phagozytose von apoptotischen Zellen beinhaltet ihre Erkennung über spezifische Oberflächensignale (*eat-me signals*). Hierzu können beispielsweise die Bindung von Thrombospondin (TSP) oder des Komplementproteins C1q sowie die Expression des Transmembranglykoproteins ICAM3

(*intracellular adhesion molecule 3*) auf der Oberfläche apoptotischer Zellen gehören (Ravichandran and Lorenz, 2007). Eines der wichtigsten Oberflächensignale apoptotischer Zellen ist die Exponierung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS). PS ist in lebenden Zellen asymmetrisch auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran verteilt, wo es als Adaptermolekül in verschiedenen intrazellulären Signalwegen, wie zum Beispiel der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) oder der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) Raf1, agiert (Vance and Steenbergen, 2005). Während der Apoptose wird PS aktiv auf die Zelloberfläche transportiert und kennzeichnet diese für die Eliminierung durch phagozytierende Immunzellen. Die Erkennung von PS kann entweder über die indirekte Bindung der Phagozyten an sogenannte Opsonine oder Brückenmoleküle (*bridging molecules*) wie MFG-E8 (*milk fat globule epidermal growth factor 8*) oder durch die direkte Bindung an spezifische PS-Rezeptoren wie TIM-1, TIM-4 (*T cell immunoglobulin mucin-1/-4*) oder BAI-1 (*brain specific angiogenesis inhibitor 1*) erfolgen (Kobayashi et al., 2007;.

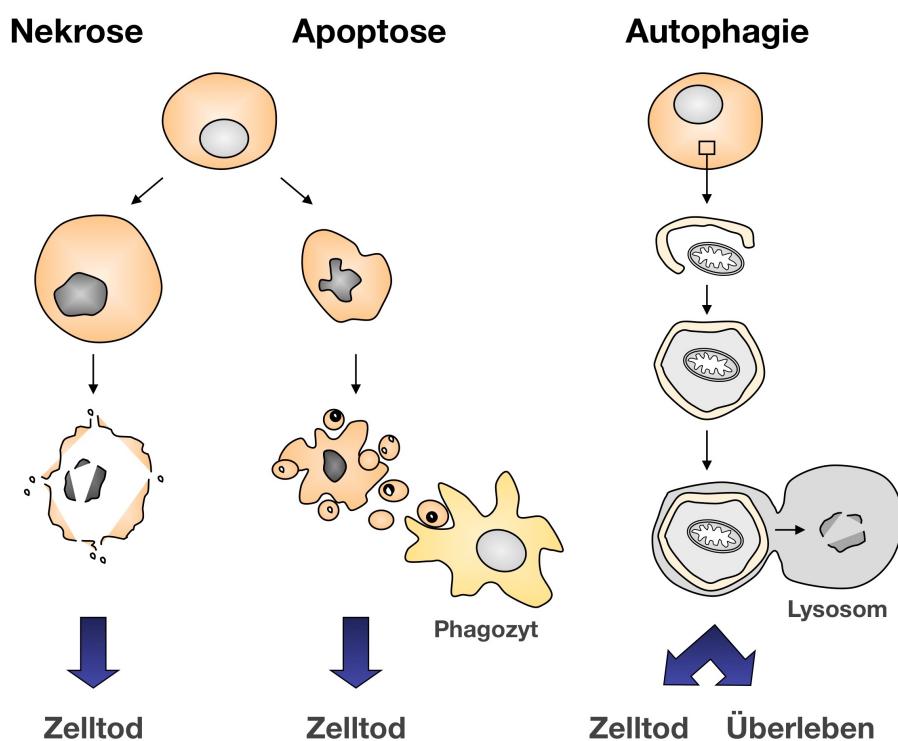


Abb. 1: Schematische Gegenüberstellung von Apoptose, Nekrose und Autophagie

Apoptotische Zellen schrumpfen und zerfallen in apoptotische Körperchen, die über Phagozyten (gelb) aufgenommen werden können (Mitte). Im Gegensatz dazu schwollen nekrotische Zellen an. Die Plasmamembranintegrität bleibt nicht gewahrt, so dass entzündliche intrazelluläre Bestandteile in das externe Milieu gelangen und hierdurch eine proinflammatorische Immunantwort auslösen können (links). Bei der Autophagie werden cytoplasmatische Bestandteile über eine phagophore Doppelmembran eingeschlossen (Autophagosom). Durch die Fusion mit Lysosomen (grau) zum Autophagolysosom können sie proteolytisch abgebaut werden. Über den autophagischen Verdau zellulärer Bestandteile kann der Zelle Energie zugeführt und somit ihr Überleben unter Stress- und Hungerbedingungen gesichert werden. Bei anhaltenden Mangelbedingungen kann eine exzessive Autophagie jedoch auch zum Zelltod führen (rechts).

Miyanishi et al., 2007; Park et al., 2007a; Santiago et al., 2007; Wu et al., 2006). Die Bindung apoptotischer Zellen über spezifische Oberflächenrezeptoren ist essentiell, da diese nicht nur für die Aufnahme sondern auch für die Identifizierung der sterbenden Zelle als körpereigene Struktur – im Gegensatz zu Pathogenen - verantwortlich sind. Statt einer proinflammatorischen Immunantwort induziert die Aufnahme apoptotischer Zellen daher die Produktion anti-inflammatorischer Cytokine wie TGF- β (*transforming growth factor β*) und IL-10 (*interleukin 10*) (Wu et al., 2006).

Im Gegensatz zur Apoptose ist der nekrotische Zelltod durch ein starkes Anschwellen der Zelle gekennzeichnet (Abb. 1). Durch den Verlust der Membranintegrität dringen Elektrolyte in die Zelle ein, die einen Nachstrom von Wasser bewirken. Das Cytoplasma und die Zellorganellen schwollen daher stark an (Oncose) und die Zelle platzt schließlich, wobei intrazelluläre Bestandteile in das umliegende Milieu freigesetzt werden (Majno and Joris, 1995). Diese induzieren die Aktivierung von dendritischen Zellen, Makrophagen, neutrophilen Zellen und NK Zellen (*natural killer cells*) und lösen so eine proinflammatorische Immunantwort aus. Die Nekrose von Zellen kann unter anderem durch akute und traumatische Verletzungen, zum Beispiel bei Verbrennungen oder Schnittwunden, sowie durch verschiedene biochemische Faktoren wie die Depletion des intrazellulären ATPs, die exzessive Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*), einer Störung der intrazellulären Calcium-Homöostase (Ca^{2+}) sowie der damit einhergehenden Aktivierung verschiedener Proteasen wie Calpaine oder lysosomaler Cathepsine ausgelöst werden (Taylor et al., 2008; Zong and Thompson, 2006). Viele dieser Faktoren können auch apoptotische Signalwege induzieren, jedoch geht man davon aus, dass Zellen je nach Intensität der Zellschädigung apoptotisch oder - bei exzessiver Zellschädigung - nekrotisch absterben können (Zong and Thompson, 2006). Ebenso kann eine Blockierung apoptotischer Signalwege die Induktion einer sekundären Nekrose, auch Nekroptose genannt, bedingen (Degterev and Yuan, 2008).

Eine dritte Form des Zelltodes, der autophagische Zelltod, verläuft über den lysosomalen Verdau essentieller Zellbestandteile in Doppelmembran-Vesikeln, den Autophagolysosomen. Bei der Autophagie wird ein Teil des Cytoplasmas über die Bildung einer Phagophore in der Zelle eingeschlossen (Abb. 1). Die Fusion des so entstandenen Autophagosoms mit einem oder mehreren Lysosomen ermöglicht anschließend die Zersetzung der eingeschlossenen Zellbestandteile über die eingebrachten lysosomalen Enzyme (Levine and Kroemer, 2008). Die Autophagie ist ein evolutionär stark konservierter Prozess, der in geringem Maße in allen Zellen abläuft und über welchen verletzte, funktionsgestörte oder überzählige Organellen sowie falsch gefaltete Proteine abgebaut

werden können. Weitere wichtige Funktionen der Autophagie beinhalten die Beseitigung intrazellulärer Pathogene, wie Viren, Bakterien oder Protozoen, sowie die Kreuzpräsentation cytosolischer Antigene über MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II Moleküle (Levine and Kroemer, 2008). Unter Nährstoffmangelbedingungen ermöglicht der autophagische Abbau intrazellulärer Zellbestandteile des weiteren eine vorübergehende Deckung des Energiebedarfs der Zelle (Levine and Deretic, 2007). Die Autophagie besitzt somit eine wichtige Rolle in der zellulären Homöostase und kann unter Stressbedingungen auch lebenserhaltend wirken. Wie Autophagie letztendlich auch den Tod einer Zelle auslösen kann, ist noch weitgehend unbekannt. Unklar ist, ob der autophagische Zelltod durch den exzessiven Verdau essentieller zellulärer Bestandteile ausgelöst wird oder ob bei übermäßiger Autophagie, beispielsweise unter lang anhaltenden Mangelbedingungen, sekundär ein apoptotischer oder nekrotischer Zelltod induziert wird (Maiuri et al., 2007).

1.2. Apoptose und Apoptosemediatoren

Die Apoptose kontrolliert eine Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse. Sie ist ein wichtiger Regulator der Zellhomöostase, der embryonalen Morphogenese und der Zelltrophie und spielt eine zentrale Rolle bei der Eliminierung entarteter, infizierter oder autoreaktiver Zellen. Eine Deregulation apoptotischer Signalwege kann die Entstehung von Tumoren oder Autoimmunität begünstigen und bedingt eine Vielzahl akuter und chronisch-degenerativer Erkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Danial and Korsmeyer, 2004). Die Entschlüsselung apoptotischer Signalwege und ihrer Mediatoren ist daher eine wesentliche Voraussetzung zum Verständnis und Therapie dieser Erkrankungen.

1.2.1. Caspasen

Verantwortlich für einen Großteil der dramatischen Veränderungen, die während der Apoptose in der Zelle ausgelöst werden, sind eine Reihe von Cysteinproteasen, die Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*). Bislang wurden 18 verschiedene Mitglieder der Caspasen-Genfamilie in Säugetieren identifiziert, von denen zwölf auch in menschlichen Zellen exprimiert werden (Eckhart et al., 2008; Reed et al., 2003) (Tabelle 1). Caspasen werden als katalytisch inaktive oder nur gering aktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, die über ihre Oligomerisierung oder proteolytische Prozessierung aktiviert werden (Boatright and Salvesen, 2003; Salvesen and Dixit, 1999). Sie bestehen aus

Caspase	Mensch	Maus
Caspase-1	+	+
Caspase-2	+	+
Caspase-3	+	+
Caspase-4	+	-
Caspase-5	+	-
Caspase-6	+	+
Caspase-7	+	+
Caspase-8	+	+
Caspase-9	+	+
Caspase-10	+	-
Caspase-11	-	+
Caspase-12	- (+)	+
Caspase-13	-	-
Caspase-14	+	+
Caspase-15	-	-
Caspase-16	+	+
Caspase-17	-	-
Caspase-18	-	-

Tabelle 1: Vergleich humaner und muriner Caspasen

Menschen exprimieren zwölf verschiedene Caspasen. Die humane Caspase 12 ist verkürzt und existiert nur als enzymatisch inaktives Protein (Casp-12S*). Nur wenige Bevölkerungsgruppen afrikanischen Ursprungs exprimieren eine aktive Form (Casp-L). Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse keine Caspase-10. Murine Caspase-11 ist ortholog zu den menschlichen Caspasen 4 und 5. Sowohl Menschen als auch Mäuse exprimieren keine Caspase-13, -15, -17 und -18.

einer variablen N-terminalen Prodomäne sowie einer kleinen (p10) und einer großen (p20) Untereinheit. Diese können nach Dimerisierung der Procaspsen durch die proteolytische Spaltung der Zymogene freigesetzt werden und bilden als Heterotetramer aus je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten das aktive Enzym. Die aktiven Zentren in den großen Untereinheiten der prozessierten Caspasen liegen dabei an entgegen gesetzten Enden im aktiven Caspase-Molekül (Nicholson, 1999; Thornberry and Lazebnik, 1998).

Caspasen werden in inflammatorische und apoptotische Caspasen unterteilt, wobei bei letzteren wiederum zwischen apoptotischen Initiatorcaspsen (Caspase-2, -8, -9, -10) und apoptotischen Effektorcaspsen (Caspase-3, -6, -7) unterschieden wird (Denecker et al., 2007; Eckhart et al., 2008; Martinon and Tschopp, 2004; Saleh et al., 2006) (Abb. 2). Apikale Initiatorcaspsen können autokatalytisch aktiviert werden und anschließend die Hydrolyse der distalen Effektorcaspsen initiieren (Taylor et al., 2008). Sie liegen normalerweise als schwach aktive Monomere vor, die durch die Dimerisierung in Multiproteinkomplexen wie dem DISC (*death inducing signaling complex*) oder dem Apoptosom aktiviert werden können. Ihre Rekrutierung erfolgt über spezifische Signalmotive in ihren langen Prodomänen (> 10 kDa) - der Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) oder der Caspase-Rekrutierungsdomäne (*caspase recruitment domain*, CARD). Distale Effektorcaspsen besitzen nur kurze Prodomänen (< 30 AS) und liegen als inaktive Dimere vor, die durch aktive Initiatorcaspsen prozessiert und dadurch aktiviert werden können (Festjens et al., 2006; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Nicholson, 1999).

Caspasen spalten im Laufe der Apoptose mehrere hundert Zielproteine und können durch diese kontrollierte Proteolyse den Tod der Zelle induzieren, ohne dass benachbarte Zellen geschädigt oder intrazelluläre Bestandteile aus der sterbenden Zelle freigesetzt werden.

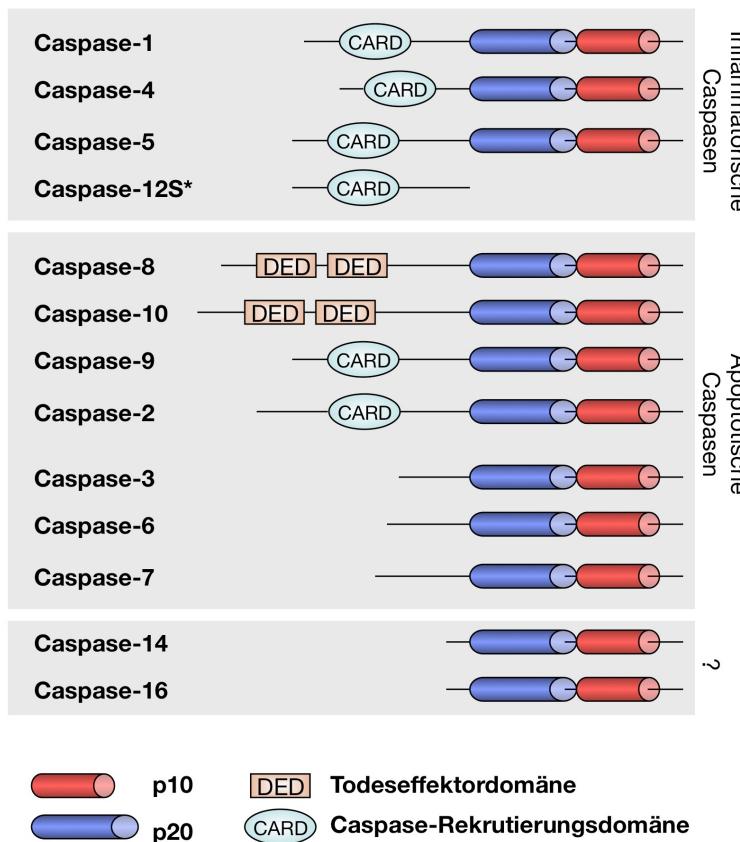


Abb. 2: Strukturelle Übersicht der humanen Caspasen

Caspasen werden unterteilt in inflammatorische und apoptotische Caspasen. Die inflammatorischen Caspasen-1 und -5 sind an der Prozessierung und Reifung der proinflammatorischen Cytokine IL-1 β und IL-18 beteiligt. Die verkürzte Form von Caspase-12 (Casp-12S*) wirkt vermutlich als dominant-negativer Regulator für proinflammatorische Signalwege. Bei apoptotischen Caspasen wird zwischen Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) unterschieden. Initiatorcaspasen besitzen eine verlängerte Prodomäne, die Rekrutierungsmotive wie die CARD (caspase recruitment domain) oder die DED (death effector domain) enthält. Caspase-14 und -16 konnten bisher keiner Unterteilung zugeordnet werden. Caspase-14 spielt eine wichtige Rolle bei der terminalen Differenzierung von Keratinocyten. Die Funktion von Caspase-16 ist noch unbekannt.

Caspasen spalten ihre Substrate nach einem Tetrapeptidmotiv ($P_4-P_2-P_3-P_1$), wobei an Position 1 (P_1) immer ein Aspartat angeordnet ist. Anhand ihrer Substratspezifität können Caspasen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Gruppe I Caspasen (Caspase-1, -4, -5) bevorzugen das Tetrapeptidmotiv (W/L)ExD, während Gruppe II Caspasen (Caspase-2, -3, -7) das Substratmotiv DExD spalten, das in sehr vielen der Todessubstrate zu finden ist. Gruppe III Caspasen (Caspase-6, -8, -9, -10) schneiden hingegen bevorzugt am Proteinmotiv (L/V/I)E(T/H)D (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Thornberry et al., 1997). Über vierhundert verschiedene Caspase-Substrate sind bereits bekannt und ihre proteolytische Spaltung ist verantwortlich für die charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen, die während der Apoptose beobachtet werden können (Fischer et al., 2003; Taylor et al., 2008). Die Spaltung von Zelladhäsions- und Strukturproteinen wie Cateninen und Desmoplakin führt dazu, dass die Zelle den Kontakt zu benachbarten Zellen verliert. Durch die Proteolyse des Cytoskeletts verliert sie ihre Form, und es bilden sich die für apoptotische Zellen charakteristischen Membranbläschen (*membrane blebs*) aus. Nukleare Lamine werden gespalten und der Zellkern fragmentiert. Ebenso katalysieren Caspasen die Fragmentierung cytoplasmatischer Organellen wie des endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparates und der Mitochondrien. Durch die Prozessierung von ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*) durch Caspase-3 wird die Endonuklease CAD (*caspase-activated DNase*) freigesetzt, die für die oligonukleosomale

Spaltung der DNA im Zellkern verantwortlich ist. Weitere wichtige zelluläre Funktionen wie die Translation werden durch die Proteolyse von Translationsinitiationsfaktoren gestört (Fischer et al., 2003; Taylor et al., 2008). Essentielle Zelfunktionen werden somit durch die massive Zerstörung zahlreicher zellulärer Proteinsubstrate unterbunden und führen so zu einem Absterben der Zelle. Die gespaltenen Zellbestandteile werden schließlich als apoptotische Körperchen von Phagozyten aufgenommen und vollständig abgebaut.

1.2.2. Bcl-2-Proteine

Die pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine sind wichtige Regulatoren des mitochondrialen Apoptosesignalweges. Das erste, namensgebende Mitglied Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) wurde erstmals 1985 auf Grund der Tatsache beschrieben, dass seine chromosomale Translokation (t14;18) zu einer exzessiven Transkription in B-Zellen und damit zu der Entstehung Follikulärer Lymphome beiträgt (Bakhshi et al., 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1985).

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie werden je nach Anzahl der in ihnen enthaltenen α -helikalen Bcl-2-Homologiedomänen (BH-Domäne) in insgesamt drei Klassen eingeteilt (Chipuk and Green, 2008). Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-x_L, A1, Mcl-1, Boo/Diva, Bcl-g) weisen je vier BH-Domänen auf (BH1-4), während die proapoptotischen Effektormoleküle (Bak, Bax, Bok) drei (BH1-3) und die proapoptotischen *BH3-only* Moleküle (Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, bNip3, Hrk, Noxa, Puma) nur eine BH-Domäne (BH3) besitzen (Abb. 3A).

Die proapoptotischen Bcl-2-Effektormoleküle Bax (*Bcl-2 associated protein X*) und Bak (*Bcl-2 antagonist killer*) sind in der Lage, durch die Bildung von Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) die Freisetzung apoptogener Faktoren wie Cytochrom c in das Cytoplasma der Zelle zu bewirken und damit Apoptose zu induzieren. Sowohl Bax als auch Bak werden weitgehend konstitutiv exprimiert (Youle and Strasser, 2008). Unter physiologischen Bedingungen wird eine unkontrollierte Auslösung des mitochondrialen apoptotischen Signalweges daher über ihre Interaktion mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinmitgliedern verhindert. Bak wird hierbei durch die Bindung an Mcl-1 und Bcl-x_L an seiner Oligomerisierung und damit an der Bildung mitochondrialer Membranporen gehindert (Willis et al., 2005). Im Gegensatz zu Bak, welches bereits an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, ist Bax größten Teils im Cytoplasma verteilt, wo es vermutlich als inaktives Monomer vorliegt, da seine C-terminale Transmembrandomäne über eine hydrophobe Tasche im Molekül gebunden ist.

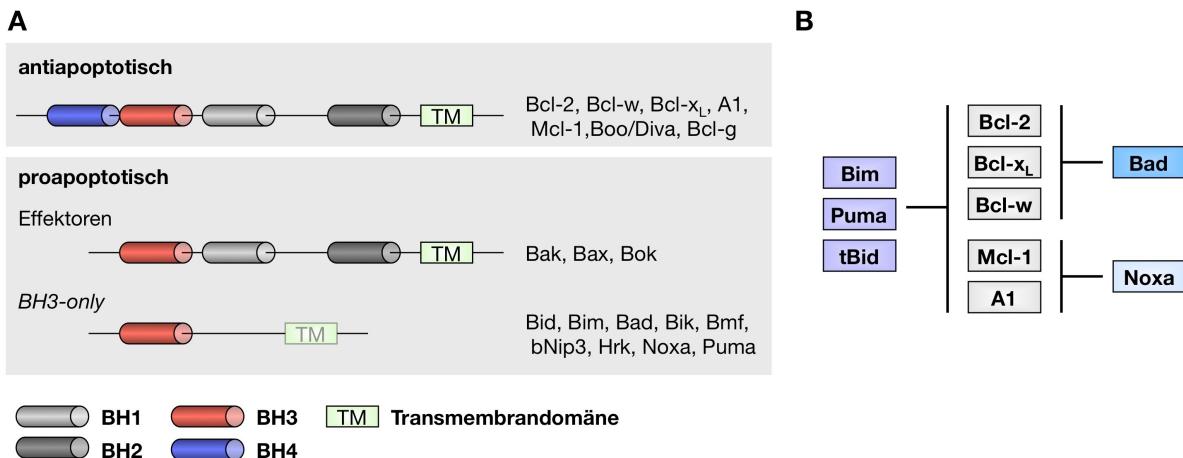


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Inhibition der Bcl-2-Proteine

(A) Die Bcl-2-Proteinfamilie wird in drei funktionelle Gruppen eingeteilt. Die antiapoptotischen Mitglieder besitzen vier BH Domänen (BH1-4) sowie, bis auf A1, eine hydrophobe, C-terminale Transmembrandomäne (TM), über die sie auf der cytosolischen Seite intrazellulärer Membranen, wie der äußeren Mitochondrienmembran, lokalisiert sind. Die proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder werden nochmals in zwei Gruppen unterteilt. Die Effektorproteine Bak, Bax und Bok besitzen drei BH-Domänen (BH1-3) und ebenfalls eine TM. Die BH3-only Proteine sind strukturell sehr divers und weisen nur die BH3-Domäne als funktionelles Motiv auf. Bis auf Hrk, Bik und bNip3 beinhalten sie keine TM. (B) BH3-only Proteine können durch die Insertion ihrer BH3-Domäne in eine hydrophobe Tasche, die aus den BH-Domänen 1, 2 und 3 gebildet wird, antiapoptotische Bcl-2-Proteine reprimieren. Die Inhibition der antiapoptotischen Mitglieder durch BH3-only Proteine erfolgt selektiv. Bim, Puma und proteolytisch gespaltenes Bid (tBid) können alle antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder inhibieren, während Bad nur mit Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w und Noxa nur mit Mcl-1 und A1 interagiert.

(Youle and Strasser, 2008). Während der Apoptose wird eine Konformationsänderung in Bax induziert, die zur Freisetzung der Transmembrandomäne und damit einer Insertion des Proteins in die äußere Mitochondrienmembran führt. Bax und Bak sind in ihrer Funktion wahrscheinlich weitgehend redundant. Während in Mausmodellen, in denen nur eines der Effektorproteine deletiert ist, nur wenige, schwach ausgeprägte Defekte detektiert werden konnten, zeigen Bax/Bak-defiziente Mäuse schwere Entwicklungsdefekte und sind embryonal letal (Lindsten et al., 2000).

Die proapoptotischen BH3-only Proteine wirken vermutlich als Sensoren, die je nach Stress-induzierendem Stimulus die antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder inhibieren und dadurch die Freisetzung der proapoptotischen Effektoren induzieren können. Ihre kurze BH3-Domäne inseriert dabei in eine hydrophobe Tasche der antiapoptotischen Mitglieder, die aus den BH-Domänen 1, 2 und 3 gebildet wird (Liu et al., 2003; Petros et al., 2000). Die Bindung der BH3-only Proteine an die antiapoptotischen Mediatoren ist selektiv (Abb. 3B). Während tBid, Bim und Puma an alle antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder binden können, inhibieren Bad und Noxa ausschließlich Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w bzw. Mcl-1 und A1 (Chen et al., 2005). BH3-only Proteine können entweder transkriptionell induziert oder durch posttranskriptionelle Modifikation, wie die Dephosphorylierung von Bad durch Calcineurin oder die Spaltung von Bid zu tBid durch Caspase-8, aktiviert werden (Shibasaki et al., 2002; Youle and Strasser,

2008). Die Selektivität der *BH3-only* Proteine als auch ihre differentielle Aktivierung ermöglicht so eine spezifische Regulation der apoptotischen Antwort je nach induzierendem Stimulus. Umstritten ist, ob neben der Neutralisation der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Neutralisationsmodell) zusätzlich eine direkte Aktivierung von Bax und Bak über *BH3-only* Proteine erfolgen muss (Direktes Aktivierungsmodell) (Chipuk and Green, 2008). Vermutet wird, dass erst die Bindung von Bid, Bim oder eventuell auch Puma die Homooligomerisierung von Bax und Bak induzieren (Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005). In Frage gestellt wurde dieses Modell jedoch dadurch, dass in Bim/Bid-defizienten Mäusen immer noch eine Aktivierung von Bax und Bak im Zuge verschiedener apoptotischer Stimuli erfolgen kann (Willis et al., 2007). Das komplexe Zusammenspiel der Bcl-2-Familienmitglieder und ihre Funktion in der Regulation apoptotischer Signalwege sind somit immer noch ungeklärt und stellen eine zentrale Fragestellung in der Erforschung der mitochondrialen Apoptose dar.

1.2.3. Die intrinsische Apoptose

Bcl-2-Proteine sind zentrale Mediatoren der intrinsischen oder mitochondrialen Apoptose. Die mitochondriale Apoptose kann unter anderem durch UV-Strahlung und der damit einhergehenden DNA-Schädigung, den Entzug von Wachstumsfaktoren, verschiedene Chemotherapeutika, ER-Stress oder durch einen starken Anstieg an intrazellulären Sauerstoffradikalen ausgelöst werden (Youle and Strasser, 2008). Ein zentraler Vorgang des intrinsischen Signalweges ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum und die dadurch vermittelte Bildung eines Multiproteinkomplexes, dem Apoptosom, wodurch schließlich Effektorcaspasen aktiviert und der Tod der Zelle induziert werden kann.

Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien während der Apoptose wird durch die Oligomerisierung von Bax und Bak und die damit verbundene Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran ausgelöst (Abb. 4). Dies geht zumeist einher mit einer Depolarisation der Mitochondrien und einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) (Kroemer et al., 2007). Im Cytoplasma bindet Cytochrom c an monomeres Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und induziert hierdurch die Bildung des Apoptosoms, eines ATP-abhängigen Multiproteinkomplexes bestehend aus heptamerem Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9. Monomeres Apaf-1 umfasst drei funktionelle Domänen – eine N-terminale CARD, eine Nukleotidbinde- und Oligomerisierungsdomäne (NOD), über die dATP als Cofaktor im Molekül gebunden ist,

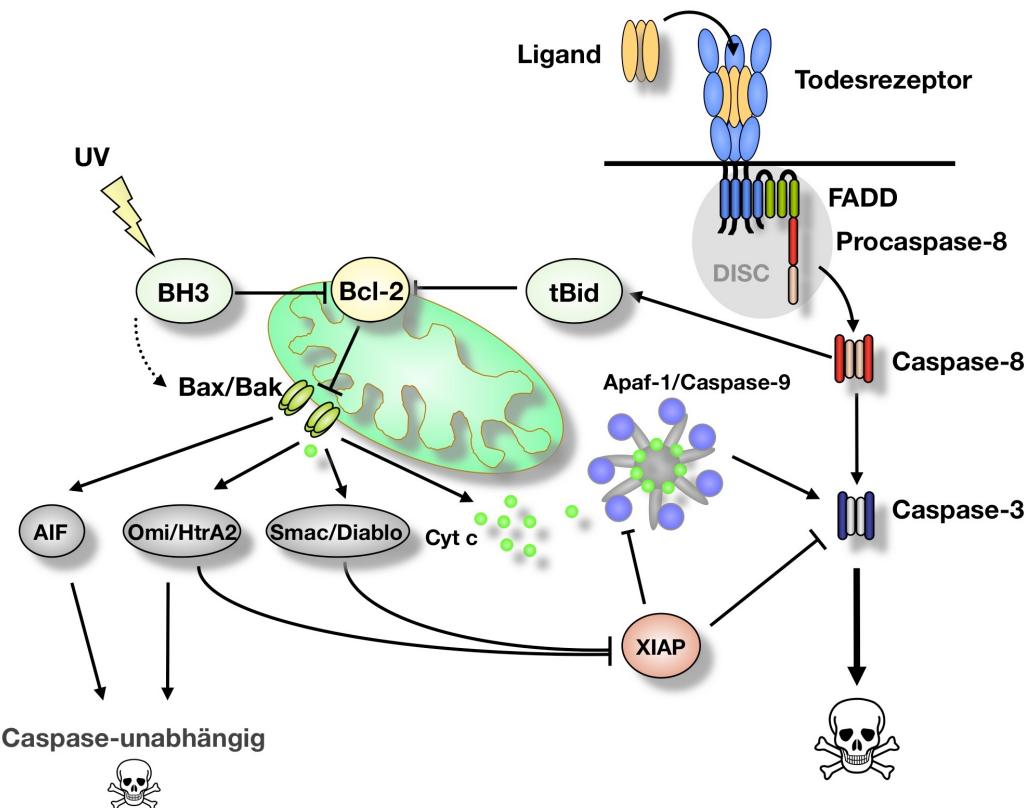


Abb. 4: Der intrinsische und extrinsische Apoptose-Signalweg

Der intrinsische Signalweg kann durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel UV-Bestrahlung oder den Entzug von Wachstumsfaktoren, ausgelöst werden. Proapoptotische *BH3-only* Proteine (BH3) werden daraufhin transkriptionell oder posttranskriptionell aktiviert und können antiapoptotische Bcl-2-Proteine inhibieren. Dies führt zu einer Oligomerisierung der Bcl-2-Effektorproteine Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran. Durch die Bak/Bax-vermittelte Porenbildung können apoptogene Faktoren wie Smac/Diablo, Omi/HtrA2, AIF und Cytochrome c aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt werden. Letzteres induziert durch seine Bindung an monomeres Apaf-1 die Bildung eines heptameren Multiproteinkomplexes, dem Apoptosom, über das Caspase-9 aktiviert werden kann. Aktive Caspase-9 kann nun ihrerseits Caspase-3 proteolytisch aktivieren. Durch die anschließend massive Spaltung zellulärer Todessubstrate wird letztendlich der Tod der Zelle ausgelöst. Der extrinsische Apoptose-Signalweg verläuft über die Aktivierung membranständiger Todesrezeptoren. Bei Bindung des spezifischen, oligomeren Liganden wird eine Oligomerisierung des Rezeptors und die Bildung des DISCs, bestehend aus der cytoplasmatischen Domäne des Todesrezeptors, dem Adapterprotein FADD sowie Procaspase-8 bzw. -10 induziert. In Typ-I-Zellen kann auf Grund der Aktivierung einer hohen Anzahl an Caspase-8-Molekülen die direkte Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3 erfolgen und damit der apoptotische Tod der Zelle ausgelöst werden. In Typ-II-Zellen muss der extrinsische Signalweg über den mitochondrialen verstärkt werden. Geringe Mengen an aktiver Caspase-8 reichen hierbei aus, um das *BH3-only* Protein Bid zu tBid zu spalten und dadurch eine Aktivierung von Bax und Bak zu induzieren.

sowie 12 C-terminale WD40-Motive. In der Abwesenheit von Cytochrome c nimmt Apaf-1 eine geschlossene Konformation ein, in der die WD40-Motive das Molekül bedecken. Die Bindung von Cytochrome c induziert in Apaf-1 die Hydrolyse von dATP zu dADP und damit eine Konformationsänderung, die wiederum eine Oligomerisierung von Apaf-1 und eine Exponierung der CARD zur Folge hat (Kim et al., 2005; Zou et al., 1997). Letztere vermittelt nun die Bindung von Procaspase-9 und damit die Aktivierung der Initiatorcaspase. Aktivierte Caspase-9 kann nun ihrerseits Effektorcaspasen wie Caspase-3 und -7 proteolytisch aktivieren und dadurch den Zelltod auslösen (Ow et al., 2008).

Neben Cytochrom c werden noch eine Reihe weiterer apoptogener Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt (Abb. 4). Smac/Diablo (*second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*) und die Serinprotease Omi/HtrA2 (*Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2*) können die Apoptose-Induktion durch die Inhibition von IAPs (*inhibitors of apoptosis*) unterstützen. IAPs können über ihre BIR-Domänen (*baculoviral IAP repeat*) mit Caspasen interagieren und diese dadurch inaktivieren. XIAP (*X-linked IAP*) kann beispielsweise über seine BIR2-Domäne an die Substratbindetasche sowohl von Caspase-3 als auch Caspase-7 binden und verhindert damit eine Spaltung von Todessubstraten durch diese Effektorcaspasen (Eckelman et al., 2006). Durch die Interaktion mit Caspase-9 über seine BIR3-Domäne hingegen zwingt XIAP die Initiatorcaspase in eine inaktive, monomere Form und kann hierdurch eine Apoptose-Induktion blockieren (Srinivasula and Ashwell, 2008). Sowohl Smac/Diablo als auch Omi/HtrA2 interagieren mit den BIR2 und BIR3 Domänen der IAPs und können so ihrerseits eine Inhibition der Caspasen verhindern. Omi/HtrA2 sowie das ebenfalls freigesetzte AIF (*apoptosis-inducing factor*) können auch unabhängig von Caspasen ein Absterben der Zelle bewirken, wobei über den Mechanismus noch relativ wenig bekannt ist. Omi/HtrA2 spaltet auf Grund seiner proteolytischen Aktivität vermutlich essentielle Zellsubstrate, während AIF nach seiner Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum in den Zellkern transloziert und hier durch die Interaktion mit Cyclophilin A eine Kondensation des Chromatins und eine Fragmentierung der DNA bewirkt (Kroemer et al., 2007).

1.2.4. Todesrezeptoren

Todesrezeptoren bilden eine Untergruppe der TNF-R-Superfamilie (*tumor necrosis factor receptor*), welche sich durch den Besitz von ein bis sechs cysteinreicher, extrazellulärer Domänen auszeichnet und pleiotrope Funktionen in der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und -differenzierung ausübt. Zur Untergruppe der Todesrezeptoren werden TNF-R1 (*tumor necrosis factor receptor 1*)/CD120a, CD95 (*cluster of differentiation 95*)/APO-1/FAS, TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*)/APO-2/DR4, TRAIL-R2/DR5/KILLER/TRICK2 sowie DR3 (*death receptor 3*)/APO-3/LARD/TRAMP/WSL1, DR6 und p75NTR gezählt (Schulze-Osthoff et al., 1998; Schutze et al., 2008) (Abb. 5). Charakteristisch für die Familie der Todesrezeptoren ist eine 80 Aminosäuren lange intrazelluläre Signalsequenz, die Todesdomäne (*death domain, DD*), welche nach Induktion des Rezeptors über die Bindung oligomerer Liganden das Apoptose-Signal in die Zelle weiterleitet (Itoh and Nagata, 1993).

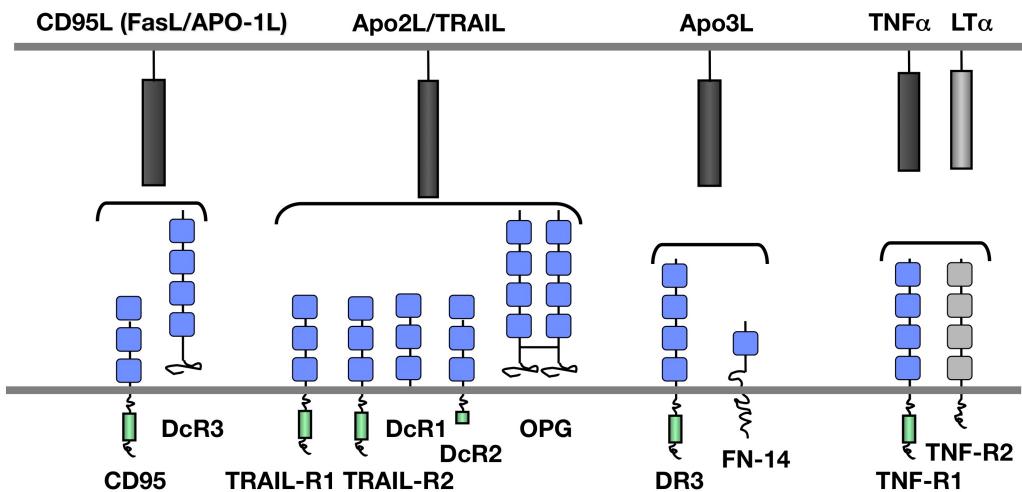


Abb. 5: Schematische Übersicht der Todesrezeptorfamilie (verändert nach Schulze-Osthoff et al., 1998)

Todesrezeptoren gehören zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren. Extrazellulär besitzen sie ein bis sechs cysteinreiche Domänen (blau), über die die Bindung der oligomeren Liganden (schwarz) erfolgt. Intrazellulär wird das Apoptose-Signal über die Todesdomäne (grün) weitergeleitet. Decoy-Rezeptoren (DcR) besitzen keine oder nur eine verkürzte Form der Todesdomäne und können daher kein Apoptose-Signal in die Zelle weitervermitteln. Inwieweit sie die Apoptose-Induktion jedoch beeinflussen oder sogar unterdrücken können, ist umstritten. OPG (Osteoprotegerin) zeigt nur eine schwache Affinität für TRAIL und spielt eine Rolle bei der Knochenentwicklung. TNF-R2 besitzt ebenfalls keine Todesdomäne, es wird jedoch vermutet, dass der Decoy-Rezeptor die Apoptose-Induktion über TNF-R1 durch eine Inhibition der NFκB-Aktivierung unterstützen kann.

Neben den Todesrezeptoren sind auch eine Reihe von Decoy-Rezeptoren (DcR) bekannt, die jedoch nicht in der Lage sind, nach Liganden-Bindung Apoptose zu induzieren, da sie entweder gar keine oder zumindest keine funktionelle Todesdomäne besitzen (Itoh and Nagata, 1993) (Abb. 5). Inwieweit die Decoy-Rezeptoren jedoch die Apoptose-Induktion durch das Auffangen der Todesliganden beeinflussen bzw. unterdrücken können, ist noch ungeklärt (Cheng et al., 1994; Roesler et al., 2005).

1.2.5. Die extrinsische Apoptose

Im Gegensatz zur mitochondrialen Apoptose erfolgt die Induktion des extrinsischen Signalweges über die Bindung oligomerer Todesliganden an ihren entsprechenden membranständigen Todesrezeptor, wie zum Beispiel die Bindung von CD95L an den CD95-Rezeptor oder von TRAIL an TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 (Abb. 4). Hierdurch wird eine Oligomerisierung des Rezeptors und damit die Bindung eines intrazellulären Multiproteinkomplexes, dem DISC (*death inducing signaling complex*), induziert (Kischkel et al., 1995). Zentrale Komponenten des DISCs sind das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain containing protein*) sowie Proaspase-8 oder im Menschen auch Proaspase-10 (Kischkel et al., 2001; Muzio et al., 1996). FADD besitzt sowohl eine

Todesdomäne (DD) als auch eine Todeseffektordomäne (DED). Über seine DD kann FADD nach Rezeptor-Aktivierung mit diesem interagieren und anschließend über eine homophile Interaktion der DEDs Procaspsase-8 oder -10 rekrutieren. Die Dimerisierung der Initiatorcaspasen im DISC induziert wiederum ihre Aktivierung und Autoproteolyse (Medema et al., 1997; Salvesen and Dixit, 1999). Die aktiven Caspasen können nun distale Effektorcaspasen wie Caspase-3 proteolytisch aktivieren und so den apoptotischen Zelltod auslösen.

Abhängig vom Zelltyp kann die intrazelluläre Caspase-8-Aktivierung jedoch auch zu gering sein, um eine effiziente Apoptose-Induktion in der Zelle zu vermitteln. In diesen sogenannten Typ-II-Zellen muss der extrinsische Signalweg daher durch den mitochondrialen Apoptose-Signalweg verstärkt werden (Scaffidi et al., 1998; Scaffidi et al., 1999b) (Abb. 4). Die Vermittlung der mitochondrialen Apoptose im Zuge des extrinsischen Signalweges erfolgt über die Prozessierung des proapoptotischen *BH3-only* Proteins Bid (*BH3-interacting death agonist*), welches auch bei geringer Konzentration an aktiver Caspase-8 von dieser zu tBid (trunkiertem Bid) gespalten werden kann. tBid kann nun die Oligomerisierung von Bax und Bak an der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von Cytochrom c induzieren. Letzteres vermittelt wiederum die Bildung des Apoptosoms und damit die Aktivierung von Caspase-9, die ihrerseits schließlich verstärkt Caspase-3 prozessieren und aktivieren kann. In Typ-I-Zellen ist eine Verstärkung des extrinsischen Signalweges über das Mitochondrium unnötig, da die Initiatorcaspasen in ausreichendem Maß im DISC aktiviert werden und so direkt distale Effektorcaspasen prozessieren können. Während in Typ-II-Zellen die Apoptose daher durch die hohe Expression an antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-x_L inhibiert werden kann, bleibt die Apoptose-Induktion über den Todesrezeptor-Signalweg in Typ-I-Zellen hierdurch unbeeinflusst (Scaffidi et al., 1999b; Schmitz et al., 1999).

Ein weiterer Unterschied zwischen Typ-I- und Typ-II-Zellen ist vermutlich auch die Notwendigkeit einer Todesrezeptor-Internalisierung während der CD95-vermittelten Apoptose. Die Liganden-Bindung an den CD95-Todesrezeptor induziert dessen Oligomerisierung zu makroskopisch sichtbaren, SDS-stabilen Mikroaggregaten, den sogenannten SPOTS (*signalling protein oligomerization transduction structures*) (Siegel et al., 2004). In Typ-I-Zellen werden die aggregierten, palmitoylierten CD95-Rezeptoren über Aktinfilamente in Lipid-reiche Regionen, den *lipid rafts*, rekrutiert und hier über Clathrin-Vesikel internalisiert (Chakrabandhu et al., 2007; Feig et al., 2007). In Typ-I-Zellen kann durch eine Inhibition der Rezeptor-Internalisierung, zum Beispiel durch die Zerstörung von Aktinfilamenten, die DISC-Rekrutierung und damit eine Induktion des apoptotischen

Programms verhindert werden (Muppudi and Siegel, 2004; Schutze et al., 2008). Ähnlich zum TNF-R1-Rezeptorsignalweg wird vermutet, dass der membranständige, nicht internalisierte CD95-Rezeptor hingegen antiapoptotische Signalwege, wie zum Beispiel die Aktivierung von NF κ B, vermitteln kann (Peter et al., 2007). Die Bedeutung der CD95-Rezeptor-Internalisierung für Typ-II-Zellen ist jedoch unklar, da eine Inhibition dieses Prozesses keinen Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität der Zellen zu nehmen scheint (Schutze et al., 2008).

1.2.6. CD95-vermittelte Apoptose und ihre Bedeutung im Immunsystem

Der CD95-Todesrezeptor ist ein glykosyliertes Typ-I-Membranprotein, welches durch die Bindung seines spezifischen Liganden, CD95L, aktiviert werden kann. Er wurde zum ersten Mal 1989 auf Grund seiner proapoptotischen Wirkung nach Bindung monoklonaler, agonistischer CD95-Antikörper beschrieben (Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989). Die proapoptotische Wirkung des CD95-Rezeptors wurde *in vivo* durch die Injektion monoklonaler CD95-Antikörper in Mäusen nachgewiesen, wodurch eine massive Apoptose in Leberzellen ausgelöst werden konnte (Nishimura et al., 1997).

Die Funktion des CD95-Rezeptors in der Regulation der Immunzellhomöostase wurde durch die Analyse von Mausstämmen mit Defekten im CD95-Rezeptor (*lymphoproliferation, lpr*)

Klassifikation	Mutation
Ia	CD95-Rezeptor
Ib	CD95L
Ic/Im	somatische CD95-Rezeptormutation in DNT-Zellen
II	Caspase-10
III	undefiniert

Tabelle 2: Molekulare Klassifikation von ALPS (verändert nach Bidere et al., 2005)

Die meisten ALPS-Patienten weisen heterozygote Mutationen im CD95-Rezeptor auf, zumeist in der intrazellulären DD (Typ Ia). Der CD95-Rezeptor wird somit noch exprimiert, er wirkt jedoch dominant-negativ. Typ Ic oder Im ALPS-Patienten werden durch somatische Mutationen im CD95-Rezeptor in DNT-Zellen definiert, während Typ Ib Patienten eine dominant-negative Form des CD95L exprimieren. Typ II ALPS-Patienten zeigen Mutationen im Caspase-10 Gen, wodurch nicht nur die CD95-sondern auch die CD3- und TRAIL-vermittelte Apoptose in Lymphozyten beeinträchtigt ist. ALPS Typ III Patienten weisen die klinischen Symptome des lymphoproliferativen Syndroms auf, jedoch ist die molekulare Ursache hierfür noch unbekannt.

oder seinem Liganden (*generalized lymphoproliferative disorder, gld*) verdeutlicht. *lpr*- und *gld*-Mäuse weisen eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen auf, die vermutlich auf der defekten Eliminierung von Lymphocyten beruht (Russell et al., 1993; Takahashi et al., 1994; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Charakteristisch sind hierbei im besonderen die hohen Akkumulation autoreaktiver Antikörper sowie einer hauptsächlich doppelt-negativen T-Zell-Population (DNT), die ungewöhnlicherweise eine hohe Expression der CD45R-Isoform B220 aufweist (CD4 $^+$ /CD8 $^+$ /B220 $^+$), welche sonst typischerweise auf B-Zellen exprimiert wird

(Bidere et al., 2005). Im Menschen können Mutationen im CD95-Signalweg zu einer schwerwiegenden lymphoproliferativen Autoimmunerkrankung führen, die unter dem Begriff Autoimmun-Lymphoproliferatives Syndrom (ALPS) bekannt ist (Fisher et al., 1995). Die molekulare Klassifikation von ALPS-Patienten erfolgt im Zusammenhang mit der Mutation im CD95-Todesrezeptorsignalweg (Tabelle 2). ALPS-Patienten zeigen ebenfalls schwere Defekte in der Eliminierung von Lymphozyten und damit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Autoimmunität und Lymphomen (Straus et al., 2001). Besonders auffällig ist auch hier die Akkumulation IL-10 produzierender, B220⁺ DNT-Zellen und CD5⁺ B-Zellen als auch die erhöhte Produktion von Autoantikörpern (Bleesing et al., 2001; Bleesing et al., 2002). ALPS-Patienten zeigen mit fortschreitendem Alter eine Verbesserung der Symptome, was vermutlich mit der Abnahme der T-Zellproduktion im Thymus zusammenhängt (Bidere et al., 2005).

Während der CD95-Rezeptorsignalweg nur eine untergeordnete Rolle während der Immunzellentwicklung spielt, besitzt er jedoch eine wichtige Funktion in der Regulation von Proliferation und Zelltod peripherer Immunzellen (Marsden and Strasser, 2003). Die Restimulation aktiverter T-Zellen ohne gleichzeitige Costimulation führt zur Induktion des Aktivierungs-induzierten Zelltods (*activation-induced cell death*, AICD), der entscheidend über den CD95-CD95L-Apoptosesignalweg reguliert wird (Krammer et al., 2007) (Abb. 6). Bei der Deletion von CD8⁺-T-Zellen spielt vermutlich auch die Apoptose-Induktion über TNF-R2 eine substantielle Rolle (Zheng et al., 1995). Das proapoptotische *BH3-only* Protein Bim besitzt ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Eliminierung überflüssiger T-Effektorzellen, in einem Prozess der ACAD (*activated cell-autonomous death*) genannt und durch den

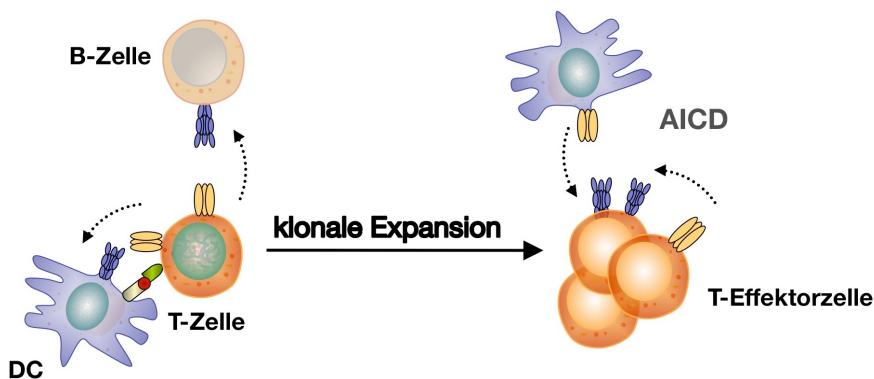


Abb. 6: CD95-Regulation der Immunzellhomöostase (verändert nach Ramaswamy and Siegel, 2007)

Die Aktivierung naiver T-Zellen über Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Dendritische Zellen oder B-Zellen induziert die Hochregulation von CD95 (blau) und CD95L (gelb). CD95L kann wiederum durch die Bindung an den CD95-Rezeptor auf aktivierten APCs deren Apoptose auslösen. Aktivierte T-Zellen proliferieren und differenzieren zu T-Effektorzellen. Nach Beendigung ihrer Effektorphase können sie entweder über den Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) über die CD95-vermittelte Apoptose oder auf Grund des Entzugs von Überlebensfaktoren (*activated cell autonomous death*, ACAD) absterben, welcher über Bim und die mitochondriale Apoptose verläuft.

Entzug überlebenswichtiger Cytokine induziert wird (Marsden and Strasser, 2003). Auf Grund der Analyse Bim^{-/-}/CD95^{Ipr/Ipr}-defizienter Mäuse wird angenommen, dass bei akuten Infektionen mit hohem Antigen-Titer die Dezimierung der T-Effektorzellen nach Bekämpfung der Infektion hauptsächlich über Bim und damit dem intrinsischen Apoptose-Signalweg reguliert wird. Bei persistierenden, chronischen Infektionen hingegen, bei denen durch die ständige Antigen-Stimulation kontinuierlich ein gewisses Maß an proinflammatorischen Cytokinen produziert wird, erfolgt eine kontrollierte Eliminierung überflüssiger, aktiver T-Zellen wahrscheinlich über AICD und den CD95-Todesrezeptor (Hughes et al., 2008; Hutcheson et al., 2008; Weant et al., 2008). Bei der Untersuchung transgener Mäuse mit spezifischer Deletion des CD95-Rezeptors in B-Zellen als auch in dendritischen Zellen zeigte sich, dass die selektive CD95-Deletion zu einer systemischen Autoimmunität in den Tieren führt, die unter anderem durch eine Akkumulation von Autoantikörpern gekennzeichnet ist (Stranges et al., 2007). Die Apoptose-Induktion über den CD95-Rezeptor ist somit auch essentiell an der Eliminierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) beteiligt (Abb. 6).

1.3. Apoptose-Regulation durch *FLICE-inhibitory Proteins (FLIP)*

An der Regulation der Apoptose sind eine Vielzahl pro- und antiapoptotischer Mediatoren beteiligt. Sie sind nicht nur für eine regulierte Aktivierung der unterschiedlichen apoptotischen Signalwege essentiell, sondern verhindern auch eine unkontrollierte, massive Induktion von Apoptose, die zu einer exzessiven Zerstörung von Zellen und Geweben führen könnte. Wichtige antiapoptotische Regulatoren sind die zellulären FLIP-Proteine (*cellular FLICE-inhibitory proteins*, c-FLIP), welche durch die Inhibition der Initiatorcaspasen am DISC schon früh in die Induktion des apoptotischen Programms eingreifen und so den Tod der Zelle verhindern können.

1.3.1 Strukturelle Aufbau der viralen und zellulären FLIP-Proteine

Auf der Suche nach DED-enthaltenden Proteinen, die mit Caspase-8 im DISC interagieren, wurden 1997 die viralen FLIP-Proteine (v-FLIP) identifiziert (Bertin et al., 1997; Hu et al., 1997a; Thome et al., 1997). Ihre Expression konnte bisher in einer Reihe von lymphotropen γ-Herpesviren wie dem Herpes-Saimiri Virus (HSV), dem Kaposi-Sarkom-assoziierten humanen Herpesvirus 8 (HHV-8), dem Epstein-Barr Virus sowie dem humanen Herpesvirus-4 (HHV-4) als auch in einer Reihe von Pockenviren wie dem *Molluscum contagiosum* Virus

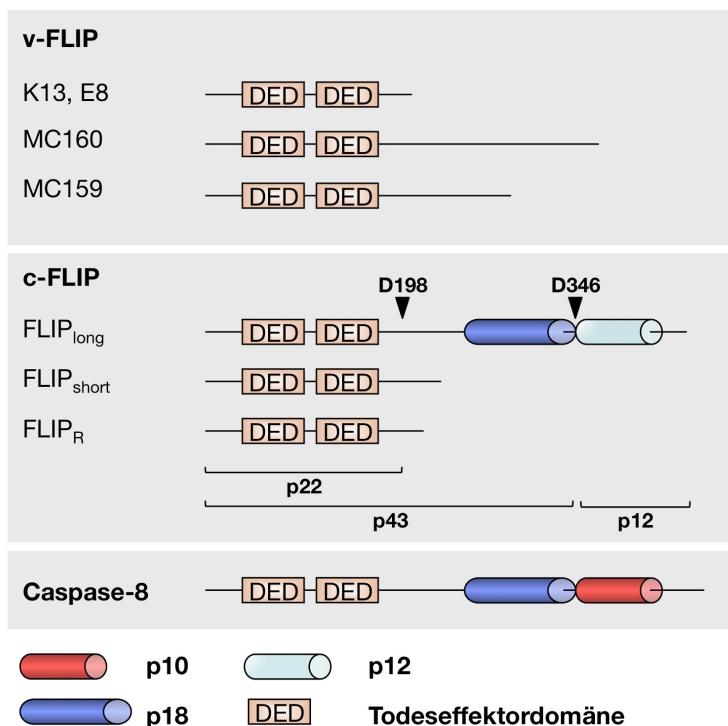


Abb. 7: Strukturelle Übersicht der viralen und zellulären FLIP-Proteine

Ähnlich wie Procaspsase-8 enthalten FLIP-Proteine zwei tandemartig angeordnete Todeseffektordomänen (DEDs), über die sie während der Apoptose in den DISC rekrutiert werden können. c-FLIP_{long} umfasst zusätzlich eine Caspase-ähnliche Domäne, die jedoch katalytisch inaktiv ist, während die kurzen c-FLIP-Isoformen jeweils eine verkürzte C-terminale Domäne von 20 bzw. 11 AS besitzen. Die Spaltung von c-FLIP_{long} an D346 führt zur Bildung von p43-FLIP und p12-FLIP. Alle FLIP-Isoformen können an D198 zu p22-FLIP prozessiert werden. p22- sowie p43-FLIP können vermutlich eine Aktivierung des NFκB-Signalweges durch die Rekrutierung von TRAFs oder des IKK-Komplexes unterstützen. MC159/MC160, E8 und K13: v-FLIPs von MCV, EHV2 und HHV8.

(MCV) detektiert werden. Nur wenig später wurden auch die zellulären FLIP-Homologe, die c-FLIPs, identifiziert, auch bekannt unter den Namen *caspase-homologue* (CASH), *caspase-eight-related protein* (Casper), *caspase-like apoptosis-regulatory protein* (CLARP), *FADD-like antiapoptotic molecule-1* (FLAME-1), *inhibitor of FLICE* (I-FLICE), *MACH-related inducer of toxicity* (MRIT) und Usurpin (Goltsev et al., 1997; Han et al., 1997; Hu et al., 1997b; Inohara et al., 1997; Irmler et al., 1997; Rasper et al., 1998; Shu et al., 1997; Srinivasula et al., 1997).

Besonders charakteristisch für zelluläre als auch virale FLIP-Proteine sind zwei tandemartig angeordnete Todeseffektordomänen (DEDs), ähnlich wie sie auch in Caspase-8 und -10 zu finden sind (Abb. 7). Das humane c-FLIP-Gen befindet sich auf Chromosom 2q33-34 in einem 200 kb-Cluster zusammen mit den Genen für Procaspsase-8 und -10, weshalb die Vermutung besteht, dass es durch Duplizierung entstanden ist (Irmler et al., 1997; Rasper et al., 1998). FLIP-prä-mRNAs können alternativ gespleißt werden. 11 Isoformen wurden bereits auf RNA-Ebene detektiert, jedoch nur drei konnten bisher auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden - die lange Caspase-8-ähnliche Isoform c-FLIP_{long} (55 kDa) sowie die beiden verkürzten Isoformen c-FLIP_{short} (26 kDa) und c-FLIP_R (25 kDa) (Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005; Irmler et al., 1997; Rasper et al., 1998; Shu et al., 1997). c-FLIP_{long} enthält neben seinen Tandem-DEDs noch eine Caspase-ähnliche Domäne. Auf Grund mehrerer Aminosäuresubstitutionen im zentralen QACxG-Motiv, wie zum Beispiel dem konservierten, katalytisch wichtigen Cystein-Rest, besitzt diese jedoch keine proteolytische Aktivität. Allerdings enthält sie eine Aspartatpaltstelle (D346) zwischen der kleinen und großen

Caspase-Untereinheit und kann daher proteolytisch durch Caspase-8 zu p43-FLIP und p12-FLIP gespalten werden (Irmler et al., 1997; Shu et al., 1997). Die verkürzten FLIP-Isoformen c-FLIP_{short} und c-FLIP_R weisen an Stelle der Caspase-ähnlichen Domäne jeweils eine kurze C-terminale Sequenz von 20 bzw. 11 Aminosäuren auf.

1.3.2. Apoptose-Inhibition durch FLIP-Proteine

Durch Überexpressionsanalysen mit viralen und zellulären FLIP-Proteinen in verschiedenen murinen und humanen Zelllinien wurde schnell deutlich, dass eine Hauptfunktion der FLIPs die Protektion der Zelle vor der Induktion apoptotischer Signalwege ist. Mittlerweile weiß man, dass FLIP-Proteine eine Apoptose-Induktion über die klassischen Todesrezeptorwege, wie CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 und -R2 sowie DR3, nicht jedoch über ionisierende Bestrahlung, Chemotherapeutika oder den Perforin/Granzym-Apoptoseweg blockieren können (Budd et al., 2006; Kataoka et al., 1998). Die Inhibition der Apoptose erfolgt dabei durch die Interaktion der FLIP-Proteine mit den Initiatorcaspasen im DISC und der daraus resultierenden Blockierung der proteolytischen Aktivierung der Caspasen (Scaffidi et al., 1999a).

Wie alle Caspasen wird auch Caspase-8 als inaktives Zymogen, bestehend aus einer kleinen und großen Untereinheit sowie einer N-terminalen Prodomäne, synthetisiert (Abb. 2). Auf Proteinebene können zwei alternativ gespleißte Procaspsase-8-Formen detektiert werden, eine Caspase-8a-Isoform (55 kDa) und eine um 15 Aminosäuren verkürzte Caspase-8b-Isoform (53 kDa) (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Während der Apoptose wird Procaspsase-8 über ihre beiden DEDs in den DISC rekrutiert und dort durch die Dimerisierung mit einem weiteren Procaspsase-8-Molekül aktiviert. Durch die anschließende proteolytische Prozessierung zum Caspase-8-Heterotetramer wird das aktive Enzym vermutlich zusätzlich stabilisiert (Boatright and Salvesen, 2003; Salvesen and Dixit, 1999). Die Spaltung der Procaspsase erfolgt in zwei Schritten (Abb. 8A). Der erste verläuft autokatalytisch und führt zur Freisetzung der kleinen p10-Untereinheit in das Cytoplasma, während ein p43- (im Fall der Caspase-8a-Isoform) oder p41-Intermediat (im Fall der Caspase-8b-Isoform) im DISC verbleibt. In einem zweiten Schritt wird durch die transkatalytische Prozessierung der Procaspsase-8-Homodimere untereinander eine Freisetzung der großen p18-Untereinheit vermittelt. Je zwei kleine und zwei große Untereinheiten bilden letztlich das aktive Enzym, welches nun distale Effektorcaspasen proteolytisch aktivieren und dadurch den Zelltod auslösen kann (Medema et al., 1997).

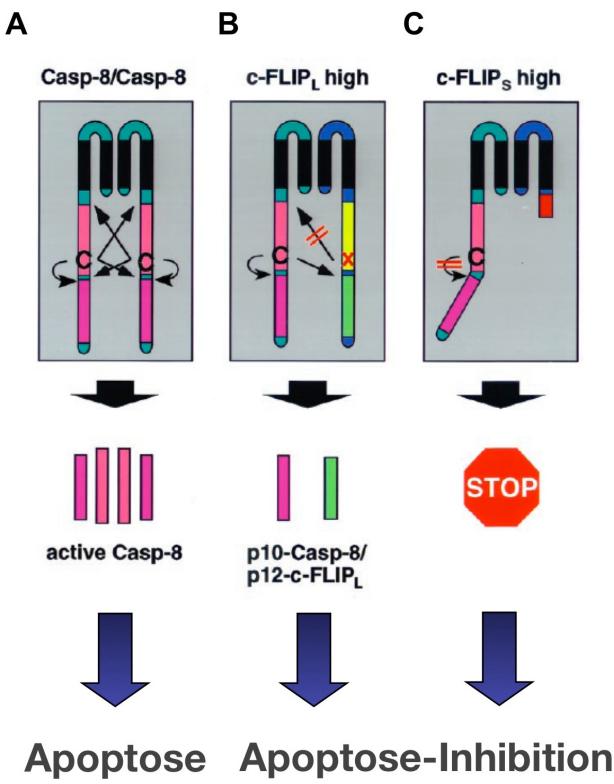


Abb. 8: Caspase-Inhibition durch FLIP im DISC (verändert nach Krueger et al., 2001a)

(A) Die auto- sowie transkatalytische Proteolyse im ProCaspase-8-Homodimer im DISC induziert die Freisetzung eines aktiven Caspase-8-Enzyms bestehend aus je zwei kleinen (p10) und großen (p18) Untereinheiten. (B) Hohe Konzentrationen an c-FLIP_{long} inhibieren den transkatalytischen Spaltungsschritt und verhindern die Bildung eines aktiven Enzyms. Die kleine Caspase-Untereinheit wird noch freigesetzt, ein p43/41-Intermediate verbleibt jedoch am DISC. c-FLIP_{long} selbst wird zu p43-FLIP gespalten und p12-FLIP in das Cytoplasma freigesetzt. (C) c-FLIP_{short} und c-FLIP_R verhindern sowohl die trans- als auch die autoproteolytische Spaltung von ProCaspase-8, da sie keine Caspase-ähnliche Domäne besitzen. Auf diese Weise kann keine aktive Caspase-8 gebildet werden und die Apoptose-Induktion in der Zelle über den Todesrezeptor ist blockiert.

FLIP-Proteine können eine Apoptose-Induktion verhindern, indem sie die proteolytische Aktivierung der Caspasen im DISC unterbinden (Budd et al., 2006). Über ihre DEDs können FLIP-Proteine durch die homophile Interaktion mit den Tandem-DEDs von Caspase-8 in den DISC rekrutiert werden. Im c-FLIP_{long}-ProCaspase-8-Heterodimer können noch eine autoproteolytische Spaltung von Caspase-8 und die Freisetzung der p10-Untereinheit erfolgen (Abb. 8B). Eine Transproteolyse der Caspase wird jedoch auf Grund der katalytisch inaktiven Caspase-Domäne von c-FLIP_{long} verhindert. Zwar wird das c-FLIP_{long} Molekül selbst noch an D346 zu p43-FLIP gespalten, eine vollständige Spaltung der Caspase wird jedoch unterbunden. Die Interaktion von c-FLIP_{short} oder c-FLIP_R mit ProCaspase-8 im DISC verhindert nicht nur den transkatalytischen sondern sogar schon den autoproteolytischen Spaltungsschritt, da selbst für die Autoproteolyse zumindest eine Caspase-ähnliche Domäne im Dimer vorliegen muss (Krueger et al., 2001b) (Abb. 8C).

Im Gegensatz zu den kurzen FLIP-Isoformen ist die Inhibition von Caspase-8 durch c-FLIP_{long} entscheidend von der Konzentration des FLIP-Proteins in der Zelle abhängig. Während stark erhöhte Konzentrationen an c-FLIP_{long} eine Apoptose-Induktion über den Todesrezeptorkomplex inhibieren, können geringe Konzentrationen an c-FLIP_{long} die Weiterleitung des apoptotischen Signals scheinbar sogar unterstützen (Chang et al., 2002; Dohrman et al., 2005; Han et al., 1997; Micheau et al., 2002; Shu et al., 1997). Die Heterodimerisierung von c-FLIP_{long} und ProCaspase-8 weist hierbei sogar eine kinetisch geringere Hemmung als die Caspase-8-Homodimerisierung auf (Boatright et al., 2004).

Inwieweit die Caspase-8-Aktivierung über c-FLIP_{long} jedoch eine physiologisch essentielle Rolle bei der Apoptose-Induktion über den Todesrezeptor spielt, ist noch unbekannt.

1.3.3. Funktion von FLIP in der Zellaktivierung und -proliferation

Überraschender Weise zeigen FLIP^{-/-}-Mäuse einen Phänotyp, der sehr stark dem Caspase-8- und FADD-defizienter Mäuse ähnelt - zweier Moleküle, die bis zu diesem Zeitpunkt mit Apoptose-Induktion nicht aber -Inhibition in Verbindung gebracht worden waren. FLIP- wie auch FADD- und Caspase-8-defiziente Mäuse sind embryonal letal und sterben *in utero* am Tag E10.5, 11.5 bzw. 12.5 der Embryonalentwicklung auf Grund von Herzinsuffizienz und inneren Blutungen (Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 2000; Yeh et al., 1998b; Zhang et al., 1998). Mutationen im Caspase-8-Gen im Menschen sind im Gegensatz zum Mausmodell nicht letal. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass Mäuse keine Caspase-8-verwandte Caspase-10 exprimieren, die das Fehlen von Caspase-8 zumindest teilweise kompensieren könnte (Reed et al., 2003). Im Menschen führen inaktivierende Mutationen von Caspase-8 jedoch erstaunlicher Weise nicht zu einer lymphoproliferativen Erkrankung, wie sie im Fall der ALPS-Patienten beobachtet werden kann. Stattdessen weisen CED-Patienten (caspase-8-deficiency state) eine starke Immunsuppression auf, die wahrscheinlich auf Defekte in der Lymphocyten-Aktivierung und -Proliferation zurückzuführen ist (Chun et al., 2002). Diese und weitere Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die DISC-Proteine FLIP, FADD und Caspase-8 neben der Apoptose-Regulation sehr wahrscheinlich noch an weiteren essentiellen Signalwegen der Zelle, wie der Zellaktivierung und -proliferation, beteiligt sind (Chau et al., 2005; Kang et al., 2004; Newton et al., 1998; Pellegrini et al., 2005; Salmena et al., 2003; Zhang et al., 1998).

FLIP-Proteine vermitteln eine Induktion der Zellproliferation und der Lymphocyten-Aktivierung vermutlich über die Aktivierung von NFκB (Krammer et al., 2007). Entscheidend hierbei sind unterschiedliche Spaltprodukte der FLIP-Isoformen, die wiederum ein Induktion des NFκB-Signalweges bewirken können. c-FLIP_{long} unterstützt nicht nur die autoproteolytische Prozessierung von Caspase-8, sondern wird auch selber von dieser zu p43- und p12-FLIP gespalten. Es konnte gezeigt werden, dass p43-FLIP mit TRAF2 (TNF-receptor associated factor 2) interagieren und über diese Interaktion eine Aktivierung von NFκB induzieren kann (Kataoka and Tschoopp, 2004). Zusätzlich zu der c-FLIP_{long} spezifischen Spaltposition D346 wurde eine weitere Caspase-Spaltstelle, D198, im FLIP-Molekül identifiziert, an der sowohl die lange als auch die kurzen FLIP-Isoformen prozessiert werden können (Golks et al., 2006) (Abb. 7). Die Spaltung von FLIP an D198 führt zur

Freisetzung eines kurzen, N-terminalen FLIP-Fragments, p22-FLIP, welches beide DEDs umfasst. Interessanterweise kann die Spaltung von FLIP zu p22 unabhängig zur Aktivierung des Todesrezeptorkomplexes erfolgen und wird nicht durch aktive Caspase-8, sondern durch das Proenzym, welches eine geringe intrinsische Proteolyseaktivität besitzt, im Cytoplasma induziert. p22 wiederum kann durch die direkte Interaktion mit IKK γ im I κ B-Kinase-Komplex eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges auslösen (Golks et al., 2006). Über NF κ B können nun antiapoptotische sowie proliferative Zielgene induziert werden, die eine Aktivierung und Proliferation der Zelle unterstützen können.

Im Zuge der Lymphocyten-Aktivierung über den T- oder B-Zell-Rezeptor induziert die Phosphorylierung des Adapterproteins Carma-1 die Assoziation von Malt-1 und Bcl-10 zum sogenannten CBM-Komplex (Carma-1, Bcl-10, Malt-1). Dieser kann die Aktivierung des IKK-Komplexes über die Rekrutierung von TRAF2 und TRAF6 und damit die Aktivierung von NF κ B vermitteln (Thome, 2008). Malt-1 ist eine Paracaspase, die ähnlich zu den Caspisen eine Protease-Domäne besitzt, allerdings nicht hinter sauren, sondern basischen oder ungeladenen Aminosäuren spaltet (Uren et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass Malt-1 mit Procaspsase-8 dimerisieren und auf Grund seiner Paracaspasen-Domäne eine reduzierte Aktivierung von Caspase-8 auslösen kann (Kawadler et al., 2008). Dies hat wiederum eine verminderte proteolytische Aktivierung von proapoptotischer Caspase-3 zur Folge. Die Prozessierung von c-FLIP_{long} zu p43 durch Caspase-8 ist jedoch nicht eingeschränkt und es wird vermutet, dass dies die NF κ B-Aktivierung noch verstärkt und hierdurch die Lymphocyten-Aktivierung unterstützt werden kann (Kawadler et al., 2008; Misra et al., 2007; Su et al., 2005). In der Tat sind transgene Mäuse mit einer spezifischen Deletion von FLIP oder Caspase-8 in T-Zellen immundefizient und zeigen eine Beeinträchtigung in der Lymphocyten-Aktivierung und -Proliferation (Chau et al., 2005; Salmena et al., 2003).

Ungeklärt ist, inwieweit FADD an der Funktion von Caspase-8 und FLIP im Zuge der Lymphocyten-Aktivierung beteiligt ist. FADD^{-/-}-T-Zellen als auch T-Zellen, die eine dominant-negative Form von FADD ohne Todeseffektor-Domäne exprimieren, weisen ebenfalls eine reduzierte Aktivierungs-induzierte Proliferation auf (Newton et al., 1998; Zhang et al., 1998). Essentiell für die proliferative Funktion von FADD ist vermutlich seine Phosphorylierung an S194. T-Zellen transgener Mäuse mit einer Mutation im entsprechenden murinen Serinrest (S191) zeigen ebenfalls Defekte in ihrer Proliferation, vermutlich da FADD in seiner phosphorylierten Form die G₀/G₁- oder G₂/M-Transition im Zellzyklus nach Aktivierung der Zellen vermittelt (Alappat et al., 2005; Alappat et al., 2003; Hua et al., 2003; Scaffidi et al., 2000; Zhang et al., 2001). Ob und inwieweit FADD mit Caspase-8 und FLIP hierbei synergistisch wirkt, ist jedoch noch unbekannt.

1.3.4. Apoptose-Regulation durch FLIP während der T-Zell-Immunantwort

Der apoptotische Zelltod ist ein essentieller Prozess zum Erhalt der Immunzellhomöostase und zum Schutz vor der Entstehung autoreaktiver Immunzellen. Durch die Beseitigung überflüssiger Immunzellen nach Beendigung einer Immunantwort als auch durch die Eliminierung aktiver Antigen-präsentierender Zellen (APCs) kann durch Apoptose eine Entstehung proinflammatorischer Autoimmunerkrankungen verhindert werden. FLIP-Proteine spielen sowohl bei der Apoptose-Regulation der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle.

Naive, periphere T-Zellen können im Zuge der adaptiven Immunantwort durch die Stimulation ihrer T-Zell-Rezeptoren (TCR) bei gleichzeitigem Erhalt eines costimulatorischen Signals aktiviert werden. Hierdurch werden mehrere intrazelluläre Signaltransduktionswege in der Zelle induziert, die letztendlich ihre Proliferation und Differenzierung zur T-Effektorzelle bewirken. Die Stimulation der T-Zelle über ihren TCR vermittelt unter anderem die Aktivierung der Phospholipase PLC γ 1, die das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu 1,4,5-Inositol-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP₃ kann wiederum an IP₃-Rezeptoren am ER binden und hierdurch einen Ausstrom von Calcium-Ionen (Ca²⁺) in das Cytoplasma der Zelle bewirken. Hierdurch wird zusätzlich eine Öffnung Plasmamembran-ständiger Calcium-Kanäle (*calcium-release-activated calcium channels*, CRAC) vermittelt (Macian, 2005). Durch den erhöhten Einstrom von Ca²⁺ aus intrazellulären Calcium-Speichern sowie aus dem extrazellulären Milieu wird so ein sehr starker, anhaltender Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration bewirkt. Dieses bindet nun an Calmodulin und kann im Komplex mit diesem die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (CaN) aktivieren. Durch die Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes wird in CaN eine Konformationsänderung induziert, die zur Befreiung der katalytischen von der autoinhibitorischen Domäne im heterodimeren CaN-Molekül führt (Shibasaki et al., 2002). Die aktive Phosphatase kann nun ihrerseits NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*)-Transkriptionsfaktoren dephosphorylieren und so aktivieren. Diese translozieren daraufhin in den Zellkern und können hier die Transkription zahlreicher für die T-Zellaktivierung und -Differenzierung essentieller Gene, wie z. B. von IL-2, induzieren (Macian, 2005). Weitere Signalwege, die während der T-Zellaktivierung induziert werden, sind der Ras-MAPK-Signalweg, über den eine Aktivierung des AP-1 (*activator protein 1*)-Heterodimers, bestehend aus c-Fos und c-Jun, vermittelt wird, welches oftmals als Transkriptionspartner von NFAT-Proteinen agiert (Hogan et al., 2003). Des Weiteren wird durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) eine Induktion des NF κ B-Signalweges induziert. Nach Aktivierung durchlaufen die T-Lymphocyten eine Phase der klonalen Expansion und die T-Helferzellen

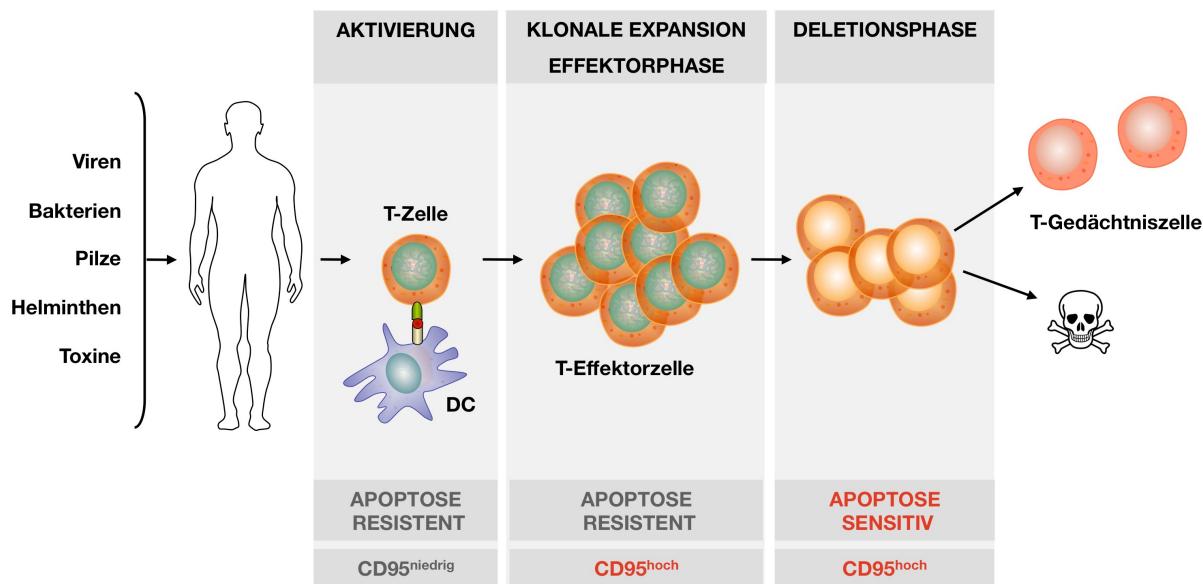


Abb. 9: Schematische Darstellung der T-Zell-vermittelten Immunität

Die Aktivierung peripherer T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (blau) wie Dendritische Zellen (DC) induziert ihre klonale Expansion und die Differenzierung von T-Helferzellen zu Th1- oder Th2-Zellen. Die T-Effektorzellen – cytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen - sind in diesem Stadium Apoptose-resistent, obwohl sie eine hohe Expression des CD95-Rezeptors als auch seines Liganden aufweisen. Nach Beendigung der Effektorphase und Bekämpfung der Infektion werden die meisten T-Zellen über Mechanismen wie den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) oder auf Grund des Fehlens essentieller Wachstums- und Überlebensfaktoren (ACAD) eliminiert. Sie zeigen nun einen IL-2-abhängigen Apoptose-sensitiven Phänotyp. Nur wenige Zellen bleiben Apoptose-resistent und überleben als langlebige Gedächtniszellen, die im Falle einer erneuten Infektion eine schnelle Reaktivierung der Immunantwort ermöglichen.

differenzieren, in Abhängigkeit des aktivierenden Signals, zu Th1- oder Th2-Zellen (T-Helferzellen des Subtyps 1 oder 2). Die T-Effektorzellen können nun durch die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, die Aktivierung von B-Zellen und phagocytierenden Makrophagen sowie die direkte Lyse Pathogen-infizierter Zellen zur Eindämmung und Beseitigung einer Infektion beitragen.

Die Aktivierung peripherer T-Zellen (*in vitro* auch als Kurzzeit-aktivierte T-Zelle bezeichnet) induziert in diesen eine Hochregulation des CD95-Todesrezeptors wie auch des Liganden auf ihrer Zelloberfläche (Krueger et al., 2003). Kurzzeit-aktivierte T-Zellen sind jedoch Apoptose-resistent, so dass sichergestellt werden kann, dass sie ihre Effektorfunktion während der Immunantwort erfüllen können und nicht schon vor Beseitigung der Infektion eliminiert werden (Abb. 9). Nach Beendigung ihrer Effektorfunktion (*in vitro* als Langzeit-aktivierte T-Zellen bezeichnet) werden sie jedoch sensitiv für Apoptose und können nun über den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) oder auf Grund des Entzugs essentieller Überlebens- und Wachstumsfaktoren (ACAD) beseitigt werden, um eine Entwicklung autoreaktiver T-Zellen zu verhindern. Nur wenige T-Zellen bleiben Apoptose-resistent und überleben als langlebige Gedächtniszellen, die später eine schnelle Reaktivierung der Immunantwort ermöglichen (Krammer et al., 2007). Die Sensitivierung aktiver T-Zellen ist

abhängig von Interleukin-2 (IL-2). IL-2 wirkt vermutlich nicht nur als wichtiger Wachstumsfaktor, sondern ist auch für einen Wechsel der T-Zellen von einem Typ-II-(Kurzzeit-aktivierte T-Zellen, geringe DISC-Bildung) zu einem Typ-I-Apoptose-Phänotyp (Langzeit-aktivierte T-Zellen, hohe DISC-Bildung) verantwortlich, der für die Sensitivierung der T-Effektorzellen essentiell zu sein scheint (Lenardo, 1991; Schmitz et al., 2003). IL-2- sowie IL-2R-defiziente Mäuse entwickeln fatale Autoimmunerkrankungen, gekennzeichnet vor allem durch die Akkumulation aktiverter, CD95-resistenter T-Lymphocyten (Kneitz et al., 1995; Sadlack et al., 1993; Suzuki et al., 1995; Van Parijs et al., 1997; Willerford et al., 1995).

Die Apoptose-Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen steht vermutlich in engem Zusammenhang mit der Expression antiapoptotischer Proteine, die eine Apoptose-Induktion vor Beendigung der Effektorphase unterdrücken können. Zentrale Regulatoren, die eine Apoptose-Induktion über den CD95-Rezeptor während der T-Zellaktivierung verhindern, sind vermutlich die zellulären FLIP-Proteine (Kirchhoff et al., 2000; Schmitz et al., 2004). FLIP-Proteine und im besonderen die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_{short} werden im Zuge der T-Zellaktivierung ebenfalls stark hochreguliert. Ihre Expression korreliert somit mit der Apoptose-Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen. Ein weiteres antiapoptotisches Protein, dessen Expression während der T-Zellaktivierung verstärkt wird, ist Bcl-x_L. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Kurzzeit-aktivierte T-Zellen durch die Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) für Apoptose sensitiviert werden können, wobei ein rapide Abnahme der c-FLIP_{short}- nicht jedoch der Bcl-x_L-Expression detektiert werden konnte (Schmitz et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass FLIP-Proteine und im besonderen die kurze Spleißvariante c-FLIP_{short} eine zentrale Rolle in der Apoptose-Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Zellen spielen.

1.3.5. Funktion von FLIP in der B-Zell-Immunantwort

Sowohl ALPS-Patienten als auch *lpr*- und *gld*-Mäuse zeigen nicht nur eine erhöhte Expansion an DNT-Zellen, sondern auch eine starke Akkumulation an Autoantikörpern (Bidere et al., 2005). *lpr*-Mäuse entwickeln zudem mit zunehmendem Alter mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit plasmacytoid B-Zell-Lymphome (Davidson et al., 1998). ALPS-Patienten besitzen ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung von non-Hodgkin's und Hodgkin's B-Zell-Lymphomen (Straus et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass die CD95-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion nicht nur eine entscheidende Rolle in der Regulation der T-Zell-Antwort, sondern auch in der B-Zell-Toleranz spielt.

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark und gelangen als naive, reife B220⁺ IgM⁺ IgD⁺ B-Zellen in die Peripherie. Hier zirkulieren sie durch das Blut sowie die sekundären lymphatischen Organe, wie die Lymphknoten und die Milz. Reife, periphere B-Zellen können über die Bindung von Antigenen an ihre Oberflächenrezeptoren (*B-cell receptor*, BCR) aktiviert werden. Einige Polysaccharid-Antigene können durch eine Kreuzvernetzung der BCRs eine direkte T-Zell-unabhängige Aktivierung von B-Zellen induzieren (LeBien and Tedder, 2008). Ein Großteil der B-Zellen (auch als follikuläre B-Zellen bezeichnet) befindet sich in den lymphoiden Follikeln der Milz und der Lymphknoten und wird hier mit Hilfe von CD4⁺ T-Helferzellen aktiviert. Die Bindung löslicher oder über Dendritische Zellen präsentierter Antigene an den BCR induziert eine Aufnahme derselben und ihre Präsentation über MHC-II-Moleküle. Die aktivierte B-Zelle wandert anschließend entlang von Chemokingradienten in die T-Zell-reichen Regionen des lymphatischen Gewebes. Th2-Zellen (T-Helferzellen des Typs 2), die durch dasselbe Antigen aktiviert worden sind, können hier durch die Interaktion mit dem MHC-Peptid-Komplex an die B-Zelle binden und diese durch die Aussendung costimulatorischer Signale aktivieren. Eines der wichtigsten costimulatorischen Signale ist die Interaktion des B-Zell-exprimierten TNF-Rezeptors CD40 mit seinem auf aktivierte T-Zellen exprimierten Liganden CD154. Hierdurch wird entweder eine direkte Entwicklung der Zellen zu extrafollikulären, kurzlebigen Plasmablasten induziert, die nur kurzweilig geringe Mengen an Antikörper produzieren, oder eine Migration der aktivierte B-Zellen in die primären Follikel ausgelöst, um die Bildung von sekundären Follikeln und den in ihnen enthaltenen Keimzentren (*germinal centres*, GC) zu initiieren (Klein and Dalla-Favera, 2008).

Die B-Zell-Keimzentren bilden sich innerhalb weniger Tage und erreichen ihre maximale Größe innerhalb von zwei Wochen. Ein cytologisch auffälliges Merkmal der GCs ist die Bildung von sogenannten hellen und dunklen Zonen (Abb. 10). In der dunklen Zone finden sich hauptsächlich dicht gepackte, stark proliferierende B-Lymphocyten, die Centroblasten, während die helle Zone aus kleineren, nur schwach proliferierenden B-Lymphocyten, den Centrocyten, sowie T-Lymphocyten und Follikulären Dendritischen Zellen (*follicular dendritic cells*, FDC) gebildet wird. Mittlerweile weiß man, dass follikuläre B-Zellen nach Aktivierung zu Centroblasten differenzieren und anschließend einen Prozess durchlaufen, der als Affinitätsreifung bezeichnet wird (Allen et al., 2007). Durch die Einführung somatischer Mutationen (*somatic hypermutation*, SHM) in der variablen, Antigen-bindenden Region des BCRs wird die Bildung hochaffiner Antikörper gefördert. Anschließend wandern die Zellen als Centrocyten in das FDC-Netzwerk der hellen GC-Zone ein, welches über Fc- oder Komplementrezeptoren Antigen-Antikörperkomplexe präsentieren kann (Park and Choi, 2005). B-Zellen, die auf Grund der SHM über hochaffine BCRs verfügen, können an diese

Immunkomplexe binden sowie selbst Antigene aufnehmen, um diese wiederum über MHC-II-Moleküle zu präsentieren. Sie kompetitieren nun mit weniger affinen B-Lymphocyten um die Bindung an CD4⁺ T-Helferzellen. B-Zellen, die einen hochaffinen Antigenrezeptor besitzen, können eine stabile Interaktion mit den T-Helferzellen eingehen und erhalten über diese Überlebens- und Differenzierungssignale (z. B. über die CD40-CD154-Interaktion). Geringe affine B-Zellen hingegen kehren entweder in die dunkle Zone zurück, wo sie eine weitere Mutationsrunde durchlaufen, oder werden direkt über Apoptose in der hellen oder dunklen Zone eliminiert und über Makrophagen (*tingible body macrophages*) beseitigt (Allen et al., 2007). Die positiv selektionierten Centrocyten differenzieren hingegen zu Antikörpers sezernierenden Plasmazellen oder zu langlebigen B-Gedächtniszellen. Plasmazellen können zusätzlich durch somatische Rekombinationen (*class-switch recombination*, CSR) einen Isotyp-Wechsel durchführen. Statt IgM oder IgD können sie nun verschiedene Antikörpersubtypen wie IgGs, IgAs oder IgEs sezernieren, wodurch die Effektorfunktion der

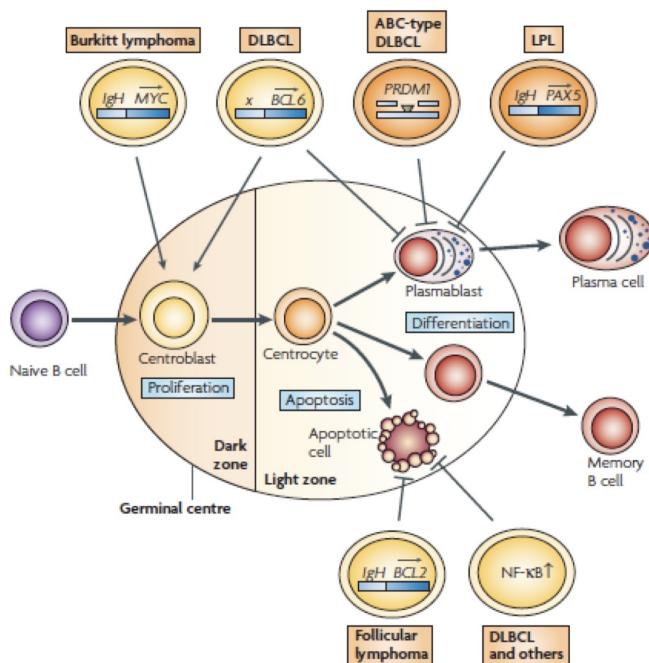


Abb. 10: Keimzentren und die Entstehung von B-Zell-Lymphomen (aus Klein and Dalla-Favera, 2008)

Keimzentren (*germinal centre, GC*) bestehen aus einer hellen und einer dunklen Zone. Naive B-Zellen differenzieren nach Aktivierung über spezifische Antigene zu stark proliferierenden Centroblasten. In der dunklen Zone des GCs werden durch somatische Hypermutationen (SHM) Punktmutation in die variablen, Antigen-bindenden Regionen des Immunglobulin-Rezeptors eingefügt. Die Centroblasten wandern anschließend in die helle Zone ein, wo sie zu Centrocyten differenzieren. Hier werden sie über die Bindung an Follikuläre Dendritische Zellen (FDC) und aktivierte CD4⁺ T-Helferzellen selektiert. Centrocyten mit hochaffinen Antigen-Rezeptoren differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen, während niedrig affine B-Zellen erneut in die dunkle Zone einwandern oder direkt über Apoptose eliminiert werden. Ein Teil der Centrocyten durchläuft während der Plasmazell-Differenzierung einen Isotyp-Wechsel (*class switch recombination*, CSR), wodurch sie veränderte Antikörper-Klassen sezernieren können. Deregulationen von Oncogenen (wie Bcl-2, c-Myc oder NF-κB) oder Tumorsuppressoren (wie PRDM1/Blimp-1) können zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen führen. Die Transformation der GC-B-Zellen wird dabei durch DNA-Schädigungen, die während der SHM und der CSR auftreten, noch unterstützt. DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, ABC-like DLBCL: Aktivierten B-Zellen ähnliches DLBCL, LPL: lymphoplasmocytisches Lymphom.

B-Zelle spezifisch auf das zu eliminierende Antigen angepasst wird (Klein and Dalla-Favera, 2008). Viele der langlebigen Plasmazellen wandern in das Knochenmark ein, wo sie mehrere Wochen oder sogar noch länger hochaffine Antikörper sezernieren können (Allen et al., 2007).

Studien mit *lpr*- und *gl*-Mausmodellen haben gezeigt, dass der CD95-Rezeptorsignalweg eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz besitzt und Defekte in der Signaltransduktion zu Autoimmunität und der Entwicklung von Lymphomen beitragen können (Bidere et al., 2005). Naive, reife B-Zellen exprimieren kaum CD95 auf ihrer Zelloberfläche. Dies ändert sich jedoch, ähnlich wie bei T-Lymphozyten, im Laufe ihrer Aktivierung. Die Stimulation des BCRs naiver B-Zellen, zum Beispiel durch anti-Immunglobulin Antikörper (anti-Ig) sowie die Costimulation der Zellen mit CD154 induzieren eine starke Hochregulation des CD95-Todesrezeptors (Mizuno et al., 2003). Die Aktivierung von B-Zellen über ihren Antigenrezeptor führt jedoch trotz verstärkter Todesrezeptorexpression nicht zu einer Sensitivierung der Zellen, da durch die gleichzeitig erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-x_L und FLIP, eine Apoptose-Induktion verhindert werden kann (Hennino et al., 2000; Koizumi et al., 1996; Schneider et al., 1997; Wang et al., 2000; Zhang et al., 1996). c-Rel-defiziente primäre murine B-Zellen sind jedoch nach BCR-Stimulation CD95-resistent, obwohl sie eine reduzierte Expression von Bcl-x_L aufweisen (Owyang et al., 2001). Daher wird vermutet, dass die Apoptose-Protektion aktivierter B-Zellen entscheidend über FLIP-Proteine reguliert wird (Budd et al., 2006; Mizuno et al., 2003). FLIP-Proteine spielen vermutlich auch eine zentrale Rolle in der Apoptose-Resistenz von GC-B-Zellen. CD154 sowie der Kontakt mit FDCs induzieren eine erhöhte FLIP-Expression in GC-B-Zellen und können diese vor einer spontanen Apoptose-Induktion schützen (Hennino et al., 2001; van Eijk et al., 2001). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von FLIP in B-Zellen *in vivo* zu einem Verbleib aktiver B-Zellen in den Keimzentren und einer erhöhten Produktion von Autoantikörpern führt (Van Parijs et al., 1999).

Murine Tumormodelle zeigen, dass eine erhöhte FLIP-Expression das Wachstum von Tumoren begünstigen und eine Eliminierung über das körpereigene Immunsystem unterdrücken kann (Djerbi et al., 1999; Medema et al., 1999). Humane primäre B-Zell-Vorläufer-ALL-Blasten (*B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia blasts*, BCP-ALL) weisen nach CD40-Stimulation eine stark erhöhte c-FLIP_{short}- und c-FLIP_R-Expression auf, die vermutlich entscheidenden Einfluss auf die Apoptose-Protektion der Zellen besitzt (Troeger et al., 2007). Primäre, maligne Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen (HRS-Zellen) zeigen ebenfalls eine abnorm erhöhte c-FLIP-Expression und aus HRS-Zellen generierte Zelllinien können durch eine Repression der FLIP-Proteinexpression gegenüber Apoptose sensitiviert

werden (Dutton et al., 2004; Mathas et al., 2004; Stagni et al., 2008; Thomas et al., 2002). In Non-Hodgkin-Lymphomen wie dem Burkitt-Lymphom korreliert eine erhöhte FLIP-Expression mit einer erhöhten Chemoresistenz des Tumors und damit einer schlechteren Überlebensprognose der Patienten (Tepper and Seldin, 1999; Valnet-Rabier et al., 2005). FLIP-Proteine sind somit nicht nur zentrale Regulatoren der T-Zell-Immunität, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Regulation der B-Zell-Antwort. Eine deregulierte FLIP-Expression kann somit wesentlich zur Entstehung von Autoimmunität und der Progression maligner Lymphome beitragen.

1.4. Pathogenese Follikulärer Lymphome

Eine Deregulation B-Zell-exprimierter Oncogene und Tumorsuppressoren sowie Defekte in der Selektion autoreaktiver B-Lymphocyten können zu der Entstehung schwerwiegender Immunerkrankungen, wie zum Beispiel SLE (*systemic lupus erythematosus*), und der Bildung bösartiger Lymphome führen. Ein Großteil der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) lässt sich vermutlich auf deregulierte GC-B-Zellen zurückführen (Klein and Dalla-Favera, 2008) (Abb. 10). B-NHLs weisen zumeist zwei unterschiedliche genetische Läsionen auf - chromosomal Translokationen oder aberrante SHMs (ASHM), die vermutlich im engen Zusammenhang mit Defekten in der Remodulierung des Immunglobulin-Repertoirs während des Rezeptor-Rearrangements im Knochenmark und der GC-Reifung stehen (Kuppers et al., 1999; Stevenson et al., 1998).

Follikuläre Lymphome (FL) sind eine der häufigsten Formen der B-NHL (de Jong, 2005). Kennzeichnend für FL sind vor allem wiederkehrende, starke Lymphknotenschwellungen (Lymphadenopathien); in späteren Stadien sind unter anderem auch der Gastrointestinaltrakt, die Milz und häufig auch das Knochenmark betroffen. Die mittlere Überlebensrate nach Diagnose liegt bei etwa 10 Jahren, variiert allerdings von 3 Jahren bei Patienten mit besonders aggressivem Verlauf bis zu über 15 Jahren bei milderem Krankheitsverlauf (de Jong, 2005).

Follikuläre Lymphome gleichen in ihrer Struktur den Keimzentren der sekundären Follikel. Cytologisch ähneln die Tumorzellen Centrocyten und Centroblasten und proliferieren in einem Netzwerk non-maligner FDCs und aktiver T-Zellen (Bende et al., 2007). In 90% der Fälle weisen FL die Translokation t(14;18)(q32;q21) auf, wodurch das Gen für das antiapoptotische Protein Bcl-2 von Chromosom 18 in den Immunglobulinlocus der schweren Antikörperkette (*immunglobulin heavy chain*, IgH) auf Chromosom 14 transloziert (Bakhshi et al., 1985; Cleary and Sklar, 1985; Tsujimoto et al., 1984). Hierdurch gelangt das

BCL-2 Gen unter den transkriptionellen Einfluss des starken IgH-Transkriptionsverstärkers (Ig-H *enhancer*), IgH-E μ , was zu einer exzessiven Expression des Gens und einer Apoptose-Protektion transformierter B-Zellen während der GC-Reifung führt (Abb. 10). Die t(14;18)(q32;q21)-Translokation im FL entsteht sehr wahrscheinlich durch Defekte im Rearrangement der variablen, Antigen-bindenden Region der schweren IgH während der B-Zellrezeptor-Bildung im Knochenmark (Raghavan et al., 2004). In etwa 10% der Fälle sind vermutlich alternative Mechanismen für die Transformation im FL verantwortlich, wie zum Beispiel die Translokation des Transkriptionsfaktors Bcl-6 in den IgH-Locus, wodurch ebenfalls eine Beendigung der GC-Differenzierung der Zellen verhindert wird (Klein and Dalla-Favera, 2008).

Sporadische t(14;18)-B-Zellen können auch ohne eine klinische Manifestation des FLs auftreten und weisen daraufhin, dass erst durch die Entwicklung weiterer, sekundärer genomischer Alterationen, wie Mutationen im p53- oder c-Myc-Signalweg, die Transformation zum FL erfolgt (Limpens et al., 1991; McDonnell et al., 1989; McDonnell and Korsmeyer, 1991). Die Transformation wird sehr wahrscheinlich durch die DNA-Veränderungen während der SHM und der CSR begünstigt, die auf Grund der ausbleibenden apoptotischen Selektion der Zellen beständig weiterlaufen können (Bende et al., 2007). Zusätzlich ist die Bildung transformierter GC-B-Zellen abhängig von der dynamischen Interaktion mit den aktivierte T-Zellen und dem FDC-Netzwerk des Keimzentrums, welche die Transformation der Zellen durch die Übersendung von Überlebens- und Proliferationssignalen (z. B. durch BAFF und IL-6) unterstützen (Park and Choi, 2005). Eine hohe Infiltration des transformierten Keimzentrums durch FDCs und aktivierte T-Zellen geht daher auch mit einer schlechteren FL-Prognose einher (de Jong, 2005). Auf Grund der Akkumulation zahlreicher genomischer Aberrationen werden die Zellen im Verlauf der Erkrankung immer unabhängiger von ihrer follikulären Umgebung. Diese verändert sich daher und die Lymphome entwickeln sich in späten Stadien zu autonomen, blastoiden Zellen, die morphologisch kaum noch vom DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) zu unterscheiden sind (Bende et al., 2007).

2. Zielsetzung

FLIP-Proteine sind essentielle Regulatoren der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Durch ihre Bindung an den Todesrezeptorkomplex können sie eine Aktivierung der Initiatorcaspasen und damit eine Induktion des apoptotischen Programms in der Zelle verhindern. Im Immunsystem können Defekte in apoptotischen Signalwegen schwerwiegende Auswirkungen auf die Immunzellhomöostase haben und eine Entwicklung von Lymphomen begünstigen. Während negative Defekte in der Apoptose-Induktion die Entstehung von Autoimmunität unterstützen, kann eine exzessive Apoptose hingegen zu einer Immundefizienz führen. Eine hohe FLIP-Expression findet sich vor allem in aktivierten Immunzellen, wie T- und B-Lymphocyten aber auch in Monocyten und Makrophagen. Es ist somit wahrscheinlich, dass FLIP-Proteine einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptose-Regulation von Immunzellen nehmen. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

- FLIP-Proteine werden nach Stimulation von Todesrezeptoren über die homophile Interaktion ihrer Todeseffektordomänen in den DISC rekrutiert und können so eine Apoptose-Induktion verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass die FLIP-Expression in einer Vielzahl von Tumoren erhöht ist und dass eine deregulierte FLIP-Expression eine Tumorprogression unterstützen kann. Ziel war es daher, durch eine strukturelle Analyse der FLIP-Proteine essentielle DISC-Bindemotive im Protein zu identifizieren, deren Inhibition eine DISC-Rekrutierung der FLIPs verhindern und damit eine Apoptose-Induktion erlauben – dies auch im Hinblick auf die mögliche Generierung hochspezifischer FLIP-Inhibitoren.
- Trotz einer hohen Expression des CD95-Todesrezeptors sind Kurzzeit-aktivierte T-Lymphocyten Apoptose-resistant. Nur so kann auch sichergestellt werden, dass sie ihre Effektorfunktion während der T-Zell-vermittelten Immunantwort auch wahrnehmen können. FLIP-Proteine und im Besonderen die kurze Spleißvariante c-FLIP_{short} werden im Zuge der T-Zellaktivierung stark hochreguliert, was die Vermutung nahelegt, dass sie eine wichtige Rolle in der Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Zellen spielen. Ausgangspunkt dieses Projektes waren daher zwei zentrale Fragestellungen: Erstens sollte untersucht werden, durch welche Signalwege die vor allem stark erhöhte c-FLIP_{short} Expression in aktivierten T-Zellen induziert wird. Zweitens sollte der Frage nachgegangen werden, in wieweit die verschiedenen FLIP-

Spleißvarianten unterschiedliche Funktionen in der Apoptose-Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Zellen besitzen.

- FLIP-prä-mRNAs werden alternativ gespleißt. Es existieren daher zahlreiche FLIP-Isoformen, von denen jedoch nur drei auch als funktionelles Protein exprimiert werden – c-FLIP_{long}, c-FLIP_{short} und c-FLIP_R. Während c-FLIP_{long} eine lange Caspase-ähnliche, katalytisch inaktive Domäne beinhaltet, unterscheiden sich die kurzen FLIP-Isoformen lediglich durch den Besitz einer kurzen C-terminalen Sequenz. Im Rahmen dieses Projektes sollte im genaueren das differentielle Spleißen der kurzen FLIP-Isoformen analysiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob etwaige funktionelle Unterschiede zwischen ihnen bestehen und ob eine deregulierte Expression der verschiedenen kurzen FLIP-Isoformen mit der vermehrten Entwicklung maligner Tumoren korreliert.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Mutationsanalysen von c-FLIP_R, der einzigen murinen kurzen FLIP-Isoform, offenbaren Voraussetzungen für die DISC-Rekrutierung

Mutational analyses of c-FLIP_R, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment

Nana Ueffing, Eric Keil, Christian Freund, Ronald Kühne, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz
Cell Death and Differentiation. 2008. Apr; 15(4): 773-782

Ergebnisse

FLIP-Proteine sind potente Inhibitoren der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose, da sie durch die Blockierung der Caspasen-Aktivierung im DISC eine Weiterleitung des apoptotischen Signals in die Zelle verhindern können. Ähnlich wie Caspase-8 und -10 besitzen sie zwei tandemartig angeordnete DEDs als charakteristisches Strukturmotiv, über die ihre Rekrutierung in den Todesrezeptorkomplex erfolgt. Ziel dieser Arbeit war es einerseits Strukturmotive in den zellulären FLIP-Proteinen zu identifizieren, die für ihre DISC-Rekrutierung und damit für ihr antiapoptotisches Potential essentiell sind. Andererseits sollte im genaueren die Bedeutung der Tandem-DEDs als auch der C-terminalen FLIP-Sequenz in den kurzen FLIP-Isoformen untersucht werden.

Im Menschen konnten bislang drei verschiedene FLIP-Spleißformen auf Proteinebene identifiziert werden – die lange FLIP-Isoform c-FLIP_{long} sowie die zwei kurzen Isoformen c-FLIP_{short} und c-FLIP_R. Über die Expression von FLIP-Proteinen in anderen Spezies, wie zum Beispiel der Maus, ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Zur Analyse der DISC-Rekrutierung und der Apoptose-Protektion durch murine FLIP-Proteine wurde daher die kurze FLIP-Isoform aus dem Thymus der Maus kloniert. Im Gegensatz zum Menschen sind bisher nur zwei unterschiedliche murine FLIP-Isoformen detektiert worden, die als c-FLIP_{long} und c-FLIP_{short} beschrieben worden sind. Sequenzanalysen mit den humanen FLIP-Isoformen ergaben jedoch überraschender Weise, dass es sich bei der hier klonierten, kurzen FLIP-Isoform um c-FLIP_R und nicht um c-FLIP_{short} handelt. Durch die Analyse der murinen und humanen *FLIP*-Genstruktur stellte sich im weiteren heraus, dass in der Maus gar keine c-FLIP_{short} Isoform generiert werden kann. Das humane *FLIP*-Gen umfasst 14 und das murine 10 Exons. Alle humanen c-FLIP-Isoformen werden ausgehend vom Translationsstart in Exon 3 und die murinen Isoformen ausgehend von Exon 2 translatiert.

Die mRNA der langen FLIP-Isoform umfasst im Menschen 10 Exons (Exon 1, 3, 4-6, 8-10, 12 und 14) und in der Maus sämtliche 10 Exons. Die mRNA der kurzen FLIP-Isoform c-FLIP_R wird generiert, wenn in der murinen FLIP-prä-mRNA Exon 5 nicht an Exon 6 und in der humanen FLIP-prä-mRNA Exon 6 nicht an Exon 7 gespleißt wird. Auf Grund eines Stop-Codons in dem jeweils nachfolgenden Intron kann daher die c-FLIP_R Isoform sowohl in der Maus als auch im Menschen exprimiert werden. Die humane c-FLIP_{short} mRNA wird hingegen durch das Spleißen von Exon 6 an Exon 7 gebildet und c-FLIP_{short} auf Grund eines Stop-Codons in Exon 7 generiert. Da im murinen *FLIP*-Gen jedoch ein homologes Exon zum humanen Exon 7 fehlt, kann in der Maus kein c-FLIP_{short} sondern nur die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_R exprimiert werden.

Humanes c-FLIP_R wurde formal zum ersten Mal 2001 von Djerbi *et. al.* in der humanen B-Zellline Raji beschrieben und später in einigen weiteren Tumorzelllinien, wie Boe^R und SKW6.4, sowie in humanen primären T-Zellen detektiert (Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005). Im Gegensatz zu c-FLIP_{short} ist über die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_R allerdings nur wenig bekannt. Aus diesem Grund sollte die Funktion von murinem c-FLIP_R genauer untersucht werden. Die stabile Überexpression von c-FLIP_R in der murinen B-Zelllinie A20 ergab, dass diese bei Stimulation des CD95-Todesrezeptors in den DISC rekrutiert wird und hierdurch die Zellen effektiv vor einer Apoptose-Induktion schützen kann. Murines c-FLIP_R kann somit ähnlich wie die humanen FLIP-Isoformen eine Weiterleitung des apoptotischen Signals am CD95-DISC verhindern.

Die kurzen c-FLIP-Isoformen c-FLIP_{short} und c-FLIP_R besitzen im Gegensatz zur langen Isoform c-FLIP_{long} keine katalytisch inaktive, Caspase-ähnliche Domäne, sondern eine kurze Isoform-spezifische C-terminale Sequenz. Poukkula *et. al.* konnten nachweisen, dass diese in c-FLIP_{short} für die hohe Instabilität des Proteins verantwortlich ist, vermutlich da sie die korrekte Positionierung der C-terminalen Lysine K192 und K195 vermittelt, deren Ubiquitinierung das Signal für die schnelle proteasomale Degradation der kurzen FLIP-Isoform darstellt (Poukkula et al., 2005). Die Deletion der spezifischen C-terminalen Sequenz in murinem c-FLIP_R (c-FLIP_R-ΔC) resultierte ebenfalls in einer stark erhöhten Stabilität des Proteins. Allerdings konnte bei Mutation der homologen Ubiquitin-Lysine im murinen c-FLIP_R Molekül (K196R/K200R) immer noch eine Ubiquitinierung des Proteins detektiert werden, die vergleichbar zum Ubiquitinierungsstatus von nicht-mutiertem c-FLIP_R war. Als weiterer Unterschied zu c-FLIP_{short} konnte beobachtet werden, dass die C-terminale Sequenz in c-FLIP_R auch Einfluss auf das antiapoptotische Potential des Proteins nimmt. Die stabile Überexpression von c-FLIP_R-ΔC in A20-Zellen führte, anders als erwartet, nicht zu einer gesteigerten Apoptose-Resistenz der Zellen. Stattdessen zeigten c-FLIP_R-ΔC

exprimierende Zellen mit einem vergleichbaren Expressionsniveau zu c-FLIP_R-exprimierenden Zellen bei Stimulation mit hohen Konzentrationen an CD95L eine höhere Apoptose-Sensitivität. DISC-Analysen ergaben im folgenden, dass C-terminal-trunkiertes c-FLIP_R bei einer Induktion des CD95-Todesrezeptors weniger effizient in den DISC rekrutiert wird. Durch die Analyse der subzellulären Lokalisation von c-FLIP_R-ΔC zeigte sich, dass die C-terminale Deletionsmutante im Gegensatz zum nativen Molekül nicht in punktartigen Strukturen im Cytoplasma der Zelle vorlag, sondern lange cytoplasmatische Filamente, sogenannte Todeseffektorfilamente (*death effector filaments*, DEF), ausbildete, die möglicherweise eine effiziente DISC-Rekrutierung von c-FLIP_R-ΔC während der Apoptose-Induktion verhindern.

Das strukturell auffälligste Merkmal der FLIP-Proteine sind ihre beiden tandemartig angeordneten DEDs, die ihnen ihre hohe Ähnlichkeit zu den Initiatorcaspasen-8 und -10 verleihen und essentiell für ihr antiapoptotisches Potential sind. DED-enthaltende Proteine wie die FLIP-Proteine gehören zusammen mit der DD (*death domain*)-, der CARD (*caspase-recruitment domain*) und der PYD (*pyrin domain*)-Subfamilie zur sogenannten DD-Superfamilie (Park et al., 2007b). Charakteristisch für die Mitglieder der DD-Superfamilie ist die gebündelte Anordnung von sechs antiparallelen α -Helices, die sich je nach Subfamilie – DD-, DED-, CARD- oder PYD-Subfamilie – in ihrer Länge und Ausrichtung voneinander unterscheiden. Durch die homophile Interaktion zwischen den α -helikalen Domänen der Mitglieder der DD-Subfamilien sind diese essentiell an der Bildung einer Vielzahl apoptotischer als auch inflammatorischer Multiproteinkomplexen beteiligt. Die DISC-Bildung im Zuge der CD95-vermittelten Apoptose wird über die Interaktion der intrazellulären DDs des oligomeren Todesrezeptors mit der C-terminalen DD des Adapterproteins FADD induziert (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). Zusätzlich besitzt FADD noch eine N-terminale DED, über die nun die Initiatorcaspasen in den DISC rekrutieren werden können (Kischkel et al., 2001; Muzio et al., 1996). Diese weisen, wie auch die FLIP-Proteine, nicht nur eine, sondern zwei hintereinander angeordnete DEDs auf. Im folgenden sollte daher der Frage nachgegangen werden, in wieweit beide DEDs im FLIP-Protein essentiell für dessen DISC-Rekrutierung sind oder ob die Tandem-DEDs lediglich eine unbedeutende Duplizierung des DED-Motives darstellen. Die Analyse verschiedener, in A20-Zellen stabil exprimierter DED-Deletionsmutanten ergab, dass, im Gegensatz zum Adapterprotein FADD, in der Tat beide DEDs in FLIP essentiell für die DISC-Rekrutierung und für das antiapoptotische Potential des Proteins sind. FLIP-Deletionsmutanten, die nur eine der beiden DEDs exprimierten, waren nicht mehr in der Lage, mit dem DISC zu interagieren und somit die Zelle vor einer Induktion der CD95-vermittelten Apoptose zu schützen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass beide DEDs kovalent verknüpft sein

müssen, da auch bei einer stabile Expression beider FLIP-DEDs gleichzeitig A20-Zellen nicht vor einer Apoptose-Induktion protektiert werden konnten.

Die meisten DED-Subfamilienmitglieder besitzen zwei DED-spezifische Protein-Interaktionsmotive, durch welche sie sich von den anderen Mitgliedern der DD-Superfamilie unterscheiden - ein spezifisches hydrophobes Motiv (*hydrophobic patch*) und eine sogenannte geladene Triade (*charged triad*), welche auch als E/D-RxDL-Motiv bezeichnet wird (Park et al., 2007b). Um zu untersuchen, ob bzw. welches dieser DED-Motive an der Assoziation von zellulären FLIP-Proteinen an den CD95-DISC beteiligt ist, wurde basierend auf der Kristallstruktur des viralen FLIP-Proteins MC159 ein strukturelles Modell für c-FLIP_R generiert (die Modellierung des c-FLIP_R-Modells erfolgte dank freundlicher Unterstützung durch Christian Freund und Ronald Kühne am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) (Li et al., 2005; Yang et al., 2005). Die strukturelle Analyse von c-FLIP_R ergab, dass zelluläre FLIP-Proteine sehr wahrscheinlich ähnlich wie die viralen FLIP-Proteine auf Grund einer extensiven hydrophoben Interaktionsfläche, die von den Helices 2 und 5 von DED1 und den Helices 1 und 4 von DED2 gebildet wird, eine sehr kompakte, hantelförmige Struktur besitzen. Ebenso konnte eine ähnliche Positionierung zweier hydrophober Motive (DED1: F28; DED2: F119, L120, Y124) als auch zweier geladener Triaden (DED1: E22, R69, D71; DED2: D113, D166, D168) in den DEDs von c-FLIP_R identifiziert werden.

Um zu untersuchen, welches der DED-Motive essentiell für die DISC-Rekrutierung und damit das antiapoptotische Potential zellulärer FLIP-Proteine ist, wurden basierend auf dem strukturellen c-FLIP-Modell mehrere FLIP-Mutanten generiert, die entweder im hydrophoben Motiv (DED1: F28G; DED2: F119G/L120G) oder der geladenen Triade (DED1: R69A/D71A; DED2: R166A/D168A) in der ersten bzw. zweiten DED mutiert sind, und diese stabil in A20-Zellen exprimiert. Die Mutation des hydrophoben Motivs in DED1 zeigte jedoch, im Gegensatz zur homologen Mutation in FADD (F25G) (Eberstadt et al., 1998), keinen Effekt hinsichtlich der DISC-Assoziation von c-FLIP_R. Ebenso konnten keine Unterschiede in der DISC-Affinität oder der Apoptose-Protektion bei Aminosäure-Mutationen in den geladenen Triaden in DED1 oder DED2 von c-FLIP_R detektiert werden. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen mit dem v-FLIP MC159, bei dem vergleichbare Mutationen in den geladenen Triaden (DED1: R69A/D71A; DED2: R166A/D168A) eine Apoptose-Protektion durch das Molekül verhinderten (Garvey et al., 2002b; Li et al., 2005; Yang et al., 2005). Die Manipulation des hydrophoben Motivs in DED2 von c-FLIP_R hingegen führte zu einem kompletten Verlust des antiapoptotischen Potentials des Proteins. DISC-Analysen ergaben im weiteren, dass c-FLIP_R, welches in seinem hydrophoben Motiv in DED2 mutiert ist, nicht mehr in den DISC rekrutiert wird und daher auch eine Weiterleitung des apoptotischen

Signals in die Zelle nicht mehr verhindern kann. Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation der FLIP-Mutante zeigte sich, dass diese diffus im Cytoplasma der Zelle verteilt war, was daraufhin deutet, dass durch die Veränderung des hydrophoben Motivs in DED2 nicht nur die DISC-Rekrutierung sondern auch eine Homooligomerisierung von c-FLIP_R vollständig unterbunden wird. Im Gegensatz zum viralen FLIP-Protein MC159 scheinen zelluläre FLIP-Proteine daher, ähnlich wie auch Caspase-8 (Yang et al., 2005), über ein spezifisches hydrophobes Motiv in der zweiten DED in den DISC rekrutiert zu werden. Dies lässt vermuten, dass c-FLIP-Proteine im Gegensatz zu v-FLIP-Proteinen kompetitiv zu den Initiatorcaspasen am DISC binden, während v-FLIPs sehr wahrscheinlich kooperativ mit dem DISC interagieren und hier eventuell eine Oligomerisierung von FADD verhindern (Garvey et al., 2002b; Li et al., 2005; Siegel et al., 1998; Yang et al., 2005). In der Tat konnte bei Coexpression von MC159 und FADD in NIH/3T3-Zellen eine Zerstörung der von FADD gebildeten DEFs beobachtet werden, während die DEF-Bildung hingegen durch die Coexpression von FADD und c-FLIP_R noch verstärkt wurde.

Diskussion

In multizellulären Organismen ist die Koordination von Zellproliferation und Zelltod ein physiologisch essentieller Prozess. Über Apoptose können sowohl überflüssige als auch potentiell schädigende Zellen selektiv entfernt werden, ohne dass eine proinflammatorische Immunantwort ausgelöst wird. Eine strikte Regulation der Apoptose ist jedoch auch entscheidend dafür, dass eine exzessive Zerstörung von Zellen und Geweben verhindert wird. FLIP-Proteine können schon sehr früh eine Induktion der apoptotischen Signaltransduktion blockieren, indem sie eine Aktivierung der Initiatorcaspasen am Todesrezeptor verhindern. Zur genaueren Untersuchungen der Mechanismen, über die zelluläre FLIP-Proteine in den DISC rekrutiert werden und eine Apoptose-Induktion am Todesrezeptor blockieren können, wurden im Rahmen dieser Arbeit strukturelle und funktionelle Analysen anhand der kurzen murinen FLIP-Isoform c-FLIP_R durchgeführt.

Überraschender Weise ergaben Sequenzanalysen mit der hier klonierten kurzen c-FLIP-Isoform aus dem Thymus der Maus, dass diese eine höhere Sequenzhomologie zu der humanen c-FLIP_R Isoform als zu humanem c-FLIP_{short} aufweist. Durch einen Vergleich der Exon-Intron-Struktur des murinen und humanen c-FLIP-Gens wurde deutlich, dass auf Grund des Fehlens eines homologen Exons zum humanen Exon 7 kein c-FLIP_{short} in der Maus generiert werden kann. Im Gegensatz zum Menschen kann in der Maus somit nur eine kurze c-FLIP-Isoform - c-FLIP_R - exprimiert werden.

Da über die Funktion muriner FLIP-Proteine bislang nur wenig bekannt ist, wurde als erstes untersucht, in wieweit murines c-FLIP_R eine Apoptose-Induktion über den CD95-DISC verhindern kann. Hierbei zeigte sich, dass c-FLIP_R bei Induktion des CD95-Todesrezeptors in den DISC rekrutiert wird und hier durch eine Blockierung der Procaspasen-Aktivierung eine Weiterleitung des apoptotischen Signals, ähnlich wie die humanen kurzen FLIP-Isoformen, effizient verhindern kann.

Humane FLIP-Proteine und im besonderen die kurzen FLIP-Isoformen zeichnen sich durch eine sehr hohe Instabilität aus (Golks et al., 2005; Schmitz et al., 2004). Je nach Stimulus werden sie zügig über den Ubiquitin-Proteasom Signalweg abgebaut und können so eine rasche Apoptose-Sensitivierung der Zelle begünstigen (Kim et al., 2002; Perez and White, 2003). Poukkula et. al. konnten nachweisen, dass die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_{short} in Abhängigkeit seines kurzen, spezifischen C-Terminus ubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert wird (Poukkula et al., 2005). Ebenso konnte auch eine schnelle proteasomale Degradation von murinem c-FLIP_R detektiert werden, wohingegen C-terminal deletiertes c-FLIP_R (c-FLIP_R-ΔC) eine erhöhte Proteinstabilität aufwies. Während Poukkula et. al. jedoch zeigen konnten, dass die Ubiquitin-vermittelte Degradation und die antiapoptotische Aktivität von c-FLIP_{short} funktionell und strukturell voneinander unabhängig sind, konnte beobachtet werden, dass die C-terminale Sequenz von c-FLIP_R nicht nur den schnellen proteasomalen Abbau, sondern auch die antiapoptotische Funktion des Proteins entscheidend beeinflusst. Die Deletion des c-FLIP_R spezifischen C-Terminus führte nicht nur zu einer erheblichen Stabilisierung, sondern auch zu einer verringerten Rekrutierung des FLIP-Proteins in den CD95-DISC, was möglicherweise auf die Retention von c-FLIP_R-ΔC in Todeseffektorfilamenten (DEF) zurückzuführen ist. DEFs sind lange cytoplasmatische Filamente, die bei der *in vitro* Expression DED-enthaltender Proteine wie Caspase-8 und FADD beobachtet werden können (Siegel et al., 1998). Unklar ist, in wieweit DEFs eine physiologische Relevanz besitzen, da sie bisher nur in Überexpressionsstudien beobachtet werden konnten. Nichtsdestotrotz zeigt die Bildung oligomerer Filamente, dass die Deletion der C-terminalen Sequenz in c-FLIP_R eine Oligomerisierung des verkürzten Proteins begünstigt und dadurch möglicherweise seine DISC-Affinität reduziert.

Ein weiterer Unterschied zu c-FLIP_{short}, der auf Grund der strukturellen Analyse von c-FLIP_R festgestellt werden konnte, ist die differentielle Ubiquitinierung der Ziellysine im Zuge der proteasomalen Degradation. In c-FLIP_{short} ist der C-Terminus vermutlich für die korrekte Positionierung der C-terminalen Ubiquitin-Ziellysine K192 und K195 verantwortlich (Poukkula et al., 2005). Die Mutation der entsprechenden Lysine (K196R/K200R) im murinen c-FLIP_R Molekül ergab jedoch keine Unterschiede im Ubiquitinierungsstatus im Vergleich zu

nicht-mutiertem c-FLIP_R, was darauf schließen lässt, dass dieses an anderen Ziellysinen als Signal für seine proteasomale Degradation ubiquitiniert wird. Interessanterweise konnten Poukkula *et. al.* bei Mutation der Ziellysine (K192R/K196R) in c-FLIP_{short} eine reduzierte Ubiquitinierung detektieren, die jedoch nicht mit einer erhöhten Proteinstabilität korrelierte (Poukkula et al., 2005). Es ist daher zu vermuten, dass die proteasomale Degradation von c-FLIP_{short} auch über die Ubiquitinierung anderer Lysine signalisiert werden kann. Da c-FLIP_R nicht an den C-terminalen Lysinen K196 und K200 ubiquitiniert wird, ist die kurze C-terminale Sequenz in c-FLIP_R vermutlich eher indirekt an der Ubiquitinierung des Proteins beteiligt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sie als Bindestelle für E3-Ubiquitinligasen agieren und so eine Ubiquitinierung der kurzen FLIP-Isoform begünstigen könnte. Chang *et. al.* konnten nachweisen, dass c-FLIP_{long} über seine Caspase-ähnliche Domäne mit der E3-Ubiquitinligase Itch interagieren kann, welche wiederum die Polyubiquitinierung und anschließende proteasomale Degradation der langen FLIP-Isoform initiiert (Chang et al., 2006). Itch bindet jedoch nicht an c-FLIP_{short}, so dass eine Interaktion mit c-FLIP_R auf Grund der hohen strukturellen Homologie der kurzen FLIP-Isoformen eher unwahrscheinlich ist. Wie genau der C-Terminus in c-FLIP_R daher die Ubiquitinierung und damit den schnellen proteasomalen Abbau des Proteins unterstützt, bleibt somit noch herauszufinden.

FLIP-Proteine besitzen zwei charakteristische tandemartig angeordnete DEDs. Durch die homophile Interaktion mit dem Adapterprotein FADD ermöglichen diese die DISC-Rekrutierung der FLIP-Proteine und sind damit für ihr antiapoptotisches Potential essentiell (Kataoka, 2005). FADD weist hingegen nur eine DED auf, über welche die Assoziation der Initiatorcaspasen an den DISC vermittelt wird (Kischkel et al., 2001; Muzio et al., 1996). Im Rahmen der Arbeit sollte daher untersucht werden, in wieweit beide DEDs für eine effiziente Interaktion zellulärer FLIP-Proteine mit dem CD95-DISC essentiell sind oder ob eine DISC-Assoziation schon durch eine DED allein vermittelt werden kann. DISC-Analysen mit FLIP-Deletionsmutanten, die nur die erste oder zweite DED exprimieren, ergaben, dass in der Tat beide DEDs entscheidend für eine Interaktion von c-FLIP_R mit dem CD95-DISC sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine kovalente Verlinkung der beiden DEDs eine Voraussetzung für die DISC-Rekrutierung von c-FLIP_R ist. Durch die Modellierung der murinen c-FLIP_R Struktur basierend auf der Kristallstruktur des viralen FLIP-Proteins MC159 zeigte sich, dass die c-FLIP-DEDs ähnlich wie bei den v-FLIP-Proteinen über eine breite hydrophobe Interaktionsfläche fest miteinander verbunden sind und somit eine sehr kompakte Struktur aufweisen (Li et al., 2005; Yang et al., 2005). Die Deletion einer der beiden Todeseffektorodomänen oder das Auflösen der kovalenten Verknüpfung zwischen ihnen führt daher sehr wahrscheinlich zu einer kompletten Zerstörung der kompakten c-FLIP-Struktur und verhindert so eine Assoziation des Moleküls an den DISC. Ein ähnlicher

Effekt konnte auch bei Analysen mit MC159 beobachtet werden, welches bei Expression der einzelnen DEDs auch keine Apoptose-Protektion mehr vermitteln konnte (Garvey et al., 2002a). Interessanterweise waren die einzelnen DEDs von MC159 jedoch immer noch in der Lage, mit FADD zu interagieren, was bereits auf einen unterschiedlichen Mechanismus in der DISC-Assoziation von viralen und zellulären FLIP-Proteinen hindeutet.

MC159 ist ein virales FLIP-Protein, welches vom humanen Pockenvirus *Molluscum contagiosum* Virus (MCV) exprimiert wird (Bertin et al., 1997; Thome et al., 1997). MCV ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, welches hauptsächlich epidermale Keratinocyten infiziert und hier die Bildung benigner Hautknötchen verursacht (Meinl et al., 1998). In immunsupprimierten Patienten kann eine MCV-Infektion jedoch zu schweren Hautläsionen führen. MC159 unterstützt die Virulenz des Virus vermutlich, indem es eine Apoptose-Induktion über Todesrezeptoren in infizierten Zellen verhindert (Bertin et al., 1997; Thome et al., 1997). Die Analyse des Strukturmodells von c-FLIP_R, basierend auf der Kristallstruktur von MC159, ergab, dass dieses, ähnlich wie das virale FLIP-Protein, vier DED-spezifische Proteininteraktionsmotive aufweist – zwei hydrophobe Motive und zwei geladene Triaden (Li et al., 2005; Yang et al., 2005). Für MC159 konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die geladene Triade in DED1 als auch in DED2 essentiell für die Rekrutierung des Proteins in den Todesrezeptorkomplex ist (Garvey et al., 2002b; Li et al., 2005; Yang et al., 2005). DISC-Analysen mit in diesen Motiven mutiertem c-FLIP_R konnten dies jedoch nicht für das zelluläre FLIP-Protein bestätigen. Mutationen in der geladenen Triade in DED1 (R69A/D71A) oder DED2 (R166A/D168A) führten nicht zu einer verminderten DISC-Rekrutierung von c-FLIP_R bei Induktion des CD95-Todesrezeptors. Gleichzeitig konnte nur eine minimal erhöhte Apoptose-Sensitivierung der Zellen detektiert werden, die eventuell darauf zurückzuführen ist, dass die geladenen Triaden auf Grund der Ausbildung eines weiten Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen an der Stabilisierung der DED-Faltung beteiligt sind (Carrington et al., 2006; Yang et al., 2005).

Strukturelle Analysen mit dem DISC-Adapterprotein FADD haben gezeigt, dass dieses ebenfalls zwei spezifische hydrophobe Motive in seiner DED besitzt (Eberstadt et al., 1998). Durch die Mutation eines dieser Motive (F25G) konnte eine Bindung von Caspase-8 an FADD vollständig verhindert und Zellen hierdurch vor einer Apoptose-Induktion geschützt werden (Eberstadt et al., 1998). Da das entsprechende hydrophobe Motiv in der DED1 von c-FLIP_R mitten in der hydrophoben Interaktionsfläche der beiden Tandem-DEDs lokalisiert und somit relativ unzugänglich für eine Interaktion mit anderen DISC-Proteinen ist, ist eine Funktion dieses Motivs in der DISC-Assoziation eher unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz war anzunehmen, dass durch die Mutation dieses zentralen Motivs eine Störung der kompakten DED-Struktur und damit auch Effekte auf die antiapoptotischen Fähigkeiten von

c-FLIP_R zu erwarten sind. Die Mutation des homologen Aminosäurenrestes (F28G) im hydrophoben Motiv in DED1 von c-FLIP_R ergab jedoch keine erhöhte Apoptose-Sensitivierung der Zellen. Ebenso konnte immer noch eine effiziente Rekrutierung von F28G-c-FLIP_R in den CD95-DISC detektiert werden. Dies bestätigt die extrem feste Packung der Tandem-DEDs und zeigt, dass das hydrophobe Motiv in der ersten DED von c-FLIP_R im Gegensatz zu FADD nicht essentiell für die DISC-Assoziation des FLIP-Proteins ist.

c-FLIP_R weist in seiner zweiten DED ebenfalls ein hydrophobes Motiv auf, welches jedoch im Gegensatz zum hydrophoben Motiv in DED1 auf der Oberfläche des Moleküls lokalisiert und somit gut zugänglich für die Interaktion mit anderen DISC-Proteinen ist. Durch die Mutation dieses Motives (F119G/L120G) konnte eine DISC-Rekrutierung von c-FLIP_R vollständig unterbunden werden. Daher konnten Zellen, die diese FLIP-Mutante stabil exprimierten auch nicht mehr vor einer Apoptose-Induktion geschützt werden. Dies zeigt somit, dass im Gegensatz zu dem viralen FLIP-Protein MC159 zelluläre FLIP-Proteine über ein hydrophobes Motiv in ihrer zweiten DED in den DISC rekrutiert werden.

Interessanterweise ist die geladene Triade in der zweiten DED von Caspase-8 stark verändert und beide DEDs von Caspase-10 weisen gar keine E/D-RxDL-Motiv auf (Yang et al., 2005). Eine Funktion der geladenen Triade für die DISC-Rekrutierung der Initiatorcaspasen ist daher eher unwahrscheinlich. In der Tat konnten Yang et. al. nachweisen, dass Caspase-8 auch über ein hydrophobes Motiv in seiner zweiten DED in den DISC rekrutiert wird (Yang et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass zelluläre FLIP-Proteine mit Caspase-8 um eine FADD-Interaktion im DISC kompetitieren. Die Verwendung anderer Proteininteraktionsmotive von c-FLIP_R und MC159 zur DISC-Interaktion zeigt hingegen, dass der Apoptose-Inhibitionsmechanismus von zellulären und viralen FLIP-Proteinen stark voneinander abweicht. Es wird vermutet, dass virale FLIP-Proteine wie MC159 daher nicht mit Caspase-8 am DISC kompetitieren, sondern eine Oligomerisierung von FADD während der Apoptose-Induktion verhindern (Li et al., 2005; Siegel et al., 1998; Yang et al., 2005). FADD zeigt *in vitro* ebenfalls eine extensive Aggregation in DEFs über seine DED und es wird angenommen, dass hierdurch eine Stabilisierung des DISCs und eine vermehrte Aktivierung der Initiatorcaspasen am Todesrezeptor vermittelt wird (Eberstadt et al., 1998; Siegel et al., 1998). Diese Annahme wird unter anderem durch die Beobachtung unterstützt, dass FADD-Mutanten, die keine DED mehr besitzen, trotz ihrer noch vorhandenen DD nur noch mit sehr geringer Affinität an den Todesrezeptor binden können (Carrington et al., 2006; Sandu et al., 2006). Vermutlich aggregiert FADD über das hydrophobe Motiv in seiner DED, welches auch für die Interaktion mit Caspase-8 verantwortlich ist, obwohl auch eine FADD-FADD-Interaktion über die geladene Triade in der FADD-DED diskutiert wird (Carrington et al., 2006; Muppidi et al., 2006; Sandu et al.,

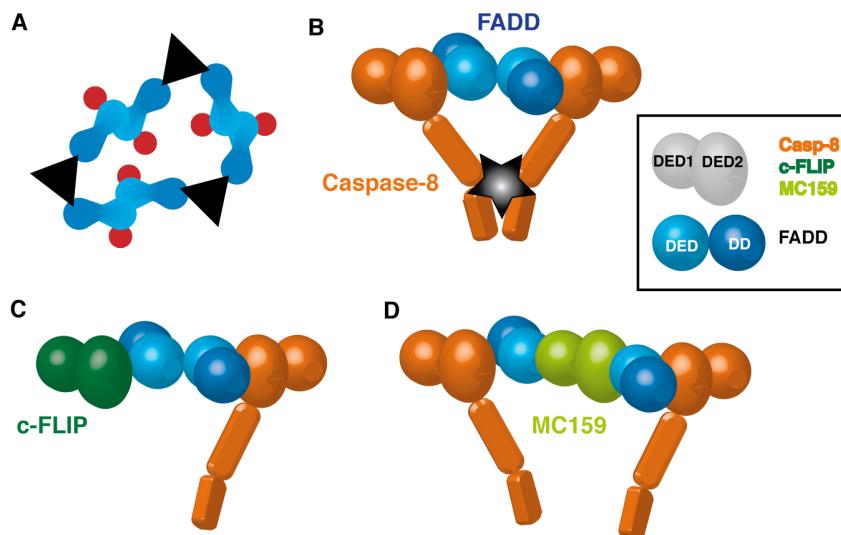


Abb. 11: Modell der Caspase-8-Aktivierung und -Inhibition durch c-FLIP_R und MC159 im DISC

(A) Die Bindung des spezifischen oligomeren Liganden an den CD95-Rezeptor induziert dessen Trimerisierung (schwarzes Dreieck). Über die cytoplasmatischen Todesdomänen (DD) der Todesrezeptoren kann nun das Adapterprotein FADD über seine C-terminale DD (dunkelblau) an den Rezeptorkomplex rekrutiert werden und vermutlich seinerseits über seine N-terminale Todeseffektordomäne (DED, hellblau) mit einem weiteren FADD-Molekül interagieren. Hochmolekulare DISC-Cluster sind nun als sogenannte SPOTS (*signaling protein oligomerization transduction structures*) mikroskopisch erkennbar (Aufsicht). Procaspase-8 (orange) assoziiert durch die homophile Interaktion seiner DEDs mit FADD an den DISC. (B) Die Dimerisierung zweier Procaspase-8-Moleküle im DISC bewirkt ihre Aktivierung und Spaltung zum heterotetrameren Enzym (als schwarzer Stern dargestellt). Dieses kann nun durch die Spaltung von Effektorcaspasen im Cytoplasma der Zelle die apoptotische Signalkaskade in der Zelle induzieren. (C) c-FLIP_R (dunkelgrün) kompetitiviert sehr wahrscheinlich um die FADD-Bindung mit Procaspase-8 im DISC. c-FLIP_R-Procaspase-8-Heterodimere sind katalytisch inaktiv. Die Procaspase wird nicht gespalten und es wird kein apoptotisches Signal in die Zelle weitergeleitet. (D) MC159 (hellgrün) verhindert durch seine Interaktion mit FADD eine FADD-Oligomerisierung. Procaspase-8 wird zwar immer noch in den DISC rekrutiert, die Caspase-Moleküle sind jedoch vermutlich zu weit voneinander entfernt, um aktiviert zu werden. Daher wird eine Auslösung der apoptotischen Signalkaskade ebenfalls unterbunden.

2006). Bei Coexpression von MC159 und FADD konnte eine Unterdrückung der FADD-DEF-Bildung durch die Expression von MC159 detektiert werden, während diese durch die Coexpression mit c-FLIP_R eher noch verstärkt wurde. Dies unterstreicht, dass MC159 vermutlich eine Oligomerisierung von FADD verhindern kann, während zelluläre FLIP-Proteine wahrscheinlich nicht eine Aggregation von FADD am DISC blockieren, sondern mit den Initiatorcaspasen um eine Bindung am DISC kompetitieren (Abb. 11).

Zelluläre FLIP-Proteine werden in zahlreichen Tumoren überexprimiert und können eine Tumorprogression substantiell unterstützen (Kataoka, 2005; Yang, 2008). FLIP-Proteine bieten daher ein attraktives Ziel in der Entwicklung von Krebstherapeutika (Yang, 2008). Die Identifizierung des Bindemotivs, welches für eine DISC-Rekrutierung der zellulären FLIP-Proteine verantwortlich ist und damit eine Apoptose-Inhibition durch zelluläre FLIP-Proteine überhaupt erst ermöglicht, könnte daher in Zukunft eine wichtige Grundlage in der Entwicklung c-FLIP-spezifischer Inhibitoren darstellen.

3.2. Die Hochregulation von c-FLIP_{short} durch NFAT unterstützt die Apoptose-Resistenz Kurzzeit-aktivierter T-Zellen

Up-regulation of c-FLIP_{short} by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells

Nana Ueffing, Marc Schuster, Eric Keil, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz
Blood. 2008. Aug 1; 112(3): 690-8

Ergebnisse

Naive T-Zellen können über die Bindung spezifischer Antigen-MHC-Komplexe aktiviert werden. Dies induziert sowohl eine klonale Expansion der Zellen als auch die Differenzierung der T-Helferzellen in die T-Helferzell-Subtypen Th1 und Th2. Diese können nun zusammen mit den cytotoxischen T-Zellen durch die direkte Lyse infizierter Zellen und durch die Aktivierung der humoralen Immunität eine Infektion bekämpfen. Eine Voraussetzung für die Wahrnehmung ihrer Effektorfunktion ist eine erhöhte Apoptose-Resistenz, da ihre Aktivierung auch eine starke Zunahme in der Oberflächenexpression des CD95-Todesrezeptors als auch seines Liganden, CD95L, induziert (Krammer et al., 2007). Die Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Zellen korreliert auch mit einer vermehrten Expression antiapoptotischer Proteine wie den FLIP-Proteinen, die vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf deren Apoptose-Sensitivität nehmen (Kirchhoff et al., 2000; Schmitz et al., 2004). Zur genaueren Analyse der Funktion von FLIP-Proteinen in Kurzzeit-aktivierten T-Lymphocyten sollten auf der einen Seite Signalwege identifiziert werden, die an der starken Hochregulation von FLIP-Proteinen und vor allem der kurzen FLIP-Isoform c-FLIP_{short} während der T-Zellaktivierung beteiligt sind. Zum anderen sollte durch eine gezielte Manipulation der FLIP-Expression ihre Bedeutung für die Apoptose-Protektion während der initialen T-Zell-Immunantwort untersucht werden.

Zur *in vitro* Analyse der FLIP-Expression in aktivierten T-Zellen wurden periphere primäre humane T-Zellen eingesetzt, die entweder mit dem Phytohämagglutinin PHA-L oder mit anti-CD3 stimuliert wurden. PHA ist ein Lektin, über welches eine Kreuzvernetzung der T-Zell-Rezeptoren und damit eine Aktivierung der Zellen induziert werden kann. Anti-CD3 hingegen kann durch die Bindung an die akzessorischen CD3-Rezeptoren eine T-Zell-Aktivierung vermitteln. Nach *in vitro* Aktivierung naiver humaner T-Zellen konnte in der Tat eine transiente, stark erhöhte Expression der kurzen FLIP-Isoform c-FLIP_{short} in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen (d1) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte eine konstitutive Expression von c-FLIP_{long} beobachtet werden, die durch die Aktivierung nur schwach

verstärkt wurde. Interessanterweise induzierte die T-Zellaktivierung allerdings zusätzlich eine Spaltung von c-FLIP_{long} zu p43-FLIP.

Die starke Hochregulation von c-FLIP_{short} im Zuge der T-Zellaktivierung legt die Vermutung nahe, dass im besonderen diese FLIP-Isoform an der Apoptose-Protektion von Kurzzeit-aktivierten T-Lymphocyten beteiligt ist. Um mögliche Signalwege zu identifizieren, die für die Induktion der c-FLIP_{short} Expression verantwortlich sind, wurde der Einfluss mehrerer pharmakologischer Inhibitoren auf die FLIP-Proteinexpression untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese weder durch eine Blockierung der MAPK p38 und JNK oder der MAPKK Mek1 noch durch die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges beeinflusst werden konnte. Stattdessen konnte eine starke Abnahme der c-FLIP_{short} Expression nach Behandlung der Zellen mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) beobachtet werden.

Calcineurin (CaN) ist eine heterodimere Serin-Threonin-Phosphatase, die in Abhängigkeit der Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels im Zuge der T-Zellaktivierung über einen Komplex aus Ca²⁺ und Calmodulin aktiviert wird (Shibasaki et al., 2002). Aktives CaN kann nun seinerseits NFAT-Transkriptionsfaktoren dephosphorylieren. Dadurch wird in diesen ein Zellkern-Lokalisationssignalmotiv (*nuclear localization signal*, NLS) zugänglich, welches eine Translokation der NFATs in den Kern vermittelt. Hier können diese nun die Transkription zahlreicher Gene, wie zum Beispiel von IL-2, induzieren (Macian, 2005). Die durch die T-Zellaktivierung vermittelte Aktivierung von CaN kann effizient über CsA verhindert werden. CsA ist ein cyclisches Oligopeptid, welches zusammen mit der cytosolischen Peptidylprolylisomerase Cyclophilin A an die regulatorische Untereinheit von CaN binden kann, wodurch die katalytische Domäne des Enzyms verdeckt und dieses inaktiviert wird (Huai et al., 2002; Lee and Park, 2006). NFAT verbleibt dadurch im Cytosol und eine Induktion der Zielgene wird somit unterbunden. Eine Regulation der c-FLIP_{short} Expression über den CaN-NFAT-Signaltransduktionsweg konnte durch die Behandlung aktiver T-Zellen mit weiteren CaN- bzw. NFAT-Inhibitoren, wie FK506 und VIVIT-Peptiden, sowie dem NFAT/NFκB-Inhibitor Rocaglamid bestätigt werden. Ähnlich wie CsA interagiert auch FK506 mit einer Peptidylprolylisomerase, FKBP-12 (*FK506-binding protein-12*), und kann durch eine sterische Blockierung der katalytischen Untereinheit die Aktivität von CaN hemmen (Griffith et al., 1995; Kissinger et al., 1995). NFAT-Transkriptionsfaktoren interagieren mit CaN über ein konserviertes N-terminales Bindemotiv, PxIxIT (Aramburu et al., 1998; Garcia-Cozar et al., 1998). Synthetische VIVIT-Peptide wurden mit Hilfe einer kombinatorischen Peptidbibliothek auf Grund ihrer hohen Affinität für die Bindung an die katalytische Domäne von CaN selektiert (Aramburu et al., 1999). Zell-permeable VIVIT-Peptide können daher durch die kompetitive Interaktion mit dem NFAT-Bindemotiv an CaN eine NFAT-

Dephosphorylierung in Zellen inhibieren, ohne jedoch die generelle Phosphataseaktivität von CaN zu unterdrücken (Noguchi et al., 2004; Takeuchi et al., 2007). Rocaglamid inhibiert sowohl eine NFAT-vermittelte Gen-Transkription als auch eine Aktivierung von NF κ B, wobei der genaue molekulare Mechanismus noch unbekannt ist (Baumann et al., 2002; Proksch et al., 2005). Im Fall von NFAT vermittelt Rocaglamid möglicherweise durch eine erhöhte Aktivierung der MAPK p38 und JNK eine Phosphorylierung der NFATs und damit ihre Retention im Cytoplasma (Proksch et al., 2005). Interessanter Weise konnte nach Behandlung der Zellen mit Rocaglamid auch eine Reduktion der c-FLIP_{long} Expression beobachtet werden, was vermutlich auf die zusätzliche Inhibition der NF κ B-Aktivierung zurückzuführen ist.

Die Annahme, dass die erhöhte c-FLIP_{short} Expression in aktivierten T-Zellen über NFAT-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, konnte durch quantitative *realtime*-PCR-Analysen unterstützt werden, die ergaben, dass die c-FLIP_{short} Induktion in der Tat auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Über Promotoranalysen konnten drei mögliche NFAT-Bindungsstellen im humanen *FLIP*-Promotor (P1) im 5'UTR (*untranslated region*) vor dem Transkriptionsstart identifiziert werden. Die NFAT-Proteinfamilie besteht aus fünf unterschiedlichen Mitgliedern - NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und NFAT5, von denen die ersten vier über Ca²⁺/Calcineurin reguliert werden (Hogan et al., 2003). Sowohl NFATc1, NFATc2 als auch NFATc3 werden in peripheren T-Zellen exprimiert und nach TCR-Stimulation aktiviert, wobei die Expression von NFATc3 in peripheren T-Zellen im Vergleich zu NFATc1 und NFATc2 jedoch eher gering ist (Macian, 2005). Durch EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)-Analysen konnte die CaN-abhängige Bindung von NFAT-Transkriptionsfaktoren an zwei dieser Bindungsstellen sowohl in der humanen T-Zelllinie HuT78 als auch in primären humanen T-Zellen nach Aktivierung bestätigt werden. Über EMSA-Analysen mit NFAT-Isoform-spezifischen Antikörpern konnte eine Bindung von NFATc2 und vermutlich auch NFATc1 an die erste und zweite NFAT-Bindungsstelle im humanen *FLIP*-Promotor in HuT78-Zellen detektiert werden. Die Bindung der NFATs erfolgt vermutlich jedoch unabhängig vom heterodimeren NFAT-Transkriptionspartner AP-1 (c-Fos/c-Jun), welcher oftmals als Transkriptionspartner von NFAT-Proteinen agiert, da mit einem c-Jun-spezifischen Antikörper keine Signalveränderung detektiert werden konnten. Des weiteren ergaben Reportergen-Analysen, dass der *FLIP*-Promotor durch eine Überexpression von NFATc1 als auch von NFATc2 in 293T-Zellen induziert werden kann. Die Induktion konnte durch die Mutation der putativen NFAT-Bindungsstellen in der *FLIP*-Promotorsequenz unterdrückt werden. Über ChIP (*chromatin immunoprecipitation*)-Analysen in der humanen T-Zellline CEM konnte ebenfalls eine Bindung von NFATc1 als auch NFATc2 zumindest an das erste NFAT-Bindungsmotiv im *FLIP*-Promotor bestätigt

werden. Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die stark erhöhte c-FLIP_{short} Expression in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen durch NFAT-Transkriptionsfaktoren - sehr wahrscheinlich durch NFATc1 und NFATc2 - vermittelt wird.

Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die kurze c-FLIP-Spleißvariante T-Lymphocyten nach ihrer Aktivierung vor einer Apoptose-Induktion schützt. Die beiden humanen T-Zelllinien HuT78 und CEM waren nach Aktivierung durch PMA/Ionomycin resistent gegenüber einer Stimulation mit dem CD95-Liganden. PMA ist ein Phorbolester, der analog zu DAG eine Aktivierung der Proteinkinase C und damit des NFκB-Signalweges induzieren kann. Das lipophile Ionophor Ionomycin hingegen kann durch eine Erhöhung des cytosolischen Calcium-Spiegels durch den Transport von Calcium über die ER- und die Plasmamembran den NFAT-Signaltransduktionsweg induzieren. Zusammen wirken PMA und Ionomycin daher als effiziente T-Zellaktivatoren. Bei gleichzeitiger CsA-Behandlung, die eine Aktivierungs-abhängige c-FLIP_{short} Hochregulation inhibierte, konnten jedoch sowohl HuT78- als auch CEM-Zellen für eine Induktion der CD95-vermittelten Apoptose sensitiviert werden.

Um spezifischer die Funktion der c-FLIP-Isoformen in der Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Zellen zu bestimmen, wurde die Expression von c-FLIP_{long} oder c-FLIP_{short} als auch beider Isoformen gleichzeitig in CEM-Zellen durch deren Infektion mit lentiviralen, FLIP-shRNA-kodierenden Vektoren stark vermindert. Durch eine Reduktion der einzelnen FLIP-Isoformen aber besonders bei der Reduktion beider Isoformen konnte eine starke Sensitivierung naiver als auch aktivierter T-Zellen gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose induziert werden. Interessanterweise konnte des weiteren schon bei der Aktivierung der Zellen mit PMA/Ionomycin eine erhöhte Aktivierungs-induzierte Apoptose-Sensitivität festgestellt werden, wobei c-FLIP_{short}-shRNA-infizierte Zellen eine ebenso starke erhöhte Apoptose-Sensitivität zeigten, wie sie durch die Reduktion beider Isoformen induziert werden konnte. Dies weist darauf hin, dass die kurze c-FLIP-Spleißvariante, c-FLIP_{short}, eine bedeutendere Rolle in der Aktivierungs-induzierten Apoptose-Protektion von T-Zellen spielt als die lange FLIP-Isoform.

Diskussion

FLIP-Proteine sind zentrale Regulatoren des extrinsischen Apoptose-Signalweges, da sie schon frühzeitig eine Apoptose-Induktion durch die Inhibition von Initiatorcaspasen im DISC verhindern können. Während die lange FLIP-Isoform c-FLIP_{long} konstitutiv in einer Vielzahl von Organen, wie dem Herz, der Niere und der Skelettmuskulatur exprimiert wird, kann eine

Expression der kurzen Isoform c-FLIP_{short} vorwiegend in lymphoiden Organen, wie dem Thymus, den Lymphknoten und der Milz, detektiert werden (Rasper et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass c-FLIP_{short} eine wichtige Rolle in der Regulation von Lymphocyten spielt. In der Tat zeigen aktivierte T-Lymphocyten eine stark erhöhte Expression vor allem der kurzen FLIP-Isoform, welche mit einer Apoptose-Resistenz der Zellen während der initialen Immunantwort korreliert (Kirchhoff et al., 2000; Schmitz et al., 2004). Obwohl noch weitere antiapoptotische Regulatoren, wie zum Beispiel Bcl-x_L, während der T-Zellaktivierung hochreguliert werden, konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Inhibition der Proteintranslation aktiverter T-Zellen für Apoptose sensitivieren kann, ohne jedoch die Expression von Bcl-x_L wohl aber die von c-FLIP_{short} zu beeinflussen (Schmitz et al., 2004). T-Lymphozyten zeigen nach ihrer Aktivierung eine starke Hochregulation sowohl des CD95-Todesrezeptors als auch seines Liganden, CD95L (Krammer et al., 2007). Um eine vorzeitige Eliminierung der T-Zellen noch vor ihrer Effektorphase zu verhindern, ist eine Apoptose-Protektion in Kurzzeit-aktivierten T-Lymphocyten entscheidend. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle von FLIP-Proteinen und im besonderen der kurzen FLIP-Isoform c-FLIP_{short} in der Apoptose-Resistenz von aktivierte T-Zellen während der initialen Immunantwort zu untersuchen. Des weiteren sollten Signaltransduktionswege identifiziert werden, die an der Regulation der FLIP-Expression in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen beteiligt sind.

Im Rahmen der Arbeit konnte die transiente Hochregulation vor allem der kurzen FLIP-Spleißvariante c-FLIP_{short} nach T-Zellaktivierung sowohl in den humanen T-Zelllinien HuT78 und CEM als auch in primären humanen T-Zellen verifiziert werden. Durch den Einsatz verschiedener pharmakologischer Inhibitoren konnte im folgenden festgestellt werden, dass die erhöhte c-FLIP_{short} Proteinexpression während der T-Zellaktivierung sehr wahrscheinlich durch den Calcineurin/NFAT-Signalweg vermittelt wird. Im Gegensatz dazu konnte jedoch keine Beeinflussung der c-FLIP_{short} oder c-FLIP_{long} Expression bei einer Inhibition der MAPK p38 und JNK, der MAPKK Mek1 oder des PI3K/Akt-Signalweges detektiert werden. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Yeh et. al. und Uriarte et. al., die eine Reduktion der FLIP-Expression in human und murinen T-Zellen durch die Inhibition von Mek1 bzw. PI3K/Akt feststellen konnten (Uriarte et al., 2005; Yeh et al., 1998a). Dies ist jedoch vermutlich auf die Verwendung unterschiedlicher experimenteller Systeme zurückzuführen. Bei Yeh et. al. wurden, anders als in dem hier verwandten System, aktivierte humane Jurkat-T-Zellen und restimulierte murine T-Zellen aus der Milz analysiert, die nach Behandlung mit dem Mek1-Inhibitor P098059 für Apoptose sensitiviert werden konnten. Uriarte et. al. konnten eine Apoptose-Sensitivierung naiver, unstimulierter Jurkat-Zellen nach einer Inhibition von PI3K/Akt detektieren. Dies korrelierte mit einer erhöhten DISC-Bildung in den Zellen als auch einer leichten Verminderung der Proteinexpression von c-FLIP_{short}, welches

jedoch bereits in unstimulierten Jurkat-Zellen detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die hier verwendeten peripheren, primären humanen T-Lymphocyten als auch die humanen T-Zelllinien CEM und HuT78 erst nach Aktivierung der Zellen eine stark erhöhte Expression von c-FLIP_{short}, die auch nicht durch eine Inhibition von PI3K/Akt oder Mek1 beeinflusst wurde.

Bisher wurde angenommen, dass die *FLIP*-Genexpression vor allem über NFκB reguliert wird, obwohl bisher keine direkte Bindung von NFκB-Transkriptionsfaktoren an den *FLIP*-Promotor nachgewiesen worden ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine erhöhte FLIP-Expression durch eine Vielzahl klassischer NFκB-Aktivatoren, wie TNF α , LPS oder anti-CD40, induziert werden kann (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001; Mora et al., 2003). Interessanterweise konnte nur eine geringe Beeinflussung der c-FLIP_{long} Expression bei Inhibition des Calcineurin/NFAT-Signalweges während der T-Zellaktivierung in humanen T-Zellen beobachtet werden, was für eine spezifische Regulation der kurzen FLIP-Isoform durch diesen Signaltransduktionsweg spricht. Bei Stimulation aktiverter humaner T-Zellen mit dem NFAT/NFκB-Inhibitor Rocaglamid konnte hingegen sowohl eine weitere Reduktion der c-FLIP_{short} als auch eine starke Verminderung der c-FLIP_{long} Proteinexpression beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass sowohl die lange als auch die kurze FLIP-Isoform in aktivierte T-Zellen auch in Abhängigkeit von NFκB reguliert werden. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass durch die T-Zellaktivierung nicht nur eine sehr starke Expression von c-FLIP_{short}, sondern auch eine Spaltung von konstitutiv exprimierten c-FLIP_{long} zu p43-FLIP induziert wurde, wodurch möglicherweise eine vermehrte Induktion des NFκB-Signalweges durch die Interaktion von p43-FLIP mit TRAF2 vermittelt wird (Kataoka and Tschopp, 2004). Die Aktivierung von T-Lymphocyten im Zuge der Immunantwort induziert wahrscheinlich somit einerseits eine verstärkte FLIP-Expression über NFκB, wobei jedoch die Expression von c-FLIP_{short} zusätzlich über die Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren verstärkt wird. Auf diese Weise kann vermutlich eine erhöhte Apoptose-Resistenz der T-Zellen während der initialen Phase der Immunantwort gewährleistet werden (Abb. 12). Zusätzlich kann durch die Spaltung von c-FLIP_{long} zu p43-FLIP eine weitere Aktivierung des NFκB-Signalweges induziert werden, wodurch eine vermehrte Proliferation und die Differenzierung aktiverter T-Zellen unterstützt wird.

Im weiteren konnte gezeigt werden, dass die stark erhöhte Expression von c-FLIP_{short} im Zuge der T-Zellaktivierung durch die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 vermittelt wird. Diese binden nach T-Zellaktivierung an zwei NFAT-Bindungsstellen im humanen *c-FLIP*-Promotor im 5'UTR des Gens vor Exon 1. NFAT-Transkriptionsfaktoren werden ebenfalls alternativ gespleißt und es konnte gezeigt werden,

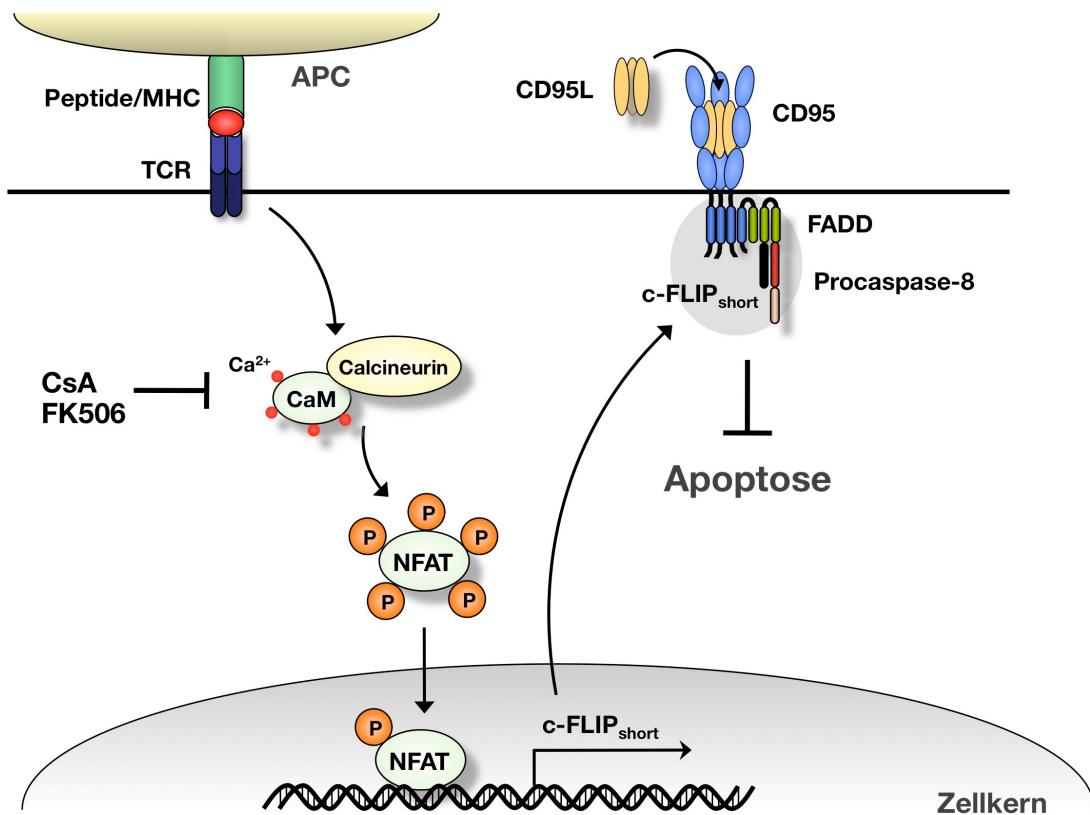


Abb. 12: NFAT-vermittelte Induktion von c-FLIP_{short} während der T-Zellaktivierung

T-Zellen werden über die Interaktion spezifischer Antigen-MHC-Komplexe, die über Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentiert werden, mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert. Dies induziert eine Reihe von Signalkaskaden in der Zelle, die unter anderem zu einer starken Erhöhung des cytoplasmatischen Calcium-Spiegels führen. Calmodulin (CaM) kann Ca²⁺-Ionen binden und nun die Phosphatase Calcineurin aktivieren. Aktives Calcineurin dephosphoryliert seinerseits NFAT-Transkriptionsfaktoren, welche daraufhin in den Zellkern translozieren und hier die Transkription NFAT-abhängiger Gene induzieren können. Hierzu zählen sowohl eine ganze Reihe inflammatorischer Cytokine, aber auch Apoptose-Regulatoren wie CD95L und die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_{short}. c-FLIP_{short} kann nun seinerseits an den CD95-DISC binden und eine Apoptose-Induktion in Kurzzeit-aktivierten T-Zellen inhibieren, indem es eine Aktivierung der Initiatorcaspase-8 am Todesrezeptor verhindert. Calcineurin kann durch die Inhibitoren Cyclosporin A (CsA) und FK506 inaktiviert werden, wodurch auch eine aktivierende Dephosphorylierung der NFATs verhindert wird und eine Induktion NFAT-spezifischer Gene, wie von c-FLIP_{short}, ausbleibt.

dass im besonderen die autoregulatorische NFATc1-Spleißform NFATc1 α /A während der T-Zellaktivierung generiert wird (Chuvpilo et al., 2002). Über Reportergen-Analysen konnte eine erhöhte Aktivität des c-FLIP-Promotors bei Überexpression der NFATc1/A-Spleißform detektiert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass der c-FLIP-Promotor im Zuge der T-Zellaktivierung vor allem über diese NFAT-Spleißvariante induziert wird. Die Interaktion der NFAT-Transkriptionsfaktoren mit dem c-FLIP-Promotor scheint allerdings unabhängig vom primären NFAT-Bindungspartner AP-1 zu erfolgen. Ob NFAT möglicherweise mit anderen Transkriptionspartnern, wie zum Beispiel IRF4 oder EGR1, am c-FLIP-Promotor interagiert, muss jedoch im weiteren noch ermittelt werden. Ebenso stellt sich die Frage, wie NFAT-Transkriptionsfaktoren eine spezifische Induktion der c-FLIP_{short} Expression erzielen können – ob durch sie eventuell die Synthese eines FLIP-Transkriptes initiiert wird, dass präferentiell

zu c-FLIP_{short} gespleißt wird und/oder ob über die NFAT-Aktivierung Spleißfaktoren induziert/rekrutiert werden, die ein Spleißen der kurzen FLIP-Isoform begünstigen.

Um die spezifische Bedeutung der einzelnen FLIP-Isoformen für die Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Lymphocyten genauer zu untersuchen, wurden CEM-Zellen mit verschiedenen FLIP-shRNA-Konstrukten lentiviral infiziert und auf diese Weise eine gezielte Reduktion der unterschiedlichen FLIP-Spleißvarianten bewirkt. Hierbei zeigte sich, dass bei Zugabe des CD95-Liganden eine besonders starke Apoptose-Sensitivierung aktiverter als auch unbehandelter Zellen durch eine gleichzeitige Verminderung beider FLIP-Isoformen erzielt werden konnte. Dies korreliert mit Ergebnissen aus FLIP-defizienten Mäusen, in denen die T-Zell-spezifische Deletion von FLIP sowohl zu einer erniedrigten Proliferation als auch zu einer erhöhten Apoptose-Sensitivität von aktivierten peripheren T-Zellen führte (Chau et al., 2005). Neben einer erhöhten Sensitivität aktiverter humaner T-Zellen bei Stimulation mit CD95L konnte zusätzlich eine erhöhte Aktivierungs-induzierte Apoptose durch die Manipulation vor allem der c-FLIP_{short} Expression beobachtet werden. T-Lymphocyten regulieren im Zuge ihrer Aktivierung sowohl den CD95-Todesrezeptor als auch den CD95L sehr stark hoch. Somit besteht die Gefahr, dass sich benachbarte, aktivierte T-Lymphocyten gegenseitig abtöten oder dass eine aktivierte T-Zelle sogar ihren eigenen Suizid induziert. Da vor allem bei einer Inhibition der c-FLIP_{short} Expression eine erhöhte Apoptose-Rate aktiverter T-Zellen detektiert werden konnte, weist dies darauf hin, dass im besonderen die kurze FLIP-Spleißvariante eine entscheidende Funktion in der Protektion Kurzzeit-aktivierter T-Zellen vor dem Aktivierungs-induzierten Zelltod besitzt.

CsA und FK506 sind hoch wirksame Immunsuppressiva, die vor allem zur Verhinderung von Organabstoßungen bei Transplantationen, aber auch zur Behandlung einer Reihe von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel von Rheumatoider Arthritis und Atopischer Dermatitis, eingesetzt werden. Ihre immunsuppressive, Toleranz-fördernde Wirkung vermitteln sie dabei einerseits, indem sie die Transkription NFAT-regulierter Zielgene, wie zum Beispiel einer Vielzahl von Cytokinen, die für die Lymphocyt-Proliferation und -Differenzierung essentiell sind, unterdrücken. Andererseits bewirken sie vermutlich auch eine Sensitivierung von Lymphocyten gegenüber Apoptose. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass CD28-costimulierte, CsA-behandelte primäre T-Zellen aus der Ratte auf Grund einer Superinduktion von proapoptotischer Caspase-3 für die CD95-vermittelte Apoptose sensitiviert werden können (Kerstan et al., 2006). Wie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, können T-Lymphocyten durch eine Suppression der c-FLIP_{short} Expression über FLIP-spezifische shRNAs als auch durch Stimulation mit CsA für eine Aktivierungs-induzierte Apoptose sensitiviert werden. Eine Unterdrückung der

c-FLIP_{short} Expression stellt daher vermutlich einen weiteren Mechanismus dar, über den CsA seine immunsuppressive Wirkung entfaltet.

Weiterhin konnte in zwei Mausmodellen für Leukämie gezeigt werden, dass die CsA- oder FK506-vermittelte Inhibition einer aberranten Calcineurin/NFAT-Aktivierung die Entwicklung und Progression von T-Zell-Lymphomen verhindern kann (Medyouf et al., 2007). Dies zeigt, dass Calcineurin/NFAT-Inhibitoren wahrscheinlich auch gewinnbringend in der Behandlung von Leukämien und lymphatischen Tumoren eingesetzt werden können. Die andauernde, hochdosierte Behandlung mit CsA und FK506, wie sie zum Beispiel in Fall von Transplantationspatienten erfolgt, bringt jedoch auch eine Reihe schwerwiegender Nebenwirkungen mit sich. Hierzu gehören eine hohe Organtoxizität (Nephrotoxizität, Gastrointestinaltoxizität, Neurotoxizität), eine verstärkte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten als auch eine erhöhte Gefährdung für die Entwicklung von lymphoproliferativen Erkrankungen (Lee and Park, 2006). Dies liegt vermutlich unter anderem daran, dass sowohl durch CsA als auch FK506 eine generelle Blockierung der Calcineurin-Aktivität und damit sämtlicher NFAT-Isoformen erfolgt. Ziel ist es daher, selektivere und daher weniger toxische Agenzien zu entwickeln, die durch die spezifische Inhibition NFAT-regulierter Gene eine gezielte Immunsuppression bewirken können. Wie hier gezeigt werden konnte, wird vor allem die kurze FLIP-Spleißvariante c-FLIP_{short} über NFAT-Proteine in aktivierten T-Zellen reguliert und ist entscheidend für deren Apoptose-Resistenz verantwortlich. Weiterhin konnte eine stark erhöhte FLIP-Expression in verschiedenen Immunerkrankungen, wie zum Beispiel Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis, als auch in zahlreichen Tumoren und Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Budd et al., 2006; Yang, 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FLIP und NFAT die Tumorangiogenese unterstützen können (Zaichuk et al., 2004). FLIP-Proteine bieten daher möglicherweise einen effektiven Angriffspunkt in der Entwicklung neuer Immun- und Krebstherapeutika.

3.3. Ein SNP im zellulären **FLICE-inhibitory protein (c-FLIP)** Gen entscheidet über die Produktion der Protein-Isoform und korreliert mit einem Risiko für Follikuläre Lymphome im Menschen

A SNP in the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) gene determines protein isoform production and is associated with risk of follicular lymphoma in humans

Nana Ueffing*, Kusum Kumari Singh*, Andrea Christians, Christoph Thorns, Alfred C. Feller, Florian Nagl, Falco Fend, Sebastian Heikaus, Alexander Marx, Reiner B. Zott, Joachim Brade, Wolfgang A. Schulz, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz**, Christian Schwerk**

submitted

*N.U. and K.S. contributed equally to this work. **I.S. and C.S. share senior authorship.

Ergebnisse

Durch den Sequenzvergleich der humanen und murinen c-FLIP-Gene (siehe Publikation I) konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden, dass in der Maus, im Gegensatz zum Menschen, nur die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_R aber kein c-FLIP_{short} exprimiert werden kann. Ziel dieser Arbeit war es daher im weiteren, das differentielle Auftreten der kurzen c-FLIP-Isoformen in verschiedenen Spezies genauer zu untersuchen. Des Weiteren sollte ermittelt werden, inwieweit funktionelle Unterschiede zwischen den kurzen c-FLIP-Spleißvarianten bestehen.

Da in der Maus (*Mus musculus*) ein homologes Exon zum humanen Exon 7 fehlt, kann diese kein c-FLIP_{short} exprimieren. Die Analyse der genomischen c-FLIP-Struktur in der Ratte (*Rattus norvegicus*), die eine hohe Ähnlichkeit mit dem Aufbau des murinen c-FLIP-Gens besitzt, ergab, dass auch in dieser nur die kurze c-FLIP_R, nicht jedoch die kurze c-FLIP_{short} Isoform exprimiert werden kann. Ebenso wurde bisher für das Wildschwein (*Sus scrofa*) und den Hund (*Canis lupus familiaris*) nur eine Expression von c-FLIP_R, nicht jedoch von c-FLIP_{short} beschrieben (Goto et al., 2004). Um das Auftreten der c-FLIP_{short} Isoform im Laufe der Evolution weiter einzugrenzen, wurde die Intron-Exon-Struktur des c-FLIP-Gens im Schimpanse (*Pan troglodytes*) analysiert. Überraschenderweise zeigte sich hierbei, dass diese zwar sehr ähnlich zum Aufbau des humanen c-FLIP-Gens ist, eine Expression von c-FLIP_{short} jedoch auf Grund eines Nukleotid-Austausches (AG → AA) im 3' Spleißakzeptor von Intron 6 ebenfalls nicht erfolgen kann.

Durch die genomische Sequenzierung des c-FLIP-Gens in verschiedenen humanen Zelllinien, für die eine differentielle Expression der kurzen FLIP-Isoformen bereits

beschrieben worden ist (Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005; Scaffidi et al., 1999a), konnte eine Korrelation der im Schimpansen identifizierten AG → AA Transition mit der Expression der kurzen FLIP-Isoform auch in menschlichen Zellen detektiert werden. Nur in den Zellen, in denen somit eine homozygote oder heterozygote AG → AA Mutation am 3' Spleißakzeptor in Intron 6 nachgewiesen werden konnte, wird demnach auch die c-FLIP_R Isoform exprimiert. Ist die Spleißposition jedoch intakt, kann in den Zellen durch das Spleißen von Exon 6 an Exon 7 c-FLIP_{short} als kurze FLIP-Isoform exprimiert werden. Ein einzelner Nukleotid-Austausch ist somit für die differentielle Expression der kurzen FLIP-Isoform im Menschen verantwortlich.

Auf Grund des hohen Einflusses der Mutation im humanen *c-FLIP*-Gen auf die Expression der unterschiedlichen FLIP-Spleißvarianten und der Tatsache, dass diese DNA-Variation nur im humanen Genom nicht jedoch im Schimpansen identifiziert werden konnte, wurde im folgenden untersucht, ob es sich bei dem hier beobachteten Nukleotid-Austausch um einen SNP (*single nucleotide polymorphism*) handelt. SNPs sind häufig auftretende genetische Variationen, die durch die Mutation eines einzigen Nukleotids entstehen und in mehr als 1% der Bevölkerung identifiziert werden können (Kim and Misra, 2007). Tatsächlich konnte durch eine Überprüfung der SNP-Datenbank (dbSNP) des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ein SNP (rs10190751 A/G) an der identifizierten Position im humanen *c-FLIP*-Gen bestätigt werden. Die weitere Analyse des *c-FLIP*-SNPs über die Datenbank des internationalen HapMap-Projektes ergab zusätzlich eine differentielle Verteilung des SNPs in verschiedenen Bevölkerungsgruppen (HapMap, 2003). Während beispielsweise eine vergleichsweise hohe Prävalenz der c-FLIP_R Isoform vor allem in einer Bevölkerungsgruppe afrikanischen Ursprungs (Yorubas, Nigeria) beobachtet werden kann, findet sich in der asiatischen Bevölkerung eine weit höhere Verbreitung der c-FLIP_{short} Isoform und nur ein sehr geringer c-FLIP_R Anteil. Ähnlich sieht vermutlich auch die Verteilung in der europäischen Bevölkerung aus. Dies konnte im folgenden durch SNP-Analysen mit genomischer DNA von etwa 200 Gesund-Spendern aus dem europäischen Raum bestätigt werden.

SNPs treten im humanen Genom in etwa mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 1000 bp auf und sind damit die am häufigsten auftretende DNA-Variation im humanem Genom (Kim and Misra, 2007). Die meisten SNPs finden sich in den nicht-codierenden Bereichen des Genoms, sie können aber auch in der codierenden Region eines Gens auftreten. Synonyme als auch nicht-synonyme SNPs können bedeutende Auswirkungen auf die Expression oder die Funktion des codierten Proteins haben, indem sie zum Beispiel die Effizienz der Transkription oder Translation, die mRNA- oder Protein-Stabilität oder auch die

Proteinfunktion an sich sowohl negativ als auch positiv maßgeblich beeinflussen können. Es wird daher angenommen, dass sie unter anderem einen entscheidenden Einfluss auf die Prädisposition für eine Vielzahl von Erkrankungen als auch auf die Medikamentenverträglichkeit von Patienten haben können (Shastry, 2007). Zusätzlich ermöglicht die Identifizierung mit Krankheits-Genen assoziierter SNPs ihren Einsatz als molekulare Marker (Shastry, 2007). Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob die AG → AA Transition im 3' Spleißakzeptor in Intron 6 im humanen *c-FLIP*-Gen und damit die differentielle Expression der kurzen c-FLIP-Isoformen mit der Entwicklung spezifischer Tumorerkrankungen korreliert. Da FLIP-Proteine vor allem im Immunsystem exprimiert werden (Rasper et al., 1998), wurden verschiedene B- und T-Zell-Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer c-FLIP-mRNA- und -Protein-Expression untersucht. Interessanter Weise konnte hierbei ein vermehrtes Auftreten der c-FLIP_R Isoform in verschiedenen B-Zell-Tumorzelllinien beobachtet werden. Die Expression von c-FLIP_R in den unterschiedlichen Zelllinien war auch hier abhängig von der Mutation der 3' Spleißposition an Intron 6. Durch SNP-Analysen wurde daher die genomische DNA verschiedener B-Zell-Tumorpatienten hinsichtlich der Verteilung des hier identifizierten *c-FLIP*-SNPs untersucht. Dabei konnte ein signifikant erhöhtes Auftreten der c-FLIP_R Isoform in Patienten mit Follikulären Lymphomen (FL) im Vergleich zu gesunden Spendern beobachtet werden.

Die verstärkte Prävalenz von c-FLIP_R in FL-Patienten deutet darauf hin, dass im besonderen durch diese FLIP-Isoform eine Entwicklung von Follikulären Lymphomen begünstigt wird. Im folgenden sollte daher untersucht werden, in wieweit Unterschiede zwischen den beiden kurzen c-FLIP-Isoformen bestehen, die ein Auftreten von FLs im Menschen unterstützen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass auch (murines) c-FLIP_R effizient in den DISC rekrutiert wird und hier eine Weiterleitung des apoptotischen Signals verhindern kann (siehe Publikation I). Golks et. al. konnten im weiteren durch Überexpressionsanalysen der kurzen humanen c-FLIP_R und c-FLIP_{short} Isoformen nachweisen, dass diese wahrscheinlich ähnlich effektiv eine Apoptose-Induktion über den Todesrezeptor verhindern können (Golks et al., 2005). Somit ist ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden kurzen FLIP-Isoformen hinsichtlich ihres antiapoptotischen Potentials eher unwahrscheinlich. Überraschenderweise konnte jedoch bei Überexpressionsanalysen der kurzen humanen FLIP-Isoformen in 293T-Zellen eine stark erhöhte Proteinexpression von c-FLIP_{short} im Vergleich zu c-FLIP_R beobachtet werden, die auch nicht über eine Transfektion mit höheren Mengen des c-FLIP_R-Konstrukt kompensiert werden konnte. Gleichzeitig konnte jedoch keine verstärkte Transkription der c-FLIP_{short} mRNA in 293T-Zellen detektiert werden. L428-Zellen weisen eine konstitutive endogene Expression der beiden kurzen FLIP-Isoformen auf. Die Behandlung von L428-Zellen oder transfizierten

293T-Zellen mit den Transkriptions-Inhibitoren Actinomycin D und α -Amanitin ergab, dass die erhöhte Proteinexpression von c-FLIP_{short} nicht durch eine erhöhte mRNA-Stabilität der c-FLIP_{short} mRNA verursacht wird. Actinomycin D interkaliert in doppelsträngige DNA und kann so unspezifisch eine Transkriptionselongation verhindern, während α -Amanitin mit einer der großen Untereinheiten der RNA-Polymerase II interagiert und hierdurch eine Translokation der Polymerase entlang der DNA fast vollständig unterdrücken kann (Bushnell et al., 2002; Sobell, 1985). Ebenso konnte durch die Stimulation der Zellen mit dem Proteintranslationsinhibitor CHX keine erhöhte Proteinstabilität der c-FLIP_{short} Isoform detektiert werden. Durch Lokalisationsstudien mit GFP-markiertem c-FLIP_R und c-FLIP_{short} konnte die stark erhöhte Proteinexpression von c-FLIP_{short} bestätigt sowie eine vermehrte Oligomerisierung von c-FLIP_{short}, nicht jedoch von c-FLIP_R, in Todeseffektorfilamenten beobachtet werden. Da weder Unterschiede in der Transkription der mRNAs noch in der mRNA- oder Proteinstabilität der kurzen FLIP-Isoformen detektiert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass die c-FLIP_{short} mRNA eventuell effizienter translatiert wird. Um daher zu überprüfen, ob die schwächere Proteinexpression von c-FLIP_R durch eine verminderte Proteintranslation der c-FLIP_R mRNA verursacht wird, wurden *in vitro* Translationen mit den kurzen FLIP-Isoformen durchgeführt. Hierbei konnte in der Tat eine verringerte Translation der c-FLIP_R mRNA im Vergleich zur c-FLIP_{short} mRNA beobachtet werden. Die differentielle Translationseffizienz wird vermutlich jedoch nicht durch deren unterschiedliche Sekundärstruktur beeinflusst, da der Einsatz denaturierter c-FLIP mRNAs keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der *in vitro* Translation hatte.

Experimenteller Beitrag der Erstautoren zu der Publikation:

Nana Ueffing Western-Blot-Analysen der FLIP-Proteinexpression mit den unterschiedlichen Zelllinien sowie primären humanen B- und T-Zellen, dies beinhaltet auch die Präparation der primären humanen T- und B-Zellen sowie Stimulation der Zellen über PMA/Ionomycin, PHA-L, LPS oder Cokulturen mit CD154-exprimierenden L-Zellen. *Abb. 2 (B), 3 (B)*.

Klonierung der c-FLIP_R und c-FLIP_{short} Konstrukte aus Raji- bzw. HuT78-Zellen sowie die Generierung der GFP-c-FLIP-Konstrukte.

Analyse der Proteinstabilität von endogenem c-FLIP in L428-Zellen sowie der Protein- und mRNA-Stabilität von überexprimiertem c-FLIP_R und c-FLIP_{short} in 293T-Zellen. *Abb. 5 (A), (C), (D)*.

FACS-Analysen zum Expressionsniveau von GFP-markiertem c-FLIP_R und c-FLIP_{short} in 293T-Zellen sowie Lokalisationsstudien in HeLa-Zellen. *Abb. 6 (A), (B).*

Analyse der c-FLIP_R und c-FLIP_{short} mRNA-Translationseffizienz über *in vitro* Translation. *Abb. 6 (C).*

Kusum K. Singh Präparation und Sequenzierung der genomischen DNA verschiedener Zelllinien. *Abb. 1 (B).*

Analyse der c-FLIP mRNA-Expression in den verschiedenen Zelllinien sowie in primären humanen B- und T-Zellen über RT-PCRs. *Abb. 2 (A), 3 (A).*

Analyse der c-FLIP_R und c-FLIP_{short} mRNA-Stabilität in L428-Zellen. *Abb. 5 (B).*

Die SNP-Analysen wurden von Kusum K. Singh und Nana Ueffing gemeinsam durchgeführt. *Abb. 4.*

Diskussion

Apoptotische Signalwege werden durch eine Vielzahl pro- und antiapoptotischer Mediatoren reguliert, wobei viele dieser Apoptose-Regulatoren alternativ gespleißt werden (Schwerk, 2005). Die verschiedenen Spleißvarianten unterscheiden sich allerdings nicht nur in ihrer mRNA-Sequenz, sondern können auch stark veränderte Funktionen in der Regulation der apoptotischen Signaltransduktion besitzen. So kann zum Beispiel die prä-mRNA des CD95-Todesrezeptors alternativ gespleißt werden. Alternative Spleißvarianten des CD95-Rezeptors beinhalten unter anderem keine Transmembrandomäne mehr, über die dieser in der Zellmembran verankert werden könnte (Cascino et al., 1995). Möglicherweise kann der sezernierte Rezeptor nun als Decoy-Rezeptor die Apoptose-Induktion durch das Abfangen von CD95-Todesliganden beeinflussen, obwohl dies allerdings umstritten ist (Cheng et al., 1994; Roesler et al., 2005; Ruberti et al., 1996). Ein wichtiger Regulator des intrinsischen Apoptosignalweges, der alternativ gespleißt wird, ist Bcl-x. Während die lange Spleißvariante, Bcl-x_L, eine antiapoptotische Funktion besitzt, wirkt eine verkürzte Spleißvariante von Bcl-x, Bcl-x_S, hingegen proapoptotisch (Boise et al., 1993). FLIP-prä-mRNAs werden ebenfalls alternativ gespleißt. Von den 11 identifizierten FLIP-mRNA-

Isoformen konnte bisher jedoch lediglich die Proteinexpression von c-FLIP_{long} sowie der beiden verkürzten FLIP-Isoformen c-FLIP_{short} und c-FLIP_R nachgewiesen werden (Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005; Irmler et al., 1997; Rasper et al., 1998; Scaffidi et al., 1999a; Shu et al., 1997). Alle auf Poteinebene exprimierten FLIP-Isoformen sind effiziente Inhibitoren der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose (Kataoka, 2005). Im Gegensatz zur langen FLIP-Isoform c-FLIP_{long} blockieren die kurzen FLIP-Isoformen c-FLIP_{short} und c-FLIP_R jedoch nicht nur die transkatalytische, sondern schon die autokatalytische Prozessierung der Procaspasen im DISC, da sie keine katalytisch inaktive, Caspase-ähnliche Domäne besitzen (Krueger et al., 2001b). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass c-FLIP_{long}-Procaspase-8-Heterodimere abhängig vom Expressionsgrad der langen FLIP-Isoform sogar eine Apoptose-Induktion in der Zelle begünstigen können, vermutlich da durch die Interaktion der Caspase-ähnlichen Domäne mit der intakten Protease-Domäne der Caspase die Initiatorcaspase aktiviert werden kann (Chang et al., 2002; Dohrman et al., 2005; Han et al., 1997; Micheau et al., 2002; Shu et al., 1997). Dies zeigt somit, dass auch die alternativ gespleißten FLIP-Isoformen nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Unterschiede untereinander aufweisen. Ausgangspunkt dieser Arbeit war es, Unterschiede zwischen der Funktion sowie der Expression der beiden kurzen FLIP-Isoformen c-FLIP_R und c-FLIP_{short} genauer zu untersuchen.

Im Gegensatz zu c-FLIP_{long} unterscheiden sich die kurzen FLIP-Isoformen nur in ihren verkürzten C-terminalen Sequenzen von 20 AS (c-FLIP_{short}) bzw. 11 AS (c-FLIP_R). Diese haben in beiden FLIP-Isoformen einen entscheidenden Einfluss auf die hohe Instabilität des Proteins (siehe Publikation I) (Poukkula et al., 2005). Funktionelle Unterschiede zwischen den beiden c-FLIP-Isoformen hinsichtlich ihres antiapoptotischen Potentials konnten in Überexpressionsanalysen bisher jedoch nicht identifiziert werden (Golks et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings eine verringerte Translationseffizienz der c-FLIP_R Isoform detektiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die kurzen FLIP-Isoformen sich nicht auf Grund ihres antiapoptotischen Potentials, sondern auf Grund unterschiedlicher Konzentrationen im DISC in der Fähigkeit, die apoptotische Signalkaskade am Todesrezeptor zu beeinflussen, unterscheiden. Ungeklärt ist allerdings bisher, warum c-FLIP_R schlechter als c-FLIP_{short} translatiert wird. Da durch die Denaturierung der kurzen c-FLIP-mRNA kein Unterschied in ihrer *in vitro* Translation detektiert werden konnte, ist ein Einfluss der differentiellen Sekundärstruktur wahrscheinlich auszuschließen. Kimchi-Sarfaty et al. konnten nachweisen, dass synonyme SNPs starke Auswirkungen auf die Translationseffizienz eines Proteins durch das Einfügen seltener Codons haben können, da durch eine geringeres Vorkommen der entsprechenden tRNAs die Translation des Proteins verzögert und hierdurch seine Faltung beeinflusst werden kann (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

Bei der Analyse der c-FLIP_R mRNA konnte jedoch kein vermehrtes Auftreten seltener Codons festgestellt werden, die eine verzögerte Translation im Vergleich zur c-FLIP_{short} mRNA erklären könnten. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Translation der c-FLIP_R mRNA über die spezifische Bindung von micro-RNAs an die C-terminale Sequenz beeinflusst wird. Da jedoch eine verringerte Translationseffizienz auch bei der *in vitro* Translation mit Retikulocytenlysaten aus dem Kaninchen beobachtet werden konnte, ist eine Regulation der c-FLIP_R mRNA über micro-RNAs eher unwahrscheinlich. Die beiden kurzen FLIP-Isoformen unterscheiden sich lediglich in ihrer C-terminalen Sequenz und daher ist diese höchst wahrscheinlich für die verminderte Translation der c-FLIP_R Isoform ausschlaggebend. Möglich ist, dass über den C-Terminus von c-FLIP_R Mediatoren gebunden werden, die eine effiziente Translation der FLIP-mRNA stören, indem sie ihre Assoziation mit dem Ribosom verhindern und sie in sogenannte *stress-granules* oder *P-bodies* rekrutieren (Parker and Sheth, 2007). *Stress-granules* sind Aggregate bestehend aus untranslatierten mRNAs und Teilen des Translationsinitiationskomplexes, die vor allem unter Stressbedingungen wie z. B. im Rahmen der Hitzeschockantwort gebildet werden. *P-bodies* bestehen ebenfalls aus akkumulierten mRNA-Translationsinitiationskomplexen, allerdings wird angenommen, dass hier im Gegensatz zu den *stress-granules* nicht nur eine Lagerung, sondern auch ein Abbau der mRNAs erfolgen kann (Parker and Sheth, 2007). Durch die Rekrutierung der c-FLIP_R mRNA in diese Ribonukleoproteinkomplexe könnte daher eventuell eine Retention oder sogar eine Degradation der FLIP-mRNA vermittelt werden. Ob oder welche Proteine an einer Rekrutierung der c-FLIP_R mRNA in diese Komplexe beteiligt sein könnten, muss im weiteren jedoch noch geklärt werden.

Die Sequenzanalyse der c-FLIP-Genstruktur der Maus hatte ergeben, dass diese auf Grund des Fehlens eines homologen Exons zum humanen Exon 7 kein c-FLIP_{short}, sondern lediglich c-FLIP_R als einzige kurze FLIP-Isoform exprimieren kann (siehe Publikation I). Dies konnte im folgenden auch für die Ratte bestätigt werden. Ebenso konnte auch im Wildschwein und im Hund lediglich eine Expression von c-FLIP_R und nicht von c-FLIP_{short} detektiert werden. Somit ist zu vermuten, dass es sich bei c-FLIP_R um die evolutionär ältere kurze FLIP-Isoform handelt. Hingegen konnte ein homologes, c-FLIP_{short} spezifisches Exon zum humanen Exon 7 im Schimpansen identifiziert werden. Überraschenderweise kann im Schimpansen jedoch auf Grund eines Nukleotid-Austausches am konservierten 3' Spleißakzeptor in Intron 6 des c-FLIP-Gens auch kein c-FLIP_{short} exprimiert werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im Schimpansen, ähnlich wie beim Menschen, eine individuelle Mutation des Spleißakzeptors über die Generierung der c-FLIP_{short} Isoform entscheidet oder dass eine Expression von c-FLIP_{short} in anderen Schimpansen-Spezies möglich ist. Allerdings konnte auch in Bonobos die beobachtete Mutation im 3' Spleißakzeptor in Intron 6 des c-FLIP-

Gens detektiert werden. Von den hier analysierten Säugetieren kann somit nur im Menschen sowohl c-FLIP_R als auch c-FLIP_{short} als kurze FLIP-Isoform exprimiert werden.

Die Expression von c-FLIP_{short} ist bisher vorwiegend in lymphoiden Organen, wie dem Thymus, den Lymphknoten und der Milz, detektiert worden (Rasper et al., 1998). Gleichfalls wurde eine Expression von c-FLIP_R erstmals in der B-Zellline Raji und später auch in einigen weiteren B-Zell-Tumorzelllinien, wie Boe^R und SKW6.4, sowie in humanen, primären T-Zellen beschrieben (Djerbi et al., 2001; Golks et al., 2005; Scaffidi et al., 1999a). Aus diesem Grund wurden mehrere T- und B-Zelllinien sowie humane, primäre T- und B-Zellen hinsichtlich ihrer c-FLIP-Expression analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass nur Zellen, die eine AG → AA Mutation am 3' Spleißakzeptor in Intron 6 im c-FLIP-Gen aufweisen, auch in der Lage sind, c-FLIP_R zu exprimieren (Abb. 13).

Die weitere Analyse des Nukleotid-Austausches im humanen c-FLIP-Gen ergab, dass es sich bei der hier identifizierten Mutation um einen SNP (rs10190751 A/G) handelt. SNPs sind die am häufigsten auftretenden Polymorphismen im Menschen (Kim and Misra, 2007). Es wird angenommen, dass sowohl synosome als auch nicht-synosome SNPs einen

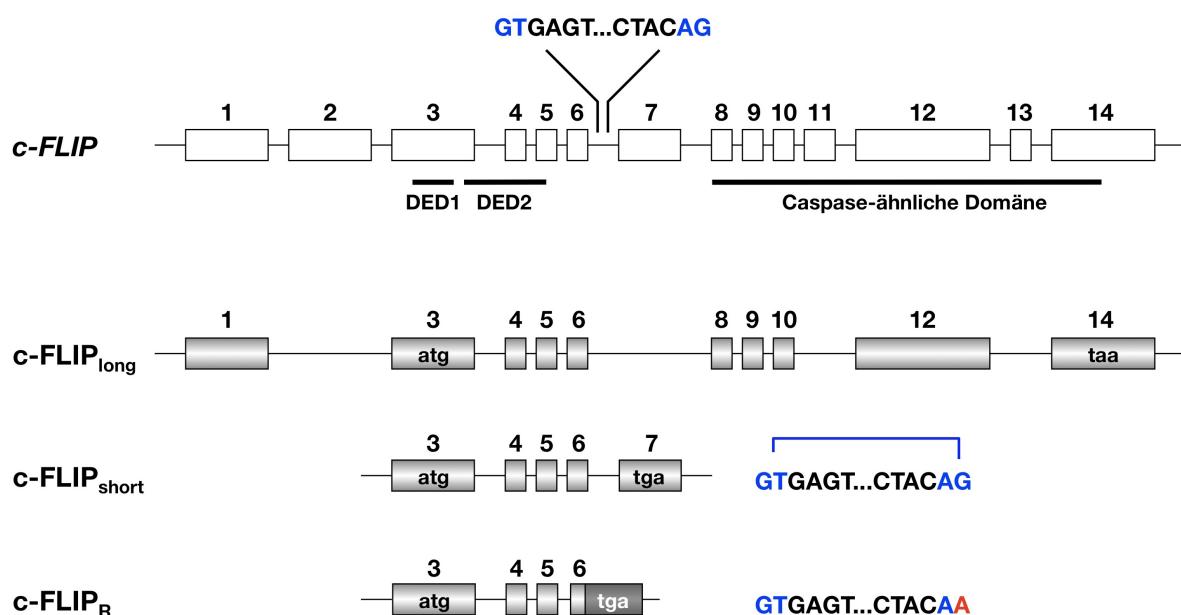


Abb. 13: Ein SNP ist verantwortlich für die Generierung der kurzen humanen FLIP-Isoformen

Das humano c-FLIP-Gen (weiß) umfasst 14 Exons. Durch alternatives Spleißen der FLIP-prä-mRNAs werden insgesamt insgesamt 11 unterschiedliche FLIP-mRNA-Spleißvarianten generiert, von denen eine lange, c-FLIP_{long}, und zwei kurze Isoformen, c-FLIP_{short} und c-FLIP_R, (grau) auch als funktionelles Protein exprimiert werden. Die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_{short} entsteht auf Grund eines Stopp-Codons im c-FLIP_{short} spezifischen Exon 7. Humanes c-FLIP_R wird hingegen wegen eines SNPs (*single nucleotide polymorphism*, AG → AA, rot) im 3' Spleißakzeptor (blau) in Intron 6 generiert. Auf Grund des mutierten Spleißakzeptors kann ein Spleißen von Exon 6 an Exon 7 nicht mehr erfolgen. Da Intron 6 ebenfalls ein Stopp-Codon aufweist, wird somit, falls ein Spleißen von Exon 6 an Exon 8 und damit die Generierung einer c-FLIP_{long} spezifischen mRNA ausbleibt, die kurze FLIP-Isoform c-FLIP_R exprimiert. atg: Startcodon. taa, tga: Stopp-Codons. Nukleotidsequenz: Sequenz im Bereich des Spleißdonors (GT, blau) bzw. -akzeptors (AG, blau) in Intron 6.

maßgeblichen Einfluss auf die Anfälligkeit gegenüber Krankheiten, auf die Progression verschiedener Erkrankungen sowie auf die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Medikamenten haben können (Shastry, 2007). Desweiteren können SNPs als nützliche molekulare Marker eingesetzt werden, um evolutionäre Beziehungen von Genen aufzuklären oder um mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziierte Gene zu identifizieren (Shastry, 2007). Bei der Analyse der c-FLIP-Expression in verschiedenen B-Zell-Lymphom-Patienten konnte in der Tat ein vermehrtes Auftreten der c-FLIP_R Isoform in Patienten mit Follikulären Lymphomen detektiert werden. Das FL ist eine der häufigsten Formen der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) und lässt sich vermutlich auf deregulierte GC-B-Zellen zurückführen (de Jong, 2005; Klein and Dalla-Favera, 2008). In 90% der Fälle weisen FL die Translokation t(14;18)(q32;q21) auf, wodurch das Gen für das antiapoptotische Protein Bcl-2 von Chromosom 18 in den Immunglobulinlocus der schweren Antikörperkette auf Chromosom 14 transloziert. Dies führt zu einer exzessiven Expression des *BCL2*-Gens und einer Apoptose-Protektion transformierter GC-B-Zellen (Bakhshi et al., 1985; Cleary and Sklar, 1985; Tsujimoto et al., 1984). Neben der initialen Translokation von *BCL2* sind jedoch vermutlich sekundäre genomische Alterationen an der Transformation zum FL beteiligt, da sporadische t(14;18)-B-Zellen auch ohne eine klinische Manifestation des FLs auftreten können (Limpens et al., 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-2 in Mäusen allein nicht ausreicht, um in diesen eine FL-Bildung zu induzieren (McDonnell et al., 1989; McDonnell and Korsmeyer, 1991; Strasser et al., 1993). Die Transformation der GC-B-Zellen ist des weiteren entscheidend von ihrer Interaktion mit infiltrierenden, aktivierten T-Helferzellen und dem FDC-Netzwerk im Keimzentrum abhängig, da diese die Proliferation und die Apoptose-Protektion der transformierten Zellen unterstützen (Park and Choi, 2005). FLIP-Proteine sind potente Inhibitoren der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose und es ist daher nur wahrscheinlich, dass eine deregulierte FLIP-Expression substantiell zu einer Transformation von GC-B-Zellen im FL beitragen kann. FLIP-Proteine können in GC-B-Zellen unter anderem durch die Interaktion mit CD154-exprimierenden Th2-Zellen sowie durch den Kontakt mit FDCs induziert werden und diese vor einer spontanen Apoptose-Induktion protektieren (Hennino et al., 2001; van Eijk et al., 2001). Desweiteren konnte ein substantieller Einfluss von c-FLIP-Proteinen auf die Apoptose-Sensitivität verschiedener B-Zell-Tumore, zum Beispiel in Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen oder primären B-Zell-Vorläufer-ALL-Blasten, nachgewiesen werden (Dutton et al., 2004; Mathas et al., 2004; Stagni et al., 2008; Thomas et al., 2002; Troeger et al., 2007). FLIP-Proteine spielen des weiteren auch in der T-Zell-Immunität eine entscheidende Rolle (siehe Publikation II) und nehmen eventuell auch durch ihre Expression in infiltrierender CD4⁺ T-Helferzellen einen entscheidenden Einfluss auf die Transformation

der GC-B-Zellen im Keimzentrum. Da FL-Patienten vermehrt eine heterozygote oder homozygote Expression der c-FLIP_R Isoform aufweisen, ist anzunehmen, dass im besonderen diese FLIP-Isoform einen Einfluss auf die FL-Entwicklung besitzt. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der differentiellen Translationseffizienz der beiden kurzen FLIP-Isoformen. Ob diese jedoch direkte Auswirkungen auf die Tumorentwicklung hat, indem sie beispielsweise eine veränderte DISC-Zusammensetzung beeinflusst, muss im weiteren noch untersucht werden.

4. Zusammenfassung

Die Apoptose ist ein essentieller physiologischer Prozess für die Entwicklung und zelluläre Homöostase eines jeden multizellulären Organismus. Im Immunsystem ist der apoptotische Zelltod sowohl für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz als auch für die Deletion aktiver Lymphocyten am Ende einer Immunantwort verantwortlich. Eine aberrante Apoptose kann daher eine Entstehung von systemischer als auch Organ-spezifischer Autoimmunität, die Entwicklung von Lymphomen oder aber eine Immundefizienz begünstigen. Die Erforschung der molekularen Mechanismen, die während der apoptotischen Signaltransduktion ablaufen, ist somit ein wichtiger Schritt, um die Entstehung von Immunerkrankungen zu verstehen und effektive Therapien zu entwickeln.

Zelluläre FLIP-Proteine (c-FLIP) greifen schon früh in die Apoptose ein, indem sie eine Weiterleitung des apoptotischen Signals bereits am Todesrezeptor verhindern. Dies macht sie zu potennten Apoptose-Inhibitoren und wichtigen Regulatoren in der apoptotischen Signaltransduktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch strukturelle und funktionelle Analysen die Bedeutung von c-FLIP-Proteinen im Immunsystem und ihre Beteiligung an der Entwicklung maligner Tumore eingehender untersucht. Durch strukturelle Analysen konnte das Bindungsmotiv identifiziert werden, über welches c-FLIP-Proteine an den Todesrezeptor rekrutiert werden und welches daher für ihre antiapoptotischen Fähigkeiten essentiell ist. Es konnte gezeigt werden, dass die c-FLIP-Rekrutierung über ein spezifisches hydrophobes Motiv in der zweiten Todeseffektorodomäne des Proteins erfolgt, weshalb es vermutlich mit proapoptotischer Procaspsase-8 um eine Bindung am Todesrezeptor kompetitiert. Im Gegensatz dazu assoziieren virale FLIP-Proteine wie MC159 über ein geladenes Interaktionsmotiv mit dem Todesrezeptorkomplex. Die Identifizierung des hydrophoben c-FLIP-Bindungsmotivs zeigt daher, dass zelluläre und virale FLIP-Proteine, trotz ihrer hohen strukturellen Homologie, Apoptose über sehr divergente Mechanismen inhibieren.

Eine deregulierte FLIP-Expression konnte bisher in einer ganzen Reihe von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Multipler Sklerose oder Rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden, und es ist daher zu vermuten, dass antiapoptotische FLIP-Proteine von zentraler Bedeutung für die Entstehung und Progression dieser Erkrankungen sind. Ziel dieser Arbeit war es daher auch, ein besseres Verständnis für die Funktion von FLIP-Proteinen im Immunsystem und im besonderen in T-Lymphocyten zu bekommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FLIP-Proteine einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität aktiver T-Lymphocyten während der initialen

Immunantwort nehmen. Vor allem die kurze FLIP-Spleißvariante c-FLIP_{short} ist maßgeblich an der Apoptose-Protektion während der T-Zellaktivierung beteiligt und kann auf diese Weise sicherstellen, dass aktivierte T-Zellen ihre Effektorfunktion im Zuge der T-Zell-vermittelten Immunität auch wahrnehmen können. Im weiteren konnte gezeigt werden, dass die stark erhöhte Expression von c-FLIP_{short} im Zuge der T-Zellaktivierung durch NFAT-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Die Induktion der Transkription erfolgt hierbei durch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 mit zwei NFAT-Bindungsstellen im humanen *c-FLIP*-Promotor vor Exon 1. Die Identifizierung von c-FLIP_{short}, nicht jedoch c-FLIP_{long}, als NFAT-reguliertes Molekül zeigt des weiteren, dass unterschiedliche Signalwege eine unabhängige Induktion der verschiedenen FLIP-Isoformen bewirken können.

Im weiteren konnte gezeigt werden, dass die kurzen humanen FLIP-Spleißvarianten c-FLIP_R und c-FLIP_{short} auf Grund eines SNPs (*single nucleotide polymorphism*) im 3' Spleißakzeptor von Intron 6 im *c-FLIP*-Gen generiert werden. Bei der Analyse der FLIP-Isoformen-Expression in verschiedenen Spezies konnte überraschender Weise eine Expression von c-FLIP_{short} nur im Menschen nachgewiesen werden, da entweder nur im menschlichen Genom ein intakter 3' Spleißakzeptor vor dem c-FLIP_{short} spezifischen Exon detektiert werden konnte oder ein c-FLIP_{short} spezifisches Exon im Genom anderer Spezies gar nicht existiert. Dies lässt vermuten, dass es sich bei c-FLIP_R um die evolutionär ältere kurze c-FLIP-Isoform handelt. Des Weiteren konnte eine verminderte Translationseffizienz von humanem c-FLIP_R im Vergleich zu c-FLIP_{short} nachgewiesen werden, welche sehr wahrscheinlich auf den Einfluss der Isoform-spezifischen C-terminalen Sequenzen zurückzuführen ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die differentielle Expression der kurzen c-FLIP-Isoformen mit der Entstehung maligner Tumore im Menschen korreliert. Es konnte ein vermehrtes Auftreten der c-FLIP_R Isoform in Patienten mit Follikulären Lymphomen nachgewiesen werden, so dass zu vermuten ist, dass im besonderen diese c-FLIP-Isoform eine Transformation und Progression des Lymphoms unterstützt.

Die wichtige Funktion von FLIP-Proteinen in der Entstehung und Progression zahlreicher maligner Tumore macht deutlich, dass sie ein attraktives Ziel in der Entwicklung von Krebstherapeutika darstellen. Eine sorgfältige Analyse der Funktion sowie der differentiellen Regulation der unterschiedlichen FLIP-Isoformen ist daher von zentraler Bedeutung für ein Verständnis als auch die Behandlung dieser Erkrankungen. Die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, über welche FLIP-Proteine ihr antiapoptotisches Potential entfalten, wie die Identifizierung des essentiellen Rekrutierungsmotivs zellulärer FLIP-Proteine, stellen somit eine wichtige Grundlage für die Entwicklung hochspezifischer c-FLIP-Inhibitoren dar.

5. Summary

Apoptosis constitutes an essential physiological process for the development and cellular homeostasis of multicellular organisms. In the immune system apoptotic cell death is responsible for the maintenance of self-tolerance as well as for the deletion of activated lymphocytes at the end of an immune response. Hence, aberrant apoptosis can support the development of systemic as well as organ-specific autoimmunity and lymphoma or the emergence of immune deficiency. Analyzing apoptotic signaling mechanisms is therefore of major importance in order to understand the pathogenesis of immune diseases and to design effective therapies.

Cellular FLIP proteins (c-FLIP) can prevent apoptosis induction already at the death receptor level. Therefore, they are potent apoptosis inhibitors and important regulators of apoptotic signaling pathways. This thesis describes functional and structural studies of cellular FLIP proteins in order to clarify their role as important apoptosis inhibitors in the immune system and their contribution to the development of malignant tumors. Structural analyses identified the binding motif of c-FLIP proteins which enables their recruitment to the death receptor upon apoptosis induction and which is therefore essential for their antiapoptotic properties. c-FLIP recruitment is mediated by a specific hydrophobic motif in their second death effector domain and c-FLIP proteins thereby most likely compete with proapoptotic caspase-8 for binding to the death receptor. On the contrary, viral FLIP proteins like MC159 have been shown to associate with the death receptor via a charged interaction motif. These results therefore indicate that, despite their high structural homology, cellular and viral FLIP proteins prevent apoptosis by very divergent mechanisms.

A deregulated FLIP expression has been observed in a multitude of autoimmune diseases, including multiple sclerosis or rheumatoid arthritis. Therefore, it can be assumed that antiapoptotic FLIP proteins are of major importance for the development and progression of such diseases. Hence, understanding the function of FLIP proteins in the immune system and especially in T lymphocytes was an additional aim of this thesis. It could be demonstrated that FLIP proteins critically influence the apoptosis sensitivity of activated T lymphocytes during the initial immune response. Especially the small FLIP splice variant c-FLIP_{short} is crucially involved in apoptosis protection during T cell activation and therefore assures accomplishment of the T cell's effector function. During my studies I identified that the highly increased expression of c-FLIP_{short} in the course of T cell activation is mediated by NFAT transcription factors. Induction of transcription occurs via the interaction of the transcription factors NFATc1 and NFATc2 with two NFAT binding motifs in the human

c-FLIP promoter in front of exon 1. The identification of c-FLIP_{short}, but not c-FLIP_{long}, as an NFAT-regulated target furthermore demonstrates that different signaling pathways can mediate an independent induction of the various FLIP isoforms.

In addition, this thesis provides evidence that the small human splice variants c-FLIP_R and c-FLIP_{short} are generated due to a SNP (*single nucleotide polymorphism*) at the 3' splice acceptor in Intron 6 in the *c-FLIP* gene. Surprisingly, by analyzing FLIP isoform expression in different species an expression of the small FLIP isoform c-FLIP_{short} could only be observed in humans that carry an intact splice acceptor in front of the c-FLIP_{short} specific exon. In other species, however, either this splice acceptor is mutated or a homologous c-FLIP_{short}-specific exon is not present in the genome. Hence, the c-FLIP_R isoform is presumably the ancient small FLIP isoform. In addition, a reduced translation efficiency of human c-FLIP_R in comparison to c-FLIP_{short} could be demonstrated, which is most likely controlled by the isoform-specific C-terminal sequences. Furthermore, a correlation between a differential expression of the short c-FLIP isoforms and the development of malignant tumors could be detected. An increased occurrence of c-FLIP_R could be verified in patients with follicular lymphoma. Therefore, it can be assumed that especially this isoform supports a transformation and progression of this type of lymphoma.

The major impact of FLIP proteins in the occurrence and progression of numerous tumors makes them an attractive target for the development of cancer therapeutics. A thorough analysis of the function and the differential regulation of the FLIP isoforms is therefore of pivotal importance for the understanding as well as for the treatment of such diseases. Resolution of the molecular mechanisms by which FLIP proteins deploy their antiapoptotic potential and the identification of their essential recruitment motif thus constitutes an important basis for the development of highly specific c-FLIP-inhibitors.

6. Literaturverzeichnis

- Alappat, E.C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A.E., Thorburn, A., Kidd, V.J., Slaughter, C.A., Osborn, S.L., *et al.* (2005). Phosphorylation of FADD at serine 194 by CK1alpha regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19, 321-332.
- Alappat, E.C., Volkland, J., and Peter, M.E. (2003). Cell cycle effects by C-FADD depend on its C-terminal phosphorylation site. *J Biol Chem* 278, 41585-41588.
- Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202.
- Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., and Hogan, P.G. (1998). Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1, 627-637.
- Aramburu, J., Yaffe, M.B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L.C., Hogan, P.G., and Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285, 2129-2133.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.
- Baumann, B., Bohnenstengel, F., Siegmund, D., Wajant, H., Weber, C., Herr, I., Debatin, K.M., Proksch, P., and Wirth, T. (2002). Rocaglamide derivatives are potent inhibitors of NF-kappa B activation in T-cells. *J Biol Chem* 277, 44791-44800.
- Bende, R.J., Smit, L.A., and van Noesel, C.J. (2007). Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21, 18-29.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Ottilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H., Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., *et al.* (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1172-1176.
- Bidere, N., Su, H.C., and Lenardo, M.J. (2005). Genetic Disorders of Programmed Cell Death in the Immune System. *Annu Rev Immunol.*
- Bleesing, J.J., Brown, M.R., Dale, J.K., Straus, S.E., Lenardo, M.J., Puck, J.M., Atkinson, T.P., and Fleisher, T.A. (2001). TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin Immunol* 100, 314-324.
- Bleesing, J.J., Brown, M.R., Novicio, C., Guarraia, D., Dale, J.K., Straus, S.E., and Fleisher, T.A. (2002). A composite picture of TcR alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol* 104, 21-30.
- Boatright, K.M., Deis, C., Denault, J.B., Sutherlin, D.P., and Salvesen, G.S. (2004). Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J* 382, 651-657.

- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.
- Budd, R.C., Yeh, W.C., and Tschopp, J. (2006). cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 6, 196-204.
- Bushnell, D.A., Cramer, P., and Kornberg, R.D. (2002). Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1218-1222.
- Carrington, P.E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J.M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., and Werner, M.H. (2006). The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* 22, 599-610.
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., and Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 154, 2706-2713.
- Chakrabandhu, K., Herincs, Z., Huault, S., Dost, B., Peng, L., Conchonaud, F., Marguet, D., He, H.T., and Hueber, A.O. (2007). Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J* 26, 209-220.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmler, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21, 3704-3714.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J.L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y.C., and Karin, M. (2006). The E3 ubiquitin ligase Itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124, 601-613.
- Chau, H., Wong, V., Chen, N.J., Huang, H.L., Lin, W.J., Mirtsos, C., Elford, A.R., Bonnard, M., Wakeham, A., You-Ten, A.I., et al. (2005). Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. *J Exp Med* 202, 405-413.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J., and Mountz, J.D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263, 1759-1762.

- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164.
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., et al. (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.
- Chuvpilo, S., Jankevics, E., Tyrsin, D., Akimzhanov, A., Moroz, D., Jha, M.K., Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Feoktistova, E., Konig, T., et al. (2002). Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 16, 881-895.
- Cleary, M.L., and Sklar, J. (1985). Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7439-7443.
- Cleary, M.L., Smith, S.D., and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19-28.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Davidson, W.F., Giese, T., and Fredrickson, T.N. (1998). Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 187, 1825-1838.
- de Jong, D. (2005). Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol* 23, 6358-6363.
- Degterev, A., and Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 378-390.
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochevier, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den Broecke, C., Van Damme, P., D'Herde, K., Hachem, J.P., et al. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol* 9, 666-674.
- Djerbi, M., Darreh-Shori, T., Zhivotovsky, B., and Grandien, A. (2001). Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol* 54, 180-189.
- Djerbi, M., Sclepanti, V., Catrina, A.I., Bogen, B., Biberfeld, P., and Grandien, A. (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 190, 1025-1032.
- Dohrman, A., Russell, J.Q., Cuenin, S., Fortner, K., Tschopp, J., and Budd, R.C. (2005). Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol* 175, 311-318.
- Dutton, A., O'Neil, J.D., Milner, A.E., Reynolds, G.M., Starczynski, J., Crocker, J., Young, L.S., and Murray, P.G. (2004). Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects

- Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 6611-6616.
- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., Zheng, L., Lenardo, M.J., and Fesik, S.W. (1998). NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. Nature 392, 941-945.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep 7, 988-994.
- Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., and Tschachler, E. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. Mol Biol Evol 25, 831-841.
- Feig, C., Tchikov, V., Schutze, S., and Peter, M.E. (2007). Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. EMBO J 26, 221-231.
- Festjens, N., Cornelis, S., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2006). Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. Biol Chem 387, 1005-1016.
- Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell Death Differ 10, 76-100.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell 81, 935-946.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J 384, 201-232.
- Garcia-Cozar, F.J., Okamura, H., Aramburu, J.F., Shaw, K.T., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., and Rao, A. (1998). Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. J Biol Chem 273, 23877-23883.
- Garvey, T., Bertin, J., Siegel, R., Lenardo, M., and Cohen, J. (2002a). The death effector domains (DEDs) of the molluscum contagiosum virus MC159 v-FLIP protein are not functionally interchangeable with each other or with the DEDs of caspase-8. Virology 300, 217-225.
- Garvey, T.L., Bertin, J., Siegel, R.M., Wang, G.H., Lenardo, M.J., and Cohen, J.I. (2002b). Binding of FADD and caspase-8 to molluscum contagiosum virus MC159 v-FLIP is not sufficient for its antiapoptotic function. J Virol 76, 697-706.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. J Biol Chem 280, 14507-14513.
- Golks, A., Brenner, D., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2006). The c-FLIP-NH₂ terminus (p22-FLIP) induces NF-κB activation. J Exp Med 203, 1295-1305.
- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M., and Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. J Biol Chem 272, 19641-19644.

- Goto, Y., Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Matsui, T., Maeda, A., and Manabe, N. (2004). Porcine (*Sus scrofa*) cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP): molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. *J Reprod Dev* 50, 549-555.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K., and Navia, M.A. (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82, 507-522.
- Han, D.K., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask, B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M., and Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11333-11338.
- Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Palleja, M., Krammer, P.H., and Defrance, T. (2000). Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol* 165, 3023-3030.
- Hennino, A., Berard, M., Krammer, P.H., and Defrance, T. (2001). FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 193, 447-458.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M., and Dixit, V.M. (1997a). A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 9621-9624.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997b). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17255-17257.
- Hua, Z.C., Sohn, S.J., Kang, C., Cado, D., and Winoto, A. (2003). A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* 18, 513-521.
- Huai, Q., Kim, H.Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J.O., and Ke, H. (2002). Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12037-12042.
- Hughes, P.D., Belz, G.T., Fortner, K.A., Budd, R.C., Strasser, A., and Bouillet, P. (2008). Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28, 197-205.
- Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Siddiqui, A.M., Haines, G.K., 3rd, Wu, T., Li, Q.Z., Davis, L.S., Mohan, C., and Perlman, H. (2008). Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* 28, 206-217.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10717-10722.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.

- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Kang, T.B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E.E., Pewzner-Jung, Y., Yoge, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., et al. (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* 173, 2976-2984.
- Kataoka, T. (2005). The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* 25, 31-58.
- Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmiger, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschoop, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 161, 3936-3942.
- Kataoka, T., and Tschoop, J. (2004). N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24, 2627-2636.
- Kawadler, H., Gantz, M.A., Riley, J.L., and Yang, X. (2008). The paracaspase MALT1 controls caspase-8 activation during lymphocyte proliferation. *Mol Cell* 31, 415-421.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kerstan, A., Armbruster, N., Leverkus, M., and Hunig, T. (2006). Cyclosporin A abolishes CD28-mediated resistance to CD95-induced apoptosis via superinduction of caspase-3. *J Immunol* 177, 7689-7697.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8, 1348-1358.
- Kim, H.E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17545-17550.
- Kim, S., and Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 9, 289-320.
- Kim, Y., Suh, N., Sporn, M., and Reed, J.C. (2002). An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 22320-22329.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., and Gottesman, M.M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525-528.
- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Krueger, A., Schmitz, I., and Krammer, P.H. (2000). TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165, 6293-6300.

- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276, 46639-46646.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L.A., Tempczyk, A., Kalish, V.J., Tucker, K.D., Showalter, R.E., Moomaw, E.W., et al. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378, 641-644.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8, 22-33.
- Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S., and Schimpl, A. (1995). Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25, 2572-2577.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Pena-Cruz, V., Dorfman, D.M., Jinushi, M., Umetsu, S.E., Butte, M.J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., et al. (2007). TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27, 927-940.
- Koizumi, T., Wang, J., Suzuki, Y., Masuda, K., and Watanabe, T. (1996). Regulation of bcl-xL expression and Fas susceptibility in mouse B cells by CD40 ligation, surface IgM crosslinking and IL-4. *Mol Immunol* 33, 1247-1253.
- Krammer, P.H., Arnold, R., and Lavrik, I.N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7, 532-542.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., et al. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001a). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 8247-8254.
- Krueger, A., Fas, S.C., Baumann, S., and Krammer, P.H. (2003). The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193, 58-69.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001b). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.

- Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525-535.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-1580.
- Lee, M., and Park, J. (2006). Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol Cells* 22, 1-7.
- Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353, 858-861.
- Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7, 767-777.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Li, F.Y., Jeffrey, P.D., Yu, J.W., and Shi, Y. (2005). Crystal structure of a Viral FLIP: Insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling. *J Biol Chem*.
- Limpens, J., de Jong, D., van Krieken, J.H., Price, C.G., Young, B.D., van Ommen, G.J., and Kluin, P.M. (1991). Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6, 2271-2276.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19, 341-352.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5, 472-484.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-752.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.
- Marsden, V.S., and Strasser, A. (2003). CONTROL OF APOPTOSIS IN THE IMMUNE SYSTEM: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. *Annu Rev Immunol* 21, 71-105.
- Martinon, F., and Tschoop, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561-574.

- Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Johrens-Leder, K., Vornlocher, H.P., et al. (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 199, 1041-1052.
- McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79-88.
- McDonnell, T.J., and Korsmeyer, S.J. (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349, 254-256.
- Medema, J.P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C.J., and Offringa, R. (1999). Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190, 1033-1038.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.
- Medyouf, H., Alcalde, H., Berthier, C., Guillemin, M.C., dos Santos, N.R., Janin, A., Decaudin, D., de The, H., and Ghysdael, J. (2007). Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 13, 736-741.
- Meinl, E., Fickenscher, H., Thome, M., Tschopp, J., and Fleckenstein, B. (1998). Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today* 19, 474-479.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21, 5299-5305.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Misra, R.S., Russell, J.Q., Koenig, A., Hinshaw-Makepeace, J.A., Wen, R., Wang, D., Huo, H., Littman, D.R., Ferch, U., Ruland, J., et al. (2007). Caspase-8 and c-FLIPL associate in lipid rafts with NF-kappaB adaptors during T cell activation. *J Biol Chem* 282, 19365-19374.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435-439.
- Mizuno, T., Zhong, X., and Rothstein, T.L. (2003). Fas-induced apoptosis in B cells. *Apoptosis* 8, 451-460.
- Mora, A.L., Corn, R.A., Stanic, A.K., Goenka, S., Aronica, M., Stanley, S., Ballard, D.W., Joyce, S., and Boothby, M. (2003). Antiapoptotic function of NF-kappaB in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL. *Cell Death Differ* 10, 1032-1044.
- Muppudi, J.R., Lobito, A.A., Ramaswamy, M., Yang, J.K., Wang, L., Wu, H., and Siegel, R.M. (2006). Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 1641-1650.

- Muppidi, J.R., and Siegel, R.M. (2004). Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol* 5, 182-189.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Newton, K., Harris, A.W., Bath, M.L., Smith, K.G., and Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J* 17, 706-718.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nishimura, Y., Hirabayashi, Y., Matsuzaki, Y., Musette, P., Ishii, A., Nakauchi, H., Inoue, T., and Yonehara, S. (1997). In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver. *Int Immunol* 9, 307-316.
- Noguchi, H., Matsushita, M., Okitsu, T., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Kang, S., Li, S.T., Kobayashi, N., Matsumoto, S., Tanaka, K., et al. (2004). A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 10, 305-309.
- Ow, Y.L., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 532-542.
- Owyang, A.M., Tumang, J.R., Schram, B.R., Hsia, C.Y., Behrens, T.W., Rothstein, T.L., and Liou, H.C. (2001). c-Rel is required for the protection of B cells from antigen receptor-mediated, but not Fas-mediated, apoptosis. *J Immunol* 167, 4948-4956.
- Park, C.S., and Choi, Y.S. (2005). How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114, 2-10.
- Park, D., Tosello-Trampont, A.C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L., Mandell, J.W., and Ravichandran, K.S. (2007a). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* 450, 430-434.
- Park, H.H., Lo, Y.C., Lin, S.C., Wang, L., Yang, J.K., and Wu, H. (2007b). The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 25, 561-586.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.
- Pellegrini, M., Bath, S., Marsden, V.S., Huang, D.C., Metcalf, D., Harris, A.W., and Strasser, A. (2005). FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells. *Blood* 106, 1581-1589.
- Perez, D., and White, E. (2003). E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha by downregulating c-FLIP. *S. J Virol* 77, 2651-2662.

- Peter, M.E., Budd, R.C., Desbarats, J., Hedrick, S.M., Hueber, A.O., Newell, M.K., Owen, L.B., Pope, R.M., Tschopp, J., Wajant, H., et al. (2007). The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129, 447-450.
- Petros, A.M., Nettesheim, D.G., Wang, Y., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E.D., Zhang, H., Thompson, C.B., et al. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9, 2528-2534.
- Poukkula, M., Kaunisto, A., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Katajamaki, T., Johnson, M.S., Sistonen, L., and Eriksson, J.E. (2005). Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem* 280, 27345-27355.
- Proksch, P., Giaisi, M., Treiber, M.K., Palfi, K., Merling, A., Spring, H., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2005). Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. *J Immunol* 174, 7075-7084.
- Raghavan, S.C., Swanson, P.C., Wu, X., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2004). A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 428, 88-93.
- Ramaswamy, M., and Siegel, R.M. (2007). A FAScinating receptor in self-tolerance. *Immunity* 26, 545-547.
- Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., et al. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 5, 271-288.
- Ravichandran, K.S., and Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7, 964-974.
- Reed, J.C., Doctor, K., Rojas, A., Zapata, J.M., Stehlík, C., Fiorentino, L., Damiano, J., Roth, W., Matsuzawa, S., Newman, R., et al. (2003). Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res* 13, 1376-1388.
- Roesler, J., Izquierdo, J.M., Ryser, M., Rosen-Wolff, A., Gahr, M., Valcarcel, J., Lenardo, M.J., and Zheng, L. (2005). Haploinsufficiency, rather than the effect of an excessive production of soluble CD95 (CD95{Delta}TM), is the basis for ALPS Ia in a family with duplicated 3' splice site AG in CD95 intron 5 on one allele. *Blood* 106, 1652-1659.
- Ruberti, G., Cascino, I., Papoff, G., and Eramo, A. (1996). Fas splicing variants and their effect on apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406, 125-134.
- Russell, J.H., Rush, B., Weaver, C., and Wang, R. (1993). Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4409-4413.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75, 253-261.
- Saleh, M., Mathison, J.C., Wolinski, M.K., Bensinger, S.J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R.J., Green, D.R., and Nicholson, D.W. (2006). Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440, 1064-1068.

- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., et al. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Sandu, C., Morisawa, G., Wegorzewska, I., Huang, T., Arechiga, A.F., Hill, J.M., Kim, T., Walsh, C.M., and Werner, M.H. (2006). FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death Differ* 13, 2052-2061.
- Santiago, C., Ballesteros, A., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Kaplan, G.G., Freeman, G.J., and Casasnovas, J.M. (2007). Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity* 27, 941-951.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999a). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999b). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274, 22532-22538.
- Scaffidi, C., Volkland, J., Blomberg, I., Hoffmann, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (2000). Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70- kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* 164, 1236-1242.
- Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2003). An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells towards CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* 171, 2930-2936.
- Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ* 6, 821-822.
- Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S.C., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2004). Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol* 172, 2194-2200.
- Schneider, T.J., Grillot, D., Foote, L.C., Nunez, G.E., and Rothstein, T.L. (1997). Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 159, 4834-4839.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459.
- Schutze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 655-662.

- Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K. (2005). Regulation of Apoptosis by Alternative Splicing. *Mol Cell* in revision.
- Shastry, B.S. (2007). SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet* 52, 871-880.
- Shibasaki, F., Hallin, U., and Uchino, H. (2002). Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem (Tokyo)* 131, 1-15.
- Shu, H.B., Halpin, D.R., and Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.
- Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J., and Lenardo, M.J. (1998). Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol* 141, 1243-1253.
- Siegel, R.M., Muppudi, J.R., Sarker, M., Lobito, A., Jen, M., Martin, D., Straus, S.E., and Lenardo, M.J. (2004). SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol* 167, 735-744.
- Sobell, H.M. (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5328-5331.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Ottolie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., et al. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 18542-18545.
- Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2008). IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 30, 123-135.
- Stagni, V., di Bari, M.G., Cursi, S., Condo, I., Cencioni, M.T., Testi, R., Lerenthal, Y., Cundari, E., and Barila, D. (2008). ATM kinase activity modulates Fas sensitivity through the regulation of FLIP in lymphoid cells. *Blood* 111, 829-837.
- Stevenson, F., Sahota, S., Zhu, D., Ottensmeier, C., Chapman, C., Oscier, D., and Hamblin, T. (1998). Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* 162, 247-259.
- Stranges, P.B., Watson, J., Cooper, C.J., Choisy-Rossi, C.M., Stonebraker, A.C., Beighton, R.A., Hartig, H., Sundberg, J.P., Servick, S., Kaufmann, G., et al. (2007). Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 26, 629-641.
- Strasser, A., Harris, A.W., and Cory, S. (1993). E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 8, 1-9.
- Straus, S.E., Jaffe, E.S., Puck, J.M., Dale, J.K., Elkorn, K.B., Rosen-Wolff, A., Peters, A.M., Sneller, M.C., Hallahan, C.W., Wang, J., et al. (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98, 194-200.

- Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S., and Lenardo, M. (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307, 1465-1468.
- Suzuki, H., Kundig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., Griesser, H., et al. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268, 1472-1476.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76, 969-976.
- Takeuchi, K., Roehrl, M.H., Sun, Z.Y., and Wagner, G. (2007). Structure of the calcineurin-NFAT complex: defining a T cell activation switch using solution NMR and crystal coordinates. *Structure* 15, 587-597.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Tepper, C.G., and Seldin, M.F. (1999). Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 94, 1727-1737.
- The International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426, 789-796.
- Thomas, R.K., Kallenborn, A., Wickenhauser, C., Schultze, J.L., Draube, A., Vockerodt, M., Re, D., Diehl, V., and Wolf, J. (2002). Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 160, 1521-1528.
- Thome, M. (2008). Multifunctional roles for MALT1 in T-cell activation. *Nat Rev Immunol* 8, 495-500.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., et al. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Troeger, A., Schmitz, I., Siepermann, M., Glouchkova, L., Gerdemann, U., Janka-Schaub, G.E., Schulze-Osthoff, K., and Diloo, D. (2007). Up-regulation of c-FLIPS+R upon CD40 stimulation is associated with inhibition of CD95-induced apoptosis in primary precursor B-ALL. *Blood* 110, 384-387.

- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224, 1403-1406.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6, 961-967.
- Uriarte, S.M., Joshi-Barve, S., Song, Z., Sahoo, R., Gobejishvili, L., Jala, V.R., Haribabu, B., McClain, C., and Barve, S. (2005). Akt inhibition upregulates FasL, downregulates c-FLIPs and induces caspase-8-dependent cell death in Jurkat T lymphocytes. *Cell Death Differ* 12, 233-242.
- Valnet-Rabier, M.B., Challier, B., Thiebault, S., Angonin, R., Margueritte, G., Mougin, C., Kantelip, B., Deconinck, E., Cahn, J.Y., and Fest, T. (2005). c-Flip protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome. *Br J Haematol* 128, 767-773.
- van Eijk, M., Medema, J.P., and de Groot, C. (2001). Cutting edge: cellular Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein protects germinal center B cells from apoptosis during germinal center reactions. *J Immunol* 166, 6473-6476.
- Van Parijs, L., Biuckians, A., Ibragimov, A., Alt, F.W., Willerford, D.M., and Abbas, A.K. (1997). Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* 158, 3738-3745.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A.K., and Baltimore, D. (1999). Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity* 11, 763-770.
- Vance, J.E., and Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 44, 207-234.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., et al. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.
- Wang, J., Lobito, A.A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A., and Lenardo, M.J. (2000). Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. *Eur J Immunol* 30, 155-163.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Weant, A.E., Michalek, R.D., Khan, I.U., Holbrook, B.C., Willingham, M.C., and Grayson, J.M. (2008). Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Immunity* 28, 218-230.
- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.

- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 19, 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856-859.
- Wu, Y., Tibrewal, N., and Birge, R.B. (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* 16, 189-197.
- Yang, J.K. (2008). FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 49, 19-27.
- Yang, J.K., Wang, L., Zheng, L., Wan, F., Ahmed, M., Lenardo, M.J., and Wu, H. (2005). Crystal Structure of MC159 Reveals Molecular Mechanism of DISC Assembly and FLIP Inhibition. *Mol Cell* 20, 939-949.
- Yeh, J.H., Hsu, S.C., Han, S.H., and Lai, M.Z. (1998a). Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med* 188, 1795-1802.
- Yeh, W.C., Itie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D.V., et al. (2000). Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12, 633-642.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., et al. (1998b). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.
- Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169, 1747-1756.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Zaichuk, T.A., Shroff, E.H., Emmanuel, R., Filleur, S., Nelius, T., and Volpert, O.V. (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 199, 1513-1522.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H., and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.
- Zhang, J., Kabra, N.H., Cado, D., Kang, C., and Winoto, A. (2001). FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery. *J Biol Chem* 276, 29815-29818.
- Zhang, X., Li, L., Choe, J., Krajewski, S., Reed, J.C., Thompson, C., and Choi, Y.S. (1996). Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 173, 149-154.

- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H., and Lenardo, M.J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.
- Zong, W.X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 20, 1-15.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC-like DLBCL	Aktivierten B-Zellen ähnliches diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma)
ACAD	activated cell-autonomous death
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	activation-induced cell death
AIF	apoptosis-inducing factor
ALPS	Autoimmun-Lymphoproliferatives Syndrom
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
AP-1	activator protein 1
APC	Antigen-presenting cell
AS	Aminosäure
ASHM	aberrant somatic hypermutation
ATP	Adenosintriphosphat
BAI-1	brain specific angiogenesis inhibitor 1
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x	B-cell lymphoma-like X
BCP-ALL	B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia blasts
BCR	B-Zell-Rezeptor (B cell receptor)
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	BH3-interacting death agonist
BIR	baculoviral IAP repeat

B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
bp	Basenpaare
CAD	caspase-activated DNase
CaN	Calcineurin
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
Caspase	cysteine-dependent aspartate-directed protease
CEDS	caspase-8 deficiency state
CD95	cluster of differentiation 95
CD95L	cluster of differentiation 95 Ligand
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CHX	Cycloheximid
CRAC	calcium-release-activated calcium channel
CRD	Cystein-reiche Domäne
CsA	Cyclosporin A
CSR	Isotyp-Wechsel (class-switch recombination)
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)
DEF	Todeseffektorfilament (death effector filament)
Diablo	direct IAP binding protein with low pI
DISC	death inducing signaling complex
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell Lymphom (diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNT	doppelt negative T-Zelle
DR	Todesrezeptor (death receptor)

EHV2	Equine herpesvirus-2
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FADD	FAS-associated death domain protein
FADD-DN	dominant-negatives FADD
FDC	follicular dendritic cells
FL	Follikuläres Lymphom
FLICE	FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme
FKBP-12	FK506-binding protein-12
GC	Keimzentrum (germinal centre)
gld	generalized lymphoproliferativ disorder
HHV8	Human Herpesvirus 8
HRS-Zellen	Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen
IAP	inhibitor of apoptosis
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
ICAM3	intracellular adhesion molecule 3
Ig	Immunglobulin
IgH	schwere Antikörperkette (immunglobulin heavy chain)
IgL	leichte Antikörperkette (immunglobulin light chain)
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-R	IL-Rezeptor
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	1,4,5-Inositol-Trisphosphat
LPL	lymphoplasmocytisches Lymphom
lpr	lymphoproliferation
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase Kinase
MCV	<i>Molluscum contagiosum</i> Virus
MFG-E8	milk fat globule epidermal growth factor 8
MHC	major histocompatibility complex
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK Zellen	natural killer cells
NLS	nuclear localization signal
NOD	Nukleotidbinde- und Oligomerisierungsdomäne
OPG	Osteoprotegrin
PKC	Proteinkinase C
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PYD	pyrin domain
Ros	Roscovitin
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
sCD95	sekretierter CD95-Rezeptor
SHM	somatic hypermutation
SLE	systemic lupus erythematosus
Smac	second mitochondrial activator of caspases
SNP	single nucleotide polymorphism

SPOTS	signalling <u>protein oligomerization</u> <u>transduction</u> <u>structures</u>
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
Th1	T-Helperzelle Typ 1
Th2	T-Helperzelle Typ 2
TIM-1/-4	T cell immunoglobulin mucin-1/-4
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAMP	TNF-receptor apoptosis-mediating protein
TSP	Thromospondin
UTR	untranslated region
v-FLIP	viral FLICE-inhibitory protein
WB	Western Blot
WM	Wortmannin
XIAP	x-linked inhibitor of apoptosis

8. Publikationen

Mutational analyses of c-FLIP_R, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment

Nana Ueffing, Eric Keil, Christian Freund, Ronald Kühne, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz

Cell Death and Differentiation. 2008. Apr; 15(4): 773-782

Up-regulation of c-FLIP_{short} by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells

Nana Ueffing, Marc Schuster, Eric Keil, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz

Blood. 2008. Aug 1; 112(3): 690-8

A SNP in the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) gene determines protein isoform production and is associated with risk of follicular lymphoma in humans

Nana Ueffing*, Kusum Kumari Singh*, Andrea Christians, Christoph Thorns, Alfred C. Feller, Florian Nagl, Falco Fend, Sebastian Heikaus, Alexander Marx, Reiner B. Zott, Joachim Brade, Wolfgang A. Schulz, Klaus Schulze-Osthoff, Ingo Schmitz**, Christian Schwerk**

Submitted.

Mutational analyses of c-FLIP_R, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment

N Ueffing¹, E Keil¹, C Freund², R Kühne³, K Schulze-Osthoff¹ and I Schmitz^{*1}

Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) proteins are known as potent inhibitors of death receptor-mediated apoptosis by interfering with caspase-8 activation at the death-inducing signaling complex (DISC). Among the three human isoforms, c-FLIP_{long}, c-FLIP_{short} and c-FLIP_R, the latter isoform is poorly characterized. We report here the characterization of murine c-FLIP_R and show that it is the only short c-FLIP isoform expressed in mice. By generating several mutants, we demonstrate that both death effector domains (DEDs) are required for DISC binding and the antiapoptotic function of c-FLIP_R. Surprisingly, the C-terminal tail is important for both protein stability and DISC recruitment. Three-dimensional modeling of c-FLIP_R revealed a substantial similarity of the overall structures and potential interaction motifs with the viral FLIP MC159. We found, however, that c-FLIP_R uses different structural motifs for its DISC recruitment. Whereas MC159 interferes with interaction and self-oligomerization of the DISC component FADD by its extensive hydrophilic surface, a narrow hydrophobic patch of c-FLIP_R on the surface of DED2 is crucial for DISC association. Thus, despite the presence of similar tandem DEDs, viral and cellular FLIPs inhibit apoptosis by remarkably divergent mechanisms.

Cell Death and Differentiation (2008) 15, 773–782; doi:10.1038/sj.cdd.4402314; published online 25 January 2008

Death receptors like CD95 (Fas/Apo-1) transduce death signals upon ligand binding and formation of a death-inducing signaling complex (DISC), which comprises the receptor, the adaptor protein Fas-associated death domain (FADD) and procaspase-8 (FLICE) or procaspase-10.¹ This assembly brings procaspase-8/10 in close proximity to the receptor and allows them to be activated by dimerization.^{2–4} Activation of the initiator caspases can be counteracted by FLICE-inhibitory proteins (FLIPs).^{5,6} Next to viral FLIP (v-FLIP) proteins,⁷ three cellular homologs (cellular FLICE-inhibitory proteins (c-FLIPs)) have been identified, namely c-FLIP_{long}, c-FLIP_{short} and c-FLIP_R, which are generated by differential splicing.^{8–10} The C-terminus of c-FLIP_{long} contains a catalytically inactive caspase-like domain, whereas c-FLIP_{short} and c-FLIP_R have only a truncated C-terminus.

As a characteristic feature, FLIP proteins contain tandem death effector domains (DEDs), which mediate their recruitment into the DISC.^{10,11} The DED forms a bundle of six antiparallel α -helices similar to the death domain (DD) and the caspase recruitment domain (CARD), two other signaling motifs involved in homotypic protein interactions.¹² Curiously, despite their importance in apoptosis, there are currently no reported structures for cellular FLIP proteins. Only the structure of the tandem DEDs of the v-FLIP MC159 from *Molluscum contagiosum* has been reported showing a rigidly associated

dumbbell-shaped molecule, which is tightly packed by an extensive hydrophobic interface between its two DEDs.^{13,14} Similar to FADD, each DED of MC159 contains two prominent surface features important for protein interactions that distinguish them from other death motifs, namely a hydrophobic patch and a charge triad, also known as RxLD motif.^{13–16}

Although the structure of MC159 provides a template for understanding the mechanism of FLIP inhibition, it is unknown which structural motifs mediate DISC recruitment of cellular FLIP proteins. In the present study, we characterize for the first time the short isoform of murine c-FLIP and show that c-FLIP_R but not c-FLIP_{short} is the sole truncated isoform expressed in murine cells. We further demonstrate that both DEDs of c-FLIP_R are crucial for DISC recruitment and inhibition of caspase-8 processing. Moreover, we found that the unique C-terminal tail of c-FLIP_R not only determines protein stability, but also its antiapoptotic function. Interestingly, despite the structural similarity of MC159 and c-FLIP_R, point mutations in the charge triads, which block apoptosis protection by MC159, did not abrogate apoptosis inhibition by c-FLIP_R. Instead, we show that the hydrophobic patch in DED2 is critical for recruitment of c-FLIP_R into the DISC. Thus, our results demonstrate that viral and cellular FLIPs prevent apoptosis by divergent mechanisms, suggesting a surprisingly functional diversity of the DED motif.

¹Institute of Molecular Medicine, University of Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, Düsseldorf D-40225, Germany; ²Protein Engineering Group, Leibniz-Institute of Molecular Pharmacology, Robert-Roessle-Strasse 10, Berlin D-13125, Germany and ³Drug Design Group, Leibniz-Institute of Molecular Pharmacology, Robert-Roessle-Strasse 10, Berlin D-13125, Germany

*Corresponding author: I Schmitz, Institute of Molecular Medicine, University of Düsseldorf, Building 23.12, Universitätsstrasse 1, Düsseldorf D-40225, Germany. Tel: +49 211 8115893; Fax: +49 211 8115892; E-mail: ingo.schmitz@uni-duesseldorf.de

Keywords: apoptosis; CD95; caspase-8; c-FLIP; DISC

Abbreviations: CD95L, CD95 ligand; c-FLIP, cellular FLICE-inhibitory protein; CHX, cycloheximide; DED, death effector domain; DISC, death-inducing signaling complex; FADD, Fas-associated death domain; v-FLIP, viral FLICE-inhibitory protein

Received 30.7.07; revised 26.11.07; accepted 17.12.07; Edited by A Ashkenazi; published online 25.1.08

Results

c-FLIP_R but not c-FLIP_{short} is expressed in mouse. Although two short splice variants, c-FLIP_{short} and c-FLIP_R, have been described in human cells,^{8,10,17} little is known about their expression in other species. As human c-FLIP_{short} is expressed primarily in lymphoid tissues,¹⁸ we prepared RNA from mouse thymus and performed RT-PCR. A cDNA with an open reading frame of 648 bp was cloned, encoding a protein of 215 amino acids (aa). Surprisingly, sequence alignment with human c-FLIP revealed that it resembles more human c-FLIP_R than c-FLIP_{short} (Figure 1a).

Comparison of the gene structures showed that the human c-FLIP gene comprises 14 exons spanning about 52 kb, whereas the mouse gene has 10 exons spanning 42 kb (Figure 1b). The mRNA of mouse c-FLIP_{long} contains all 10 exons, with the translational start in exon 2 and the stop codon in exon 10 (Figure 1b). Mouse c-FLIP_R is generated when exon 5 is not spliced to exon 6, which encodes a part of the c-FLIP_{long} protein. Instead, the c-FLIP_R mRNA includes an intronic sequence with an in-frame stop codon (Figure 1b). Similar splice events occur during generation of human c-FLIP_{long} and c-FLIP_R. However, the human c-FLIP gene contains an additional exon 7 that can be alternatively spliced to c-FLIP_{short} (Figure 1b). As a homologous exon is missing in the mouse gene, c-FLIP_R is the only short isoform expressed in murine cells.

Mouse c-FLIP_R is rapidly degraded via the proteasome pathway. To characterize mouse c-FLIP_R, we generated Flag-tagged versions of the full-length molecule and a C-terminal deletion mutant (c-FLIP_R-ΔC, aa 1–186) comprising only the tandem DEDs (Figure 2a). These constructs were stably transfected into the mouse B-cell line A20 that is sensitive to CD95-mediated apoptosis. Analyzing various clones with different expression levels, we generally observed a higher expression of the truncated c-FLIP_R-ΔC

construct compared with the full-length protein, although the expression of other DISC components, including CD95, FADD and caspase-8, remained unchanged (Figure 2b). As human c-FLIP_{short} and c-FLIP_R have a short half-life time,^{8,19} we tested the stability of mouse c-FLIP_R. To this end, we treated A20 cells expressing comparable amounts of either c-FLIP_R or c-FLIP_R-ΔC with the translation inhibitor cycloheximide (CHX). As shown in Figure 2c, expression of full-length c-FLIP_R decreased rapidly upon addition of CHX, suggesting a fast degradation of the protein. In contrast, the levels of c-FLIP_R-ΔC remained constant even after 8 h of CHX treatment (Figure 2c). Thus, the C-terminal amino acids seem to determine the stability of the mouse c-FLIP_R protein.

We next tested whether degradation of c-FLIP_R is mediated by the ubiquitin–proteasome pathway. HEK293T cells were transfected with His-tagged ubiquitin alone or together with c-FLIP_R, c-FLIP_R-ΔC or additional mutants. Immunoblot analysis of the ubiquitinated proteins, enriched from cell lysates with Ni²⁺-beads, revealed that c-FLIP_R was polyubiquitinated, showing a typical high-molecular-weight ubiquitin ladder (Figure 2d). In contrast, ubiquitination of the mutant c-FLIP_R-ΔC was strongly reduced, suggesting that the C-terminal sequence is important for this process.

Poukkula et al.²⁰ found two lysine residues (K192, K195), which mediate ubiquitin-dependent degradation of human c-FLIP_{short}. To investigate whether these lysines are also required for degradation of mouse c-FLIP_R, we mutated the homolog residues to arginine (K196R/K200R). Surprisingly, the K196R/K200R-mutant was as efficiently ubiquitinated as the wild-type protein (Figure 2d). Therefore, the C-terminal tail does not contain the essential ubiquitination sites but might rather play an indirect role for c-FLIP_R degradation. Consistent with this, c-FLIP_R mutants encoding only the first (DED1) or the second DED (DED2) became also ubiquitinated (Figure 2d). Thus, these experiments suggest that mouse c-FLIP_R has a short half-life time due to proteasome-mediated degradation, which is influenced by its unique C-terminus.

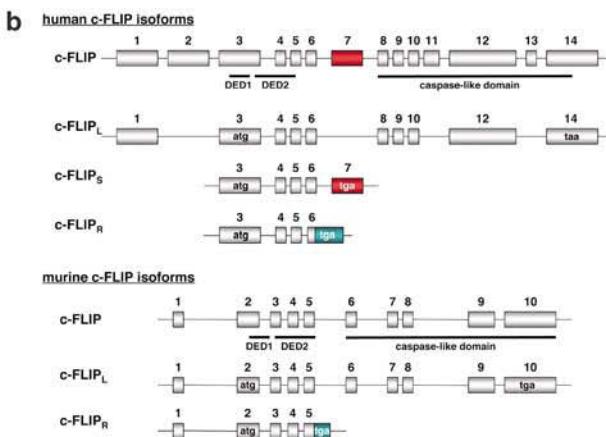
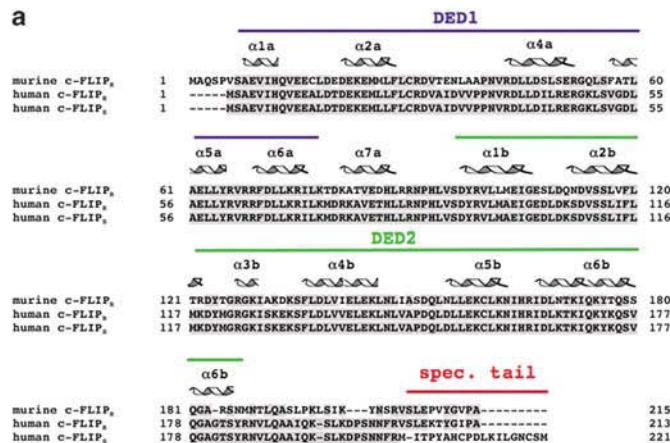


Figure 1 Mouse and human c-FLIP isoforms. (a) Sequence alignment of murine c-FLIP_R with human c-FLIP_R and c-FLIP_{short}. The sequence of the short c-FLIP isoform cloned from mouse thymus was aligned to human c-FLIP_R (as published in Djerbi et al.¹⁷) and human c-FLIP_{short} (AAC51623) using the Geneious software (<http://www.geneious.com>). Sequences are shown in single-letter amino-acid code. (b) Intron-exon structure of the human (top) and mouse (bottom) gene locus. Exons containing the translational start and stop codons are labeled with 'atg', 'taa' and 'tga', respectively. Regions encoding for the first DED, the second DED and the caspase-like domains are indicated. The human-specific exon 7, which is contained in the c-FLIP_{short} mRNA, is marked in red, and the intronic sequences are marked in green.

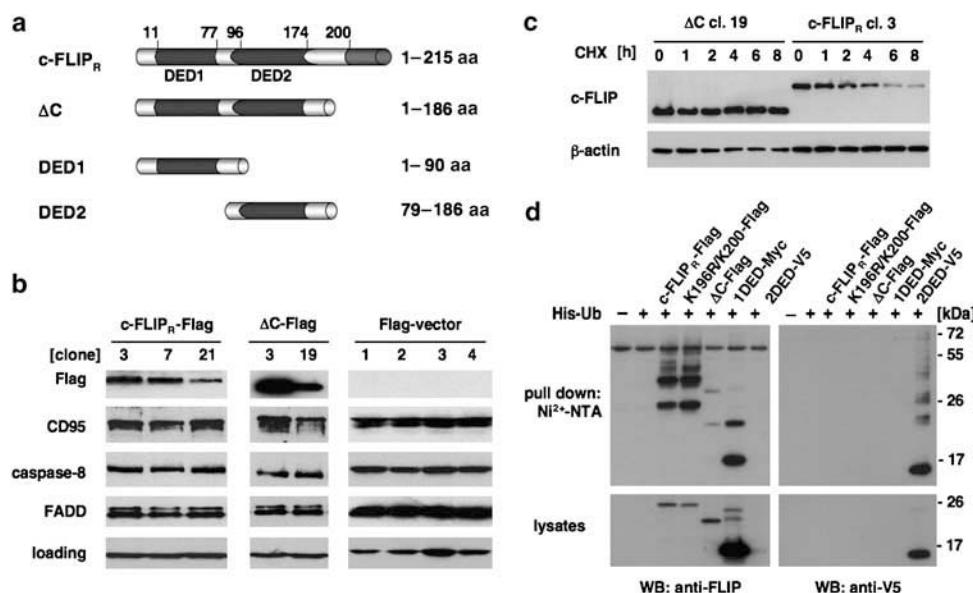


Figure 2 Deletion of the C-terminal tail of c-FLIP_R increases protein stability. (a) Schematic representation of the different c-FLIP_R mutants. Full-length murine c-FLIP_R and the ΔC-construct contain the two characteristic DEDs at amino-acid positions 11–77 and 96–174. c-FLIP_R-ΔC lacks the C-terminal tail starting at position 200 aa. The constructs DED1 and DED2 encode only the first and second DED, respectively. (b) A20 transfectants stably expressing an empty pEF-Flag-control vector, full-length c-FLIP_R or c-FLIP_R-ΔC cloned into the pEF-Flag-vector were analyzed by western blotting for the expression of c-FLIP_R, CD95, caspase-8 and FADD. Blots were probed with either anti-β-actin or anti-tubulin to control equal protein loading. The results show representative blots from several generated clones with different expression levels of the transgenes. (c) A20 cells stably transfected either with full-length c-FLIP_R or with c-FLIP_R-ΔC were treated for 0, 2, 4, 6 and 8 h with CHX (10 µg/ml). Subsequently, cells were lysed and analyzed by western blotting for c-FLIP_R expression. β-Actin served as loading control. (d) 293T cells were transiently transfected with His-ubiquitin or with His-ubiquitin and the indicated c-FLIP_R constructs. After 20 h, the cells were incubated for another 4 h with 10 µg/ml of the proteasome inhibitor MG132. After cell lysis, proteins bound to His-tagged ubiquitin were precipitated with Ni²⁺-NTA agarose. Precipitates were analyzed for the respective c-FLIP_R-constructs by western blotting. The partial binding of the non-ubiquitinated c-FLIP_R versions to the Ni²⁺-beads is presumably due to the highly negatively charged epitope tag sequences.

Deletion of the C-terminal tail of c-FLIP_R diminishes its antiapoptotic function. To investigate the antiapoptotic function of c-FLIP_R, we treated wild-type A20 cells and transfectants stably expressing c-FLIP_R constructs with CD95 ligand (CD95L) for up to 8 h, and measured caspase activation at various time points. As detected by their processing, activation of caspase-3 and caspase-8 was readily detected upon stimulation with CD95L in wild-type and vector control cells (Figure 3a). In contrast, both caspases remained uncleaved in cells expressing c-FLIP_R-ΔC or c-FLIP_R (Figure 3a). Thus, mouse c-FLIP_R blocks CD95-mediated caspase activation.

As assessed by measurement of DNA fragmentation, expression of full-length c-FLIP_R also resulted in an almost complete protection against CD95L-induced apoptosis, whereas the vector control cells were as sensitive as the wild-type cells (Figure 3b). Complete CD95 resistance was observed in several clones with high (clone no. 3; Figure 3b), intermediate and low expression levels of full-length c-FLIP_R (data not shown). Interestingly, A20 cells expressing the truncated c-FLIP_R-ΔC showed a different behavior that was dependent on the expression level and CD95L concentration. At low CD95L concentrations, cells with high and low levels of c-FLIP_R-ΔC expression were similarly protected as full-length c-FLIP_R-expressing cells. In contrast, at higher concentrations of CD95L cells with a lower expression of c-FLIP_R-ΔC (e.g., clone no. 19) showed some apoptosis induction, even when several clones with comparable expression of the truncated and full-length c-FLIP_R proteins were analyzed.

(compare clone no. 19 and 3; Figures 2b and 3b). This suggests that the C-terminal tail influences the antiapoptotic function of mouse c-FLIP_R, which is in contrast to human c-FLIP_{short} whose C-terminal deletion did not interfere with apoptosis inhibition.²⁰ This conclusion is supported by our observation that incubation of cells with high concentrations of CD95L for longer time periods activated caspase-8 in c-FLIP_R-ΔC- but not c-FLIP_R-expressing cells, as shown by the appearance of the p18 caspase-8 fragment (Figure 3c).

The C-terminal tail of c-FLIP_R contributes to DISC recruitment and antiapoptotic function. It was surprising that despite the increased protein stability (see Figure 2b) c-FLIP_R-ΔC was less potent in inhibiting apoptosis when compared with full-length c-FLIP_R (see Figure 3b). As c-FLIP proteins act at the receptor level,^{10,11} we analyzed DISC formation in the transfected cell lines. To rule out that different expression levels of the transgenes might affect DISC formation, we chose clones with comparable expression of full-length c-FLIP_R (clone no. 3) and c-FLIP_R-ΔC (clone no. 19). As expected, following a 15-min incubation with CD95L, recruitment of FADD and caspase-8 was observed in wild-type and vector control A20 cells (Figure 4a). In both cell lines, cleavage of caspase-8 to the p43 intermediate was detected, indicating initiation of the death signal. In contrast, caspase-8 processing was undetectable in cells transfected with c-FLIP_R-ΔC or full-length c-FLIP_R (Figure 4a). Moreover, when the total amount of uncleaved and processed caspase-8 in the DISC was

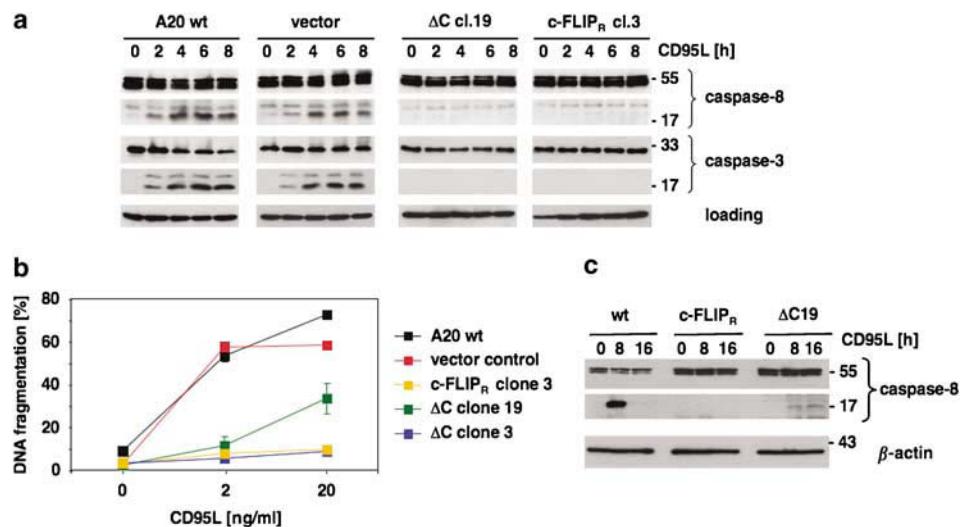


Figure 3 Deletion of the C-terminal tail diminishes the antiapoptotic potential of c-FLIP_R. (a) Wild-type A20 cells (wt) or A20 cells stably transfected with either full-length c-FLIP_R, c-FLIP_R-ΔC or an empty vector control were stimulated for the indicated time with Flag-tagged CD95 ligand (2 ng/ml) and anti-Flag antibody (1 µg/ml). Activation of caspase-8 and caspase-3 was analyzed by western blotting. β-Actin or tubulin served as loading control. The blots are representative for several transfectants analyzed and show caspase activation in clone no. 19 with low expression of c-FLIP_R-ΔC and clone no. 3 with high expression of full-length c-FLIP_R. (b) For analysis of apoptosis sensitivity, wild-type cells and transfectants were left untreated or stimulated for 16 h with different concentrations of Flag-tagged CD95 ligand (2 and 20 ng/ml) cross-linked with anti-Flag antibody (1 µg/ml). The amount of apoptotic cells was determined by Nicoletti assay. (c) Cells were stimulated with 20 ng/ml CD95 ligand and anti-Flag antibody (1 µg/ml) for 8 and 16 h or left untreated. Caspase-8 activation was analyzed by western blotting as described in (a). Note that the disappearance of the p18 caspase-8 fragment in A20 wild-type cells after CD95 ligand treatment for 16 h is presumably due to massive cell death and the leakage of the p18 fragment into the culture supernatant

compared, reproducibly less caspase-8 was recruited upon expression of full-length c-FLIP_R than in the control cells or FLIP_R-ΔC cells (Figure 4a). This is consistent with the observation that c-FLIP_R-ΔC was less efficiently recruited into the DISC than the full-length protein (Figure 4a), and could explain the impaired protection at high concentrations of CD95L (see Figure 3b).

As DISC recruitment of c-FLIP might be influenced by its subcellular localization, we performed immunofluorescence staining of NIH/3T3 cells transiently transfected with either c-FLIP_R full-length or c-FLIP_R-ΔC. The full-length protein was distributed in the cytosol and partly localized in dotted structures (Figure 4b). c-FLIP_R-ΔC was also localized in the cytosol, but showed oligomerization into structures similar to death effector filaments (Figure 4b). Formation of such filaments by c-FLIP_R-ΔC but not full-length c-FLIP_R was not due to the higher expression of the deletion mutant, as shown in a titration experiment (Supplementary Figure 1). Even at the lowest amount of the transfected DNA, when c-FLIP_R-ΔC was not detectable by immunoblotting, filament formation was observed. In contrast, full-length c-FLIP_R did not form extensive filaments, although protein expression was much higher. Death effector filaments have been shown to be sites of caspase activation correlating with apoptosis induction.²¹ Despite formation of these filaments by FLIP_R-ΔC, we did not observe apoptosis induction in the transfected cells (data not shown), suggesting that aggregated DEDs of c-FLIP do not build a platform for caspase-8 activation. Nevertheless, retention of c-FLIP_R-ΔC in those filaments might explain its reduced DISC recruitment.

Covalently linked tandem DEDs are required for DISC recruitment.

Like caspase-8 and caspase-10, but in

contrast to FADD, c-FLIP proteins contain two DEDs. Whether the tandem DEDs are simply a duplication of a protein interaction motif or functionally important has not been addressed *in vivo*. Therefore, we investigated which of the two DEDs of c-FLIP_R is required for its antiapoptotic function. To this end, we employed truncation constructs encoding only the first (DED1) or the second DED (DED2) and expressed them stably in A20 cells. Transfectants expressing only DED1 or DED2 showed a marginally reduced sensitivity for CD95-mediated apoptosis (Figure 5a). In addition, no DISC recruitment of the single DEDs and normal caspase-8 activation were observed (Figure 5b). In line, processing of caspase-3 and caspase-8 was comparable to vector control cells (data not shown). Moreover, in contrast to full-length c-FLIP_R that was localized in cytoplasmic granular structures, both single DEDs were evenly distributed in the cytosol and nucleus (Figure 5c). Thus, a single DED of c-FLIP_R is insufficient to inhibit CD95-mediated apoptosis. We next generated double transfectants expressing both DEDs as separate molecules but without an intramolecular linker, and analyzed their sensitivity toward CD95L. Cells expressing both DEDs were as sensitive as vector control cells (Figure 5a) and showed no DISC recruitment (Figure 5b) and processing of caspase-3 and caspase-8 (data not shown). Thus, an intramolecular linkage seems to be crucial for binding of the tandem DEDs to the DISC. Taken together, both DEDs of mouse c-FLIP_R are required for DISC recruitment and its antiapoptotic activity.

A model of the molecular structure of murine c-FLIP_R. To define the surface residues of murine c-FLIP_R involved in interaction with other DISC proteins, we created a structural model of c-FLIP_R on the basis of the structure (PDB code,

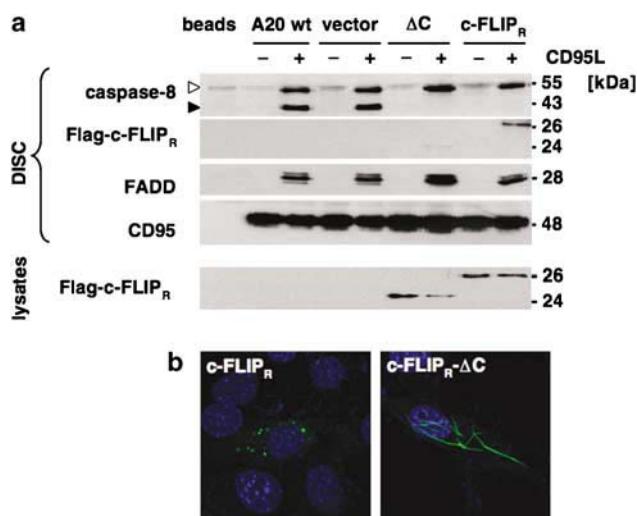


Figure 4 Deletion of the C-terminal tail of c-FLIP_R reduces DISC recruitment and leads to formation of death effector filaments. (a) Wild-type A20 cells (wt) or cells stably transfected with full-length c-FLIP_R, c-FLIP_R-ΔC or a Flag-control vector were either stimulated for 15 min with the Flag-tagged CD95 ligand (200 ng/ml) or left untreated. DISC components were co-immunoprecipitated with CD95 using an anti-CD95 antibody (Jo2) coupled to protein-G-sepharose and analyzed by western blotting. (b) NIH/3T3 cells were transiently transfected with either c-FLIP_R or c-FLIP_R-ΔC. Twenty-four hours post transfection, the cells were fixed and stained with anti-Flag antibody (green) and DAPI (blue). Subsequently, samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy

2BBR) of the v-FLIP MC159.^{13,14} The sequence alignment of MC159 and c-FLIP_R, and their backbone superposition, are shown in Figure 6a. The homology model of c-FLIP_R displays the two helical bundles of the individual DEDs packed against each other in the predicted way. The major difference between c-FLIP_R and MC159 is the absence of an additional short α -helix at the beginning of the c-FLIP_R DED1, which is due to the slightly shortened N-terminus (data not shown). However, the conspicuous surface motifs, including the charge triad and the hydrophobic patch, which are functionally important for MC159 and caspase-8,¹³ are very similarly placed within the two structures (Figure 6b, left panel). Interestingly, residues F119, L120 and Y124 are part of an extended hydrophobic patch on the DED2 surface of c-FLIP_R, which is not strictly conserved in MC159 (Figure 6b, right panel).

Our model allowed us to perform mutagenesis based on structural reasoning, and the residues mutated in this study are depicted in Figure 6c. First, we were interested in the role of the hydrophobic patch of DED1 that forms the interface with DED2. We therefore mutated Phe-28 to glycine, since mutation of the corresponding residues in FADD (F25G) and MC159 (F30A) impairs their signaling function.^{16,22} The F28G substitution, however, had no effect on caspase processing, DISC formation, subcellular localization or the antiapoptotic function of c-FLIP_R (Figure 7). This suggests that the architecture of c-FLIP_R was not disturbed and that Phe-28

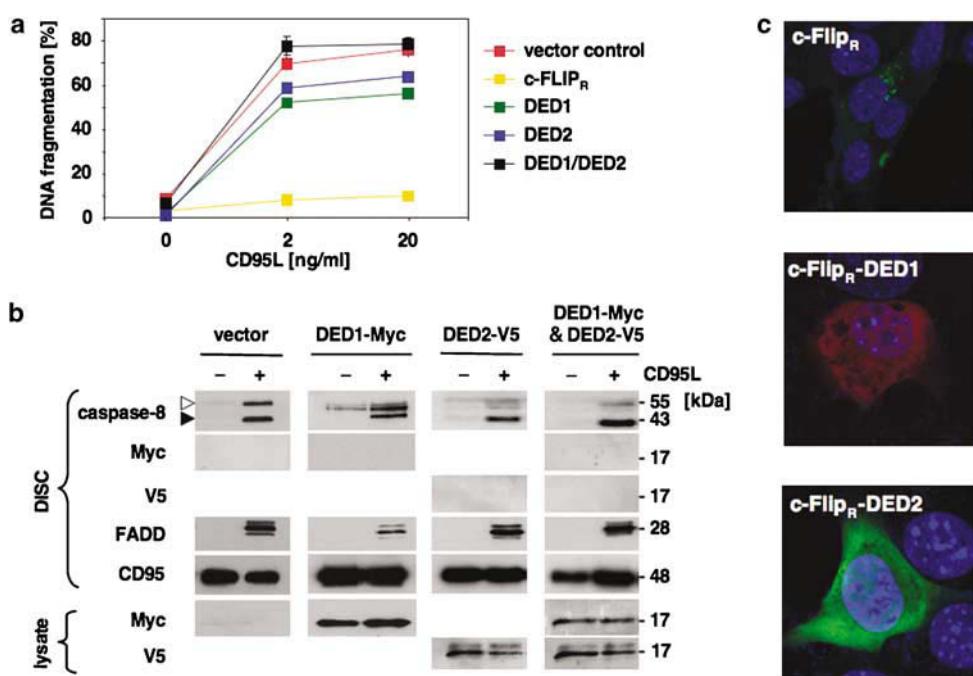


Figure 5 DISC recruitment requires intramolecular linkage between the two DEDs. (a) Wild-type A20 cells (wt) or A20 cells stably transfected with c-FLIP_R-DED1, c-FLIP_R-DED2 or both DEDs were either left untreated or stimulated for 16 h with different concentrations of Flag-tagged CD95 ligand (2 and 20 ng/ml) cross-linked with anti-Flag antibody (1 μ g/ml). The amount of apoptotic cells was quantified by Nicoletti assay. (b) Cells expressing Myc-tagged DED1, V5-tagged DED2 or both DEDs were stimulated for 15 min with 200 ng/ml Flag-CD95L or left untreated. DISC components were co-immunoprecipitated with the CD95 receptor using anti-CD95 antibody coupled to protein-G-sepharose and analyzed by western blotting. (c) NIH/3T3 cells were transiently transfected with Flag-c-FLIP_R, DED1-Myc or DED2-V5. Twenty-four hours post transfection, the cells were fixed and stained with tag-specific antibodies, followed by an Alexa-Fluor-conjugated secondary antibody and DAPI. Subsequently, samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy

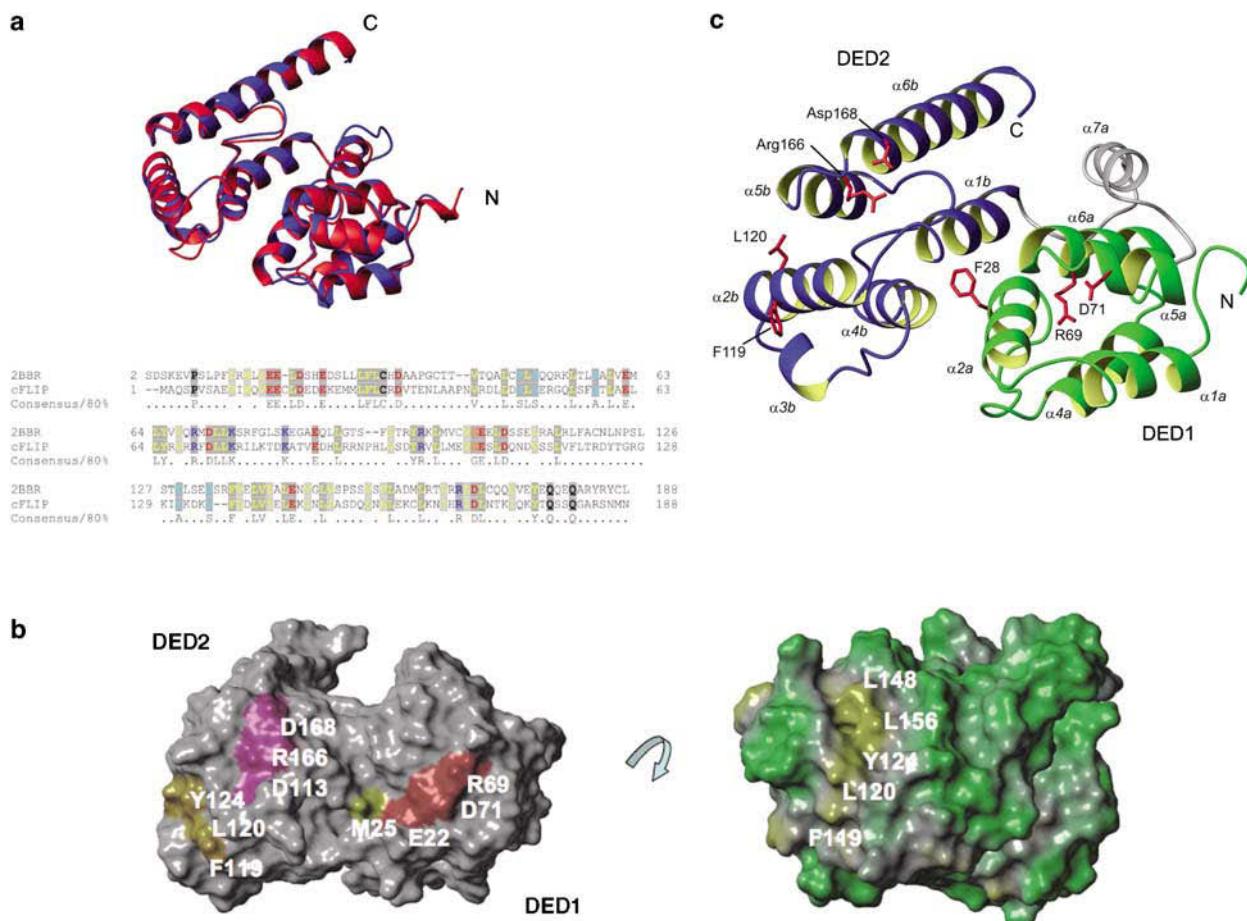


Figure 6 Structural modeling of murine c-FLIP_R. (a) Sequence and structural alignment of v-FLIP MC159 and c-FLIP_R. The conserved residues in the sequence are marked in bold letters. Color indications are as follows: yellow, conservation of hydrophobic amino acids; blue, conservation of basic amino acids; red, conservation of acidic amino acids and cyan, conservation of small amino acids. Backbone superposition shows that sequence changes of c-FLIP_R (blue) relative to v-FLIP (red) are in accordance with relatively small structural differences, resulting in an r.m.s.d. for the backbone atoms of 0.97 Å. (b) Left panel: Representation of hydrophobic and charged motifs within each DED of c-FLIP_R. Motifs are colored as follows: charge triad of DED1 in red (E22, R69, D71), hydrophobic patch of DED1 in yellow (M25), charge triad of DED2 in magenta (D113, R166, D168) and hydrophobic patch of DED2 in gold (F119, L120, Y124). For the hydrophobic motif of DED1, only M25 is slightly surface-exposed, whereas the hydrophobic patch containing F119 and L120 is part of a larger shallow hydrophobic cleft on the surface of DED2. Right panel: Hydrophobic amino acids present on the surface of the DED2 hydrophobic patch are highlighted. Hydrophobic regions are marked in yellow and hydrophilic regions are marked in green. The extended hydrophobic surface is composed of the residues F119, L120, L146, L148 and L156. (c) Homology model of murine c-FLIP_R. The ribbon structure highlights the secondary structure topology of the two DEDs (DED1 and DED2, colored green and blue, respectively). Similar to v-FLIP, helix 3 of the DED fold is missing, but for reasons of consistency helical numbering is maintained according to the canonical fold and similar to the numbering of the v-FLIP structure 2F1S. The side chains of the residues that were mutated in this study are shown as sticks and are labeled by residue type and number

hydrophobic contacts are not required for stabilization of the DED1/DED2 interface.

The charge triads of c-FLIP_R are dispensable for DISC recruitment. Both DEDs of v-FLIP MC159 contain a hydrogen-bonded cluster of charged amino acids, called the charge triad, which is important for apoptosis inhibition.^{13,14,22} To analyze whether the charge triads play a functional role for cellular FLIP, we mutated both motifs in c-FLIP_R (mutants R69A/D71A and R166A/D168A). A20 cells expressing these mutants were not impaired in protection against CD95-mediated apoptosis when compared with c-FLIP_R (Figure 7a). Moreover, both charge triad mutants inhibited caspase activation similarly as wild-type c-FLIP_R or the F28G mutant (Figure 7b). DISC analysis showed also

normal recruitment of the R166A/D168A mutant and no processing of caspase-8 (Figure 7c). The same results were observed with the R69A/D71A mutant (Figure 7d). Thus, in contrast to v-FLIP, the charge triad of c-FLIP_R is dispensable for DISC recruitment and its antiapoptotic function.

The hydrophobic patch of DED2 of c-FLIP_R is crucial for DISC recruitment. In addition to the charge triad, c-FLIP_R contains characteristic hydrophobic epitopes in both DEDs. This hydrophobic patch in DED1 is buried in the DED1/DED2 interface, whereas DED2 contains an extended hydrophobic patch with residues F119, L120, L146, L148 and L154 on its surface (Figure 6b). To investigate the importance of this motif for DISC interaction of c-FLIP_R, we mutated Phe-119 and Leu-120 (F119G/L120G) and generated several clones

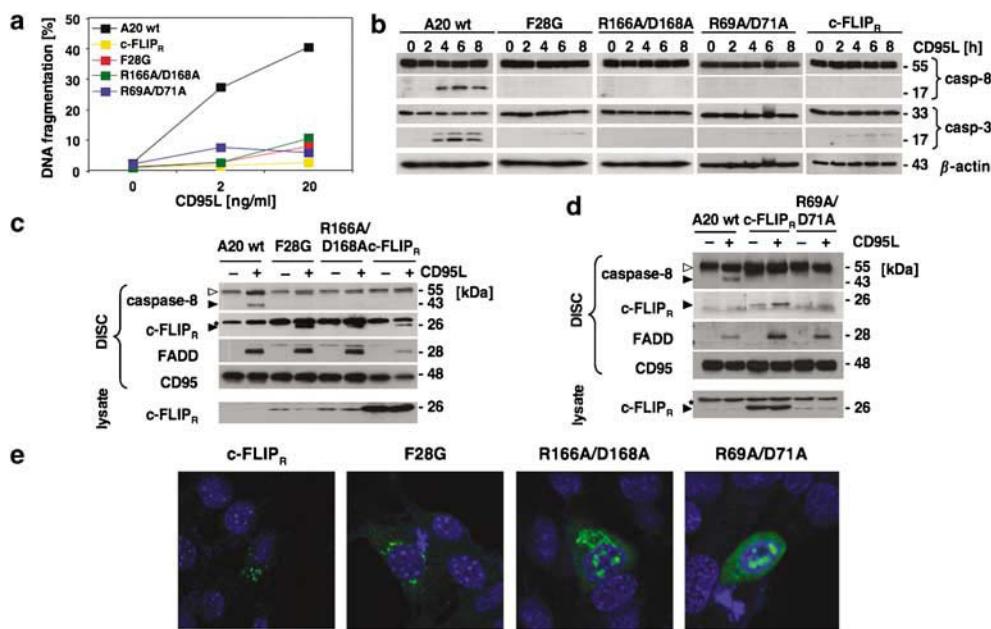


Figure 7 The charge triads are not required for DISC binding of c-FLIP_R. (a) Different c-FLIP_R mutants were generated with mutations either in the charge triad of the first DED (R69A/D71A) or the charge triad of the second DED in c-FLIP_R (R166A/D168A). Additionally, the hydrophobic patch (F28G) in DED1 was mutated. The different constructs were stably transfected into A20 cells and apoptosis sensitivity of the transfectants was determined by Nicoletti assay. To this end, cells were either left untreated or stimulated for 16 h with different concentrations of Flag-tagged CD95 ligand (2 and 20 ng/ml) cross-linked with anti-Flag antibody (1 μ g/ml). (b) A20 cells transfected with the respective c-FLIP_R mutants were stimulated for the indicated time with Flag-tagged CD95 ligand (2 ng/ml) and anti-Flag antibody (1 μ g/ml). Cells were lysed and cleavage of caspase-8 and caspase-3 was determined by western blotting. Equal protein loading was checked by probing the blots with anti- β -actin. (c, d) DISC analyses of A20 cells expressing the various c-FLIP_R constructs. Cells expressing the DED1 F28G mutant (c), the DED2 charge triad R166A/D168A mutant (c) or the DED1 charge triad R69A/D71A mutant (d) were analyzed in comparison to wild-type A20 cells or cells expressing full-length FLIP_R. Cells were either stimulated for 15 min with Flag-tagged CD95 ligand (200 ng/ml) or left untreated. DISC components were co-immunoprecipitated with CD95 using anti-CD95 coupled to protein-G–sepharose and analyzed by western blotting. (e) NIH/3T3 cells were transiently transfected with the indicated c-FLIP_R mutants. Twenty-four hours post transfection, cells were stained with anti-Flag antibody followed by an anti-mouse Alexa-Fluor-488 antibody and DAPI. Subsequently, samples were analyzed under a confocal laser scanning microscope. *An unspecific band recognized by the anti-FLIP antibody

stably expressing this mutant (Figure 8a). Strikingly, all clones showed a complete loss of protection and were as sensitive toward CD95-mediated apoptosis as untransfected cells (Figure 8b). Concomitantly, caspases were readily processed in cells expressing the F119G/L120G upon stimulation with CD95L (Figure 8c). Furthermore, as DISC recruitment of the F119G/L120G mutant was severely diminished, caspase-8 processing could be clearly detected (Figure 8d).

In agreement with the impaired DISC recruitment, we observed an altered subcellular localization of the protein. The F119G/L120G mutant was not localized in dotted structures or death effector filaments, but evenly distributed in the cytosol (Figure 8e). It is conceivable that not only the interaction of F119G/L120G mutant with DISC components but also its self-oligomerization is affected by mutation of the hydrophobic patch. Similar effects have been observed for mutations in the corresponding hydrophobic patch in caspase-8, which resulted in a loss of FADD binding.¹³ Thus, the hydrophobic patch of the second DED in mouse c-FLIP_R is crucial for DISC recruitment and its antiapoptotic function.

Moreover, unlike MC159, c-FLIP_R did not inhibit oligomerization of FADD (Supplementary Figure 2B and C). In fact, cellular FLIP proteins rather enhanced formation of insoluble filaments (Supplementary Figure 2B and C). In summary, our results indicate that, in contrast to v-FLIP MC159, c-FLIP

proteins utilize the same interaction motif as caspase-8. While MC159 interferes with FADD self-association, our results imply that c-FLIP_R directly competes with caspase-8 for recruitment to the DISC.

Discussion

c-FLIP is expressed in three isoforms arising from differential mRNA splicing. Although human c-FLIP_{long} and c-FLIP_{short} are well studied, little is known about the other short splice variant, c-FLIP_R, that was initially identified in human Raji B cells¹⁷ and later also in some malignant cell lines and primary T cells.^{8,10} Here, we report the functional and structural characterization of the novel c-FLIP_R isoform in the mouse. Our analysis indicates that c-FLIP_R is the only short isoform in the mouse. By modeling the three-dimensional structure of c-FLIP_R and by analyzing the mouse DISC *in vivo*, we characterize for the first time the structural requirements for DISC recruitment of cellular FLIP proteins. Our results suggest that mouse c-FLIP_R and v-FLIP MC159 inhibit death receptor-mediated apoptosis by different mechanisms.

The unique C-terminal tail and covalently linked tandem DEDs are important for DISC recruitment of c-FLIP_R. To determine the structural requirements of c-FLIP proteins for DISC recruitment, we generated several deletion and point

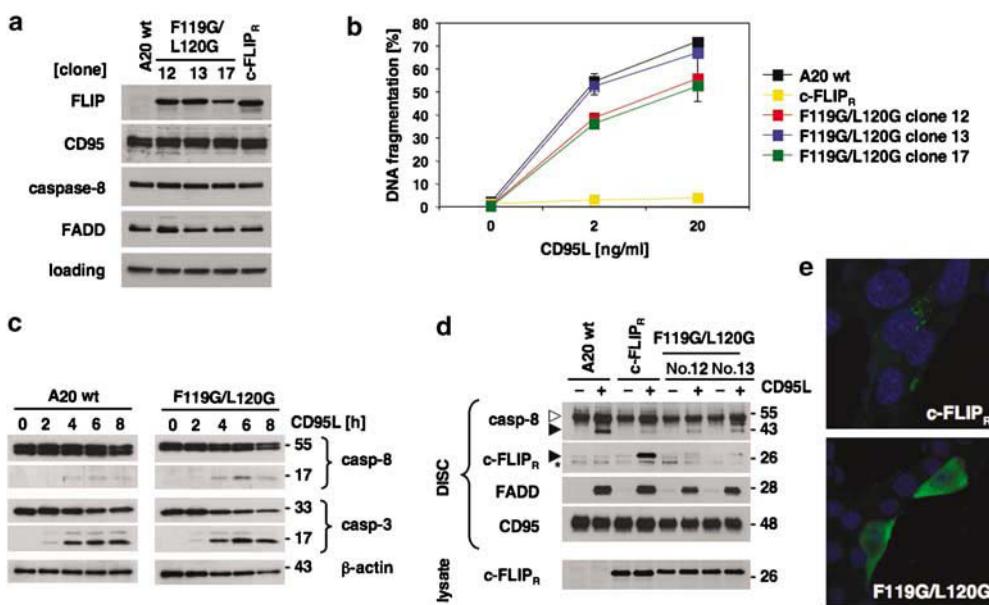


Figure 8 The hydrophobic patch in the DED2 of c-FLIP_R is responsible for binding to FADD and caspase-8 in the DISC. (a) A20 transfectants stably expressing an empty pEF-Flag-control vector, full-length c-FLIP_R or the c-FLIP_R-F119G/L120G mutant cloned into the pEF-Flag vector were analyzed by western blotting for the expression of c-FLIP_R, CD95, caspase-8 and FADD. Blots were probed with anti-tubulin to control equal protein loading. (b) Apoptosis sensitivity of the different clones was determined by Nicoletti assay. To this end, cells were either left untreated or stimulated for 16 h with different concentrations of Flag-tagged CD95 ligand (2 and 20 ng/ml) cross-linked with anti-Flag antibody (1 µg/ml). (c) A20 cells transfected with the respective c-FLIP_R mutants were stimulated for the indicated time with Flag-tagged CD95 ligand (2 ng/ml) and anti-Flag antibody (1 µg/ml). Cells were lysed and cleavage of caspase-8 and caspase-3 was determined by western blotting. Equal protein loading was checked by probing the blots with anti-β-actin. (d) A20 cells expressing the DED2 hydrophobic patch F119G/L120G mutant (clones no. 12 and 13) were analyzed for DISC formation and compared with wild-type A20 cells or cells expressing full-length FLIP_R. Cells were either stimulated for 15 min with Flag-tagged CD95 ligand (200 ng/ml) or left untreated. DISC components were co-immunoprecipitated with CD95 using anti-CD95 coupled to protein-G-sepharose and analyzed by western blotting. (e) NIH/3T3 cells were transiently transfected with the indicated c-FLIP_R mutants. Twenty-four hours post transfection, cells were stained with anti-Flag antibody followed by an anti-mouse Alexa-Fluor-488 antibody. Subsequently, samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy. *An unspecific band recognized by the anti-FLIP antibody

mutants and found that a linkage between both DEDs of c-FLIP_R is required for its antiapoptotic function. Neither DED1 nor DED2 was recruited into the CD95 DISC, which is presumably caused by the compact structure of the tandem DED (Figure 6),^{13,14} and is also consistent with the incapacity of the single DEDs of viral MC159 to protect cells against apoptosis.²³

We also analyzed the function of the C-terminal tail of c-FLIP_R, which distinguishes the protein from the other two isoforms. Surprisingly, at comparable expression levels c-FLIP_R-ΔC less efficiently protected against apoptosis and displayed an impaired DISC recruitment when compared with the full-length protein. The reduced antiapoptotic activity of c-FLIP_R-ΔC is in contrast to C-terminal deletion mutants of human c-FLIP_{short} or MC159, which suppressed death receptor-mediated apoptosis equally as the wild-type proteins.^{20,23} Accordingly, an equal incorporation of c-FLIP_{short} and its C-terminal deletion mutant into the TRAIL-DISC has been observed.²⁰ Although we cannot exclude that the disparity of the mutants in DISC binding might be attributed to different experimental systems, our results suggest that the C-terminus of c-FLIP_R mediates DISC interaction. A contribution of the C-terminus to DISC binding is therefore the first described functional difference between c-FLIP_R and c-FLIP_{short}. In addition, we show that mouse c-FLIP_R is rapidly degraded and that the C-terminal tail determines protein stability. Since mutation of two lysines (K196, K200),

however, did not prevent ubiquitination, the C-terminus is presumably not the direct site of ubiquitination, but seems to regulate protein stability indirectly, for example, by composing a binding site for an E3 ubiquitin ligase. The use of different target residues for ubiquitin conjugation therefore constitutes an additional difference between c-FLIP_{short} and c-FLIP_R. Thus, the C-terminal tail appears to regulate not only DISC recruitment but also degradation of c-FLIP_R via the proteasome pathway.

The hydrophobic patch of DED2 is indispensable for c-FLIP function. The three-dimensional structures of MC159 and FADD revealed various characteristic DED motifs, including a charge triad and hydrophobic patch.^{13–15} The former includes Arg-69 and Asp-71 in DED1, as well as Arg-166 and Asp-168 in DED2 of c-FLIP_R (Figure 6b). On the basis of structural data, this motif has been proposed to be important for protein–protein interactions of DED-containing proteins.¹⁴ In contrast to MC159, in which mutations in the charge triad motifs of DED1 or DED2, abolished its antiapoptotic potential,¹³ the charge triads of c-FLIP_R are not absolutely required for DISC binding and apoptosis inhibition (Figure 7). We observed a slightly impaired DISC recruitment of c-FLIP_R mutated in either of the two charge triads, which might be explained by the fact that the charge triad participates in stabilization of the DED fold.¹⁵ Indeed, our model shows that R166 and D168 are involved in a

hydrogen bond network stabilizing contacts to helix I (backbone carbonyl of S108) and helix II (D113) of DED2. Nevertheless, the antiapoptotic function of the R166A/D168A and the R69A/D71A mutants was fully preserved, arguing that the charge triads are not crucial for cellular FLIPs.

In contrast to the mutants discussed above, mutation of the hydrophobic patch in DED2 (F119G/L120G) completely abolished DISC recruitment and the antiapoptotic function of c-FLIP_R (Figure 8). The F119G/L120G mutant showed a different localization similar to the single DED mutants that were also not recruited into the DISC. Thus, next to a covalent linkage of the tandem DEDs, the hydrophobic patch of DED2 is crucial for DISC recruitment and the function of c-FLIP_R. Importantly, also mutation of the hydrophobic patch in DED2 of caspase-8 has been shown to abolish its interaction with FADD, whereas the corresponding mutation in v-FLIP MC159 had no effect.¹³

The distinct effects of mutation of the surface motifs indicate that viral and cellular FLIPs employ different mechanisms to inhibit apoptosis. MC159 has been suggested to block apoptosis by inhibiting the oligomerization of FADD, thereby impairing its interaction with death receptors.¹⁸ As c-FLIP_R and caspase-8 use the same motif for FADD interaction (Figure 8; Rasper *et al.*¹⁸), it is likely that the two molecules show competitive binding to the adapter protein. To investigate these possibilities, we expressed caspase-8 and FADD together with c-FLIP_R or MC159. The known insolubility and assembly of the DED proteins into death effector filaments did not allow us to directly show a competitive binding c-FLIP_R and caspase-8 to the FADD protein. Nevertheless, consistent with its inhibitory effect on FADD oligomerization, we found that MC159 also inhibited the formation of death filaments (Supplementary Figure 2). c-FLIP_R, in contrast, enhanced the assembly of FADD into death effector filaments. Although these distinct effects on FADD oligomerization in death effector filaments might not necessarily reflect their physiological function, it further supports the view that viral and cellular FLIPs employ different mechanisms to inhibit death receptor-mediated apoptosis.

Materials and Methods

Cell culture and transfections. The mouse B-cell line A20 was cultured in RPMI 1640 (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (BioWest, Frickenhausen, Germany), 2 mM glutamine, 50 μM β-mercaptoethanol and 50 μg/ml of each penicillin and streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). NIH/3T3 cells and 293T human embryonic kidney cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glucose; PAA Laboratories) supplemented with 10% fetal calf serum and 50 μg/ml of each penicillin and streptomycin. Transient transfections of 293T cells and NIH/3T3 cells were performed with FUGENE 6 (Roche, Mannheim, Germany) and Optifect (Invitrogen) reagent according to the manufacturers' protocols. For stable transfection, 1 × 10⁷ A20 cells were pulsed with 10 μg DNA at 100 V and 750 μF (Gene Pulser Xcell; Bio-Rad, Munich, Germany). Stably transfected clones were selected by limited dilution in medium containing 4 μg/ml puromycin (Sigma, Deisenhofen, Germany), 500 μg/ml blasticidin (Invitrogen) or 1 mg/ml G418 (PAA Laboratories). Transgene expression was analyzed by Western blotting. The constructs for GFP-FADD²¹ and MC159⁷ have been described earlier.

Cloning of murine c-FLIP_R and mutagenesis. Total RNA was isolated from the thymus of a C57Bl/6 mouse by acidic phenol–guanidinium thiocyanate–chloroform extraction.²⁴ RNA was reverse transcribed with Superscript III (Invitrogen) and PCR was performed with Pfx proof-reading polymerase

(Invitrogen). The primers used were designed according to the published murine CASHβ sequence: 5'-GGATGGAGACTGGACGAGAAC-3' (forward primer) and 5'-CCACAGTAGTCATGCCAGAT-3' (reverse primer). c-FLIP_R mutants were generated by using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and verified by DNA sequencing. Primer sequences are available upon request. Wild-type c-FLIP_R, c-FLIP_R-ΔC and all point mutants were cloned into pEF-FLAG.¹⁰ DED1 was cloned in frame with the Myc-tag of pEF/Myc/cyto (Invitrogen) and DED2 in frame with the V5-His-tag of pEF6/V5-His-TOPO (Invitrogen).

FACS assays. Cell surface staining and cytotoxicity assays were performed as described previously.¹⁹ For assaying apoptosis, 1 × 10⁶ cells were stimulated in 24-well plates (if not stated otherwise) with 2 or 20 ng/ml CD95L and anti-Flag (M2; 1 μg/ml; Sigma), or left untreated for the indicated time periods.

Western blot analysis. For western blot analysis, cells were lysed in TPNE buffer (PBS adjusted to 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF and 1 μg/ml each of leupeptin, aprotinin, chymostatin and pepstatin A). A 20-μg weight of post-nuclear supernatant protein, as determined by the BCA method (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), was separated by 12% SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Freiburg, Germany) and blocked with 5% non-fat dry milk in PBS/Tween (0.05% Tween-20 in PBS). After washing with PBS/Tween, the blots were incubated overnight with specific antibodies at 4°C. Blots were washed again with PBS/Tween, incubated with horseradish peroxidase (HRPO)-coupled secondary antibodies (1:20 000) for 1 h at room temperature, washed again and developed with a chemiluminescence reagent (Amersham). For stripping, blots were incubated in Re-Blot mild solution (Chemikion, Hofheim, Germany) according to the manufacturer's procedure.

The antibodies used for western blotting and immunoprecipitation were as follows: β-actin (AC-74; Sigma), caspase-3 (46; BD Biosciences, Heidelberg, Germany), caspase-8 (IG12; Alexis, Gruenberg, Germany), FADD (1F7; Upstate, Hamburg, Germany), CD95 (Jo2; BD Biosciences), CD95 (M20; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), Flag (M2; Sigma), c-MYC (9E10; Santa Cruz Biotechnology), V5 (Invitrogen) and tubulin (Molecular Probes, Goettingen). HRPO-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Santa Cruz Biotechnology. HRPO-conjugated goat anti-rat IgG, donkey anti-goat IgG, goat anti-mouse IgG1, IgG2a and IgG2b were from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL, USA).

Immunoprecipitations. For DISC analysis, 2 × 10⁷ A20 cells were stimulated with 200 ng/ml Flag-CD95L or left untreated. If not stated otherwise, stimulation was stopped with cold PBS after 15 min. Cells were lysed in DISC buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF and 1 μg/ml of leupeptin, aprotinin, chymostatin and pepstatin A) for 15 min on ice and centrifuged (15 min, 14 000 × g). Subsequently, the DISC was precipitated with 2 μg anti-CD95 (Jo2) coupled to protein G beads (Sigma) for 4 h at 4°C. Finally, the beads were washed three times with 750 μl ice-cold DISC buffer and analyzed by western blotting.

To analyze ubiquitination of c-FLIP_R, HEK293T cells were transiently transfected with His-ubiquitin with or without c-FLIP_R full-length or c-FLIP_R-ΔC using FUGENE 6 transfection reagent. 20 h later, cells were incubated with 10 μg/ml MG132 for further 4 h. Then, cells were washed and lysed in buffer A (6 M urea, 0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoethanol). Lysates were sonicated and incubated with 20 μl Ni-NTA agarose (Qiagen) for 4 h at room temperature. Beads were washed with 1 ml each of buffer A, buffer B (6 M urea, 0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM β-mercaptoethanol) and buffer C (6 M urea, 0.1 M sodium phosphate, 10 mM Tris/HCl pH 6.3, 10 mM β-mercaptoethanol). Subsequently, precipitated proteins were analyzed by western blotting.

Fluorescence microscopy. A total of 4 × 10⁴ NIH/3T3 cells grown on a coverslip in a 12-well dish were transiently transfected with 4 μg plasmid DNA using Optifect transfection reagent. Twenty-four hours later, cells were washed with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 15 min. The cells were washed again and permeabilized with 0.05% saponin and 4% BSA in PBS for 30 min. Thereafter, cells were incubated with the anti-Flag antibody overnight in blocking solution (4% BSA, 0.05% saponin in PBS) at 4°C. Coverslips were washed several times with PBS and incubated with anti-mouse Alexa-Fluor-488 secondary antibody (Molecular Probes) for 1 h at room temperature. For nuclear staining, the cells were washed several times and incubated with 4',6'-diamidino-2-phenylindole

dihydrochloride (DAPI, 100 ng/ml) for 10 min. Cells were then mounted in mounting medium (DakoCytomation, Hamburg, Germany) and analyzed under a confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at a magnification of $\times 630$.

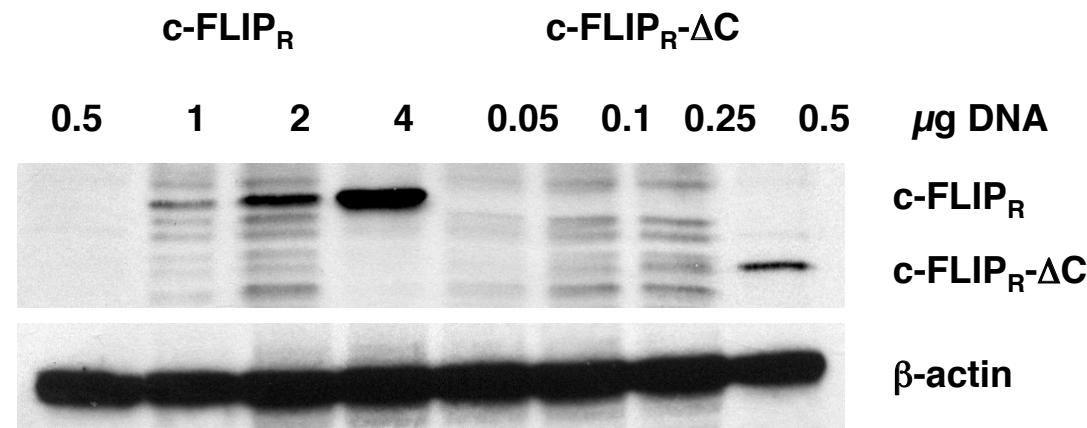
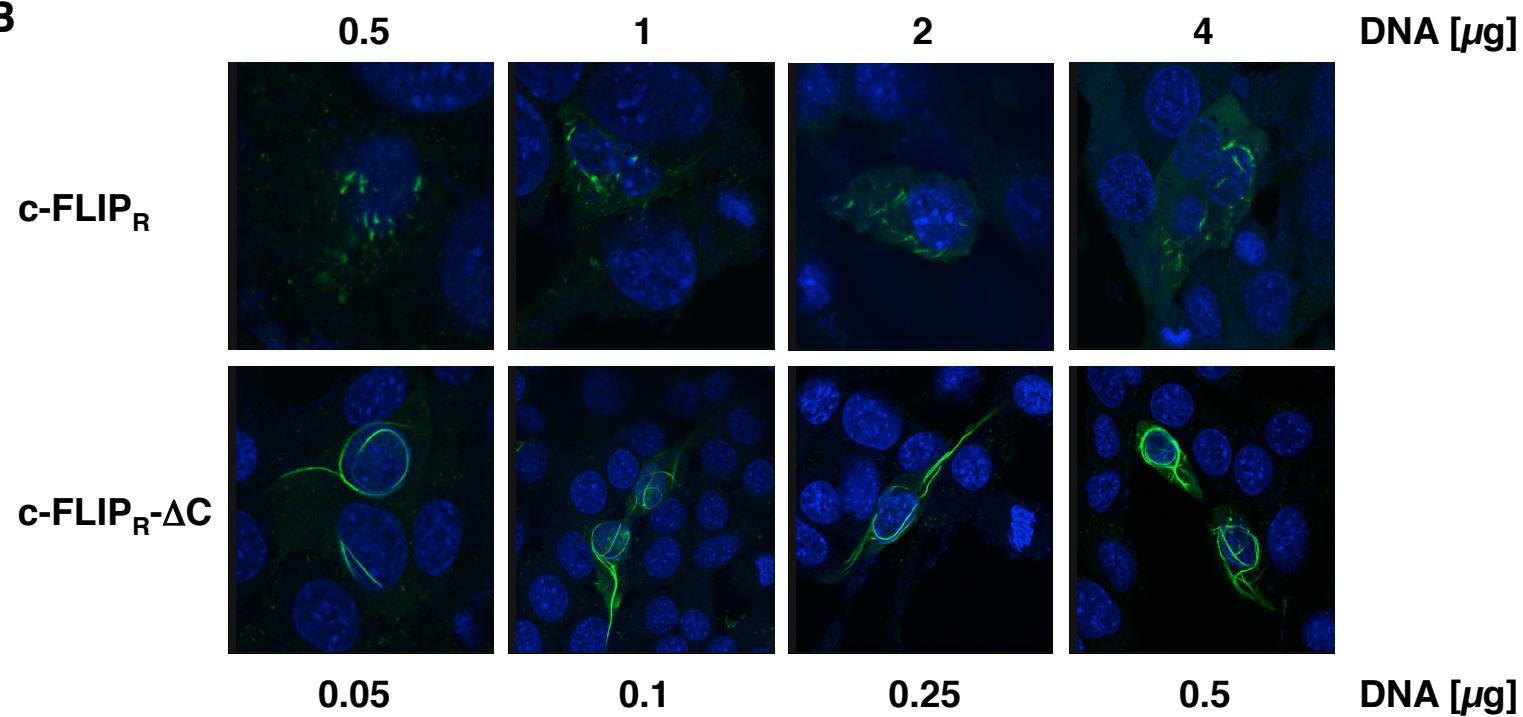
Structural modeling. Structural modeling was based on the 1.2-Å resolution crystal structure 2BBR of MC159.¹³ According to the sequence alignment presented in Figure 6a, the residues 4–17, 21–38, 42–88 and 92–188 of 2BBR were mutated by the equivalent amino-acid side chains preserving positions of backbone atoms, using the biopolymer module of Sybyl7.2.5 (Tripos Inc., St Louis, MO, USA). The gaps were modeled by means of the loop search procedure of Sybyl7.2.5. To relax the non-conserved residues of the c-FLIP_R-model, the structure was minimized using harmonic restraints for all conserved residues (Amber8, 10 000 steps). Finally, the model was minimized again without any restraints (Amber8, 30 000 steps). The root mean-square distance (r.m.s.d.) of the heavy backbone atoms between 2BRR and the c-FLIP_R-model is 0.97.

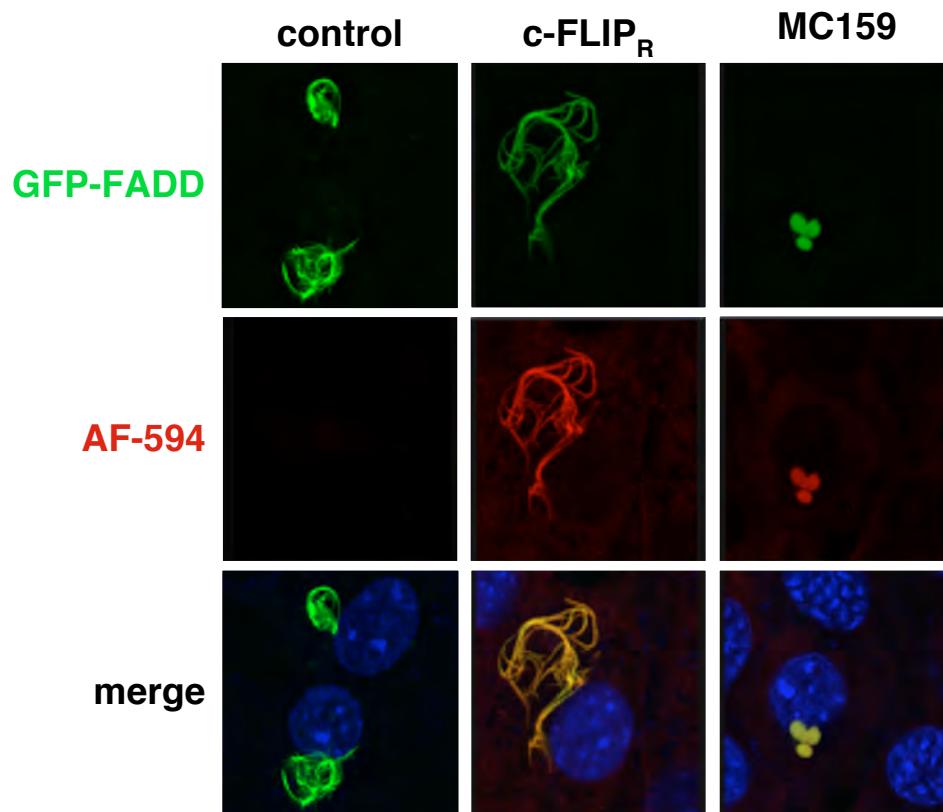
Acknowledgements. We thank Carina Meyer and Daniel Scholtysik for expert technical assistance, and Dr Christian Schwerk for helpful discussions. We are also grateful to Drs Vishva Dixit, Thomas Hofmann, Michael Lenardo, Margot Thome and Harald Wajant for various reagents. This work was supported by grants from the Forschungskommission, Faculty of Medicine Düsseldorf, by the Deutsche Krebshilfe and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK1033).

- Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 26–35.
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003; **11**: 529–541.
- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X. Interdimer processing mechanism of pro caspase-8 activation. *EMBO J* 2003; **22**: 4132–4142.
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003; **11**: 543–549.
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8247–8254.
- Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 196–204.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; **386**: 517–521.
- Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. c-FLIP_R, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; **280**: 14507–14513.

- Irmel M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; **388**: 190–195.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1541–1548.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20633–20640.
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 561–586.
- Yang JK, Wang L, Zheng L, Wan F, Ahmed M, Lenardo MJ et al. Crystal structure of MC159 reveals molecular mechanism of DISC assembly and FLIP inhibition. *Mol Cell* 2005; **20**: 939–949.
- Li FY, Jeffrey PD, Yu JW, Shi Y. Crystal structure of a viral FLIP: insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling. *J Biol Chem* 2006; **281**: 2960–2968.
- Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T et al. The structure of FADD and its mode of interaction with pro caspase-8. *Mol Cell* 2006; **22**: 599–610.
- Eberstadt M, Huang B, Chen Z, Meadows RP, Ng SC, Zheng L et al. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* 1998; **392**: 941–945.
- Djerbi M, Darreh-Shori T, Zhivotovsky B, Grandien A. Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the antiapoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol* 2001; **54**: 180–189.
- Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL et al. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 271–288.
- Schmitz I, Weyd H, Krueger A, Baumann S, Fas SC, Krammer PH et al. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with *de novo* protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol* 2004; **172**: 2194–2200.
- Poukkuila M, Kaunisto A, Hietakangas V, Denessiouk K, Katajamaki T, Johnson MS et al. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem* 2005; **280**: 27345–27355.
- Siegel RM, Martin DA, Zheng L, Ng SY, Bertin J, Cohen J et al. Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1243–1253.
- Garvey TL, Bertin J, Siegel RM, Wang GH, Lenardo MJ, Cohen JL. Binding of FADD and caspase-8 to *Molluscum contagiosum* virus MC159 v-FLIP is not sufficient for its antiapoptotic function. *J Virol* 2002; **76**: 697–706.
- Garvey T, Bertin J, Siegel R, Lenardo M, Cohen J. The death effector domains (DEDs) of the *Molluscum contagiosum* virus MC159 v-FLIP protein are not functionally interchangeable with each other or with the DEDs of caspase-8. *Virology* 2002; **300**: 217–225.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

A**B**



Supplementary Information

Supplementary figure 1 The formation of death effector filaments by c-FLIP_R-ΔC is independent of protein expression levels. **(A)** NIH/3T3 cells were transiently transfected with the indicated amounts of plasmids DNA of c-FLIP_R or c-FLIP_R-ΔC. 24 h post transfection, cellular lysates were prepared for Western blot analysis. Expression of c-FLIP_R and c-FLIP_R-ΔC was analyzed with anti-Flag antibodies. Blots were probed with anti-β-actin to control equal protein loading. Note that the lowest amount of c-FLIP_R plasmid DNA equals the highest amount of c-FLIP_R-ΔC plasmid DNA used, and that protein expression is identical when 1 μg of c-FLIP_R plasmid DNA and 0.5 μg of c-FLIP_R-ΔC plasmid DNA were used for transfection. **(B)** NIH/3T3 cells were transiently transfected as described in (A). 24 h post transfection, cells were stained with anti-Flag-antibody followed by an anti-mouse Alexa-Fluor-488 antibody and DAPI. Subsequently, samples were analyzed under a confocal laser scanning microscope. Note that c-FLIP_R-ΔC forms death effector filaments under any condition used. In contrast, c-FLIP_R does not form death effector filaments even at high expression levels.

Supplementary figure 2 Cellular and viral FLIP proteins differentially affect FADD oligomerization into death effector filaments. NIH/3T3 cells were transiently transfected with GFP-FADD (green) with or without either Flag-c-FLIP_R or HA-tagged MC159. 24 h post transfection, the cells were fixed and stained with tag-specific antibodies and AlexaFluor-594-coupled secondary antibodies (red) as well as with DAPI (blue). Subsequently, samples were analyzed by confocal laser scanning microscopy. The results show that c-FLIP_R enhanced the assembly of FADD into death effector filaments, whereas MC159 inhibited formation of the filaments. Furthermore, FADD protein residing in death effector filaments

was only found in the Triton-X100-insolube fraction, while MC159-induced FADD located in the MC159-induced dot-like structures remained fully soluble (data not shown).

Up-regulation of c-FLIP_{short} by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells

Nana Ueffing,¹ Marc Schuster,¹ Eric Keil,¹ Klaus Schulze-Osthoff,¹ and Ingo Schmitz¹

¹Institute of Molecular Medicine, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

Upon encounter with pathogens, T cells activate several defense mechanisms, one of which is the up-regulation of CD95 ligand (CD95L/FasL) which induces apoptosis in sensitive target cells. Despite expression of the CD95 receptor, however, recently activated T cells are resistant to CD95L, presumably due to an increased expression of antiapoptotic molecules. We show here that, in contrast to naive or long-term activated T cells, short-term activated T cells strongly up-regulate the caspase-8 inhibitor, cellular

FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). Intriguingly, upon activation, T cells highly induced the short splice variant c-FLIP_{short}, whereas expression of c-FLIP_{long} was only marginally modulated. In contrast to the general view that c-FLIP transcription is controlled predominantly by nuclear factor- κ B (NF- κ B), induction of c-FLIP_{short} in T cells was primarily mediated by the calcineurin-nuclear factor of activated T cells (NFAT) pathway. Importantly, blockade of NFAT-mediated c-FLIP expression by RNA interference or inhibition of cal-

cineurin rendered T cells sensitive toward CD95L, as well as activation-induced apoptosis. Thus, the resistance of recently activated T cells depends crucially on induction of c-FLIP expression by the calcineurin/NFAT pathway. Our findings imply that preventing autocrine CD95L signaling by c-FLIP facilitates T-cell effector function and an efficient immune response. (Blood. 2008;112: 690-698)

Introduction

Activation of naive peripheral T cells by their cognate antigen results in induction of their proliferation and differentiation into T effector cells. These comprise CD4⁺ T-helper cells and CD8⁺ cytotoxic T cells, which in turn can induce immune responses by the secretion of cytokines, cell-cell interactions, or their ability to directly kill target cells. Importantly, despite high expression of death receptors such as CD95, effector T cells display an antiapoptotic phenotype allowing immune defense function and clearance of invading antigens.^{1,2} Once the infection has been efficiently contained, these T cells become apoptosis-sensitive, leading to deletion of most cells and survival of a few memory T cells.^{3,4} Apoptosis thus represents a tightly regulated process by which lymphocyte homeostasis is controlled and the emergence of autoreactive cells is prevented.

Upon activation, T cells show a rapid up-regulation of antiapoptotic proteins. In addition to Bcl-x_L, a strong increase in FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) is most prominent.⁵⁻⁷ FLIPs inhibit death-receptor-mediated apoptosis by preventing the cleavage of death-inducing signaling complex (DISC)-associated pro-caspase-8 and -10 to the mature active enzymes, thereby blocking initiation of the extrinsic apoptosis cascade.^{2,8} Three different isoforms of the cellular FLIP (c-FLIP) have been reported so far, namely c-FLIP_{long}, c-FLIP_{short}, and c-FLIP_R, which are generated by alternative splicing.^{2,5,9} All 3 isoforms comprise a tandem death effector motif (DED) that is crucial for their recruitment into the DISC.¹⁰ Additionally, c-FLIP_{long} contains an inactive caspase-like domain, whereas each of the 2 short isoforms, c-FLIP_{short} and c-FLIP_R, possesses a unique truncated C-terminus. For the latter ones only antiapoptotic functions have been described so far, whereas the role

of c-FLIP_L remains controversial. Next to its antiapoptotic abilities, low levels of c-FLIP_{long} have also been shown to promote cell death by increasing the enzymatic activity of caspase-8.¹¹⁻¹³ In vitro studies with primary human T cells have shown that FLIP proteins, especially c-FLIP_{short}, are highly up-regulated upon T-cell activation, which correlates with a protection against CD95-mediated apoptosis.^{7,14} Conversely, treatment of activated T cells with the protein translation inhibitor cycloheximide reduced c-FLIP expression, without affecting Bcl-x_L expression, and rendered the cells apoptosis sensitive.⁷ Therefore, c-FLIP proteins are thought to play a central role in the protection of activated T cells.

How c-FLIP expression in T cells is regulated at the molecular level is a matter of active debate. Inducible c-FLIP expression in peripheral T cells has primarily been linked to the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway¹⁵⁻¹⁸; however, other transcription factor-binding sites do exist in the FLIP promoter. In addition, studies in various tumor cell lines have indicated a regulation of c-FLIP expression by the PI3K/Akt and Erk/MAP kinase pathway.¹⁹ To elucidate the regulation of c-FLIP expression in T lymphocytes, we investigated several signaling pathways for their involvement in activation-induced up-regulation of c-FLIP. Surprisingly, we found that c-FLIP proteins, and especially c-FLIP_{short} expression, were mainly regulated via the calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT) pathway. Analysis of the human c-FLIP promoter revealed 3 putative NFAT binding sites in front of exon 1, of which 2 are actively used in T cells for induction of c-FLIP expression. Furthermore, down-regulation of c-FLIP expression by RNA interference or the calcineurin inhibitors cyclosporine A or FK506 sensitized T cells to apoptosis, supporting a central

Submitted February 21, 2008; accepted April 30, 2008. Prepublished online as Blood First Edition paper, May 28, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-02-141382.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology

role of NFAT-mediated c-FLIP expression for the protection of activated T cells.

Methods

Cell culture and stable transfections

Approval for these studies was obtained from the institutional review board of Heinrich-Heine-University Düsseldorf's medical faculty. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

The human T-cell lines HuT78 and CEM were cultured in RPMI 1640 (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (BioWest, Frickenhausen, Germany) and 50 µg/mL each of penicillin and streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Human embryonic kidney cells (293T) were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM high glucose; PAA Laboratories) supplemented with 10% fetal calf serum and 50 µg/mL each of penicillin and streptomycin. HeLa human cervix carcinoma cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 µM β-mercaptoethanol, and 50 µg/mL each of penicillin and streptomycin.

Preparation and activation of human peripheral T cells

Human peripheral T cells were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Biochrom, Berlin, Germany) from buffy coat material obtained from the Institute of Hemostasis and Transfusion Medicine of the University Hospital Düsseldorf. Monocytes were depleted by incubation of peripheral blood lymphocytes (PBLs) for 1 hour in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 50 µg/mL each of penicillin and streptomycin in 175-cm² cell culture flasks. Nonadherent cells were collected and B lymphocytes were removed by magnetic-activated cell sorting (MACS) via CD20⁺ MACS beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purified T lymphocytes were incubated with 5 µg/mL Leucoagglutinin (PHA-L) (Sigma, Deisenhofen, Germany) overnight if not stated otherwise. For further cultivation for up to 6 days, T cells were washed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS) and supplemented with 25 U/mL interleukin-2 (IL-2; Tebu-bio, Offenbach, Germany). The following signaling pathways inhibitors were used: PD098059 (Sigma), SB203580 (Sigma), JNK-II (Calbiochem, Darmstadt, Germany), cyclosporine A (Calbiochem), FK506 (Alexis, Grünberg, Germany), rocaglamide (Alexis), and VIVIT peptide.²⁰ VIVIT peptide was synthesized in-house by standard solid-phase methods, purified by high-performance liquid chromatography (HPLC), and analyzed by mass spectrometry for purity and correct molecular composition.

Transient transfections and luciferase assays

Transient transfection of 293T cells was performed with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. For luciferase assays, 4 µg of a pGL3 reporter construct containing nucleotides -501 to +104 relative to the proposed transcriptional start site of *CFLAR* (c-FLIP) exon 1 were cotransfected with 0.4 µg of a control reporter construct containing the Rous sarcoma virus promoter in front of the β-galactosidase (*lacZ*) gene. The c-FLIP promoter construct was kindly provided by Dr Wafik El-Deiry (Philadelphia, PA).²¹ In addition to the luciferase constructs, 2 µg of an NFATc1 or NFATc2 plasmid were cotransfected with 2 µg of a plasmid encoding a constitutively active form of calcineurin. The plasmids encoding NFATc1, NFATc2, and calcineurin were a kind gift of Dr Edgar Serfling (Würzburg, Germany). After a 24-hour transfection, cells were lysed in 100 µL of 25 mM glycylglycine/pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, and 1% Triton X-100 and were centrifuged at 20 000g at 4°C for 5 minutes. Then, 100 µL reaction buffer (25 mM glycylglycine/pH 7.8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, 15 mM potassium phosphate, pH 7.8) was added to 30 µL supernatant and luciferase activity was measured after injection of 100 µL luciferin (0.3 mg/mL) using a microplate luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). For normalization, β-galactosidase assay was performed using the Galacto-

Light system (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's protocol. FLIP promoter mutants were generated by using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and verified by DNA sequencing.

Lentiviral infection of cells

c-FLIP MISSION TRC shRNA Target Set cloned into the lentiviral vector pLKO.1 was purchased from Sigma. c-FLIP_{short} shRNA oligonucleotides (see Document S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) were annealed and cloned into the lentiviral vector pLKO.1. Lentiviral vectors were cotransfected with the envelope vector pMD2.G (Addgene no. 12259) and the gag-pol expression plasmid pCMV_dR8.2dvr (Addgene no. 8455) into 293T cells as described in "Transient transfections and luciferase assays." Lentiviruses (LVs) were harvested 36 hours and 60 hours after transfection. Crude virus was filtered through 0.45-µm PVDF filters (Millipore, Billerica, MA), concentrated by ultracentrifugation at 100 000g for 60 minutes at 4°C and stored at -80°C until further use. Titers were determined by infection of HeLa cells with serial dilutions of LV stocks and 5 µg/µL polybrene (Sigma). Specific knockdown of the various c-FLIP isoforms was verified by Western blot analysis. CEM cells were infected by adding LVs and 5 µg/µL polybrene to 2 × 10⁶ cells. Cells were centrifuged for 1 hour at 860g and then incubated overnight. At 48 hours after infection, cells were cultured for 2 weeks in selection medium containing 2 µg/mL puromycin (Sigma). Successful integration of LVs was confirmed by Western blot analysis.

RNA isolation, RT-PCR, and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from 5 × 10⁶ to 10 × 10⁶ cells with the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total mRNA (1 µg) was used for cDNA synthesis using the SuperScript III First-Strand reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) kit of Invitrogen. Real-time PCR was carried out on an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Measurements were run in triplicate and normalized to GAPDH values.

FACS assays

Cell-surface staining and cytotoxicity assays were performed as described previously.⁷ For assaying apoptosis, 5 × 10⁵ cells were stimulated for 16 hours in 24-well plates (if not stated otherwise) with CD95L, or left untreated for the indicated times. CD69, CD25, and CD3 antibodies used for cell-surface staining were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany). CD95 surface staining was performed with 2R2 antibody, which was purified and FITC-conjugated in house. For blocking activation-induced apoptosis, neutralizing anti-CD95L (clone 5G51; BioCheck, Münster, Germany) was added at 5 µg/mL to cell cultures. Specific apoptosis was calculated as follows: (% experimental apoptosis - % spontaneous apoptosis) / (100 - % spontaneous apoptosis) × 100.

Western blot analysis

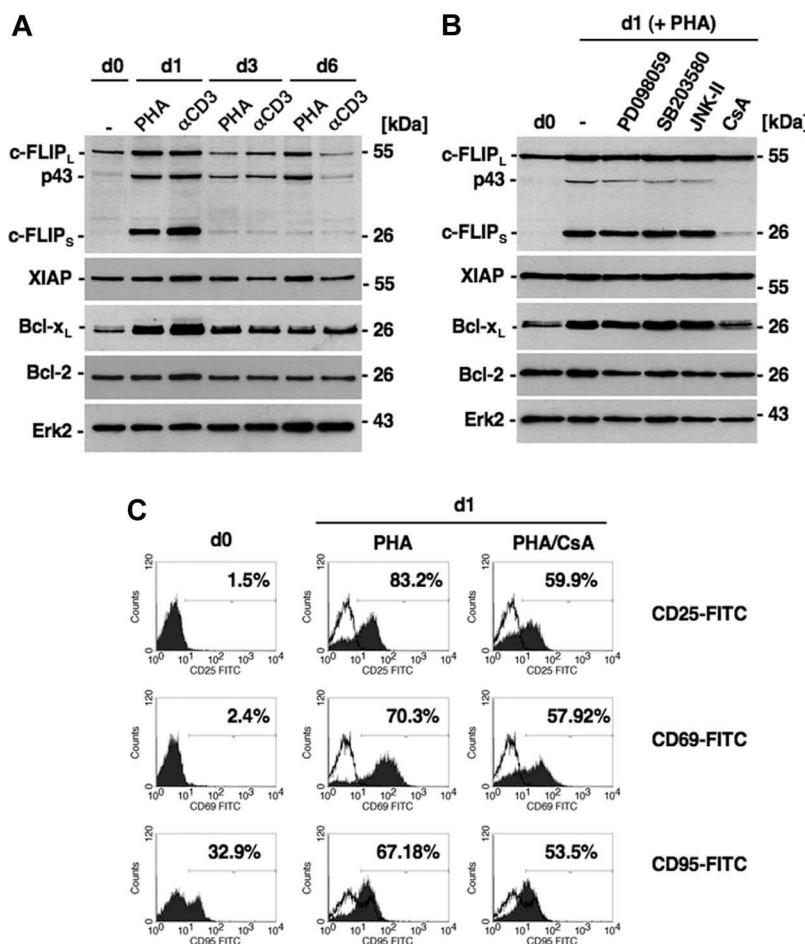
Western blot analysis was performed as described previously.¹⁰ Quantification of protein expression was carried out using a LAS 3000 CCD camera (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) and AIDA software (Raytest, Sprockhövel, Germany).

Electrophoretic mobility shift assay

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using nuclear extracts of primary peripheral T lymphocytes or HuT78 cells was performed according to standard procedures. A detailed protocol can be found in the supplementary information.

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed using a ChIP kit from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). For each precipitation



2.5×10^6 CEM cells were fixed for 25 minutes at 37°C by adding formaldehyde directly to the culture medium at a final concentration of 1%. Cells were washed twice in ice-cold PBS with protease inhibitors (1 mM PMSF and 5 µg/mL each of aprotinin, leupeptin, pepstatin A, and chymostatin) and lysed in sodium dodecyl sulfate (SDS) solution (1% SDS, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) for 10 minutes at 4°C. Lysates were sonicated (Sonoplus; Bandelin Electronics, Berlin, Germany) 3 times (30% power, 0.5 seconds) to shear genomic DNA into fragments of 200 bp to 1200 bp. After 10-fold dilution in a solution of 0.01% SDS, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8.0), lysates were precleared with 75 µL salmon sperm DNA-saturated protein A agarose (50% vol/vol) for 30 minutes at 4°C. The agarose was removed by centrifugation and each sample was incubated with 10 µg anti-NFATc1 (sc-13033-X; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), anti-NFATc2 (4G6-G5; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit IgG, or mouse control IgG overnight at 4°C. Protein/DNA complexes were harvested and washed according to the manufacturer's protocol. After reversal of the cross-linking by incubation at 65°C for 4 hours, DNA was isolated with a PCR purification kit (Qiagen) and amplified using primers specific for both NFAT binding sites.

Results

We have previously reported that primary T cells up-regulate c-FLIP_{short} after 1 day of T-cell receptor (TCR) stimulation.^{7,14} For a more detailed analysis, we stimulated freshly isolated primary human T cells (d0) with the lectin PHA or anti-CD3ε antibodies overnight to trigger TCR activation and analyzed the cells directly (d1) or after culture for an additional 2 days (d3) or 5 days (d6) with IL-2. IL-2 was added because of its role as a survival and growth

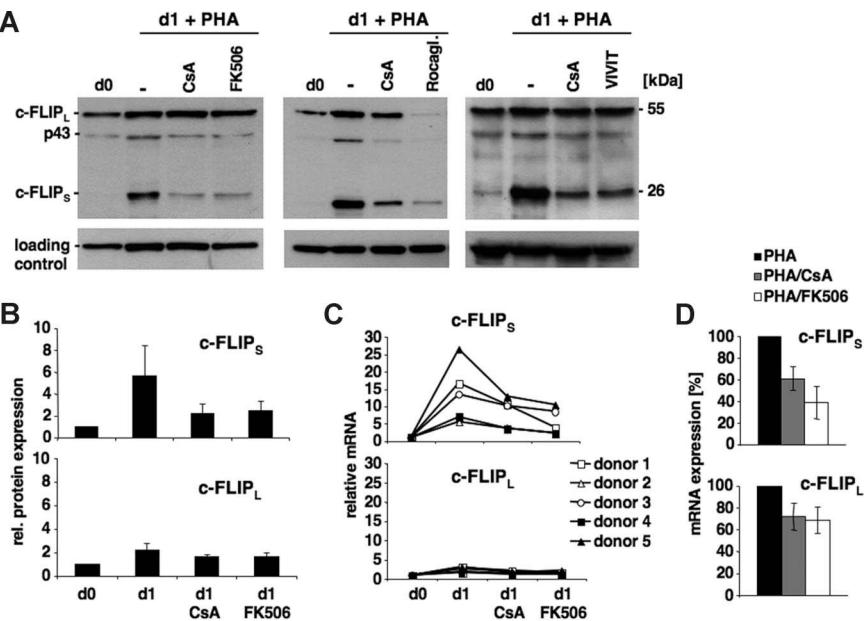
Figure 1. c-FLIP is highly up-regulated in short-term activated T cells. (A) Freshly prepared human peripheral T cells (d0) were stimulated with either PHA-L (5 µg/mL) or CD3ε antibody (coated, 10 µg/mL OKT-3) for 16 hours. Short-term activated T cells (d1) were washed and incubated with 25 U/mL IL-2 for up to 6 days (d6). c-FLIP, XIAP, Bcl-x_L, and Bcl-2 expression were determined by Western blot analysis. Erk2 served as a loading control. (B) Human peripheral T cells were treated for 16 hours with 5 µg/mL PHA-L in the presence or absence of 50 nM PD098059 (MEK1 inhibitor), 50 nM SB203580 (p38 inhibitor), 1 µM JNK-II, or 1 µM cyclosporine A (CsA). Subsequently, cells were analyzed by Western blotting. (C) Isolated peripheral T cells were stimulated with 5 µg/mL PHA-L or PHA-L plus 1 µM CsA for 16 hours. T-cell activation was determined by flow cytometric detection of CD69, CD25, and CD95 surface expression.

factor as well as its ability to sensitize T cells for activation-induced cell death.¹⁴ Both PHA and anti-CD3ε strongly induced the expression of c-FLIP_{short}, which was absent in freshly isolated T cells (Figure 1A). Importantly, induction of c-FLIP_{short} expression was only transient and declined upon longer cultivation. In contrast, expression of c-FLIP_{long} and Bcl-x_L was detectable under all culture conditions and was only slightly up-regulated on day 1 (Figure 1A). The expression of XIAP and Bcl-2, 2 other antiapoptotic proteins, and the MAP kinase (MAPK) Erk2 remained unchanged in the course of T-cell activation (Figure 1A).

To investigate the mechanism of c-FLIP_{short} up-regulation, we first used pharmacologic inhibitors of several signaling pathways. Inhibition of the 3 classic MAPK pathways (Erk, p38^{MAPK}, and JNK) by PD098059, SB203580, and JNK-II, respectively, had no effect on c-FLIP_{short} expression (Figure 1B). Even when used at higher micromolar concentrations, c-FLIP expression remained unaffected by MAPK inhibitors (Figure S1A). Similarly, the inhibitors wortmannin (PI3K), rapamycin (mTOR), and SB415286 (GSK3) also showed no effect (Figure S1B). However, expression of c-FLIP_{short} was significantly reduced in d1 T cells treated with the immunosuppressant cyclosporine A (CsA; Figure 1B). Interestingly, CsA had only a minor effect on the expression of c-FLIP_{long}, which was similar to that observed in d0 T cells. Of note, CsA reduced but did not abolish T-cell activation, as determined by the expression of the activation markers CD25 and CD69 on the surface of d1 T cells (Figure 1C). In contrast, the cdk2 inhibitor roscovitine suppressed c-FLIP up-regulation most likely by a complete inhibition of T-cell activation (Figure S1B, data not

Figure 2. Block of c-FLIP up-regulation in short-term activated T cells by inhibition of calcineurin.

(A) Human peripheral T cells were lysed immediately (d0) or stimulated for 16 hours (d1) with 5 µg/mL PHA-L in the presence or absence of 1 µM cyclosporine A (CsA), 100 nM FK506, 200 nM rocamamide, or 10 µM VIVIT peptide. c-FLIP expression was analyzed by Western blotting. Tubulin or β-actin served as a loading control. (B) Inhibition of c-FLIP_{long} and c-FLIP_{short} up-regulation in short-term activated T cells by CsA and FK506 was analyzed by quantitative Western blotting. Protein expression levels are represented as the means plus or minus the standard deviation (SD) of at least 4 independent experiments. (C,D) Quantification of c-FLIP mRNA levels in unstimulated versus PHA-L-, PHA-L/CsA-, and PHA-L/FK506-treated peripheral T cells of 5 different blood donors by real-time PCR. Panel D displays the percentage of inhibition of c-FLIP mRNA up-regulation in CsA- and FK506-treated cells.



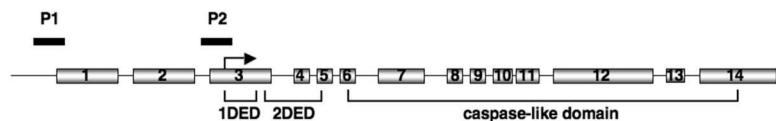
shown). Therefore, we conclude that a CsA-sensitive pathway mediates induction of c-FLIP_{short}.

CsA inhibits the phosphatase calcineurin, which dephosphorylates and thereby activates transcription factors of the NFAT family.²² As NFAT plays a major role in T-cell biology, we wanted to confirm that CsA inhibits c-FLIP expression by interfering with calcineurin-mediated NFAT activation. Therefore, we used additional inhibitors of the NFAT pathway, such as FK506,^{23,24} rocamamide,²⁵ and VIVIT peptide, which blocks calcineurin-NFAT interaction.²⁰ As shown in Figure 2A, FK506 and the VIVIT peptide inhibited up-regulation of c-FLIP_{short} to an extent similar to CsA, whereas c-FLIP_{long} expression was again only marginally affected. Interestingly, rocamamide strongly reduced expression of both c-FLIP isoforms, which might be explained by its ability to inhibit both NFAT and NF-κB.²⁶ Taken together, the potent induction of c-FLIP_{short} in T cells relies strongly on the calcineurin/NFAT pathway.

We then performed quantitative Western blot analysis to determine the extent to which the calcineurin/NFAT pathway contributes to c-FLIP_{short} induction. Upon T-cell activation, c-FLIP_{short} was up-regulated approximately 5-fold compared with freshly isolated T cells (Figure 2B left panel). Addition of CsA or FK506 reduced the expression to a 2-fold induction compared with unstimulated control cells (Figure 2B top panel). In contrast, c-FLIP_{long} was induced upon TCR stimulation at most 2-fold, and inhibition of calcineurin by CsA or FK506 had only marginal effects (Figure 2B bottom panel). Next, we asked whether induction of c-FLIP_{short} was indeed regulated at the transcriptional level. To this end, we performed real-time RT-PCR experiments with mRNAs from different blood donors and analyzed c-FLIP_{short} and c-FLIP_{long} transcript levels in freshly isolated T cells (d0), PHA-activated T cells (d1), and d1 T cells either treated with either CsA or FK506. The mRNA of c-FLIP_{long} was induced at most 3-fold upon activation with PHA (Figure 2C bottom panel). Addition of CsA or FK506 attenuated c-FLIP_{long} induction only slightly. In contrast, PHA up-regulated c-FLIP_{short} mRNA 5-fold to 27-fold depending on the donor (Figure 2C top panel), whereas addition of CsA or FK506 reduced expression by 40% to 60% (Figure 2C,D), suggesting that c-FLIP_{short} is regulated by NFAT at the transcriptional level in primary human T cells.

To assess whether the *c-FLIP* gene (*CFLAR*, gene ID 8837) is a direct target of NFAT transcription factors, we initially undertook a promoter analysis of the human *c-FLIP* (*CFLAR*) promoter. *CFLAR* is located on human chromosome 2 between the genes *NDUFB3* (encoding NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1β subcomplex 3; ending at position 201,658,710) and *CASP10* (encoding caspase-10; starting at position 201,756,100). As a first step, we used the gene2promoter software (Genomatix, Munich, Germany) to determine possible promoter sequences within this chromosomal region. The analysis suggested 2 potential promoter regions, one directly upstream of exon 1 comprising part of the 5' UTR and another adjacent to exon 3 containing the start codon (Figure 3A). We then analyzed the 2 potential promoters using the MatInspector (Genomatix) software for the prediction of potential NFAT-binding sites.²⁷ The first promoter region upstream of exon 1 comprises 3 potential NFAT-binding sites (Figure 3B), whereas in the second putative promoter no NFAT-binding sites could be identified (data not shown). Notably, the first promoter also contained one NF-κB site (Figure 3B), which may explain the NF-κB-dependent expression of c-FLIP in certain cell types.

To investigate whether T-cell activation induces binding of NFAT to these putative sites in the c-FLIP promoter region 1, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using nuclear extracts of the human T-cell line HuT78. Similar to primary T cells, activation of HuT78 cells by Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin triggered a strong up-regulation of c-FLIP_{short} that was efficiently blocked by CsA (Figure 4A). For EMSAs, oligonucleotides were used comprising 1 of the 3 potential binding sites in promoter region 1, termed sites 1, 2, and 3 (Figure 3B). T-cell activation rapidly induced DNA-binding activity to site 1 and 2 probes (Figure 4B), but not to an oligonucleotide comprising the binding site 3 (data not shown). Interestingly, binding to the first putative NFAT site occurred more rapidly with the strongest shift after 1 hour, whereas DNA binding to the second site was slightly delayed, peaking after 2 hours of cell activation. Binding to the radioactive NFAT consensus oligonucleotide was efficiently competed by an excess of unlabeled site 1 or site 2 oligonucleotides, resulting in a concentration-dependent decrease of the shifted complex, whereas unlabeled site 1 or site 2 probes

A**B**

201,688,637

tggtttgagacggaaatccaggctcgactgatggccactgcctttagcctgggcacagcc
gagaccttgtcaagaGGAAAcaaaaaaaacaaaaacatacacaaaaaccacaaatgtttca
cgtttgttatgactcccacaaatgttaaacactcgccggcggtgtggctcagccgttaatccccgc
actttggggaggccggggccggcgatcagggtaaaggttcgagaccatctggccaaacagtggaaaccccg
ctctactaaacaaaaaaatttggccggctgtggccgtgcctgtatgcctggggactggggca
agagaatcgcgttgaacttagggcgagggttgcagtgcgtgaaatgcggccactgcacccgc
cagagcggactctgtcaaaaaaagaGGAAAgaaaaaaaacactcgccgtgtttactctaa
cgcgttggacttggcgtcagatcaccccccgttactgtatactcagtcacacaqccatacaGGAAAcacgg
agcttgcgtcgtcactccggacgatctcaactaaaaGGGActccggagacttgggtggggactcggccctcacaca
gtgagtgccggatctttggactttgtccagtgcacgtgagacaacaaggaccacggggagggtttaggag
aagccggcgaacacgcgtccggccaccaaggctccgc

201,689,236

mutated in the NFAT recognition sequence had no effect on protein-DNA complex formation (Figure 4C).

In order to determine which of the NFAT proteins bind to the FLIP promoter, we performed supershift experiments with antibodies specific for NFATc1, NFATc2, and NFATc3. Supershift or disappearance of the NFAT-DNA complex could be detected by incubation of nuclear extracts with antibodies against NFATc2 and NFATc1, but not NFATc3 (Figure 4D). Because transcription factor AP-1 can associate with NFAT under certain conditions,²⁸ we also included a c-Jun antibody in

Figure 3. Promoter analysis of the human c-FLIP gene. (A) The gene structure of the human *c-FLIP* gene (*CFLAR*), which is located on chromosome 2, is shown. *CFLAR* comprises 14 exons spanning approximately 52 kb with exon 3 containing the translational start codon. The regions coding for the first DED (1DED), the second DED (2DED), and the caspase-like domain of the long isoform are indicated. The 2 potential promoter regions are in front of exon 1 (P1) and exon 3 (P2), respectively, and are represented by —. (B) Sequence of *c-FLIP* promoter P1. The sequence of chromosomal region 201,688,637 to 201,689,236 of human chromosome 2 is shown. Promoter P1 is shaded in gray. The core nucleotides of 3 potential NFAT binding sites (GGAAA) are marked in bold, and a potential NF-κB site (aaaGGAct) is in italics. The oligonucleotide sequences used as probes for EMSA analyses are underlined.

the supershift analyses. Interestingly, the c-Jun antibody did not reduce or supershift the NFAT-DNA complex, suggesting that AP-1 was not coupled to NFAT at the 2 sites of *c-FLIP* promoter (Figure 4D). Furthermore, we prepared nuclear extracts from freshly isolated, primary human T lymphocytes which also demonstrated an activation-dependent and CsA-inhibitable NFAT binding to site 1 and site 2 (Figure 4E,F).

To analyze the transcriptional activation of the human *c-FLIP* promoter by NFAT, luciferase assays were performed using a *c-FLIP* reporter construct (pGL3-FLIP) comprising the

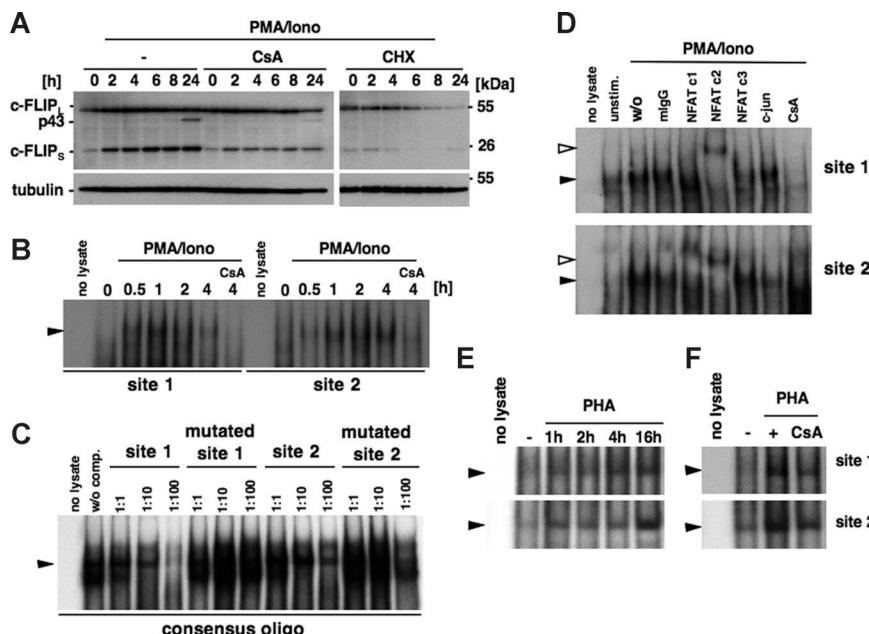
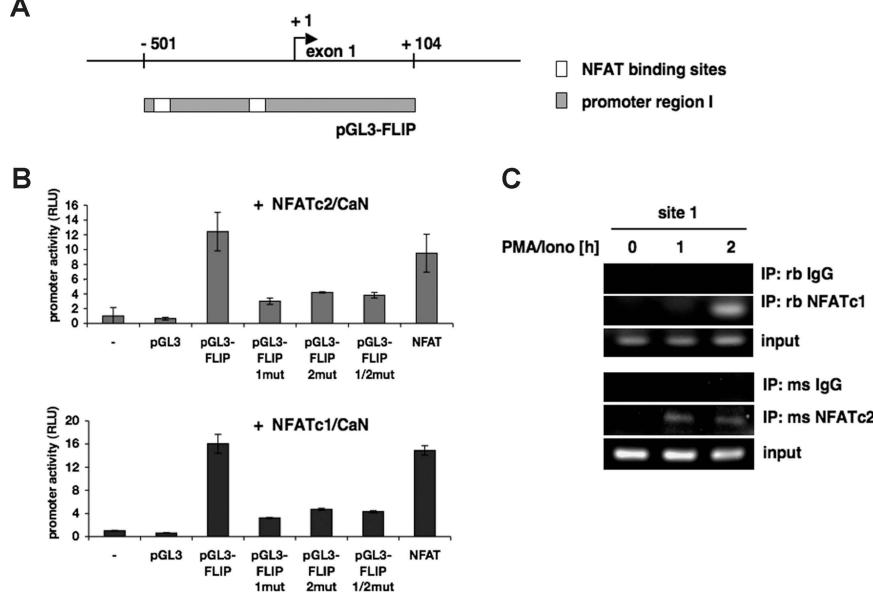


Figure 4. NFAT proteins bind to the human *c-FLIP* promoter in activated T cells. (A) HuT78 cells were stimulated for the indicated time with 20 ng/mL PMA and 1 μM ionomycin with or without 1 μM CsA or 10 μg/mL cycloheximide (CHX). *c-FLIP* expression was analyzed by Western blotting. Tubulin served as a loading control. (B) HuT78 cells were treated for the indicated time with 20 ng/mL PMA and 1 μM ionomycin with or without 1 μM CsA. EMSAs were performed with radioactive oligonucleotides comprising either the putative NFAT binding site 1 or site 2 of the human *c-FLIP* promoter. ▶ indicates the NFAT-specific DNA complex. (C) For competition assays, nuclear extracts of PMA/ionomycin-stimulated cells were incubated with the radioactively labeled NFAT consensus oligonucleotide and the indicated relative concentrations of unlabeled site 1 or site 2 oligonucleotides. Site 1 and site 2 oligonucleotides with a mutation in the putative NFAT recognition sequences were used as negative controls. As a negative control, oligonucleotide incubated without nuclear extract (no lysate) was loaded. A nuclear extract from stimulated cells in the absence of competing oligonucleotide (w/o comp) served as a positive control. (D) Supershift analyses were performed by incubation of nuclear extracts of PMA/ionomycin-stimulated cells with NFATc1, NFATc2, NFATc3, c-Jun, or a control mouse IgG (mlgG) antibody. The NFAT-specific and supershifted DNA/protein complexes are indicated by ▶ and ▷, respectively. (E) Human peripheral T cells were stimulated with 5 μg/mL PHA-L for the indicated time points. Nuclear extracts were prepared and EMSA analyses were performed using either the putative NFAT site 1 or site 2 oligonucleotides. (F) Freshly prepared human peripheral T cells were incubated with PHA-L or PHA-L plus CsA for 16 hours. EMSA analyses were performed by incubation of nuclear extracts with radioactive NFAT site 1 or site 2 oligonucleotides.

Figure 5. The human c-FLIP promoter is induced upon NFAT activation. (A) Schematic representation of the luciferase reporter construct comprising the human c-FLIP promoter I (in gray). The reporter construct contains both putative NFAT binding sites indicated as □. (B) Luciferase assays were performed in 293T cells transiently transfected with the c-FLIP reporter construct (pGL3-FLIP), an empty vector control (pGL3), or, as a positive control, a reporter construct comprising 3 tandem repeats of the NFAT binding site of the IL-2 promoter (NFAT). Expression plasmids encoding either NFATc1 or NFATc2 and constitutively active calcineurin were cotransfected. At 24 hours after transfection, luciferase activity was quantified. β -galactosidase activity was used for normalization. Results are displayed as the mean plus or minus SD of 3 independent experiments. (C) ChIP analysis of the c-FLIP promoter in CEM cells stimulated for the indicated time points with 20 ng/mL PMA and 1 μ M ionomycin. ChIP procedure was done as described in "Chromatin immunoprecipitation." NFAT-chromatin complexes were immunoprecipitated with NFATc2 and NFATc1 antibody, respectively. Rabbit IgG (rbIgG) and mouse IgG (msIgG) were used as negative controls. PCR was performed with primers specific for the NFAT binding site 1 of the c-FLIP promoter and analyzed by agarose gel electrophoresis. Genomic DNA (input) was used as a positive control in the PCR analysis.



promoter region 1 with both NFAT-binding sites (Figure 5A). For this purpose, we transiently expressed NFATc1 or NFATc2 together with a constitutively active form of calcineurin. Calcineurin was cotransfected because NFAT transcription factors are readily phosphorylated and thereby inactivated upon expression. Indeed, overexpression of NFATc1 as well as of NFATc2 in 293T cells resulted in an increased luciferase activity (Figure 5B). Moreover, mutation of the proposed NFAT binding sites strongly reduced luciferase expression, indicating that induction of the c-FLIP promoter by NFAT was indeed regulated by the suggested binding sites (Figure 5B). Next, we tested direct binding of NFAT transcription factors to the endogenous c-FLIP promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP). A stimulation-dependent binding of NFATc1 and NFATc2 to the first binding site was observed in CEM cells, confirming that c-FLIP was indeed a direct transcriptional target of NFAT (Figure 5C). Unfortunately, we were unable to analyze site 2 by ChIP, most likely because the surrounding A-T-rich sequences prevented an efficient PCR amplification. Nevertheless, these experiments clearly show that c-FLIP is a bona fide NFAT target gene.

FLIP proteins are strongly up-regulated in activated T cells and inhibit apoptosis by preventing the cleavage of initiator caspases in the DISC. To further determine the importance of the c-FLIP isoforms, we treated the human T-cell lines HuT78 and CEM with the CD95L to trigger the extrinsic apoptosis cascade. Both cell lines were highly apoptosis-sensitive, as detected by a CD95L-induced increase of DNA fragmentation (Figure 6). CEM cells, like HuT78 cells, strongly up-regulated FLIP proteins upon activation, which was blocked by the addition of CsA (Figure S2A). Accordingly, T-cell activation led to a protection of both cell lines against CD95-mediated apoptosis, whereas CsA treatment inhibited c-FLIP up-regulation and rendered the cells sensitive again (Figure 6).

In order to delineate the relative contributions of the short and long isoforms to this protection, we next used RNA interference and stably infected CEM cells with lentiviral shRNA constructs targeting c-FLIP_{long}, c-FLIP_{short}, or both isoforms (Figure 7A). The knock-down of c-FLIP_{long} was less efficient than that of c-FLIP_{short}, which may be explained by the different half-life of the 2 proteins.^{7,29} Activation of CEM cells

by PMA/ionomycin induced an up-regulation of CD95L and a certain degree of apoptosis, which was almost completely prevented by a neutralizing CD95L antibody (Figure 7B). In line with the reduced c-FLIP expression, CEM cells expressing either of the c-FLIP shRNAs displayed increased apoptosis sensitivity upon activation, in comparison to the respective control cells. Interestingly, cells with a c-FLIP_{short} knock-down (c-FLIP_S or c-FLIP_{S/L} shRNA) were more sensitive than cells expressing an shRNA targeting specifically c-FLIP_{long} (Figure 7B). Stimulation of knock-down cells with increasing concentrations of CD95L led to strongly elevated apoptosis (Figure 7C). Similarly to untransfected cells (Figure 6), activation with PMA/ionomycin rescued control cells from apoptosis, whereas c-FLIP knock-down cells remained sensitive toward CD95L.

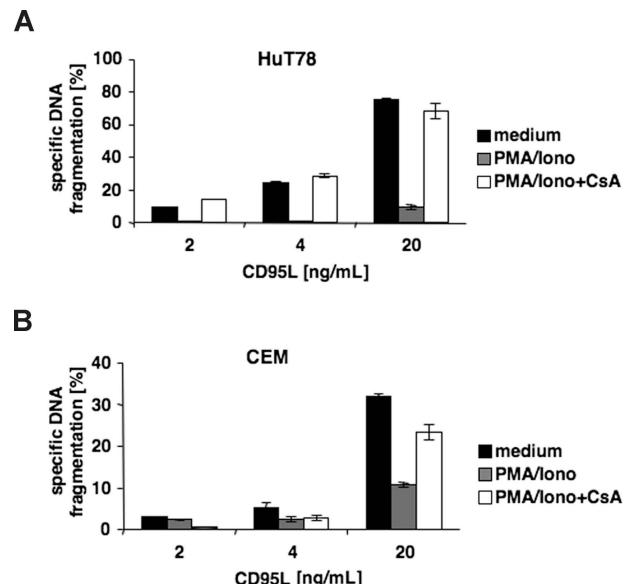


Figure 6. Cyclosporine A abolishes activation-induced resistance to apoptosis. (A) HuT78 and (B) CEM cells were either left untreated or stimulated for 16 hours with 20 ng/mL PMA and 1 μ M ionomycin (Iono) with or without 1 μ M CsA. Cells were then treated for an additional 8 hours with the indicated concentrations of CD95L. Apoptosis was determined by measuring DNA fragmentation and cell nuclei with hypodiploid DNA.

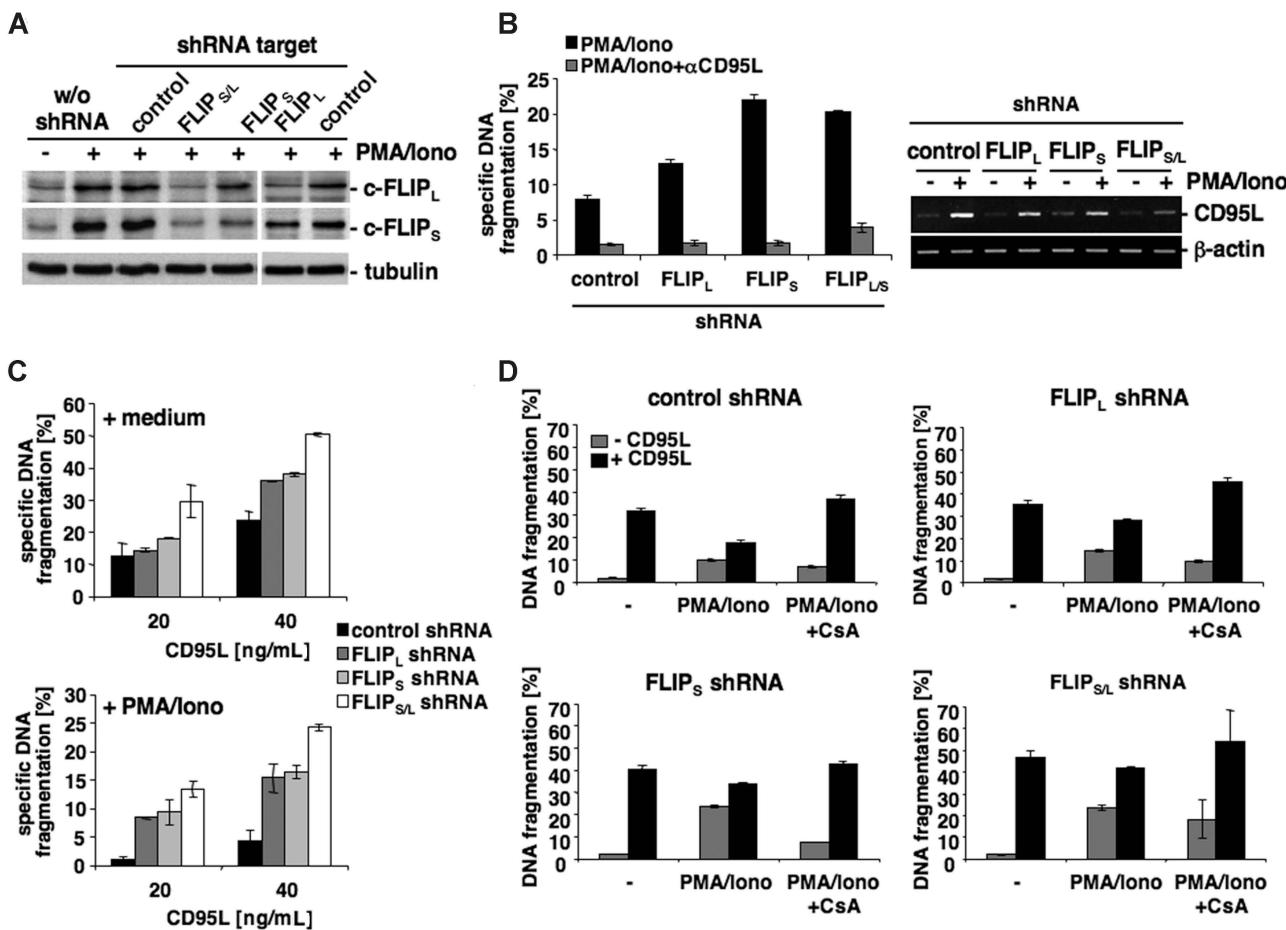


Figure 7. Inhibition of c-FLIP up-regulation sensitizes activated T cells to apoptosis. (A) CEM cells were either left untreated or stably transduced by lentiviral infection with a control shRNA or shRNAs targeting c-FLIP_{long} (FLIP_L), c-FLIP_{short} (FLIP_S), or both c-FLIP_{long} and c-FLIP_{short} (FLIP_{L/S}). Efficient knock-down of the various c-FLIP isoforms was confirmed by Western blotting. Tubulin served as a loading control. (B) Left panel: CEM cells stably transduced with the indicated shRNAs were stimulated for 14 hours with PMA and ionomycin with or without neutralizing CD95L antibody (α CD95L; 5 μ g/mL, clone 5G51). Apoptotic cells were quantified by measuring DNA fragmentation. Right panel: Up-regulation of CD95L in unstimulated or PMA/ionomycin-treated CEM cells expressing the indicated shRNAs was analyzed by RT-PCR. (C) CEM cells stably transduced with the indicated shRNAs were either left untreated (top panel) or stimulated with PMA and ionomycin (bottom panel). Two hours later CD95L was added at the indicated concentrations and apoptosis was quantified after an additional 8 hours of stimulation. (D) CEM cells stably transduced with the indicated shRNAs were left untreated or stimulated for 2 hours with PMA and ionomycin in the presence or absence of 8 μ M CsA. The cells were then cultured for an additional 8 hours with or without 40 ng/mL CD95L, before apoptosis was determined by flow cytometric measurement of DNA fragmentation.

(Figure 7C). Cells expressing shRNAs against both c-FLIP isoforms were highly sensitive to apoptosis and significantly more susceptible than isoform-specific knock-down cells. Of note, while both single knock-down cells showed a similar apoptosis sensitivity upon addition of CD95L, c-FLIP_{short} single knock-down cells displayed a higher overall apoptosis rate due to the increased level of activation-induced apoptosis (Figure 7D).

To analyze whether c-FLIP is the major antiapoptotic target of the calcineurin/NFAT pathway, we tested whether CsA can still sensitize the different knock-down cell lines. CsA sensitized control shRNA-expressing cells toward apoptosis, whereas cells in which c-FLIP_{short} or both isoforms were knocked down showed only a marginal PMA/ionomycin-mediated protection against apoptosis and a strongly reduced sensitization by CsA (Figure 7D). Interestingly, c-FLIP_{long} single knock-down cells were still markedly sensitized by CsA, which was most likely due to the CsA-induced inhibition of c-FLIP_{short} expression. Altogether, these data suggest that c-FLIP plays a central role in the protection against CD95-mediated apoptosis upon T-cell activation. Furthermore, apoptosis inhibition in activated T cells appears to be predominantly regulated by the short rather than the long c-FLIP isoform.

Discussion

Previous reports have shown that c-FLIP and particularly the truncated isoform c-FLIP_{short} is up-regulated upon T-cell activation.^{7,9,14,30,31} The signaling mechanisms leading to c-FLIP gene induction in short-term activated T cells, however, have not directly been investigated. We show here by various means including pharmacologic inhibition, reporter gene assays as well as EMSA and ChIP analyses, that c-FLIP is a bona fide NFAT target gene in T cells. Moreover, we demonstrate that induction of c-FLIP in recently activated T cells is important to prevent activation-induced suicide mediated by a concomitant up-regulation of the CD95L. In this context, it is important to note that treatment with CsA almost exclusively affected c-FLIP_{short} expression and that CsA-treated T cells were as sensitive toward CD95L as T cells with a knock-down of both c-FLIP isoforms. Moreover, isoform-specific knock-down of c-FLIP splice variants revealed that particularly c-FLIP_{short}-deficient cells were sensitive toward activation-induced apoptosis. Therefore, c-FLIP_{short} rather than c-FLIP_{long} may be a crucial factor determining the resistance of recently activated T cells.

Transcription of the *c-FLIP* gene has been shown to be induced by NF-κB^{15,16} and the androgen receptor³² and to be repressed by c-Myc,²¹ E2F1,³³ FOXO3a,³⁴ and AP-1.³⁵ Interestingly, p53 had opposite effects on *c-FLIP* expression in different cellular systems, as one report showed induction and another study repression of *c-FLIP* by p53.^{36,37} Given this context-specific regulation of *c-FLIP* expression by p53, it is conceivable that distinct transcription factors are involved in *c-FLIP* expression in different cell types. As most of the previous studies have been performed in nonhematopoietic cell lines, we therefore wished to analyze signaling pathways involved in the regulation of the *c-FLIP* gene in T cells. We demonstrate that in primary T cells and in T-cell lines, the calcineurin/NFAT pathway is particularly important for *c-FLIP*_{short} transcription. Interestingly, NFATc1/A, an inducible isoform with a truncated C-terminal domain, is strongly up-regulated in activated T cells by an NFAT-dependent autoregulatory loop.³⁸ In contrast to other NFAT proteins, NFATc1/A is unable to promote anti-CD3-induced apoptosis. It is therefore assumed that different NFAT isoforms have distinct target gene preferences and differentially regulate pro- and antiapoptotic genes in effector T cells. As we found a role for both NFATc1 and NFATc2 in *c-FLIP* promoter activity, it is thus tempting to speculate that NFATc1/A or threshold levels of individual NFAT proteins control *c-FLIP*_{short} expression and thereby regulate T-cell effector function.

In contrast to previous reports,^{30,39} we did not find any evidence that the MAPK or PI3K/Akt pathways were essential for expression of *c-FLIP* in T cells. This may be explained by differences in the experimental systems, as we analyzed protein instead of RNA expression and investigated primary human T cells instead of transformed cell lines. Although no direct binding to the promoter has been shown, *c-FLIP* is generally considered an NF-κB target gene. This view is supported by the finding that activators of NF-κB (including TNFα, LPS, or anti-CD40) induce *c-FLIP* expression, whereas cells deficient in NF-κB activation show reduced *c-FLIP* induction.¹⁵⁻¹⁷ Accordingly, high expression of *c-FLIP* is generally observed in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and Behcet disease.^{18,40-42} It was, however, also reported that NF-κB RelA-deficient mouse embryonic fibroblasts do not differ in tumor necrosis factor (TNF)-induced *c-FLIP* expression compared with wild-type cells, suggesting that *c-FLIP* expression can occur independently of NF-κB.⁴³

In contrast to CsA, we found that rocacamide, which has been shown to inhibit NF-κB as well as NFAT transcription factors,^{25,26} impaired the expression of both *c-FLIP*_{long} and *c-FLIP*_{short}, suggesting that NF-κB indeed contributes to *c-FLIP* gene regulation in T cells. It is therefore conceivable that NF-κB acts as a general activator of the *c-FLIP* gene during T-cell activation, whereas the calcineurin/NFAT pathway might more specifically enhance expression the *c-FLIP*_{short} isoform. Thus, our data demonstrate for the first time that a particular *c-FLIP* splice variant is induced by a certain transcription factor. Whether NFAT is involved in a transcription-coupled splicing event is an intriguing possibility that should be investigated in future studies.

Upon encounter with pathogens, T cells become activated and initiate effector mechanisms, one of which is the killing of infected target cells by CD95L.⁴⁴ Surprisingly, although recently activated T cells highly up-regulate CD95 receptor^{1,7} as well as its ligand,⁴⁵⁻⁴⁷ they do not commit suicide or induce fratricide in the initial immune response. Therefore, T cells must have various cell-survival mechanisms to prevent their elimination during activation. One of these is the up-regulation of antiapoptotic proteins such as Bcl-x_L upon T-cell activation (Figure 1).^{14,48} Moreover, we have previously shown that short-term activated T cells have a reduced capacity for DISC

formation.^{2,14} Here we demonstrate that in primary human T cells *c-FLIP*_{short} is highly up-regulated at the mRNA and protein level, while expression of *c-FLIP*_{long} is only marginally modulated. The induction of *c-FLIP*, especially the *c-FLIP*_{short} isoform, in recently activated T cells plays an important functional role in protection from CD95-mediated apoptosis, as an RNAi-mediated knock-down of *c-FLIP* sensitized T cells for CD95L-induced as well as activation-induced apoptosis. Strikingly, the cells, especially those in which *c-FLIP*_{short} had been knocked down, displayed a highly elevated sensitivity toward activation-induced apoptosis. Therefore, *c-FLIP*_{short} is an important mediator of resistance acquired by an activated T cell to protect itself from death receptor-mediated apoptosis.

CsA and FK506 are immunosuppressive drugs commonly used in transplantation medicine to induce immunologic tolerance. Sensitization to CD95-mediated apoptosis may contribute to the tolerance-promoting effects of these drugs. Supporting this hypothesis is a study showing that CsA sensitized CD28-costimulated rat T cells toward CD95-mediated apoptosis by up-regulating caspase-3 expression.⁴⁹ We observed impaired *c-FLIP*_{short} expression in CsA-treated activated T cells, providing an alternative molecular mechanism for tolerance induction by regulating apoptosis sensitivity. Interestingly, accumulating evidence suggests that calcineurin and NFAT transcription factors not only play an essential role in development and the immune system, but also in tumor development.^{50,51} Moreover, *c-FLIP* is highly expressed in certain tumors, suggesting it as a potential therapeutic target.⁵² In line with these observations, NFAT and *c-FLIP* were shown to support angiogenesis,⁵³ an essential process for tumor growth. In addition, it was recently demonstrated that inhibition of calcineurin by CsA or FK506 in vivo led to clearance of malignant cells and a better survival in 2 mouse models of leukemia.⁵⁴ Nevertheless, due to the various functions of calcineurin, long-term treatment with CsA is associated with severe side effects. Thus, direct interference with the expression of NFAT target genes could be an alternative strategy for immunosuppression. Our data suggest that *c-FLIP* might be such a target gene involved in tumorigenesis and immunosuppression.

Acknowledgments

We thank Daniel Scholtyssik for expert technical assistance and Dr Bernhard Reis for scientific advice. In addition, we would like to thank Drs Wafik S. El-Deiry, Peter H. Krammer, David Root, Edgar Serfling, Gudrun Totzke, Didier Trono, Bob Weinberg, and Harald Wajant for various reagents.

This work was supported by grants from the Deutsche Krebsforschungsgemeinschaft (Bonn, Germany) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bonn, Germany; GK1033, SFB575, SFB612).

Authorship

Contribution: N.U. designed and performed research and wrote the paper; M.S. and E.K. performed research; K.S.O. contributed vital new reagents and wrote the paper; and I.S. designed research, analyzed and interpreted the data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Ingo Schmitz, Institute of Molecular Medicine, University of Düsseldorf, Building 23.12, Universitätsstrasse 1, D-40225 Düsseldorf, Germany; e-mail: ingo.schmitz@uni-duesseldorf.de.

References

- Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol.* 1993;5:625-630.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:1541-1548.
- Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:532-542.
- Arnold R, Frey CR, Muller W, Brenner D, Krammer PH, Kiefer F. Sustained JNK signaling by proteolytically processed HPK1 mediates IL-3 independent survival during monocytic differentiation. *Cell Death Differ.* 2007;14:568-575.
- Irmel M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997;388:190-195.
- Kirchhoff S, Muller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol.* 2000;165:6293-6300.
- Schmitz I, Weyd H, Krueger A, et al. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol.* 2004;172:2194-2200.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 2001;276:20633-20640.
- Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280:14507-14513.
- Ueffing N, Keil E, Freund C, Kuhne R, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Mutational analyses of c-FLIP(R), the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell Death Differ.* 2008;15:773-782.
- Micheau O, Thome M, Schneider P, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 2002;277:45162-45171.
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, et al. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 2002;21:3704-3714.
- Dohrman A, Russell JQ, Cuenin S, Fortner K, Tschopp J, Budd RC. Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol.* 2005;175:311-318.
- Schmitz I, Krueger A, Baumann S, Schulze-Bergkamen H, Krammer PH, Kirchhoff S. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol.* 2003;171:2930-2936.
- Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 2001;21:5299-5305.
- Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3964-3973.
- Mora AL, Corn RA, Stanic AK, et al. Antiapoptotic function of NF-kappaB in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL. *Cell Death Differ.* 2003;10:1032-1044.
- Todaro M, Zerilli M, Triolo G, et al. NF-kappaB protects Behcet's disease T cells against CD95-induced apoptosis up-regulating antiapoptotic proteins. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2179-2191.
- Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol.* 2005;25:31-58.
- Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, et al. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med.* 2004;10:305-309.
- Ricci MS, Jin Z, Dews M, et al. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol.* 2004;24:8541-8555.
- Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:472-484.
- Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 1992;357:695-697.
- Flanagan WM, Cortesey B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature.* 1991;352:803-807.
- Proksch P, Giaisi M, Treiber MK, et al. Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. *J Immunol.* 2005;174:7075-7084.
- Baumann B, Bohnenstengel F, Siegmund D, et al. Rocaglamide derivatives are potent inhibitors of NF-kappa B activation in T cells. *J Biol Chem.* 2002;277:44791-44800.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 2005;21:2933-2942.
- Travers A. Transcription: activation by cooperating conformations. *Curr Biol.* 1998;8:R616-618.
- Poukkula M, Kaunisto A, Hietakangas V, et al. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem.* 2005;280:27345-27355.
- Yeh JH, Hsu SC, Han SH, Lai MZ. Mitogen-activated protein kinase kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med.* 1998;188:1795-1802.
- Golks A, Brenner D, Krammer PH, Lavrik IN. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med.* 2006;203:1295-1305.
- Gao S, Lee P, Wang H, et al. The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2005;19:1792-1802.
- Salon C, Eymin B, Micheau O, et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ.* 2006;13:260-272.
- Skurk C, Maatz H, Kim HS, et al. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem.* 2004;279:1513-1525.
- Li W, Zhang X, Olumi AF. MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res.* 2007;67:2247-2255.
- Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, et al. Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene.* 2001;20:5225-5231.
- Bartke T, Siegmund D, Peters N, et al. p53 up-regulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene.* 2001;20:571-580.
- Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, et al. Auto-regulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity.* 2002;16:881-895.
- Uriarte SM, Joshi-Barve S, Song Z, et al. Akt inhibition upregulates FasL, downregulates c-FLIPs and induces caspase-8-dependent cell death in Jurkat T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 2005;12:233-242.
- Sharief MK. Increased cellular expression of the caspase inhibitor FLIP in intrathecal lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000;111:203-209.
- Sehra YK, Seidi OA, Sharief MK. Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2001;113:268-274.
- Bai S, Liu H, Chen KH, et al. NF-kappaB-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3844-3855.
- Yeh WC, Itie A, Elia AJ, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity.* 2000;12:633-642.
- Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:323-370.
- Latinis KM, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem.* 1997;272:31427-31434.
- Li-Weber M, Laur O, Hekele A, Coy J, Walczak H, Krammer PH. A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. *Eur J Immunol.* 1998;28:2373-2383.
- Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, et al. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity.* 2000;12:293-300.
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* 1995;3:87-98.
- Kerstan A, Armbruster N, Leverkus M, Hunig T. Cyclosporin A abolishes CD28-mediated resistance to CD95-induced apoptosis via superinduction of caspase-3. *J Immunol.* 2006;177:7689-7697.
- Buchholz M, Ellenrieder V. An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in carcinogenesis. *Cell Cycle.* 2007;6:16-19.
- Muller MR, Rao A. Linking calcineurin activity to leukemogenesis. *Nat Med.* 2007;13:669-671.
- Safa AR, Day TW, Wu CH. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008;8:37-46.
- Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV. Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med.* 2004;199:1513-1522.
- Medyoub H, Alcalde H, Berthier C, et al. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* 2007;13:736-741.

Supplemental Figures and Methods

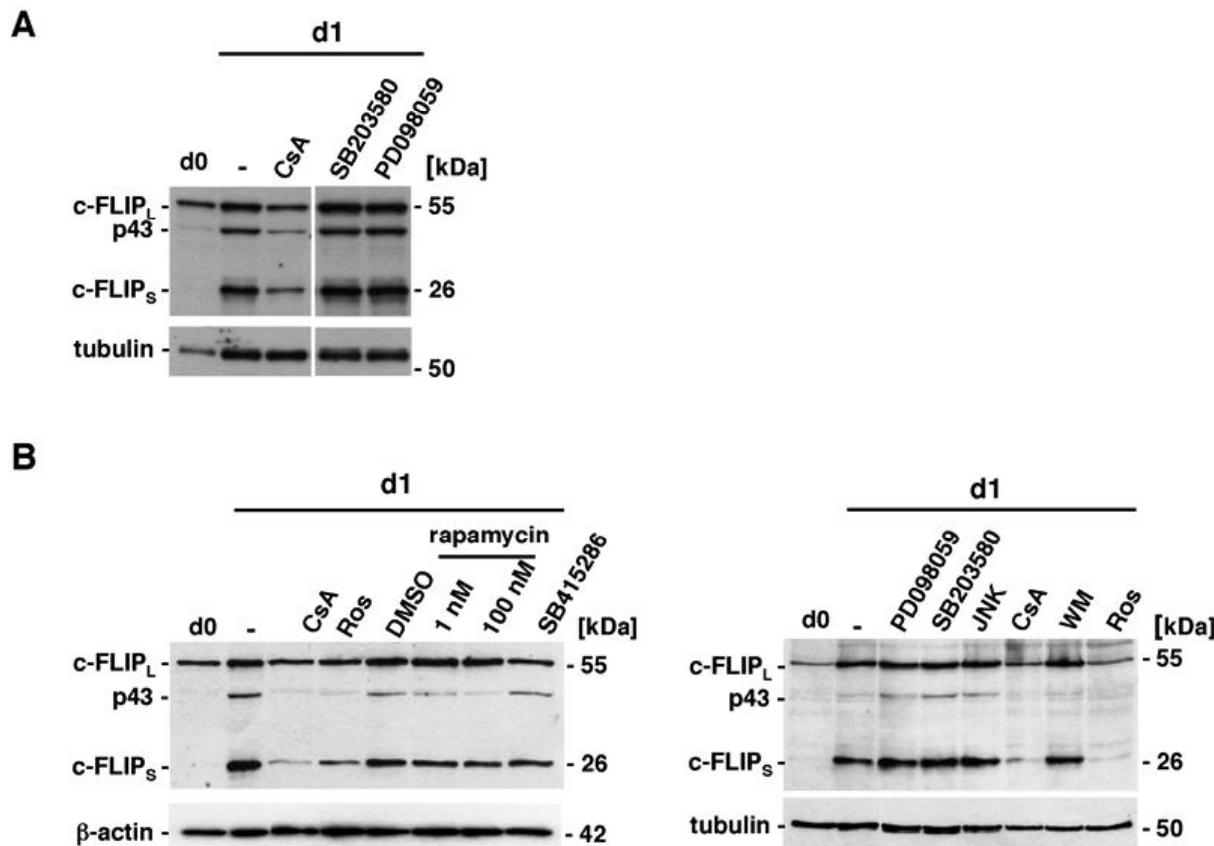


Figure S1. Effect of different signaling pathway inhibitors on c-FLIP expression

(A) Human peripheral T cells were treated for 16 h with 5 µg/ml PHA-L in the presence or absence of 20 µM PD098059 (MEK1 inhibitor), 1 µM SB 203580 (p38 inhibitor), or 1 µM cyclosporine A (CsA) (d1 T cells). Subsequently, cells were analyzed by Western blotting. Freshly prepared T cells (d0 cells) served as a control. (B) Inhibition of mitogen-activated protein kinases (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), mammalian target of rapamycin (mTOR) or glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β) does not interfere with induction of c-FLIP_{short} in primary T cells. Human peripheral T cells were immediately lysed (d0) after isolation or stimulated for 16 h (d1) with either 5 µg/ml PHA-L or PHA-L plus 1 µM cyclosporine A (CsA), 25 µM roscovitine (Ros, Cdk2 inhibitor), 1 or 100 nM rapamycin (mTOR inhibitor), 3 µM SB415286 (GSK3β inhibitor), 50 nM PD098059 (MEK1 inhibitor), 50 nM SB203580 (p38 inhibitor), 1 µM JNK-II, or 10 nM wortmannin (WM, PI3K inhibitor). c-FLIP expression was analyzed by Western blotting. Tubulin or β-actin served as a loading control. Note that roscovitine inhibited not only c-FLIP_{short} expression but also T cell activation, as revealed by a strong downregulation of the activation markers CD25 and CD69 (data not shown).

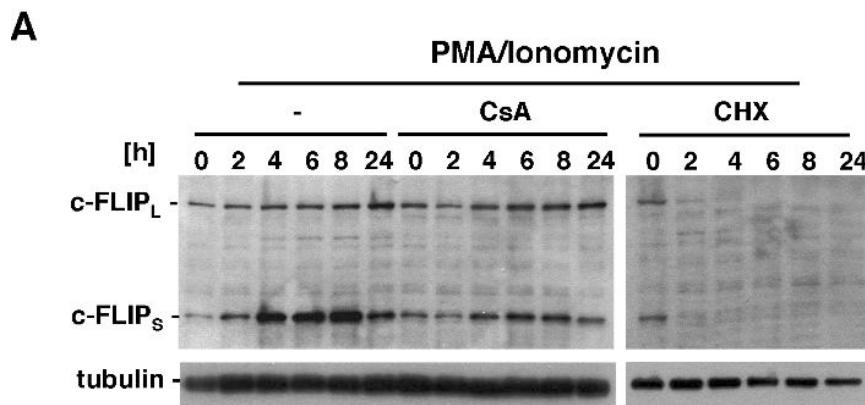


Figure S2

(A) Regulation of c-FLIP expression in CEM cells. Cells were stimulated for the indicated time with 20 ng/ml PMA and 1 μ M ionomycin in the absence or presence of 1 μ M CsA or 10 μ g/ml cycloheximide (CHX) and c-FLIP expression was analyzed by Western blot. Tubulin served as a loading control. (B) Controls for the ChIP experiments in CEM cells. The panel shows a ChIP with rabbit control IgG and anti-acetylated histone-3 (Ac-H3) that served as negative and positive control for the ChIP procedure shown in Figure 5C. Here, the GAPDH promoter was analyzed as a constitutively transcribed gene. Genomic DNA (input) and water were used as positive and negative controls for PCR analysis.

Antibodies used for Western blotting

The antibodies used for Western blotting were: FLIP (NF6; kind gift of Dr. P. Krammer, Heidelberg, Germany); caspase-8 (12F5; in house); β-actin (AC-74) and tubulin (DM1A; Sigma); Bcl-x_L (44) and XIAP (48; BD Biosciences, Heidelberg, Germany); Erk2 (#9108; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany). Anti-Bcl-2 (C-2) and HRPO-conjugated goat anti-rabbit IgG was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). HRPO-conjugated goat anti-rat IgG, donkey anti-goat IgG, goat anti-mouse IgG1, IgG2a and IgG2b were from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL).

VIVIT peptide

The sequence of the VIVIT peptide used for blocking the calcineurin-NFAT-interaction is as follows: NH₂-RRRRRRRRRRGGGMAGPVIVITGPHEE-COOH.

Primers

Primer sequences used for mutagenesis are as follows:

NFAT site 1

forward 5'-GCGCGAGACCCTGTCTCAAGAAGGCGCACAAAAAAACAAAC-3',
reverse 5'-GTTTGTCCCCCTTGCGCCTTCTTGAGACAGGGCTCGCGC-3'

NFAT site 2

forward 5'-GTCTAAAAAAGGCGCGAAAGAAAGAAAAAAACACTCGC-3'
reverse 5'-GCGAGTGTCCCCCTTGCGCCTTCTTGAGAC-3'

Amplification primers for real-time PCR are as follows:

<i>c-FLIP_L</i>	forward 5'-CCTAGGAATCTGCCTGATAATCGA-3'
	reverse 5'-TGGGATATACCATGCATACTGAGATG-3'
<i>c-FLIP_{short}</i>	forward 5'-GCAGCAATCCAAAAGAGTCTCA-3'
	reverse 5'-ATTCCAAGAATTTCAGATCAGGA-3'
<i>GAPDH</i>	forward 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'
	reverse 5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTGGC-3'

Amplification primers for binding site 1 by PCR following ChIP are as follows:

forward	5'-GAAATCCAGGCTGCAGTGAG-3'
reverse	5'-CTGGGAGTCATAGCAAACGTG-3'

Generation of a c-FLIP_{short} shRNA expressing lentiviral vector

c-FLIP_{short} shRNA oligonucleotides were designed according to the protocol given by the Broad Institute (Cambridge, USA). The annealed oligonucleotide was cloned into the lentiviral vector pLKO.1 via *AgeI* and *EcoRI* restriction digestion of the pLKO.1 cloning vector (Addgene #10878).

fwd 5'-CCGGATAACACCCATGCCATTGTCTCGAGACAATGGGCATAGGGTGTATTGGG-3',
rev 5'-AATTCAAAAAATAACACCCATGCCATTGTCTCGAGACAATGGGCATAGGGTGTAT-3'

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Nuclear extracts of primary peripheral T lymphocytes or HuT78 cells were prepared as follows: 5-10 x 10⁶ cells were lysed in 500 µl buffer I (10 mM HEPES/pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA). After 15 min, 30 µl 10% NP40 was added, cells were vortexed for 10 sec, and lysates were incubated on ice for another 10 min. The cells were

centrifuged at 425 g at 4 °C for 5 min and washed once with 500 µl buffer I. Nuclear extracts were obtained by incubation of the pellets in 10-20 µl buffer II (20 mM HEPES/pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA) for 30 min and subsequent centrifugation at 20,000 g at 4 °C for 15 min. 10 µg of the nuclear extracts were incubated with 1.5 µg of poly(dI-dC) (Roche, Penzberg, Germany) for 10 min on ice and then binding reaction was performed by adding 4 µl of 5x binding buffer (62.5 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 50% glycerol), 2 µg of bovine serum albumin, and 40,000 cpm of the ³²P-labeled putative NFAT oligonucleotide. Samples were incubated for another 20 min at room temperature and then loaded on a 4% non-denaturing polyacrylamide gel. Gels were run at 180 V in 0.5x Tris-borate/EDTA buffer, pH 8.3. After drying, gels were exposed on a film for autoradiography. Supershifts were performed by preincubation of the samples for 30 min with 2 µg of anti-NFATc1 (7A6; Alexis, Lausen, Switzerland) or with antibodies against NFATc2 (4G6-G5), NFATc3 (F-1) and c-Jun (sc-45) from Santa Cruz Biotechnology. For competition assays, cold oligonucleotides were added to the binding reaction mixture at the indicated concentrations.

BIOLOGICAL SCIENCES – GENETICS

A SNP in the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) gene determines protein isoform production and is associated with risk of follicular lymphoma in humans

Nana Ueffing^{*†}, Kusum K. Singh^{*}, Andrea Christians[‡], Christoph Thorns[§], Alfred C. Feller[§], Florian Nagl[¶], Falco Fend[¶], Sebastian Heikaus[¶], Alexander Marx^{**}, Reiner B. Zott^{††}, Joachim Brade^{‡‡}, Wolfgang A. Schulz^{§§}, Klaus Schulze-Osthoff^{¶¶}, Ingo Schmitz^{*†***}, Christian Schwerk^{*†††}

^{*}Institute of Molecular Medicine, University of Duesseldorf, D-40225 Duesseldorf, Germany;

[†]Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University of Duesseldorf, D-40225 Duesseldorf, Germany; [‡]Institute for Pathology, D-42859 Remscheid, Germany;

[§]Institute of Pathology, University of Luebeck, D-23538 Luebeck, Germany; [¶]Department of Pathology, University of Tuebingen, D-72076 Tuebingen, Germany; Institute of Pathology, University of Duesseldorf, D-40225 Duesseldorf, Germany; ^{**}Department of Pathology, Mannheim Medical Faculty, University of Heidelberg, D-68167 Mannheim, Germany;

^{††}Department of Hemostasis and Transfusion Medicine, University of Duesseldorf, D-40225 Duesseldorf, Germany; ^{‡‡}Department of Statistics, Mannheim Medical Faculty, University of Heidelberg, D-68167 Mannheim, Germany; ^{§§}Department of Urology, Urological Hospital, University of Duesseldorf, D-40225 Duesseldorf, Germany; ^{¶¶}Interfaculty Institute for Biochemistry, University of Tuebingen, Hoppe-Seyler-Strasse 4, D-72076 Tuebingen, Germany; ^{†††}Childrens Hospital, Mannheim Medical Faculty, University of Heidelberg, D-68167 Mannheim, Germany

***Corresponding author:

Ingo Schmitz

Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University of Duesseldorf

Universitaetsstrasse 1, Düsseldorf D-40225, Germany

Tel.: +49 211 8115893

Fax.: +49 211 8115892

Email: ingo-schmitz@uni-duesseldorf.de

Author contributions:

N.U. and K.K.S. contributed equally to this work; I.S. and C.S. contributed equally to this work; W.A.S., K.S.-O., I.S., and C.S. designed research; N.U. and K.K.S. performed research; A.C., C.T., A.C.F., F.N., F.F., S.H., A.M., R.B.Z., and W.A.S. contributed new reagents/analytic tools; N.U., K.K.S., J.B., K.S.-O., I.S., and C.S. analyzed data; and C.S. wrote the paper.

Abstract

The cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) is a modulator of death receptor mediated apoptosis and plays a major role in T cell and B cell homeostasis. The c-FLIP gene transcript is subject to alternative splicing and so far three different c-FLIP-isoforms (c-FLIP_L, c-FLIP_S and c-FLIP_R) have been demonstrated on the protein level. Here we describe a single nucleotide polymorphism (SNP) at position 2 of the AG dinucleotide consensus in the 3' splice site of intron 6 of the human c-FLIP gene (rs10190751 A/G), which leads to either an intact (AG) dinucleotide or a dead (AA) splice consensus. Whereas an intact splice site directs exclusively production of c-FLIP_S via inclusion of exon 7, the splice dead variant causes production of c-FLIP_R due to read through into intron 6. Comparison of c-FLIP short isoform protein sequences in several mammals identifies c-FLIP_R as the ancestral short version of c-FLIP. Analysis of diverse human cell lines points to an increased occurrence of c-FLIP_R in cancerogenic B cell lines. Importantly, analysis of follicular lymphoma patients reveals an increased risk associated with appearance of rs10190751 A causing disruption of the splice consensus and expression of c-FLIP_R. Employing *in vivo* and *in vitro* expression studies we observe a strikingly stronger expression of the c-FLIP_S isoform compared to c-FLIP_R, which is achieved at the level of protein translation.

Introduction

During the extrinsic pathway of apoptosis apical initiator caspases are integrated and activated in the death-inducing signalling complex (DISC) (1-3). Following their activation the initiator caspases in turn cleave and activate terminal effector caspases, which execute cell death via the processing of selected target proteins (4). Competing with the activity of caspases and their cofactors are the cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs), which resemble death effector domain-containing caspases in their protein structure, but do not contain a proteolytic active caspase-like domain. Similar to initiator caspases, c-FLIPs are integrated into the DISC where they can interfere with caspase activation, although under certain circumstances also caspase-activating settings have been observed (5,6).

Several alternatively spliced c-FLIP gene transcripts can be identified in human cells, but only three specific isoforms have been described on the protein level so far. The best characterized isoforms are the long version, c-FLIP_L, and a short form named c-FLIP_S (7,8). The production of c-FLIP_L and c-FLIP_S is regulated by an alternative splicing event leading to either inclusion or skipping of exon 7. Inclusion of exon 7 leads to production of c-FLIP_S, which is truncated at the C-terminus and lacks the inactive caspase-like domain, due to the introduction of a stop codon into the c-FLIP open reading frame. In contrast, exon 7 skipping allows synthesis of the full length isoform of c-FLIP.

Recently, expression of a third isoform of c-FLIP (c-FLIP_R) was demonstrated, which was originally identified in Raji cells (9,10). c-FLIP_R is the only murine short isoform of c-FLIP (11). Expression of c-FLIP_R requires inclusion of the intron 6 into the c-FLIP transcript. Since read through into intron 6 leads to a rapid encounter of a stop codon a second short form of c-FLIP is produced, which is in size very similar to c-FLIP_S and differs only at the final C-terminal amino acids (9,10).

Due to its important functions in cellular signalling pathways c-FLIP plays major roles during the development of several cell types, especially cells of the immune system (6). These

include duties of c-FLIP in development and activation of T cells as well as B cells. Particularly, the death receptor pathway and c-FLIP play a crucial role during the germinal center reaction, which is the main source of high affinity antibody-producing memory B cells and plasma cells (12). Notably, the majority of B cell lymphomas, including follicular lymphomas, originate from germinal center B cells (13).

In this study we describe a functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the human c-FLIP gene (rs10190751 A/G), which is located in the 3' splice consensus of intron 6 and determines c-FLIP short isoform production. We find that c-FLIP_R protein expression levels are significantly lower than those of c-FLIP_S. Importantly rs10190751 A, which directs expression of c-FLIP_R, is associated with an increased risk for follicular lymphoma.

Results

c-FLIP gene isoform expression in mammals.

We have previously shown that the c-FLIP genomic structures of humans and mice differ significantly from each other (11). In contrast to the situation in humans the mouse c-FLIP gene lacks an equivalent of exon 7. In consequence, mice do not produce a c-FLIP_S isoform, but the sole truncated isoform generated is a homologue of c-FLIP_R. To investigate isoform production of c-FLIP proteins in mammals in more detail, we compared the c-FLIP short isoform protein sequences from several selected species (Fig. 1A).

Similar to the described murine isoforms (11), the rat expressed also c-FLIP_R as only short isoform. Accordingly, the genomic sequence of the rat displays an intron-exon structure related to that of the mouse. An isoform homologous to c-FLIP_R has also been described for porcine c-FLIP (14) and c-FLIP_R is the only short c-FLIP protein sequence described for *Canis familiaris*. A homologue of c-FLIP_L nearly identical to the human isoform is expressed by the common chimpanzee, *Pan troglodytes* (data not shown). Interestingly, although the c-FLIP genomic sequence of *P. troglodytes* deposited in the database is highly similar in sequence and retains the human intron-exon structure, production of c-FLIP_S is also not possible due to a nucleotide exchange at position 2 of the AG dinucleotide consensus in the 3' splice site of intron 6. The putative amino acid sequence of the c-FLIP_R isoform expressed by *P. troglodytes* is identical to human c-FLIP_R.

A single nucleotide polymorphism in the 3' splice site of intron 6 of the human c-FLIP gene.

The presence of a nucleotide exchange in the 3' splice site of intron 6 led us to question whether a similar exchange could be involved in definition of c-FLIP-isoform production. We therefore sequenced genomic DNA of selected human cell lines, which express either c-FLIP_S (HeLa, HuT78, J16, Bjab) or c-FLIP_R (Raji, SKW6.4, BL60, Nalm6)

(9,10) (our own observations). Additionally, we analyzed two *P. troglodytes* cell lines and one cell line obtained from its close relative, the Bonobo (*Pan paniscus*). The analysis revealed that all three chimpanzee cell lines carried the defective splice site (Fig. 1B). Most interestingly, also all human cell lines described to produce c-FLIP_R displayed a nucleotide exchange in the 3' splice site of intron 6 identical to that of the chimpanzee species. In contrast, cells expressing c-FLIP_S had an intact splice acceptor.

The detection of two different nucleotides in the splice acceptor site of intron 6 in different human cell lines strongly pointed to the possibility of a single nucleotide polymorphism (SNP). As expected, screening of the NCBI SNP database revealed the presence of a SNP (rs10190751 A/G) at this position. Notably, the data of the International HapMap project (15) showed that rs10190751 A/G is variably distributed in the different populations analysed (Fig. 1C).

To obtain an overview of the rs10190751 A/G variation in human cell lines we analysed further cell lines by genomic sequencing and SNP assays. We placed an emphasis on B and T cells, since expression of c-FLIP_R has often been found in these cell types (10). Our analysis revealed an increased appearance of c-FLIP_R especially in B cell lines (supplemental table 1).

rs10190751 A/G variation determines c-FLIP short isoform production in human

We analysed a selected set of cell lines by reverse transcribed PCR (RT-PCR) and Western blotting. Among these were cell lines, which, according to genomic sequencing and SNP assay analysis (supplemental table 1), were homozygous for an intact splice acceptor site (rs10190751 G; J16, Hut78, CEM, MED-B1, Ramos, Daudi, Bjab), homozygous for the splice defect allele (rs10190751 A; BL60, SKW6.4, Raji, Nalm6) or contained both alleles (L428, L1236). Cells containing copies of the splice intact allele should have the potential to express both c-FLIP_S and c-FLIP_R. Strikingly, on RNA (Fig. 2A) as well as protein (Fig. 2B)

level we detected expression of c-FLIP_R only in those cases, when cells were either heterozygous or homozygous for the splice dead phenotype. In contrast, all cell lines homozygous for an intact splice acceptor produced only c-FLIP_S on RNA as well as protein level. The long isoform c-FLIP_L was, as expected, expressed in all cell lines analysed.

We further examined production of c-FLIP isoforms in *P. troglodytes* cell lines as well as in primary B and T cells. Primary B cells heterozygous for rs10190751 A/G as determined by genomic sequencing (data not shown) displayed synthesis of mRNAs for both short c-FLIP isoforms (Fig. 3A, *left panel*). We also detected expression of both isoforms in primary T cells after stimulation with PHA-L (Fig. 3A, *right panel*). For analysis on protein level we selected primary cells, which expressed both short c-FLIP isoforms, or cells, which were homozygous for either c-FLIP_S or c-FLIP_R expression. To maximize c-FLIP production primary B and control cells were stimulated with LPS or PMA and Ionomycin, and primary T cells were treated with PHA-L, respectively (Fig. 3B). Although we did not determine the rs10190751 A/G status of all primary cells analyzed, in the cases we did we detected only c-FLIP short protein isoforms corresponding to the SNP variants present in the primary B and T cells investigated. The *P. troglodytes* cell lines EB176 and LTR2008 displayed expression of the c-FLIP_R isoform on RNA and protein level, as expected (Fig. 3A and B).

rs10190751 A and c-FLIP_R expression are associated with follicular lymphoma

The accumulated appearance of rs10190751 A and concomitant expression of c-FLIP_R led us to investigate the frequency of rs10190751 A in lymphoma patients (n=186) compared to healthy subjects (n=233). Additionally, we analyzed a set (n=130) of described urothelial carcinomas samples (16), since a role of c-FLIP in this type of cancer has been proposed (17,18). As mentioned above (Fig. 1C), variants of rs10190751 A/G are unevenly distributed in different populations. Therefore, control and carcinoma samples were carefully controlled regarding ethnical background.

As can be seen in Table 1, analyzing genotype distribution we detected a difference between control samples and follicular lymphoma applying a χ^2 test ($p=0,043$). We also detected significant association of rs10190751 A with follicular lymphoma ($p=0,014$). Furthermore a significant difference in allelic distribution between follicular lymphoma and the control samples was found ($p=0,018$). In contrast, no significant results were observed comparing the urothelial carcinoma and control samples (Table 1).

c-FLIP_R is significantly lower expressed than c-FLIP_S

We observed that the protein levels of c-FLIP_R seemed to be overall lower than those of c-FLIP_S, which was especially evident when both isoforms were expressed in the same cell (Fig. 3 and data not shown). Lower expression levels for c-FLIP_R had also been noted before in primary human T cells (10). A similar turn-over rate of c-FLIP_S and c-FLIP_R proteins after treatment with cycloheximide (CHX) had been described in Boe cells (10) and we confirmed this observation in L428 cells (Fig. 4A). Additionally, similar stabilities of c-FLIP_S and c-FLIP_R mRNAs were observed in L428 cells after treatment with the transcription inhibitors α -amanitin (data not shown) or actinomycin D (Fig. 4B).

To analyze the expression levels and turn-over rates of c-FLIP short forms expressed exogenously from cDNA templates, 293T cells were transiently transfected with expression plasmids encoding c-FLIP_S or c-FLIP_R followed by treatment with CHX. Like the endogenous short c-FLIP isoforms, exogenously expressed c-FLIP_S and c-FLIP_R displayed similar half-lives (Fig. 4C). We did not achieve protein levels of c-FLIP_R as high as those of c-FLIP_S, even if we transfected the ten-fold amount of expression plasmid. Furthermore, we treated 293T cells cotransfected with equal amounts of c-FLIP_S and c-FLIP_R with α -amanitin (data not shown) or actinomycin D (Fig. 4D). c-FLIP_S and c-FLIP_R mRNAs derived from cDNA expression plasmids were equally expressed and demonstrated comparable stabilities.

To investigate the protein expression levels of c-FLIP_S and c-FLIP_R more quantitatively we transiently transfected 293T cells with green fluorescent protein (GFP) fusion constructs expressing either GFP-c-FLIP_S or GFP-c-FLIP_R. Transfection with identical amounts of the plasmids leads to an impressively stronger production of c-FLIP_S compared to c-FLIP_R (Fig. 5A). Immunofluorescence analysis revealed that both c-FLIP_S and c-FLIP_R localize to the cytoplasm (Fig. 5B). So called “death effector filaments”, which can be caused by overexpression of c-FLIP proteins (19,20), could only be observed in GFP-cFLIP_S transfected cells (Fig. 5B, *middle panel*), again underlining the higher expression levels of this c-FLIP short isoform.

Enhanced expression levels of c-FLIP_S are achieved on the level of protein translation

Since we did not observe peculiar differences in c-FLIP_S and c-FLIP_R transcript levels, we investigated whether high protein expression levels of c-FLIP_S are achieved during protein translation. Interestingly, in a coupled transcription/translation system we obtained an approximately five times higher expression level of c-FLIP_S compared to c-FLIP_R when equal amounts of expression plasmid were added into the system (Fig 5C, *upper panel*). Importantly, a similar effect could be observed, when c-FLIP short isoform production was initiated by the addition of *in vitro* transcribed RNA encoding either c-FLIP_S or c-FLIP_R to translation competent extracts excluding differences in transcription efficiency of the c-FLIP short isoform RNAs (Fig. 5C, *lower panel*). When translation was performed with c-FLIP RNAs preheated at 65°C an identical result was obtained, indicating that differences in protein translation are not caused by secondary RNA structures.

Discussion

Here we have in detail investigated selected mammals for their described isoforms of the c-FLIP protein (Fig. 1A). We found that of all species analysed only humans present c-FLIP_S as short isoform. In several species the missing c-FLIP_S expression is due to the lack of an equivalent of exon 7, as it is the case in the mouse and the rat (11) (our own data). The appearance of exon 7 or an equivalent in higher mammals (humans, chimpanzee species) suggests that c-FLIP_R is the original ancestral short isoform of c-FLIP and that expression of c-FLIP_S occurred later in evolution.

Although the common chimpanzee *Pan troglodytes* contains an exon 7 equivalent, the sequence provided in the database as well as the *P. troglodytes* cell lines analyzed (EB176, LTR2008) lack the potential to express c-FLIP_S due to a nucleotide exchange in the second position of the AG dinucleotide of the splice acceptor consensus sequence. Interestingly, an identical exchange constitutes a SNP (rs10190751 A/G) in humans (Fig. 1B and C). An intact splice acceptor would theoretically allow production of both short isoforms, but we detected c-FLIP_R only in cells containing at least one splice dead allele (rs10190751 A), strongly indicating that the rs10190751 A/G variant status is the critical factor determining the short c-FLIP isoform(s) expressed. Although we have detected only the splice dead variant in *P. troglodytes* and *P. paniscus* cell lines, we cannot exclude that a SNP identical to rs10190751 A/G is also present in *Pan* species and that, therefore, chimpanzee species might have the potential to express c-FLIP_R as well as c-FLIP_S.

We observed an accumulation of the c-FLIP_R directing SNP variant rs10190751 A in tumorigenic B cell lines (supplemental table 1). In agreement, increased appearance of c-FLIP_R in B and also T cells has been noted before (10). Analysis of the distribution of rs10190751 A/G variant in B cell lymphoma patients revealed an association of rs10190751 A with an increased risk for follicular lymphoma (Table 1). In contrast, investigation of a set of urothelial carcinoma samples did not reveal an association, pointing out that the association

with rs10190751 A is specific for follicular lymphoma and not a general attribute of cancer cells.

The initiating genetic event of follicular lymphoma is the t(14:18) translocation, which occurs in ~90% of follicular lymphoma and causes constitutive expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 (21-23). Although expression of Bcl-2 is thought to be an essential factor during the development of follicular lymphoma, overexpression of Bcl-2 alone is not sufficient to cause follicular lymphoma in mice (24-26) and the presence of sporadic t(14:18) bearing B cells has been reported in a substantial proportion of healthy individuals (27). Therefore, secondary events, including the accumulation of genetic alterations and clonal selection, must contribute to the development of follicular lymphoma (reviewed by 28,29).

Ongoing somatic mutation and cytological as well as architectural features, including a follicular growth pattern, identify follicular lymphoma as a germinal center B cell tumor (13). In agreement with the important role of c-FLIP during the germinal center reaction (6,12,30), perturbation of the c-FLIP isoform composition could contribute to development of follicular lymphoma. Furthermore, changes in c-FLIP protein levels have been described in several distinct B cell malignancies (6,31-33). Importantly, we detect a higher protein expression of c-FLIP_S compared to c-FLIP_R (Fig. 3, 4 and 5, and data not shown), an observation also noted in human T cells (10)(and our own observation). *In vitro* transcription and translation analyses indicate that the difference in c-FLIP_S and c-FLIP_R protein levels are achieved at the level of translation (Fig. 5C), but determination of the exact mechanism awaits further investigation. Differential levels in c-FLIP short isoform expression would also lead to a shift in the proportion of long and short c-FLIP molecules, which in turn would effectively influence the amounts of the different isoforms in the DISC. Noteworthy, varying roles in the DISC have been described for c-FLIP_L and the short c-FLIP isoforms (5).

Recent findings have pointed to an important role of the immunological micro-environment for the development of follicular lymphoma, including functions of T cells and

follicular dendritic cells (reviewed in) (28,29). Studies from different groups have pointed to a growth supportive role of CD4-positive T-helper cells in at least a subset of follicular lymphoma (34-36). Most interestingly, transgenic mice expressing Bcl-2 in multiple hematopoietic lineages developed lymphomas reminiscent of follicular lymphoma. These mice displayed a significantly enlarged T cell compartment, consistent with a high Bcl-2 expression in the T cells (34). A functional modulation of CD4-positive T cells was also suggested in rapidly transforming follicular lymphoma, which presented differences in the spatial distribution and activation of this T cell subset (35). These results are consistent with the fact, that c-FLIP proteins play a major role during T cell survival (37). The expression profile of c-FLIP isoforms might influence the risk for follicular lymphoma not only by affecting B cell homeostasis, but rather by modulating survival of T cells within the microenvironment of follicular lymphoma.

Our data point out that a SNP in the human c-FLIP gene is associated with a risk for follicular lymphoma. Interestingly, a recent study has identified an increased risk of follicular lymphoma associated with a SNP in the human CD40 gene (38). Stimulation of B cell-expressed CD40 by T cell-expressed CD154 is highly important for the delivery of B cell survival signals, including upregulation of c-FLIP (12,30,39-42). Taken together, these observations underline the potential impact of SNPs in genes involved in lymphocyte regulation for the development of follicular lymphoma.

Materials and Methods

Patients and control samples

Samples were obtained from 233 healthy control individuals, 186 follicular lymphoma patients and 130 urothelial carcinoma patients. Protocols were approved by the ethics committee (IRB) in Duesseldorf including the conductance of the research project. All samples were of Caucasian origin.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted by using the SAS software.

Cell culture and transient transfections.

Cell lines were cultured and transiently transfected with Lipofectamin 2000 reagent as described in *SI Text*.

For c-FLIP induction cell lines were stimulated with 20 ng/ml (phorbol12-myristate13-acetate) (PMA; Sigma, Deisenhofen, Germany) and 1 µM ionomycin (Sigma) where indicated. Primary human T and B cells were activated by treatment with 5 µg/ml phytohaemagglutinin-L (PHA-L; Sigma) and 10 µg/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma), respectively. Activated T cells were washed with PBS and stimulated with 25 U/ml interleukin-2 (IL-2; Tebu-bio, Offenbach, Germany) for up-to 6 days. Daudi cells were cocultured for 72 h with L cells stably expressing the CD40L. L cells were pretreated with 10 µg/ml Mitomycin (Sigma) to avoid fibroblast growth.

Preparation of human peripheral T and B cells.

Human peripheral lymphocytes were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Biochrom AG, Berlin, Germany) from buffy coat material obtained from the Institute of Hemostasis and Transfusion Medicine of the University Hospital Düsseldorf.

Monocytes were depleted by incubation of peripheral blood lymphocytes (PBLs) for 1 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 50 µg/mL of each penicillin and streptomycin in 175 cm² cell culture flasks. Non-adherent cells were collected and T and B lymphocytes were separated by magnetic-activated cell sorting via CD20⁺ MACS beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

RNA isolation and RT-PCR.

Total RNA was isolated from 5-10 x 10⁶ cells with the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). 1 µg of total mRNA was used for cDNA synthesis using the SuperScriptTM III First-Strand RT-PCR kit of Invitrogen. The following primers were used to amplify c-FLIP_L, c-FLIP_S and c-FLIP_R from cDNA: c-FLIP sense, 5'-gatgttgctatacatgtggttc-3'; c-FLIP_L antisense, 5'-cctgaatggatttcttcactgg-3'; c-FLIP_S antisense, 5'-atttccaagaatttcagatcagga-3'; c-FLIP_R antisense, 5'-tcatgctgggattccatatgtt-3'.

Cloning of c-FLIP_S and c-FLIP_R

c-FLIP_S and c-FLIP_R were cloned from Hut78 and Raji cells by polymerase chain reaction using the following primers : c-FLIP sense, 5'-gggttacccatgtctgctgaagtcatcc-3'; c-FLIP_S antisense, 5'-gctctagagctcacatggaacaatttcaag-3'; c-FLIP_R antisense, 5'-gctctagagctcatggttccatatg-3'. c-FLIP short isoforms were cloned into the pEF4 expression vector (Invitrogen) by restriction digestion with KpnI and XbaI (Fermentas, St. Leon-Rot). For the generation of GFP-tagged c-FLIP expression constructs, the c-FLIP isoforms were cloned into the pEGFP-C1 expression vector (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) via the Gateway System (Invitrogen) using the following primers: c-FLIP sense, 5'-cacctctgctgaagtcatccatc-3'; c-FLIP_S antisense, 5'-tcacatggaacaatttcaag-3'; c-FLIP_R antisense, 5'-tcatgctgggattccatatg-3'.

Western blot analysis.

Western blot analysis was performed as described in *SI Text*.

The antibodies used for Western blotting were: c-FLIP (NF6; kind gift of Dr. P. Krammer, Heidelberg, Germany); β-actin (AC-74) and tubulin (DM1A; Sigma). HRPO-conjugated goat anti-mouse IgG1 and IgG2a were from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL).

Fluorescence microscopy.

HeLa cells grown on a coverslip in a 12-well dish were transiently transfected with 0,5 µg plasmid DNA using FuGENE 6 transfection reagent (Roche, Mannheim, Germany). 24 h later, cells were washed with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Coverslips were washed several times with PBS and incubated with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 100 ng/ml) for 10 min. Cells were then mounted in mounting medium (DakoCytomation, Hamburg, Germany) and analyzed under a confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at a magnification of 630x.

Genomic DNA preparation and SNP assays.

Total DNA from paraffin embedded tissues were isolated either using the DNeasy® Blood and Tissue Kit from Qiagen or innu PREP DNA mini kit from Life Science Unlimited according to manufacturer's instructions. SNP assays were carried out on an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR (Darmstadt, Germany) system using the TaqMan® SNP Genotyping Assay of Applied Biosystems (#4351379, C_30472738) according to manufacturer's instructions.

In vitro transcription and translation.

In vitro transcription was performed by using the T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System of Promega (Madison, WI). Transcribed RNA was isolated by phenol-chloroform extraction and *in vitro* translated with help of the Rabbit Reticulocyte Lysate System of Promega according to manufacturer's instructions. Coupled *in vitro* transcription and translation was carried out with the TNT Quick Coupled Transcription/Translation System of Promega according to manufacturer's protocols.

Acknowledgements

We thank Daniel Scholtyssik and Andrea Meyer for expert technical assistance. We also would like to thank Dr Peter H. Krammer for providing us with the NF6 antibody. We thank Dr. Axel Schwerk for help with statistical analyses.

Figure Legends

Fig. 1. Expression of different c-FLIP short isoforms in mammals. (A) Sequence alignment of mammalian c-FLIP_S and c-FLIP_R proteins. Alignments were performed using the Geneious software (<http://www.geneious.com>). Sequences are shown in single-letter amino acid code. (B) Analysis of c-FLIP genomic sequences of selected cell lines by sequencing of genomic DNA. Shown is the region covering the 3' splice site of intron 6. The AG dinucleotide consensus (bold letters) and the position of rs10190751 A/G (arrow) are indicated (C) Distribution of the variants of rs10190751 A/G in the different populations analyzed in the HapMap project (CEU, Utah residents with ancestry from northern and western Europe; HCB, Han Chinese in Beijing, China; JPT, Japanese in Tokyo, Japan; YRI, Yoruba in Ibadan, Nigeria).

Fig. 2. Differential expression of the c-FLIP isoforms in selected cell lines. (A) Reverse transcription polymerase chain reaction was used to determine the abundance of specific different c-FLIP RNA isoforms within the different human cell lines tested. β-actin served as a loading control. (B) Analysis of c-FLIP protein expression of the selected cell lines by Western blotting. The human T cell lines J16, HuT78, and CEM were stimulated for 16 h with 20 ng/ml PMA and 1 μM ionomycin. Daudi cells were kept in co-cultures with L cells stably expressing the CD40L for 72 h. For a better visualization of short c-FLIP isoform levels a long exposure is shown additionally. As loading control tubulin expression levels are presented.

Fig. 3. Variation of the short c-FLIP isoform expression in chimpanzee cells as well as primary B and T cells. (A) Expression of c-FLIP isoforms in EB176, LTR2008, primary B cells (*left panel*) and primary T cells (*right panel*) was analyzed by reverse transcription PCR.

Human peripheral T cells (donor 1 and donor 2) were either left untreated or stimulated with PHA-L (5 µg/ml) for 16 hours. Activated T cells (d1) were washed with PBS and stimulated with IL-2 (25 U/ml) for another 5 days (d6). The indicated cell lines expressing c-FLIP_L and c-FLIP_R were used as control. (B) EB176 and LTR2008 cells (*left panel*) were left untreated or stimulated for 16 h with 20 ng/ml PMA and 1 µM ionomycin. Freshly prepared human peripheral B cells (*middle panel*) or T cells of four different blood donors (*right panel*) were either left untreated or stimulated with LPS (10 µg/ml) or PHA-L (5 µg/ml) for 16 h. c-FLIP expression was determined by Western blot analysis. Tubulin served as a loading control.

Fig. 4. Increased protein expression of c-FLIP_S. (A) L428 cells were treated for the indicated times with 10 µg/ml cycloheximide. c-FLIP expression was analyzed by Western blot. β-actin served as a loading control. (B) L428 cells were treated for the indicated times with actinomycin D (ActD, 1 µg/ml). Endogenous c-FLIP isoform mRNA stability was detected by RT-PCR. (C) 293T cells were transiently transfected with the indicated amounts of c-FLIP_S or c-FLIP_R. 24 h post transfection cells were treated for up to 8 h with 10 µg/ml cycloheximide. Protein stability of the two c-FLIP isoforms was monitored by Western blot analysis. Tubulin was analyzed to control equal protein loading. (D) 293T cells were cotransfected with equal amounts of c-FLIP_S and c-FLIP_R. 24 h later, cells were stimulated for the indicated times with actinomycin D (1 µg/ml). mRNA stability was assessed by RT-PCR. The asterisk marks a band of unclear identity, which appears specifically in the transfected cells.

Fig. 5. Enhanced mRNA translation of c-FLIP_S. (A) GFP-tagged c-FLIP_S or c-FLIP_R was transiently overexpressed in 293T cells. Differences in protein expression were determined by evaluating the GFP fluorescence intensity via FACS analysis. (B) HeLa cells were transiently transfected with either GFP-c-FLIP_S or GFP-c-FLIP_R. 24 h post transfection the cells were fixed and stained with DAPI (blue). Subsequently, samples were analyzed by confocal laser

scanning microscopy. (*C*) *Upper panel*: Coupled *in vitro* transcription/translation of c-FLIP_S and c-FLIP_R. 5, 2, or 1 μ l of translated proteins were separated via SDS-PAGE and analyzed by Western Blot. The second (lower) c-FLIP bands are probably caused by translational start at an internal methionine. *Lower panel*: c-FLIP_S or c-FLIP_R were *in vitro* transcribed and then equal RNA amounts were applied for an *in vitro* translation assay. Protein levels of the two c-FLIP isoforms were determined by Western Blot.

Table 1. Genotype distribution, association with rs10190751 A and allelic frequency in urothelial carcinoma samples, follicular lymphoma samples and controls.

References

1. Boatright KM, et al. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Molecular Cell* 11: 529-541.
2. Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang,X (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J* 22: 4132-4142.
3. Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Molecular Cell* 11:543-549.
4. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10:76-100.
5. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21:8247-8254.
6. Budd RC, Yeh WC, Tschoopp J (2006) cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature Rev* 6:196-204.
7. Irmler M, et al. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
8. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274:1541-1548.
9. Djerbi M, Darreh-Shori T, Zhivotovsky B, Grandien A (2001) Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol* 54:180-189.

10. Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 14507-14513.
11. Ueffing N, *et al.* (2008) Mutational analyses of c-FLIP(R), the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell Death Differ* 15: 773-782.
12. Klein U, Dalla-Favera R (2008) Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Rev* 8:22-33.
13. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *New England J Med* 341:1520-1529.
14. Goto Y, *et al.* (2004) Porcine (*Sus scrofa*) cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP): molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. *J Reprod Dev* 50:549-555.
15. The International HapMap Project (2003) *Nature* 426:789-796.
16. Steinhoff C, *et al.* (2000) Glutathione transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Arch Toxicol* 74:521-526.
17. Korkolopoulou P, *et al.* (2004) c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. *Urology* 63:1198-1204.
18. Steele LP, Georgopoulos NT, Southgate J, Selby PJ, Trejdosiewicz LK (2006) Differential susceptibility to TRAIL of normal versus malignant human urothelial cells. *Cell Death Differ* 13:1564-1576.
19. Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ (2003) The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nature Immunol* 4:404-409.

20. Siegel RM, *et al.* (1998) Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol* 141:1243-1253.
21. Cleary ML, Sklar J (1985) Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7439-7443.
22. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097-1099.
23. Bakhshi A, *et al.* (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41:899-906.
24. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349:254-256.
25. McDonnell TJ, *et al.* (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57:79-88.
26. Strasser A, Harris AW, Cory S (1993) E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-B and immunoglobulin-secreting cells but not T cells. *Oncogene* 8:1-9.
27. Limpens J, *et al.* (1995) Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85:2528-2536.

28. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ (2007) Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21:18-29.
29. de Jong D (2005) Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol* 23:6358-6363.
30. Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T (2001) FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 193:447-458.
31. Troeger A, *et al.* (2007) Up-regulation of c-FLIPS+R upon CD40 stimulation is associated with inhibition of CD95-induced apoptosis in primary precursor B-ALL. *Blood* 110:384-387.
32. van Houdt, *et al.* (2007) Expression of c-FLIP is primarily detected in diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma and correlates with lack of caspase 8 activation. *Histopathology* 51:778-784.
33. Takahashi H, *et al.* (2006) FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clin Cancer Res* 12:3265-3271.
34. Egle A, Harris AW, Bath ML, O'Reilly L, Cory S (2004) VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* 103:2276-2283.
35. Glas AM, *et al.* (2007) Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 25:390-398.

36. Martin I, et al. (1999) Role of autologous CD4+ T cell clones in human B non-Hodgkin's lymphoma: aborted activation and G1 blockade induced by cell-cell contact. *Eur J Immunol* 29:3188-3195.
37. Krammer PH, Arnold R, Lavrik, IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nature Rev* 7:532-542.
38. Skibola CF, et al. (2008) A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma. *Blood* 111:4348-4354.
39. Guzman-Rojas L, Sims-Mourtada JC, Rangel R and Martinez-Valdez H (2002) Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* 107:167-175.
40. van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C (2001) Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. *Trends Immunol* 22:677-682.
41. van Eijk M, Medema JP, de Groot C (2001) Cutting edge: cellular Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein protects germinal center B cells from apoptosis during germinal center reactions. *J Immunol* 166:6473-6476.
42. Hennino A, Berard M, Casamayor-Palleja M, Krammer PH, Defrance T (2000) Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J Immunol* 165:3023-3030.

Fig. 1 A

	1	10	20	30	40	50	60
c-FLIP-S (homo)	-----	-----	-----	MSAEVIHQVEEALDTDEKEMILLFLCRDVAIDVV			
c-FLIP-R (homo)	-----	-----	-----	MSAEVIHQVEEALDTDEKEMILLFLCRDVAIDVV			
c-FLIP-S (pan)	-----	-----	-----	MSAEVIHQVEEALDTDEKEMILLFLCRDVAIDVV			
c-FLIP-R (mus)	-----	-----	-----	MAQSPVSAEVIHQVEECLDEDKEEMMLFLCRDVTENLA			
c-FLIP-R (rattus)	-----	-----	-----	MAIYSTVSAEVIHQVEEALDTDEKEMILLFLCRDVTENLA			
c-FLIP-S (sus)	-----	-----	-----	MTLYRMSADEVIHQVEEALDTDEKEMILLFLCRDVTENLA			
c-FLIP-R (canis)	-----	-----	-----	MKTEASWPFIIDWCVILLQFGMTLYRMSADEVIHQVEEALDTDEKEMILLFLCRDVAADVA			
c-FLIP-S (homo)	PPNVRDILLDLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-R (homo)	PPNVRDILLDLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-S (pan)	PPNVRDILLDLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-R (mus)	APNVRDILLDSLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-S (rattus)	PPNVRDILLDLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-R (sus)	PLNVRDILLDLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-R (canis)	PLTVRDILLDLRERGKLSVCDLAEELLYRVVRPOLLKRLKMORAKVETHLRNPILWSDV						
c-FLIP-S (homo)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-R (homo)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-S (pan)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-R (mus)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-S (rattus)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-R (sus)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-R (canis)	KCLKNAIHRIDLKTKIOKYKSVQAGATSYRNVLQAAIOK-SLKDPSSNFRM-ITPVYAHCP						
c-FLIP-S (homo)	DLKILGNCSM						
c-FLIP-R (homo)	A-----						
c-FLIP-S (pan)	A-----						
c-FLIP-R (mus)	A-----						
c-FLIP-S (rattus)	A-----						
c-FLIP-R (sus)	A-----						
c-FLIP-R (canis)	A-----						

B

		TAC AG ATG						
			A/A	A/G	G/G	A	G	
Human:	HeLa	TAC AG ATG	CEU	0.067	0.300	0.633	0.217	0.783
	T cells	HuT78						
	J16	TAC AG ATG	HCB					
				0.089	0.911	0.044	0.956	
B cells	BJAB	TAC AG ATA	JPT					
	Raji	TAC AA ATG		0.045	0.955	0.023	0.977	
	SKW6.4	TAC AA ATG						
	BL60	TAC AA ATG	YRI	0.183	0.583	0.233	0.475	0.525
	NALM6	TAC AA ATG						
Chimp.:		Pan (EB176)	TAC AA ATG					
		Pan (LTR2008)	TAC AA ATG					
		Bonobo	TAC AA ATG					

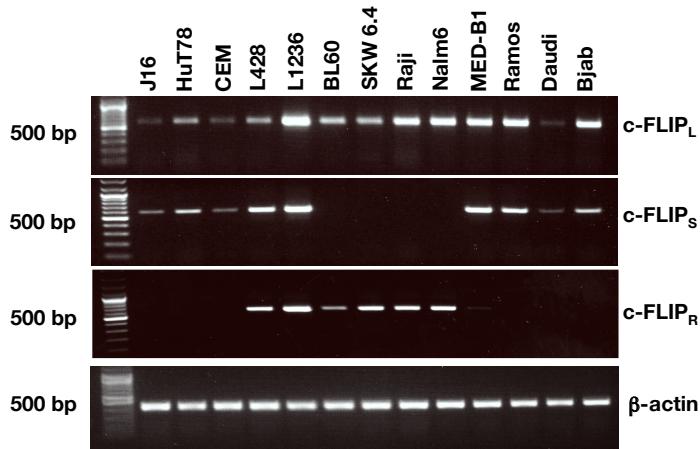


C

A/A A/G G/G A G

Fig. 2

A



B

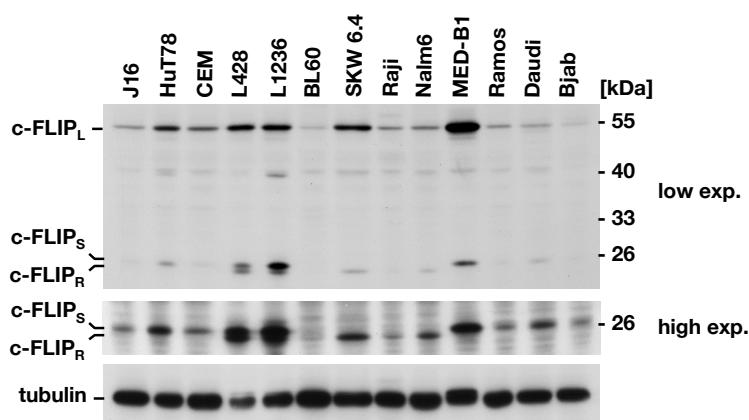


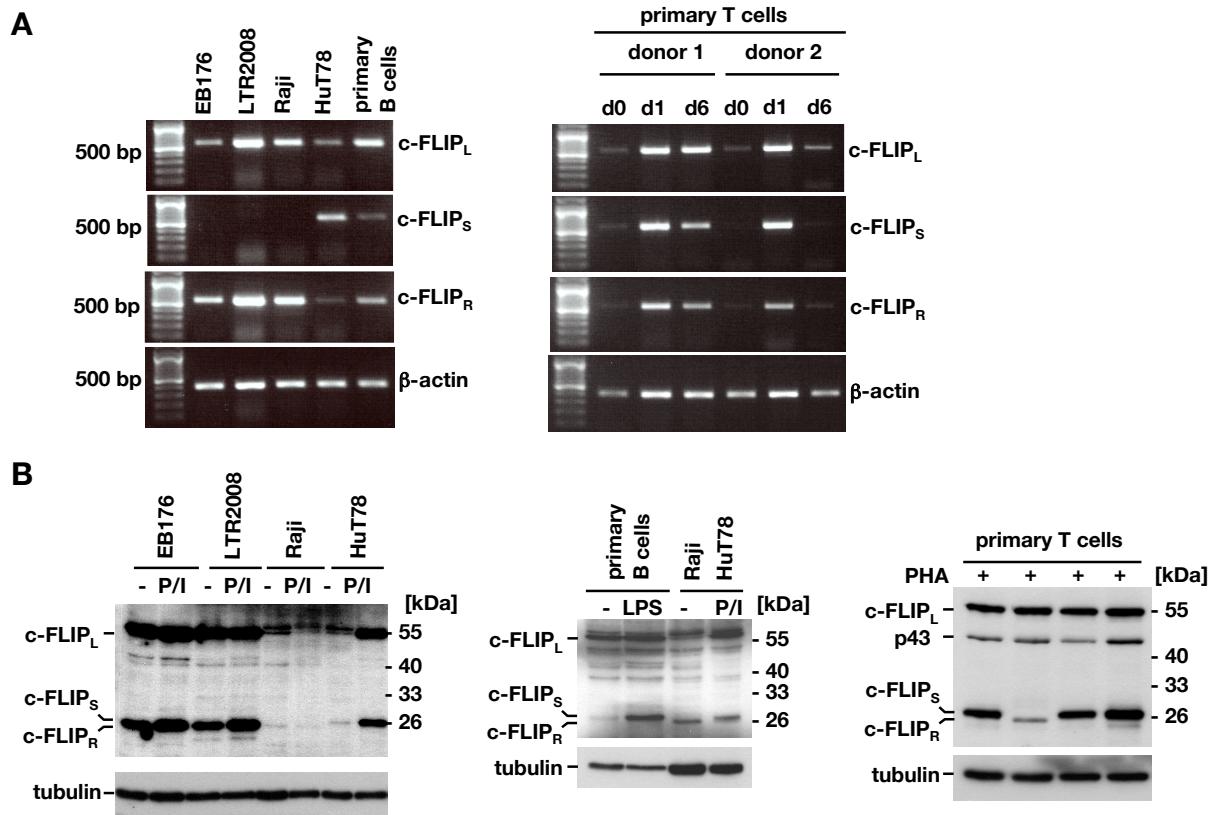
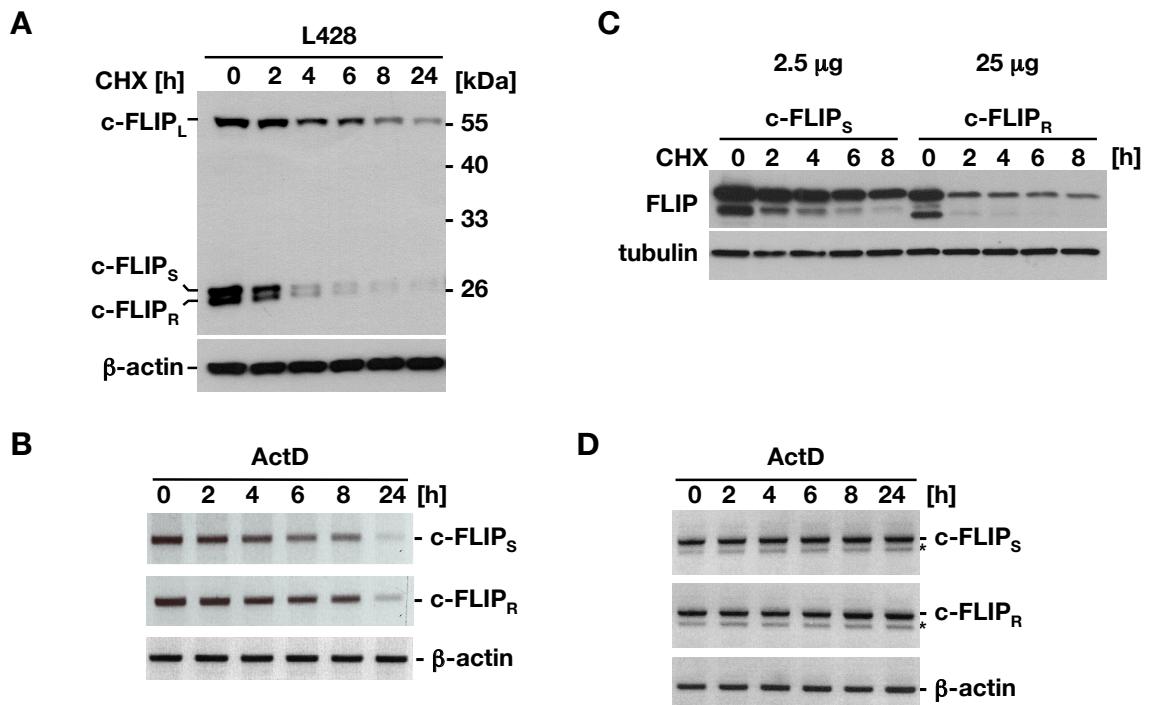
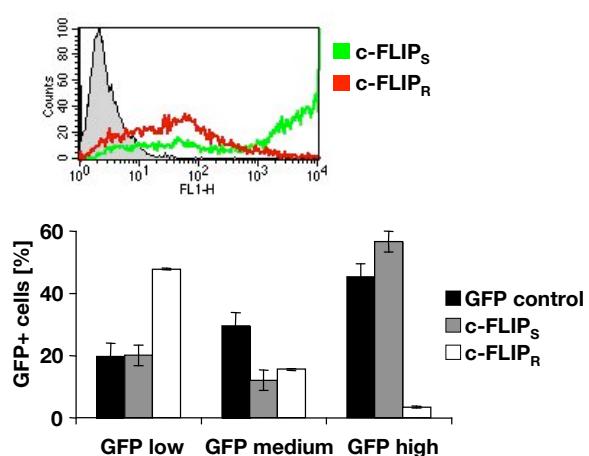
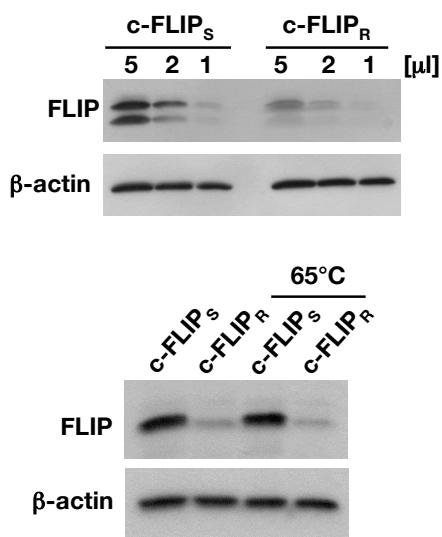
Fig. 3**Fig. 4**

Fig. 5

A



C



B

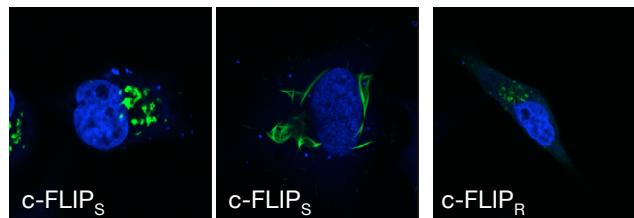


Table 1

	Controls	Uro	FL
Genotype distribution			
GG	144 (62%)	86 (66%)	91 (49,7%)
GA	82 (35%)	36 (28%)	83 (45,4%)
AA	7 (3%)	8 (6%)	9 (4,9%)
n	233	130	183
χ^2		p = 0,158	p = 0,043
Association with A			
GG	144 (62%)	86 (66%)	91 (49,7%)
GA + AA	89 (38%)	44 (34%)	92 (50,3%)
n	233	130	183
χ^2		p = 0,409	p = 0,014
Allelic frequency			
G	370 (97,5%)	208 (80%)	265 (72,4%)
A	96 (20,5%)	52 (20%)	101 (27,6%)
N	466	260	366
χ^2		p = 0,847	p = 0,018

SI Text

Cell culture and transient transfections.

Chimpanzee (LTR2008, EB176) cell lines were cultured in Iscove's modified DMEM (IMDM, PAA laboratories, Cölbe, Germany) supplemented with 15% fetal calf serum (BioWest, Frickenhausen, Germany), 2mM glutamine, 0,1 mM MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and 50 µg/mL of each penicillin and streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). HEK293T human embryonic kidney cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glucose, PAA Laboratories) supplemented with 10% fetal calf serum and 50 µg/mL of each penicillin and streptomycin. Transient transfection of HEK293T cells was performed with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. All other cell lines were cultured in RPMI 1640 (PAA Laboratories) supplemented with 10% fetal calf serum and 50 µg/mL of each penicillin and streptomycin.

Western blot analysis.

For Western blot analysis cells were lysed in TPNE buffer (PBS adjusted to 300 mM NaCl, 1% Triton-X100, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF and 1 µg/ml each of leupeptin, aprotinin, chymostatin and pepstatin A). 20 µg of postnuclear supernatant protein as determined by the BCA method (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) were separated by 12% SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Freiburg, Germany) and blocked with 5% non-fat dry milk in PBS/Tween (0.05% Tween-20 in PBS). After washing with PBS/Tween the blots were incubated overnight with specific antibodies at 4°C. Blots were washed again with PBS/Tween, incubated with horse radish peroxidase (HRPO)-coupled secondary antibodies (1:20,000) for 1 h at room temperature, washed again and developed with a chemiluminescence reagent (Amersham). For stripping, blots were incubated in Re-Blot mild solution (Chemikon, Hofheim, Germany) according to manufacturer's procedure.

SI Table

name	cell type	comments	short c-FLIP isoform status
EB 176	Pan troglodytes cell line		c-FLIP _R
LTR 2008	Pan troglodytes cell line		c-FLIP _R
B cells	human primary cells isolated from peripheral blood		c-FLIP _S and/or c-FLIP _R
BL60	human B lymphocyte	Burkitt lymphoma	c-FLIP _R
SKW6.4	human B lymphocyte	EBV transformed	c-FLIP _R
Raji	human B lymphocyte	Burkitt lymphoma	c-FLIP _R
Nalm6	human B lymphocyte	acute lymphoblastic leukemia (ALL)	c-FLIP _R
Med-B1	human B lymphocyte	mediastinal lymphoma	c-FLIP _S
Ramos	human B lymphocyte	Burkitt lymphoma	c-FLIP _S
Daudi	human B lymphocyte	Burkitt lymphoma	c-FLIP _S
Bjab	human B lymphocyte		c-FLIP _S
L-1236	human B lymphocyte	Hodgkin lymphoma	c-FLIP _S and c-FLIP _R
L-428	human B lymphocyte	Hodgkin lymphoma	c-FLIP _S and c-FLIP _R
T cells	human primary cells isolated from peripheral blood		c-FLIP _S and/or c-FLIP _R
J16	human T lymphocytes	acute lymphoblastic leukemia (ALL)	c-FLIP _S
HuT78	human T lymphocytes	lymphoma, cutaneous T cell	c-FLIP _S
CEM	human T lymphocytes	acute lymphoblastic leukemia (ALL)	c-FLIP _S

9. Anhang

Lebenslauf

Nana Ueffing

02.04.1981	geboren in Düsseldorf
1987 – 1991	Lindenschule, Düsseldorf
1991 – 2000	Humboldt-Gymnasium, Düsseldorf Abschluss: Abitur
2000-2006	Studium der Biologie Heinrich Heine Universität, Düsseldorf Abschluss: Diplom Note: ausgezeichnet
	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Medizin Heinrich Heine Universität, Düsseldorf Leitung: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff Thema: <i>Funktionelle Untersuchungen zur Modulation der Apoptose durch das anti-apoptotische Protein c-FLIP_s</i> Note: 1,0
2006 – 2009	Promotion am Institut für Molekulare Medizin Heinrich Heine Universität, Düsseldorf Leitung: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff Thema: <i>c-FLIP-Proteine – von der Struktur zur Funktion in Immunantwort und Tumorgenese</i>

Publikationsliste

Samraj AK, Keil E, **Ueffing N**, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 281:29652-9

Ueffing N, Keil E, Freund C, Kühne R, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Mutational analyses of c-FLIP_R, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 773-782.

Ueffing N, Schuster M, Keil E, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Up-regulation of c-FLIP_{short} contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells. *Blood.* 2008; 112(3): 690-8.

Keil E, **Ueffing N**, Tront J, Krueger A, Reinherz E, Hoffman B, Lieberman D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Sustained activation of p38 kinase by Gadd45b defines a novel pathway mediating negative selection of thymocytes. *Submitted.*

Ueffing N*, Singh K*, Christians A, Thorns C, Feller A C, Nagl F, Fend F, Heikaus S, Marx A, Zott R B, Brade J, Schulz W A, Schulze-Osthoff K, Schmitz I**, Schwerk C**. A SNP in the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) gene determines protein isoform production and is associated with risk of follicular lymphoma in humans. *Submitted.*

*N.U. and K.S. contributed equally to this work. **I.S. and C.S. share senior authorship.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Martin für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ingo Schmitz - für die spannende und herausfordernde Aufgabenstellung, die sehr gute wissenschaftlichen Anleitung, die konstruktive Diskussionsbereitschaft und die stete Unterstützung, die entscheidende Voraussetzungen für den Erfolg dieser Arbeit waren.

Bei Dr. Christian Schwerk bedanke ich mich herzlich für seine Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Eric, Carina, Daniel, Eni und Marc möchte ich mich für die gute Atmosphäre und die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor bedanken – es war schön, mit euch zusammen zu arbeiten!

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Molekulare Medizin für die gemeinsame verbrachte Zeit und ihre Hilfsbereitschaft. Ich werde die lustigen und erholsamen Mittagspausen in der Kaffeeküche vermissen!

Bei Katja Janßen und Katja Gotthardt möchte ich mich herzlich für den Beistand im Studium und in der Doktorarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Matthias, meinen Eltern, meiner Schwester, Mark sowie Marlene und Franz-Josef. Ich danke euch für eure immer währende Unterstützung, euer Verständnis und eure Geduld! "Welch ein Glück, geliebt zu werden! Und lieben, Götter, welch ein Glück!" (J. W. von Goethe)

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Nana Ueffing