

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
des Universitätsklinikums Düsseldorf  
der Heinrich-Heine-Universität

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger

# Molekulare Mechanismen der CD95–Aktivierung in Leberparenchymzellen

Habilitationsschrift  
für das Fach Molekulare Medizin

vorgelegt von  
Dr. med. Roland Michael Reinehr  
2005

---

## Die der Habilitationsschrift zugrunde liegenden Publikationen:

- #1) Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. (2002) Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36:602-14.
- #2) Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. (2002) Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 122:1411-27.
- #3) Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G, Häussinger D. (2002) Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology* 36:829-39.
- #4) Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. (2003) Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGFR association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* 17:731-733.
- #5) Graf D, Reinehr R, Kurz AK, Fischer R, Häussinger D. (2003) Inhibition of taurolithocholate 3-sulfate-induced apoptosis by cyclic AMP in rat hepatocytes involves protein kinase A dependent and independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 415:34-42.
- #6) Reinehr R, Graf D, Häussinger D. (2003) Bile salt-induced apoptosis involves epidermal growth factor-dependent tyrosine phosphorylation of CD95 in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 125: 839-853.
- #7) Reinehr R, Häussinger D. (2004) Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology*, 126:249-262.
- #8) Reinehr R, Görg B, Höngen A, Häussinger D. (2004) CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 279:10364-10373.
- #9) Reinehr R, Becker S, Höngen A, Häussinger D. (2004) The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. *J Biol Chem*, 279:23977-23987.
- #10) Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. (2004) Involvement of the Src family kinase Yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 127:1540-1557.
- #11) Eberle A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. (2005) Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. *Hepatology*, 41: 315-326.
- #12) Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 280:27179-27194.
- #13) Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology*, 129:2009-2031.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einführung</b>	<b>5</b>
1.1	Physiologie der Apoptose	5
1.2	Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie	7
1.3	CD95-vermittelte Apoptose in der Leber	9
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>13</b>
3.1	Zellisolation	13
3.2	Leberperfusion	13
3.3	Bestimmung des intrazellulären Wassergehaltes in der perfundierten Leber	13
3.4	Western Blot-Analysen	14
3.5	Immunpräzipitationen	14
3.6	Membranfraktionierung durch differentielle Zentrifugation	15
3.7	Immunzytochemie und konfokale Mikroskopie	15
3.8	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Einzelzellen	15
3.9	Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration und PKA-Aktivität	16
3.10	Messung des intrazellulären Ceramidgehalts	17
3.11	Protein- <i>knockdown</i> mittels Antisense-Oligonukleotiden	17
3.12	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion	17
3.13	Klonierung und Plasmidkonstruktion von CD95-YFP und EGFR-CFP und deren Transfektion	18
3.14	Mutagenese des CD95-Konstrukts	18
3.15	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Mikroskopie	18
3.16	Messung der Caspase 3- und Caspase 8-Aktivität	19
3.17	Messung der Cytochrom c-Freisetzung	19
3.18	Apoptosequantifizierung mittels TUNEL- und Annexin V-Assay	19

---

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse eigener Arbeiten</b>	<b>20</b>
4.1	Translokation des CD95 zur Plasmamembran	20
4.2	Oxidativer Stress als initiales Ereignis der Signaltransduktion	22
4.3	EGFR-Transaktivierung durch die Src-Familien-Kinase Yes	26
4.4	Kovalente Modifikationen des CD95-Rezeptors	28
4.5	Darstellung der CD95/EGFR-Interaktion mittels FRET	34
4.6	CD95-vermittelte Apoptoseinduktion	37
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
5.1	Eine schnelle Bildung von oxidativem Stress ist der Initiator der CD95-vermittelten Apoptose	39
5.2	Posttranskriptionelle Modifikationen des CD95 regulieren dessen Aktivierung und Translokation zur Plasmamembran	44
5.3	Mögliche therapeutische Ansätze	49
5.4	Mögliche Bedeutung von CD95-Modifikationen für die Leberregeneration und Kanzerogenese	51
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Eigene Publikationen</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang: Der Habilitationsschrift zugrunde liegenden Publikationen</b>	<b>72</b>

## 1. Einführung

In jedem Gewebe besteht ein Nebeneinander von programmierten Zelltod, der Apoptose und Zellproliferation, um die Gewebshomeostase aufrecht zu erhalten (Wyllie, 1987). Die Apoptose ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozeß, der nach einem festen Schema verläuft, in welches jedoch eine Vielzahl von Kontrollpunkten eingebaut sind (Walker et al., 1988).

### 1.1 Physiologie der Apoptose

Ist die Schädigung einer Zelle oder eines Gewebes durch eine extrazelluläre Noxe so groß, daß sie mit der Integrität der Zelle nicht mehr vereinbar ist, so kommt es zur passiven Zerstörung der Zelle von außen, der Nekrose. Im Gegensatz dazu ist die Apoptose ein geordneter und aktiver Prozeß der Zelle, der einem organisierteren Selbstverdau der Zelle entspricht. Da die Apoptose regelhaft nach einem festen Programm abläuft, spricht man auch vom programmierten Zelltod. Das Apoptose-Programm läuft dann an, wenn der Schaden an einer Zelle so groß ist, daß deren Funktion auf Dauer nicht mehr aufrecht erhalten werden kann oder fehlerhaft verläuft. Werden z.B. durch UV-Licht-Bestrahlung Schädigungen am Erbgut der Zelle erzeugt, so birgt dies das Risiko der Entartung, so daß sich die einzelne Zelle zum Wohle des umliegenden Gewebes in ihr (programmiertes) Schicksal fügt (Wyllie, 1987; Walker et al., 1988).

Neben der Apoptose-Induktion durch extrazellulären Stress existiert auch die Apoptose im Rahmen der Immunabwehr. Immunkompetente Zellen erkennen fremdes, geschädigtes oder infiziertes Gewebe und präsentieren Liganden von Apoptoserezeptoren auf ihrer Oberfläche und induzieren darüber Apoptose in den zu eliminierenden Zielzellen. Darüber hinaus erfolgt aber auch die Terminierung der Immunantwort und somit der Schutz vor überschießenden Immunreaktionen durch Induktion von Apoptose (Golstein et al., 1991).

Apoptose ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Kondensation des Zellkernes, DNA-Fragmentierung und der Bildung von apoptotischen *blebs/bodies* (Bläschen, Körperchen), was die Apoptose grundlegend von anderen Formen des Zelltodes, wie z.B. der Nekrose, unterscheidet (Kerr et al., 1974). Neben typischen Zeichen der Apoptose, wie Phosphatidylserin-Externalisierung oder die Aktivierung von Proteasen, den sogenannten Caspasen, ist die Volumenabnahme der Zelle im Rahmen der Apoptose [*apoptotic volume decrease* (AVD)] ein frühes und ubiquitäres

---

Ereignis des programmierten Zelltodes ([Bortner & Cidlowski, 2001, 2002](#); [Lang et al., 2000a](#); [Yu et al., 2001](#)). In Jurkat T-Zellen konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung des CD95 (Fas-/APO-1-Rezeptor) einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport ([Lang et al., 2000a](#)) und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hemmt ([Nobel et al., 2000](#)), einen auswärtsgerichteten  $\text{Cl}^-$ -Kanal aktiviert ([Szabo et al., 1998](#)), sowie den Efflux des organischen Osmolyts Taurin aus der Zelle stimuliert ([Lang et al., 1998](#)), was dann zusammen in einem AVD resultiert.

In einer Reihe von nicht-hepatischen Zelllinien ist ein AVD nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor [*tumor necrosis factor* (TNF)]  $\alpha$ , Cycloheximid oder Staurosporin beschrieben, der durch einen Efflux von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  erreicht wird, der der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien, Aktivierung von Caspasen, DNA-Fragmentierung und Veränderungen der Ultrastruktur der Zelle vorausgeht ([Maeno et al., 2000](#); [Okada et al., 2001](#)). Hemmung des AVD durch Hemmung von Volumen-abhängigen  $\text{K}^+$ - oder  $\text{Cl}^-$ -Kanälen ([Maeno et al., 2000](#)) oder durch Erhöhung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration ([Gomez-Angelats et al., 2000](#); [Thompson et al., 2001](#)) hemmt auch die Apoptose, wohingegen eine Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiports die Apoptose verstärkt ([Lang et al., 2000a](#)).

Die Aktivierung der Caspasen 8 und 3, der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die DNA-Fragmentierung wurden als nachgeschaltete Ereignisse einer Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung beschrieben ([Gomez-Angelats et al., 2000](#)). Ein Pancaspase-Inhibitor war in der Lage, den  $\text{K}^+$ -Efflux, die Zellschrumpfung und die Exekution der Apoptose nach Stimulation mit einem CD95-aktivierenden Antikörper in Jurkat T-Zellen zu hemmen ([Bortner and Cidlowski, 1996](#); [Nobel et al., 2000](#)). Eine proteolytische Aktivität (der Caspasen) scheint daher für den AVD notwendig zu sein.

Der Beitrag des AVD zur Signaltransduktion im Rahmen des programmierten Zelltodes ist bisher unklar. Hyperosmolare Stimulation von Zellen kann den AVD imitieren und selber Apoptose auslösen ([Fumarola et al., 2001](#)). Eine Aktivierung des TNF-Rezeptors mit nachfolgender Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) durch hyperosmolare Stimulation wurde bereits beschrieben ([Rosette & Karin, 1996](#)).

Ziel dieser Arbeit war es daher zum einen, die Signaltransduktionsschritte, die der Caspasen-Aktivierung und damit dem AVD vorausgehen, zu identifizieren und zum anderen, die Rolle des AVD für die Apoptose aufzuklären. Es sollte also mittels

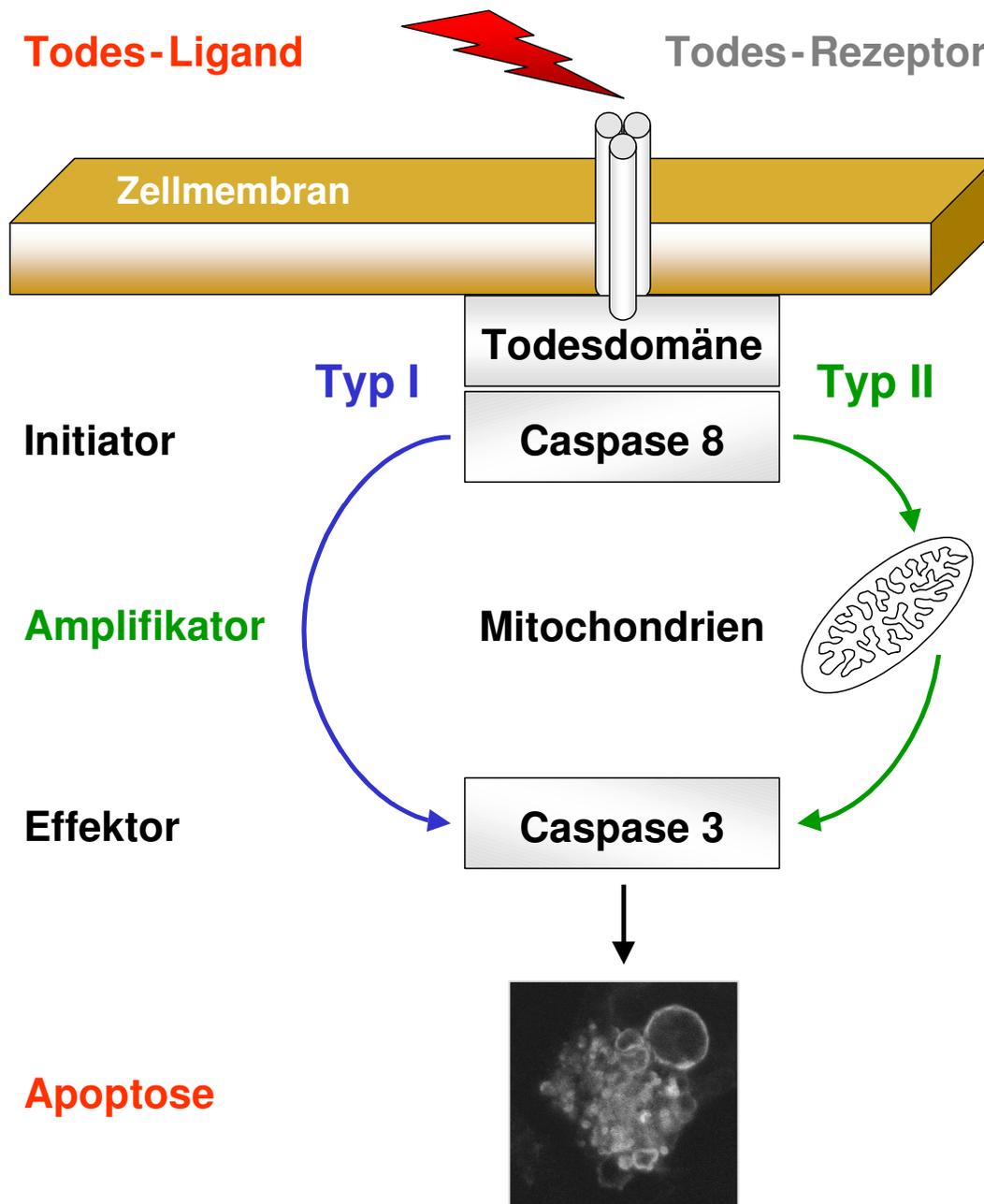
---

milder hyperosmolarer Stimulation (405 mosmol/L) von Leberparenchymzellen der Einfluß der Zellschrumpfung auf die Apoptose untersucht werden.

## 1.2 Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie

Neben dem TNF-Rezeptor 1 wurden weitere Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie, wie der APO-3, die TRAIL (*TNF-related-apoptosis-inducing-ligand*)-Rezeptoren 1 und 2, der CD95 (Fas-/APO-1-Rezeptor) sowie der DR (*death receptor*)-6 als Todesrezeptoren beschrieben. Die TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 gelten als *decoy receptors*, da sie TRAIL, den Liganden der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, binden, ohne eine Apoptose auszulösen (*to decoy*: anlocken, ködern). TNF $\alpha$  bindet an die TNF-Rezeptoren, APO-3-Ligand an den APO-3-Rezeptor und CD95-Ligand (CD95L) an den CD95. Nach Aktivierung der Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie kommt es zur Anlagerung einer Todesdomäne (*death domain*), wie der TNF-Rezeptor-assoziierten *death domain* (TRADD) oder der Fas-assoziierten *death domain* (FADD) an den jeweiligen Rezeptor. Nach Bindung der *death domain* kommt es zur Anlagerung und Aktivierung einer Initiator-Caspase, in diesem Fall der Caspase 8. Die Caspase 8 vermag mit ihrer proteolytischen Aktivität das Protein Bid zu spalten, wobei das trunkierte Bid (tBid) zu den Mitochondrien transloziert und dort zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Cytochrom c-Freisetzung führt. Diese Cytochrom c-Freisetzung hat dann die Aktivierung von Effektor-Caspasen, in diesem Falle der Caspase 9 und schließlich die Aktivierung der Caspase 3 zur Folge ([Higuchi & Gores, 2003](#)).

Man unterscheidet grundlegend zwischen sogenannten Typ I- und Typ II-Zellen: während in Typ I-Zellen die Initiator-Caspase in der Lage ist, unter Umgehung der Mitochondrien direkt die Effektor-Caspase zu aktivieren, bedarf es in Typ II-Zellen einer Amplifikation der Caspase 8-Aktivierung durch die Mitochondrien, um die schließlich die Caspase 3 zu aktivieren ([Scaffidi et al., 1998](#); [Barnhart et al., 2003](#)) (*Abbildung 1*).



**Abbildung 1: Liganden-abhängige Apoptose in Typ I- und Typ II-Zellen**

Nach Bindung des Todes-Liganden, z.B. CD95-Ligand, an den Todes-Rezeptor, z.B. CD95 (Fas-/APO-1-Rezeptor) kommt es zur Assoziation der Todesdomäne (*Fas associated death domain*, FADD) an den Todes-Rezeptor und im Folgenden zur Anlagerung und Aktivierung der Initiator-Caspase 8 und somit zur Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC). In sog. Typ I-Zellen vermag die Initiator-Caspase 8 direkt die Effektor-Caspase 3 zu aktivieren. In Typ II-Zellen hingegen bedarf es einer Amplifikation durch die Mitochondrien, um die Effektor-Caspase 3 zu aktivieren. Die initialen Schritte, die zur Aktivierung des Todes-Rezeptors und zur DISC-Bildung führen, sind weitgehend unklar. Diese an Leberparenchymzellen aufzuzeigen war Ziel dieser Arbeit.

---

Eine Sonderform stellt die Gallensalz-induzierte Apoptose in der Leber dar. Pro-apoptotische, hydrophobe Gallensäuren, wie Tauroolithocholat-3-sulfat (TLCS), Taurochenodesoxycholol (TCDC) und Glykochenodesoxycholol (GCDC) vermögen den CD95-Rezeptor ligandenunabhängig zu aktivieren, während die Gallensäure Taurocholol (TC) keinen Einfluß auf die hepatozelluläre Apoptose aufweist (Chieco et al., 1997; Faubion et al., 1999; Miyoshi et al., 1999). Die therapeutisch verwendete Gallensäure Ursodesoxycholol (UDCA), die zu Tauroursodesoxycholol (TUDC) verstoffwechselt wird, hat sogar anti-apoptotische Eigenschaften (Rodrigues et al., 1998a, 1998b, Benz et al., 1998, 2000; Kurz et al., 2000). Im Weiteren wurde berichtet, daß hydrophobe Gallensäuren neben der ligandenunabhängigen Aktivierung des CD95 auch über eine direkte Wirkung auf die Mitochondrien hepatozelluläre Apoptose induzieren (Sokol et al., 1995; Lemasters, 1999; Yerushalmi et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die grundlegenden Mechanismen der Gallensalz-induzierten Apoptose in Leberparenchymzellen aufzuklären, um potentielle anti-apoptotische, hepatoprotektive Strategien zu entwickeln.

### **1.3 CD95-vermittelte Apoptose in der Leber**

Neben anderen Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie wird auch der CD95 in der Leber exprimiert. Obwohl der CD95 neben der Leber fast ubiquitär exprimiert wird, scheint seine Funktion in der Leber von herausragender Bedeutung. So kommt es bei Mäusen nach Applikation von CD95-aktivierendem Antikörper binnen 3 h zum letalen Leberversagen (Ogasawara et al., 1993; Rodrigues et al., 1996).

Der CD95 ist an einer Reihe von pathologischen Leberprozessen beteiligt. So wird im Rahmen der alkoholischen Lebererkrankung eine Induktion des Cytochrom P450 2E1 mit nachfolgender Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet. Dieses führt zu einer Hochregulation von CD95-Ligand (CD95L) auf der Oberfläche der Hepatozyten und zum anderen zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Rust & Gores, 2000). Im Rahmen der viralen Hepatitis wurde neben der Granzym B-vermittelten Apoptose von Leberparenchymzellen durch zytotoxische T-Zellen auch eine direkte, durch CD95L-Präsentation vermittelte Apoptose beobachtet (Rust & Gores, 2000). Im Rahmen von cholestatischen Lebererkrankungen kommt es zu einer Akkumulation von hydrophoben Gallensäuren im Zellinneren der Leberparenchymzelle, wenn das Angebot an Gallensäuren die

---

Exkretionsleistung der Leberparenchymzelle übersteigt oder die Exkretionsleistung der Zelle, z.B. durch den Ausbau der entsprechenden Transporter (Bsep, Mrp2) aus der kanalikulären Membran, vermindert ist. Je nach Konzentration der hydrophoben Gallensäuren kommt es dann entweder zur Nekrose (hohe Gallensalzkonzentrationen) oder Apoptose (mäßige Gallensalzkonzentrationen; *siehe oben*) ([Higuchi & Gores 2003](#)).

Kürzlich wurde auch eine Beteiligung des CD95 an der Leberschädigung im Rahmen des HELLP (*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*)-Syndroms postuliert. Im Rahmen der arteriellen Hypertonie der Schwangeren wird CD95L von der fetalen Seite der Plazenta durch den hohen Perfusionsdruck abgeschert. CD95L wird dort vom Fetus präsentiert, um maternale, immunkompetente Zellen abzuwehren. Der abgescherte CD95L induziert dann eine CD95-vermittelte Apoptose, die die Schädigung der maternalen Leber im Rahmen dieses Krankheitsbildes erklärt ([Strand et al., 2004](#)).

Ziel dieser Studie war es daher neben der ligandenunabhängigen Aktivierung des CD95-Systems durch hydrophobe Gallensäuren oder Hyperosmolarität die CD95L-induzierte Apoptose hinsichtlich ihrer Signaltransduktion weiter aufzuklären, um potentielle therapeutische Angriffsziele zu identifizieren.

---

## 2. Fragestellung

Neben der CD95-Ligand (CD95L)-vermittelten Aktivierung des CD95-Systems, kommt es auch nach Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren in Leberparenchymzellen zu einer CD95-vermittelten Apoptose (Chieco et al., 1997; Faubion et al., 1999; Miyoshi et al., 1999; Higuchi & Gores 2003). An der Gallensalz-induzierten Apoptose ist neben dem oxidativen Stress (Sokol et al., 1995; Lemasters, 1999; Yerushalmi et al., 2001; Higuchi & Gores 2003) auch eine Reihe von Proteinkinasen-Systemen beteiligt, mit zum Teil pro- (Jones et al., 1997) und anti-apoptotischer Wirkung (Takikawa et al., 2001). Darüber hinaus mag auch extrazellulärer Stress, wie UV-Licht-Bestrahlung (Rosette & Karin, 1996) oder osmotischer Schock (Fumarola et al., 2001), Apoptose auszulösen.

Pro-apoptotische Reize vermögen aber auch, proliferative Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren. So kommt es nach Stimulation von Cholangiozyten mit pro-apoptotischen Gallensäuren zu einer Aktivierung des *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptors, einem Wachstumsfaktor-Rezeptor, mit nachfolgender Aktivierung der MAP-Kinasen *extracellular signal-regulated kinases* (Erk)-1 und -2 (Qiao et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es nun aufzuzeigen, durch welche molekularen Signaltransduktionsmechanismen der CD95 aktiviert wird.

Folgende Fragen ergaben sich hieraus:

1. Wird die Aktivität des CD95 durch seinen Aufenthaltsort in der Zelle / an der Plasmamembran bestimmt ?
2. Welche Modifikationen des CD95 führen zu dessen Translokation ?
3. Gibt es einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg für die Liganden-abhängige und die Liganden-unabhängige CD95-Aktivierung ?
4. Welche Rolle spielt der durch pro-apoptotische Reize ausgelöste oxidative Stress für die Aktivierung des CD95-Systems ?
5. Wo greifen potentiell anti-apoptotische, hepatoprotektive Substanzen in die zur CD95-Aktivierung führende Signaltransduktion ein ?

---

Folgende Modellsysteme wurden in aus der Ratte isolierten, kultivierten Leberparenchymzellen, humanen Hepatomzellen (Huh7-Zellen) und in der perfundierten Rattenleber untersucht:

1. hyperosmolare (405 mosmol/L) versus normoosmolare Stimulation (305 mosmol/L)
2. Stimulation mit den hydrophoben, pro-apoptotischen Gallensäuren TLCS, TCDC und GCDC, der neutralen Gallensäure TC und der hydrophilen, anti-apoptotischen Gallensäure TUDC
3. CD95 Ligand-induzierte Apoptose

Darüber hinaus wurde im Tiermodell der Gallengangsligatur (*bile duct ligation*, BDL) die mögliche protektive Wirkung des organischen Osmolytes Betain auf die Gallensalz-induzierte Apoptose einschließlich der zugrundeliegenden Signaltransduktion untersucht.

In einem weiteren Tiermodell wurde der Einfluß einer durch Endotoxininjektion ausgelösten Entzündung auf die CD95-vermittelte Apoptose in Leberparenchymzellen untersucht.

---

### **3. Methoden**

Im Nachfolgenden werden die der Habilitationsschrift zugrunde liegenden experimentellen Methoden zusammenfassend dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in den im Anhang ausgewiesenen Publikationen, auf die im Text verwiesen wird (#1-#13).

#### **3.1 Zellisolation (#1-#13)**

Leberparenchymzellen wurden aus den Lebern männlicher Wistar-Ratten mittels Kollagenase-Perfusion isoliert (Kurz et al., 2000). Dazu wurde nach Anästhesie der Ratte die Bauchhöhle eröffnet und die Pfortader kanüliert, mit Calcium-freiem Medium anperfundiert und anschließend mit Kollagenase-haltigem Medium zur Auflösung der Zellverbände perfundiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch wiederholte Niedriggeschwindigkeitszentrifugation weiter aufgetrennt, so daß schließlich Leberparenchymzellen mit einer Reinheit und Vitalität von mehr als 95 % isoliert wurden. Anschließend wurden die Zellen auf Kollagen-beschichteten Kulturschalen für bis zu 4 Tagen kultiviert.

#### **3.2 Leberperfusion (#6,#7,#10)**

Zur Untersuchung der Signaltransduktion in der intakten Leber wurden Lebern von männlichen Wistar-Ratten nicht-rezirkulierend mit Carbogen-gesättigtem Krebs-Henseleit-Puffer, dem 2,1 mmol/L Lactat und 0,3 mmol/L Pyruvat beigefügt waren, bei 37°C mit einem Fluß von  $3,5-4,5 \text{ mL} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}$  Lebergewicht perfundiert (Noé et al., 1996). Es wurden jeweils vor und nach der jeweiligen Stimulation Leberlappen entnommen und der weiteren Analyse zugeführt. Die Leberlappen wurden so entnommen, daß der portalvenöse Druck, der kontinuierlich gemessen wurde, konstant blieb. Im Weiteren wurde die LDH-Aktivität im Effluat gemessen, um eine etwaige Zellschädigung während der Perfusion zu überwachen. Die LDH-Freisetzung in das Effluat durfte hierbei  $20 \text{ mU} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}$  Lebergewicht nicht überschreiten.

#### **3.3 Bestimmung des intrazellulären Wassergehaltes in der perfundierten Leber**

Der intrazelluläre Wassergehalt in der intakten Leber als Maß für das Zellvolumen wurde aus der Differenz des Auswaschprofils von gleichzeitig perfundiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-Harnstoff und [ $^3\text{H}$ ]-Inulin (ca. 500 Bq/mL im Perfusat) berechnet (vom Dahl et al.,

---

1991). Hierzu wurden beide Isotope zunächst für 5 min perfundiert, um ein Äquilibrium der beiden Tracer in den intra- und extrazellulären Kompartimenten zu erzielen. Nach Einstellen des Äquilibriums wurden beide Isotope ausgewaschen und deren Gehalt unter konstanten Bedingungen im Effluat durch Zweispektren-Szintillations-Spektrometrie für [<sup>3</sup>H] und [<sup>14</sup>C] gemessen und ins Verhältnis gesetzt ([<sup>3</sup>H]/[<sup>14</sup>C]-Quotient). Ein vermeintlich <sup>14</sup>C-, aber nicht <sup>3</sup>H-, zugängliches Kompartiment wurde als intrazellulärer Wassergehalt (zellulärer Hydratationszustand) bezeichnet und in µL/g Lebergewicht ausgedrückt. Unter Normalbedingungen beträgt der intrazelluläre Wassergehalt  $572 \pm 11$  µL/g (vom Dahl et al., 1991).

### **3.4 Western Blot-Analysen (#1-#13)**

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen sowie zum Nachweis von kovalenten Modifikationen (Proteinphosphorylierung, -nitrierung) wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Zelllysate wurden hierzu nach Proteinbestimmung (Bradford-Methode) durch 8-15 % Polyacrylamid-Gele elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die jeweiligen Proteine wurden durch primäre Antikörper mit Hilfe der Chemolumineszenz des dazugehörigen sekundären Antikörpers detektiert. Im Weiteren kamen phosphospezifische primäre Antikörper zum Nachweis von Modifikationen selektiver Aminosäuren des zu untersuchenden Proteins zum Einsatz.

### **3.5 Immunpräzipitationen (#3,#4,#6-#13)**

Zur Anreicherung einzelner Proteine (und den an diese Proteine gebundenen weiteren Proteinen) wurden diese vor der entsprechenden Gelelektrophorese immunpräzipitiert. Hierzu wurde dem Zelllysate ein gegen das anzureichernde Protein gerichteter primärer Antikörper sowie Protein A- und G-Agarose beigefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen ist das zu untersuchende Protein aus dem Gesamtzelllysate aufgereinigt und kann jetzt der Gelelektrophorese zugeführt werden. Durch phosphospezifische Antikörper kann somit eine Phosphorylierung des Zielproteins nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelingt der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durch Detektion weiterer Proteine aus dem Immunpräzipitat.

---

### **3.6 Membranfraktionierung durch differentielle Zentrifugation (#1,#4,#6-#13)**

Mit Hilfe einer differentiellen Zentrifugation wurden Membran-haltige Kompartimente der Zelle separiert. Nach hypotoner Zellyse wurde das Lysat zunächst für 5 min bei 4°C mit 1.200 g zentrifugiert, um den Zellschrott vom Lysat zu separieren. Hiernach erfolgte eine erste Ultrazentrifugation mit 40.000 g für 35 min. Das hierbei erhaltene Pellet entspricht der Plasmamembran und wurde in einem entsprechenden Puffer resuspendiert. Der Überstand enthält das Zytosol inklusiver kleiner, im Zytosol lokalisierter Endomembranen/Endovesikel. Durch eine weitere Ultrazentrifugation (2 h, 100.000 g) wurden die Endomembranen vom Zytosol getrennt. Annexin II wurde als Markerprotein für die Plasmamembran und die GAPDH als Markerprotein für das Zytosol verwendet und in Western Blot-Analysen zur Dokumentation der Effizienz der Auftrennung detektiert.

### **3.7 Immunzytochemie und konfokale Mikroskopie (#1-#13)**

Mittels spezifischer Antikörper wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Einzelzellen und Gewebeschnitten nachgewiesen. Dazu wurde das zu untersuchende Präparat fixiert, permeabilisiert und mit Protein-spezifischen primären Antikörpern inkubiert. Die Bindung des primären Antikörpers an das Zielprotein wurde mit Hilfe eines sekundären, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die Kolokalisation von 2 gleichzeitig detektierten Proteinen wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (BioRad Confocal Laser Scanning Microscope, Leica TCS-NT) dargestellt. Um eine Translokation von Proteinen an die Plasmamembran darzustellen, wurden Präparate auch unter nicht-permeabilisierten Bedingungen immunzytochemisch gefärbt. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationsphase wurden die Zellen kurz gewaschen und dann kontinuierlich bei 4°C weiterbehandelt, in dem zunächst die primären und dann die sekundären Antikörper inkubiert wurden, bevor die Zellen schließlich fixiert wurden. Somit konnte der primäre und sekundäre Antikörper nur an die in der Plasmamembran gelegene Epitope binden.

### **3.8 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies in Einzelzellen (#3,#4,#6,#7,#12,#13)**

Zur Darstellung von reaktiven Sauerstoffspezies in Einzelzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Verfahren entwickelt. Zellen wurden hierzu mit dem

---

Fluorochrom CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5-6-Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat) beladen. Die Oxidation des nicht-fluoreszierenden 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) zu dem stark fluoreszierenden 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) reflektiert hierbei die Gesamtheit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle (Le Bel et al., 1992). CM-H<sub>2</sub>DCFDA ist ein Chloromethyl-Derivat des H<sub>2</sub>DCFDA, welches in hohem Maße in lebenden Zellen angereichert wird. CM-H<sub>2</sub>DCFDA diffundiert passiv in die Zelle, in der die Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten werden und die Thiol-reaktive Chloromethyl-Gruppe mit intrazellulärem Glutathion und anderen Thiolen reagiert. Eine intrazelluläre Oxidation des Farbstoffes führt dann zu einem fluoreszierendem Addukt, das in der Zelle „gefangen“ ist. Somit eignet sich dieses Fluorochrom auch für Messungen über längere Zeiträume in lebenden Zellen (Mahadev et al., 2001).

Zur Messung der Fluoreszenz in Einzelzellen wurden Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Diese Deckgläser wurden dann mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) bei 37°C überdeckt und mit Raumtemperatur äquilibriert. Die Zellen wurden mit Licht von 488 nm Wellenlänge mit 2 Hz Taktfrequenz angeregt, das von einem Monochromator generiert wurde. Die Emission wurde bei 515-565 nm Wellenlänge unter Zuhilfenahme einer CCD-Kamera und des QuantiCell 2000-*Calcium Imaging*-Meßplatzes (Visitech) in Einzelzellen registriert.

Zur Messung der Fluoreszenz in Zellpopulationen wurde das aus der Literatur bekannte Verfahren verwendet (Le Bel et al., 1992): hierzu wurden Zellen nach der Stimulation in Zellkulturschalen lysiert, der Zellschrott abzentrifugiert (1 min, 4°C, 10.000 g) und die Fluoreszenz im Überstand in einem Lumineszenz-Spektrometer (LS-5B, Perkin-Elmer) bei 488 nm Anregungswellenlänge und 515-565 nm Emissionswellenlänge gemessen.

### **3.9 Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration und PKA-Aktivität (#7)**

Zur Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden zwei kommerziell erhältliche Assays verwendet: zum einen ein ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, R&D Systems) und zum anderen ein RIA (*radioimmunosorbent assay*, Amersham). Die so bestimmte cAMP-Konzentration wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

Zur Bestimmung der intrazellulären Proteinkinase A (PKA)-Aktivität wurde ein kommerziell erhältlicher Assay (Protein-Kinase-Assay-Kit, Calbiochem) verwendet.

---

Die so bestimmte Aktivität wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

### **3.10 Messung des intrazellulären Ceramidgehalts (#12,#13)**

Der intrazelluläre Ceramidgehalt wurde mittels Lipidextraktion und anschließender *high performance thin layer chromatography* (HPTLC) bestimmt. Die Quantifizierung der Lipide wurde aus jeweils 500 µg Protein per FOLCH-Extraktion durchgeführt (Folch et al., 1957). Die so erhaltenen Proben wurden mit Hilfe der HPTLC weiter aufgeschlossen (Merck 60F 254s und CAMAG Linomat IV). Zur Bestimmung der Ceramide wurden die Proben per *automated multiple development* (AMD)-Prozedur (AMD 2 device, CAMAG) in insgesamt 7 Elutionen aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurde die Absorption bei 550 nm Wellenlänge im Vergleich zu einer Standardkurve gemessen (Grether-Beck et al., 2000).

### **3.11 Protein-knockdown mittels Antisense-Oligonukleotiden (#9,#10,#12,#13)**

Zum selektiven *knockdown* von Zielproteinen der Signaltransduktion wurden Antisense-Oligonukleotide gegen die Src-Kinase Yes, den *epidermal growth factor*-Rezeptor (EGFR) und die NADPH-Oxidase-Untereinheit p47<sup>phox</sup> zusammen mit Nonsense-Oligonukleotiden zur Kontrolle kommerziell hergestellt (Biognostik). Unter Zuhilfenahme von kationischen Lipiden (Lipofectamine 2000, Invitrogen) wurden die Oligonukleotide in die Zielzellen transfiziert, wo sie an die das Zielprotein kodierende mRNA binden und somit die Proteintranslation blockieren. Binnen 4 Tagen in Kultur kam es zu einer signifikanten Abnahme der jeweiligen Proteinexpression, die durch Western Blot-Analyse dokumentiert wurde.

### **3.12 Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (#8,#9,#11-#13)**

Zum semiquantitativen Nachweis von mRNA wurden RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*)-Analysen durchgeführt. Nach RNA-Extraktion wurde der RNA-Gehalt der Proben mittels Spektrophotometrie quantifiziert und jeweils gleiche RNA-Mengen mit spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in zweiprozentigen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung visualisiert. Im Weiteren wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel extrahiert und kommerziell sequenziert (MWG Biotech), um das

---

Amplifikat zu bestätigen.  $\beta$ -Aktin wurde jeweils als Beladungskontrolle amplifiziert und detektiert.

### **3.13 Klonierung und Plasmidkonstruktion von CD95-YFP und EGFR-CFP und deren Transfektion (#8,#9,#11-#13)**

Die den CD95 kodierende Nukleotidsequenz wurde mittels RT-PCR aus HepG2-mRNA amplifiziert und in den pTOPO-TA-Vektor der Firma Invitrogen ligiert. Nach Einführung der Restriktionsschnittstellen und Entfernung des Stop-Codons mittels PCR wurde das Fragment in das pYFP-N1-Plasmid der Firma Clontech inseriert, um ein Fusionsprotein des CD95 mit einem YFP (*yellow fluorescent protein*) am C-Terminus zu erhalten. Das EGFR-CFP (*cyan fluorescent protein*)-Konstrukt wurde aus dem F7 erb B1-EGFP-Plasmid (Prof. Dr. Arndt-Jovin; Brock et al., 1999) hergestellt, in dem das GFP (*green fluorescent protein*) am C-Terminus des EGFR durch das CFP aus pECFP-N1 der Firma Clontech mittels PCR ersetzt wurde. Alle Konstrukte wurden mittels kommerzieller Sequenzierung überprüft (MWG Biotech). Huh7-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 70 % Konfluenz kultiviert, bevor sie mit den jeweiligen Expressionsvektoren für das CD95-YFP- und das EGFR-CFP-Fusionsprotein unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transient transfiziert wurden.

### **3.14 Mutagenese des CD95-Konstrukts (#11,#13)**

Die 3 Tyrosinreste des CD95-YFP-Konstrukts wurden mittels *site directed mutagenesis* und Standard-PCR-Techniken einzeln, als Doppel- und Dreifach-Mutante gegen Phenylalanin ausgetauscht (Tyr→Phe). Alle Konstrukte wurden mittels kommerzieller Sequenzierung überprüft (MWG Biotech).

### **3.15 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Mikroskopie (#11-#13)**

Konfokale Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Aufnahmen der mit CD95-YFP und EGFR-CFP (ko-)transfizierten Zellen wurden mit Hilfe des LSM-510-META-Mikroskops (Zeiss) angefertigt. Der META-Scan verhindert hierbei den *cross talk* (Durchbluten) des CFP- in den YFP-Kanal. CFP wurde mit 405 nm und YFP mit 514 nm Wellenlänge angeregt. Die FRET-Effizienz wurde mittels der LSM-Image-Examiner-3.1-Software (Zeiss) bestimmt. Die FRET-Aufnahmen wurden dann jeweils

---

hinsichtlich ihrer FRET-Effizienz in Bezug zu einer Standard-Skala normalisiert und von blau/0 nach rot/255 quantifiziert (Dickinson et al., 2003).

### **3.16 Messung der Caspase 3- und Caspase 8-Aktivität (#1-#5,#8,#13)**

Die Aktivität der Caspasen 8 und 3 wurde aus dem Zelllysate mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Assays bestimmt (R&D Systems). Die so bestimmte Aktivität wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

### **3.17 Messung der Cytochrom c-Freisetzung (#3,#13)**

Zur Quantifizierung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytosol wurden die Zellen nach der Stimulation lysiert und der Zellschrott für 10 min bei 4°C mit 800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann für 1 h bei 4°C mit 100.000 g ultrazentrifugiert, um die Mitochondrien vom Zytosol zu trennen. Aus dem Überstand, der dem Zytosol entspricht, wurde dann mittels Western Blot-Analyse nach 15-prozentiger Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Cytochrom c-Gehalt der Probe bestimmt.

### **3.18 Apoptosequantifizierung mittels TUNEL- und Annexin V-Assay (#1-#13)**

Mit Hilfe der TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-dUTP nick-end labelling*)-Technik wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Assays (Roche Diagnostics) der Anteil der apoptotischen Zellen per Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und quantifiziert.

Der Symmetrieverlust der Phospholipide der Zellmembran ist ein frühes Ereignis im Rahmen des apoptotischen Zelltodes und wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Assays (Bender Medical Systems) per Fluoreszenzmikroskopie visualisiert und quantifiziert. Die gleichzeitige Verwendung von Propidiumjodid ermöglicht hierbei die simultane Quantifizierung des Anteils der nekrotischen Zellen in der gleichen Probe.

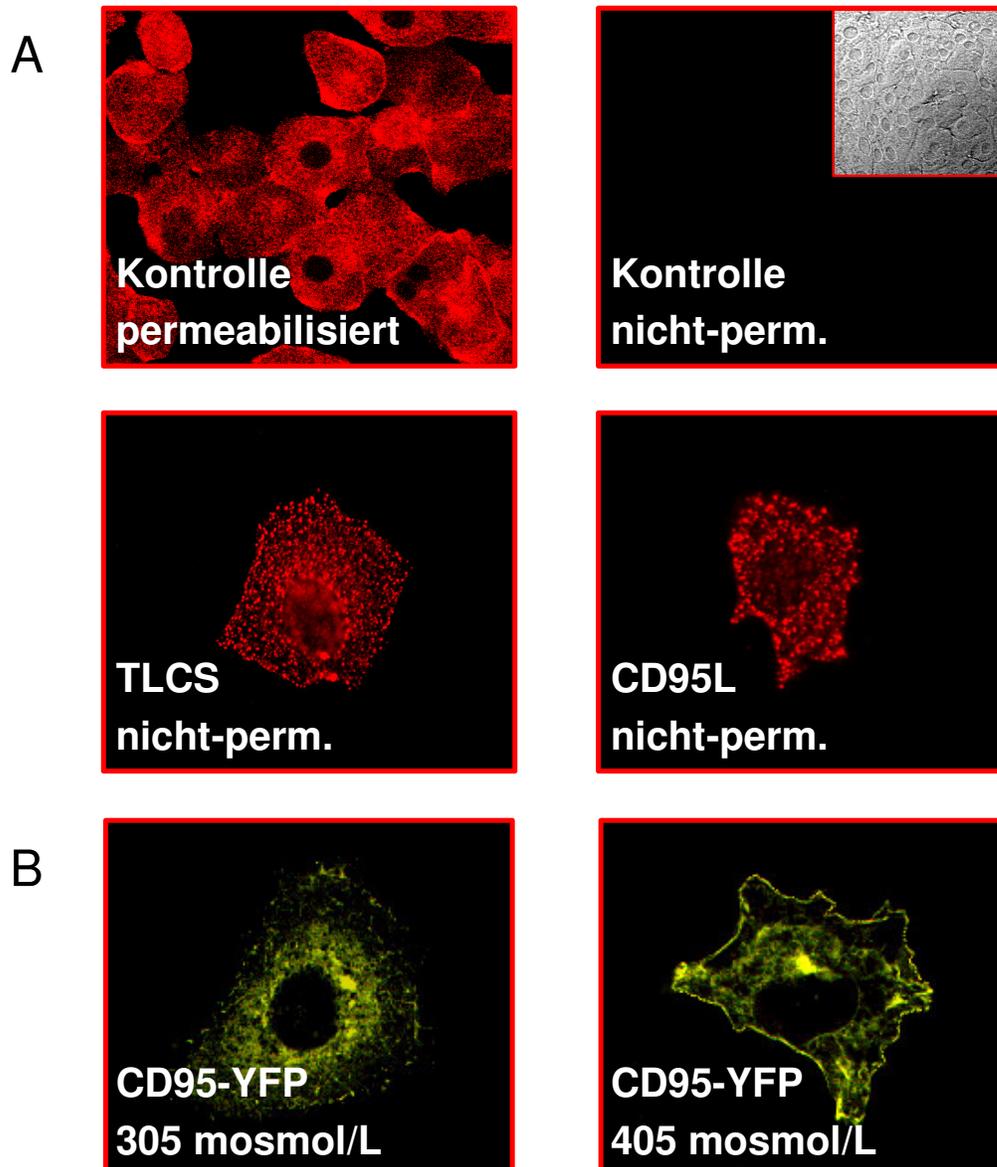
## 4. Ergebnisse eigener Arbeiten

Leberparenchymzellen sind sogenannte Typ II-Zellen, d.h. nach der Aktivierung von Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptor-Familie bedarf es nach Aktivierung der Initiator-Caspasen an der Todeseffektordomäne (z.B. Caspase 8) einer zusätzlichen mitochondrialen Amplifikation zur Aktivierung der Effektor-Caspasen (z.B. Caspase 3), um den apoptotischen Zelltod zu exekutieren (Higuchi & Gores, 2003; Barnhart et al., 2003). Während hinreichend viele Daten über die CD95-Ligand (CD95L)-vermittelte Aktivierung des CD95-Systems in Typ I-Zellen vorliegen, existieren wenige Studien zu frühen Ereignissen der CD95-Aktivierung, insbesondere der CD95L-unabhängigen CD95-Aktivierung, wie sie für hydrophobe Gallensäuren beschrieben ist (Chieco et al., 1997; Faubion et al., 1999; Miyoshi et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß hydrophobe Gallensäuren eine CD95-vermittelte Apoptose in Leberparenchymzellen induzieren können (Chieco et al., 1997; Faubion et al., 1999; Miyoshi et al., 1999; Higuchi & Gores 2003), es aber auch davon unabhängig zu einer direkten Einwirkung auf die Mitochondrien kommt (Sokol et al., 1995; Lemasters, 1999; Yerushalmi et al., 2001, Higuchi & Gores 2003). In beiden Fällen ist eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Folge (Lemasters, 1999; Higuchi & Gores 2003). Darüber hinaus war in McNtcp.24-Zellen eine durch hydrophobe Gallensäuren induzierte Translokation des CD95 zur Plasmamembran beschrieben (Sodeman et al., 2000).

### 4.1 Translokation des CD95 zur Plasmamembran

Immunzytochemische Färbungen des CD95 zeigten in permeabilisierten Leberparenchymzellen eine deutliche Expression. Färbungen an nicht-permeabilisierten Zellen hingegen zeigten so gut wie gar keine Expression des Rezeptors an der Plasmamembran, so daß der CD95 unter Kontrollbedingungen vornehmlich im Zellinneren lokalisiert ist. Nach Stimulation der Leberparenchymzellen mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität kommt es auch unter nicht-permeabilisierten Bedingungen zu einer deutlichen Immunreaktivität an der Plasmamembran als Ausdruck einer Translokation des nunmehr aktivierten CD95 aus dem Zellinneren an die Plasmamembran (#1,#2) (Abbildung 2).

Durch Transfektion des fluoreszierenden CD95-YFP-Konstrukts konnte die Translokation des CD95 an die Plasmamembran auch in lebenden Huh7-Zellen dargestellt werden (#8,#9,#11) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Translokation des CD95 zur Plasmamembran**

**A)** Wie durch immunzytochemische Färbung des CD95 in permeabilisierten, 24 h-kultivierten Leberparenchymzellen gezeigt werden konnte, exprimieren diese den CD95. Bei Färbung von nicht-permeabilisierten Zellen hingegen, ergab sich so gut wie keine Immunreaktivität an der Plasmamembran (das Kästchen zeigt das gefärbte Gesichtsfeld in der Durchlichtmikroskopie). Nach Stimulation mit der hydrophoben Gallensäure TLCS oder dem CD95-Liganden kommt es zu einer punktförmigen Immunreaktivität für den CD95 an der Plasmamembran auch in nicht permeabilisierten Zellen.

**B)** Huh7-Zellen wurden mit einem gelb-fluoreszierenden CD95-YFP-Konstrukt transfiziert. Während das CD95-YFP-Konstrukt unter normoosmolaren Bedingungen (305 mosmol/L) vornehmlich im Inneren der Zelle lokalisiert ist, kommt es nach hyperosmolarer Stimulation (405 mosmol/L) zu einer Anreicherung des CD95-YFP-Konstruktes in der Plasmamembran.

---

Im Weiteren konnte gezeigt werden, daß die Translokation des CD95 mit dessen Tyrosinphosphorylierung verbunden ist (#4,#6). Die Aufklärung der zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen war vornehmliches Ziel dieser Arbeit.

#### **4.2 Oxidativer Stress als initiales Ereignis der Signaltransduktion**

Es konnte gezeigt werden, daß die Stimulation von Leberparenchymzellen mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren und Hyperosmolarität zu einer sofortigen Bildung von ROS führt (#4,#6,#9,#10,#12,#13).

Als Quelle dieser ROS-Bildung kam neben den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Sokol et al., 1998) auch die NADPH-Oxidase in Frage. Neuere Arbeiten konnten zeigen, daß es neben der klassischen Form der NADPH-Oxidase der phagozytierenden Zellen (gp91<sup>phox</sup>) auch verwandte Formen in nicht-phagozytierenden Zellen („Nox“) gibt (Labeth et al., 2000; Edens et al., 2001; Lambeth, 2002). Die regulatorische p47<sup>phox</sup>-Untereinheit (Pani et al., 2001; Bokoch & Diebold, 2002) wird hierbei sowohl von phagozytierenden wie von nicht-phagozytierenden Zellen exprimiert (Vignais, 2001; Nauseef, 2004), während die Expression der gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit (glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 91 kDa) vor allem den phagozytierenden Zellen vorbehalten ist (Lambeth, 2002). Die entsprechenden Analoge der nicht-phagozytierenden Zellen werden mit Nox 1-5, sowie mit Duox 1-2 (Enzyme, die zusätzlich noch eine Peroxidase-Eigenschaft aufweisen) bezeichnet (Edens et al., 2001). Die gp91<sup>phox</sup> entspricht hierbei der Nox 2 (Lambeth et al., 2000). Es konnte nunmehr gezeigt werden, daß auch Leberparenchymzellen als nicht-phagozytierende Zellen Untereinheiten der NADPH-Oxidase exprimieren (#12,#13). Neben dem Nachweis der mRNA für die p47<sup>phox</sup>, Nox 1 und 2, sowie Nox 4 und Duox 1 und 2 in Leberparenchymzellen gelang auch der Nachweis von p47<sup>phox</sup>- und Nox 2-Protein mittels Western Blot-Analyse und Immunzytochemie (#12,#13). Somit weisen Leberparenchymzellen die für die Funktion der NADPH-Oxidase essentiellen Untereinheiten auf.

Im Weiteren konnte gezeigt werden, daß neben unspezifischen Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), Trolox, Melatonin oder Epicatechin (#4,#6) auch Inhibitoren der NADPH-Oxidase wie Apocynin, Neopterin und Diphenyliodonium die durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierte ROS-Bildung hemmen (#12,#13). Neben der pharmakologischen Hemmung der NADPH-Oxidase wurde

---

auch ein Protein-*knockdown* für die regulatorische NADPH-Oxidase-Untereinheit p47<sup>phox</sup> durchgeführt. Herunterregulation der p47<sup>phox</sup>-Proteinexpression führte zu einer deutlichen Hemmung der durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierten ROS-Bildung (#12,#13). Somit wurde die NADPH-Oxidase als Ursprung der „schnellen“ ROS-Bildung nach pro-apoptotischer Stimulation in Leberparenchymzellen identifiziert. Darüber hinaus unterhalten die Mitochondrien als ein zweiter, nachgeschalteter ROS-Generator die Aktivierung des CD95, wobei die Aktivierung der Mitochondrien erst über die Caspase 8 vermittelte Bid-Spaltung, also nach der initialen CD95-Aktivierung und Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC) durch Anlagerung der *Fas-associated death domain* (FADD) und der Caspase 8 an den CD95 erfolgt (Yin, 2000; Higuchi & Gores, 2003; Barnhart et al., 2003).

Die unmittelbare Bildung von Ceramiden nach Stimulation mit TNF $\alpha$  konnte bereits in neutrophilen Granulozyten gezeigt werden (Ohta et al., 1994). Die *knock out*-Maus der sauren Sphingomyelinase (*acidic sphigomyelinase*, ASMase) ist ein Tiermodell der Niemann-Pick-Krankheit Typ A oder B, die beim Menschen aufgrund einer gestörten Immunabwehr meist schon im frühen Kindesalter tödlich verläuft (Callahan & Khalil, 1976). Aus ASM-*knock out*-Mäusen isolierte Lymphozyten und Leberparenchymzellen weisen eine gehemmte CD95-vermittelte Apoptoserate auf (Paris et al., 2001; Grassme et al., 2003). Ferner vermag die ansonsten pro-apoptotische Gallensäure DCA (Desoxycholat) in ASMase-*knock out*-Mäusen keine Apoptose mehr auszulösen (Gupta et al., 2004). In eigenen Messungen konnte nun gezeigt werden, daß sowohl CD95L als auch hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität binnen 30 sec zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Ceramid-Spiegel führen, die dann für mindestens 30 min anhält (#12,#13). Inhibitoren der SMase, wie AY9944 und das trizyklische Antidepressivum Desipramin, hemmen die Ceramidbildung in unserem System. Die Ceramidbildung tritt also zeitgleich mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase auf.

Der Aktivierung der NADPH-Oxidase geht zumeist eine Aktivierung der zytosolisch lokalisierten, regulatorischen Untereinheit p47<sup>phox</sup> voraus (Pani et al., 2001; Bokoch & Diebold, 2002). Neben der Translokation der aktivierten p47<sup>phox</sup> zur Plasmamembran läßt sich deren Aktivierung auch durch Nachweis einer aktivierenden Serinphosphorylierung messen (Inanami et al., 1998; Johnson et al., 1998). Hierzu wurde die p47<sup>phox</sup> immunpräzipitiert und deren Aktivierung mittels Phospho-Serin-

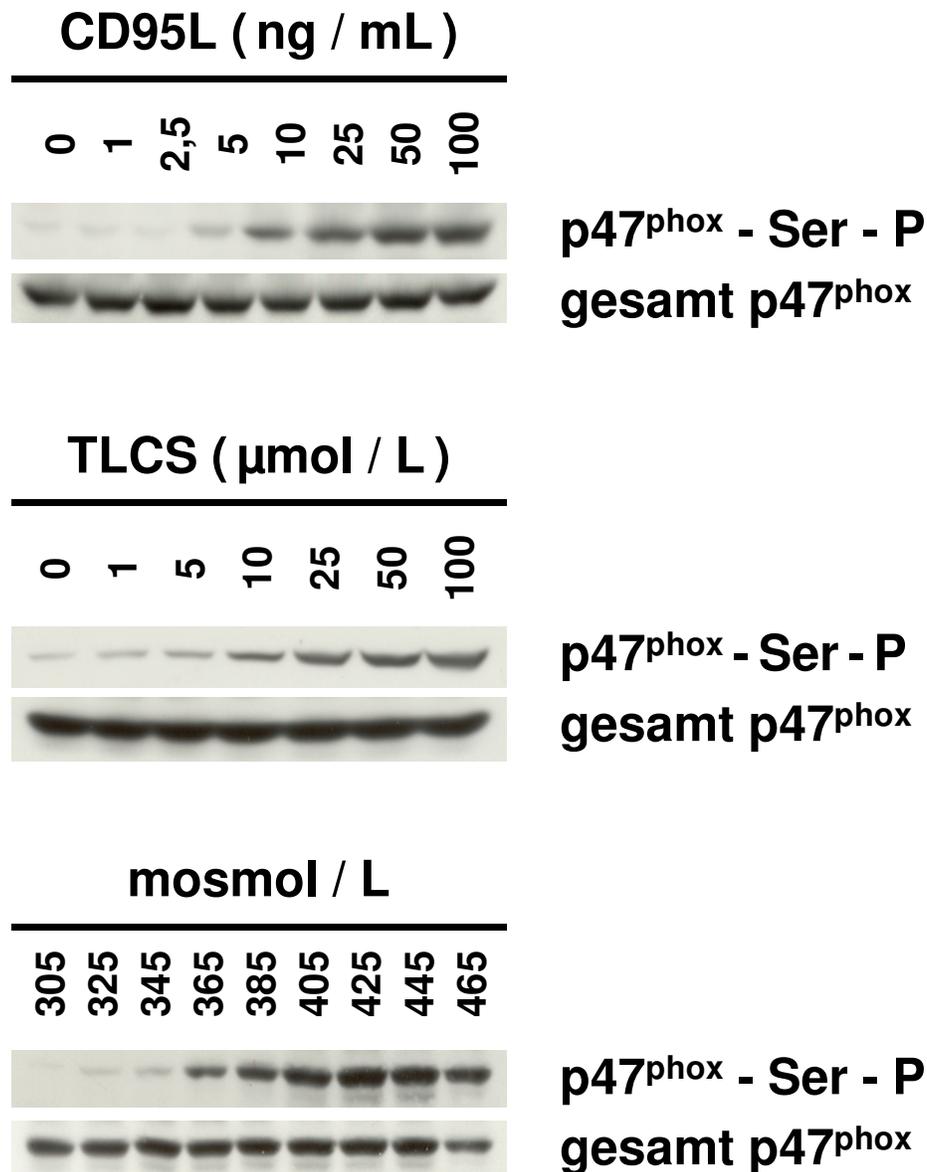
---

spezifischer Antikörper detektiert. Es konnte gezeigt werden, daß CD95L, hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität binnen 1 min zu einer aktivierenden Serinphosphorylierung der p47<sup>phox</sup> führen (#12,#13) (*Abbildung 3*).

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Serinreste der p47<sup>phox</sup>-Untereinheit ein Substrat der Proteinkinase C (PKC) $\zeta$  sind ([Dang et al. 2001](#); [Fontayne et al., 2002](#)), die wiederum durch Ceramide in ihrer Funktion als Serinkinase aktiviert wird ([Mathias et al., 1998](#)). Es konnte nunmehr gezeigt werden, daß Stimulation von Leberparenchymzellen mit CD95L, Gallensäuren oder Hyperosmolarität binnen 1 min zu einer Anreicherung der PKC $\zeta$  an der Plasmamembran führt (#12,#13). Darüber hinaus konnten Hemmstoffe der PKC $\zeta$ , wie Chelerythrin oder ein inhibitorisches Pseudosubstrat der PKC $\zeta$ , die aktivierende Serinphosphorylierung der p47<sup>phox</sup> verhindern (#12,#13).

Somit kommt es nach Stimulation von Leberparenchymzellen mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität zu einer umgehenden Freisetzung von Ceramiden durch eine SMase-Aktivität. Die Erhöhung der intrazellulären Ceramid-Konzentration führt dann zu einer Aktivierung der PKC $\zeta$ , die die p47<sup>phox</sup>-Untereinheit der NADPH-Oxidase phosphoryliert (#12,#13). Die aktivierende Serinphosphorylierung der p47<sup>phox</sup> führt zu deren Translokation zur Plasmamembran, wo sich weitere Untereinheiten der NADPH-Oxidase anlagern und den aktiven, ROS-bildenden Enzymkomplex formieren ([Inanami et al., 1998](#); [Johnson et al., 1998](#)).

Aus früheren Studien zum Zellvolumen in der perfundierten Rattenleber war bekannt, daß oxidativer Stress zu einer Zellschrumpfung führt ([Hallbrucker et al., 1992](#); [Saha et al., 1993](#)). Da hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität oxidativen Stress auslösen (siehe oben), wurden Experimente zum Zellvolumen an perfundierten Rattenlebern durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl hydrophobe Gallensäuren wie auch Hyperosmolarität binnen Minuten zu einer deutlichen Abnahme des Zellvolumens der Leberparenchymzellen führen. Diese Zellschrumpfung im intakten Organ war durch Inhibitoren der SMase (Desipramin) und der NADPH-Oxidase (Apocynin) sowie Antioxidanzien (NAC) teilweise hemmbar (Reinehr & Häussinger, unpublizierte Daten). Es kommt durch Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität also (auch im intakten Organ) zu einer schnellen ROS-Bildung, die zu einer Abnahme des Zellvolumens führt. Diese Zellschrumpfung ihrerseits führt aber auch wieder zu einer ROS-Bildung im Sinne eines sich selbst verstärkenden Regelkreises.



**Abbildung 3: Aktivierung der p47<sup>phox</sup>-Untereinheit der NADPH-Oxidase durch pro-apoptische Stimuli**

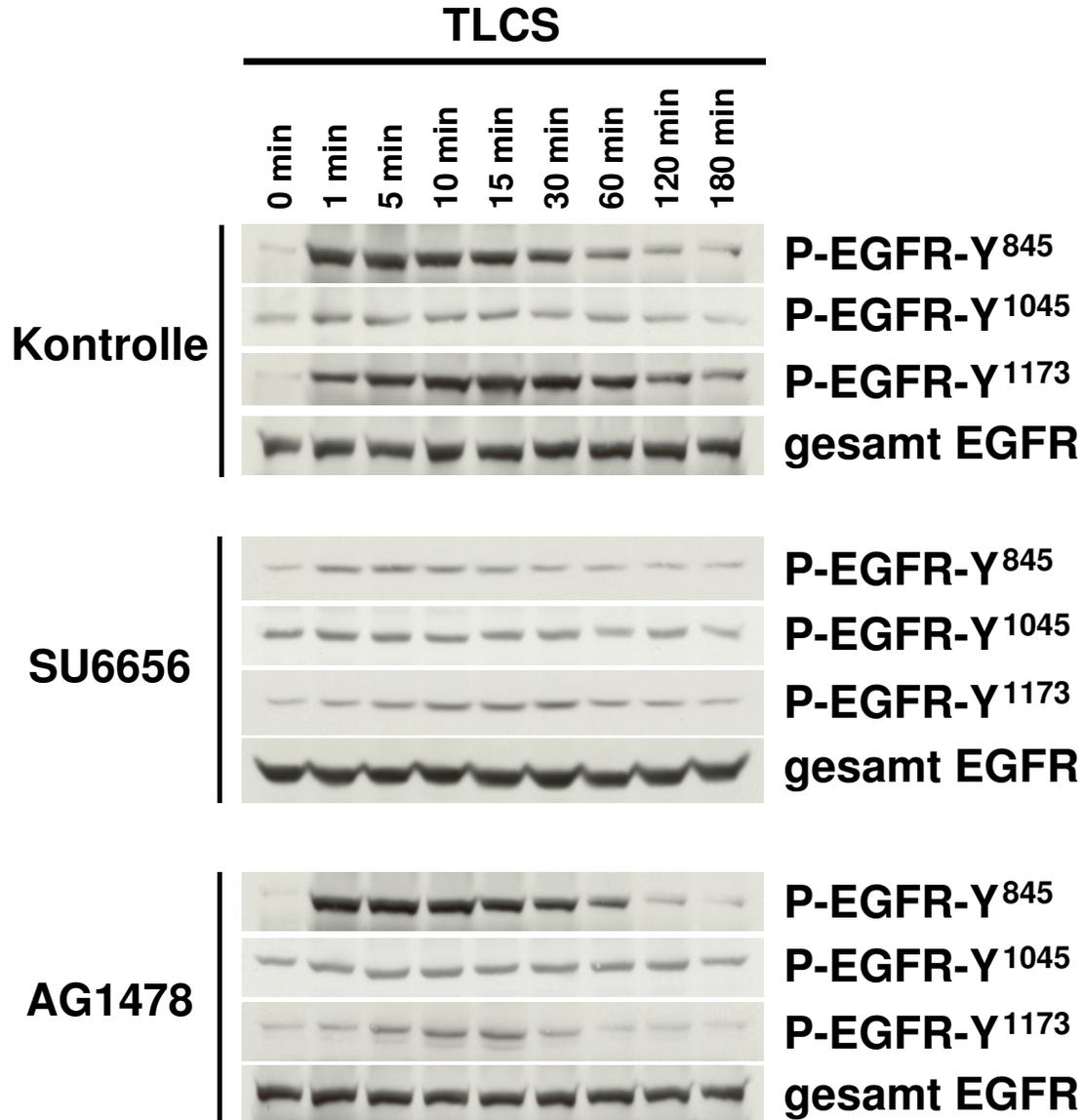
Die p47<sup>phox</sup> wurde nach entsprechender Stimulation immunpräzipitiert und mittels Western Blot-Analyse eine aktivierende Serinphosphorylierung detektiert. Zur Beladungskontrolle wurde die Gesamt-p47<sup>phox</sup>-Auftragsmenge bestimmt.

Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven für CD95-Ligand, die hydrophobe Gallensäure TLCS und Hyperosmolarität. Schon ca. 10 ng/mL CD95L, 10 μmol/L TLCS oder eine Anhebung der extrazellulären Osmolarität um 60 mosmol/L sind in der Lage, eine Aktivierung der p47<sup>phox</sup> in 24 h-kultivierten Leberparenchymzellen auszulösen.

### 4.3 EGFR-Transaktivierung durch die Src-Familien-Kinase Yes

Die umgehende ROS-Bildung nach Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität hat für die Leberparenchymzelle funktionelle Konsequenzen: es kommt im Folgenden zur Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes (#9,#10) und zur Aktivierung der MAP-Kinase JNK (#4,#6). Da die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#12) ebenso wie die Gabe des Phosphatase-Inhibitors Vanadat (#10) zu einer Aktivierung von Yes führt, erscheint eine durch die ROS-Bildung induzierte Hemmung einer Phosphatase als Ursache der Yes-Aktivierung wahrscheinlich (Knebel et al., 1996). Die Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes wurde mittels Yes-Immunpräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse detektiert, wobei ein Antikörper zum Einsatz kam, der gegen die phosphorylierte Form des Tyrosinrestes Tyr<sup>418</sup> innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne gerichtet ist (#9,#10,#12). Es konnte gezeigt werden, daß es nach Stimulation von Leberparenchymzellen mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität binnen 1 min zur aktivierenden Tyr<sup>418</sup>-Phosphorylierung der Yes-Kinase kommt (#9,#10,#12). Nach Aktivierung der Src-Familien-Kinase Src durch Cholezystokinin ist eine Src-vermittelte *Epidermal growth factor*-Rezeptor (EGFR)-Transaktivierung beschrieben (Piiper et al., 2003). Das Tyrosinmotiv Tyr<sup>418</sup> innerhalb der Tyrosinkinasedomäne der Kinasen der Src-Familie entspricht hierbei dem Tyr<sup>845(\*)</sup> innerhalb der EGFR-Tyrosinkinasedomäne (Biscardi et al., 1999). Durch Koimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, das Yes und EGFR binnen 1 min nach Stimulation assoziieren. Im Weiteren konnte durch phosphospezifische Antikörper gezeigt werden, daß es ebenfalls binnen 1 min zu einer Tyrosin<sup>845(\*)</sup>-Phosphorylierung des EGFR kommt (#9,#10,#12) (Abbildung 4). Dadurch erhält der EGFR selbst eine Tyrosinkinase-Aktivität und phosphoryliert sich selbst, gemessen an der Zunahme der Tyrosin<sup>1173(\*)</sup>-Phosphorylierung am C-Terminus des EGFR. Daß es sich hierbei um eine Yes-vermittelte Transaktivierung des EGFR handelt, zeigt die Tatsache, daß nur die Phosphorylierung am Tyr<sup>1173(\*)</sup>, nicht aber am Tyr<sup>845(\*)</sup>, AG1478 (Hemmstoff der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität) hemmbar waren, während SU6656 als Hemmstoff der Yes-Tyrosinkinase-Aktivität sowohl die EGFR-Phosphorylierung am Tyr<sup>845(\*)</sup>, als auch am Tyr<sup>1173(\*)</sup> hemmte (#9,#10,#12) (Abbildung 4). Abschließend führte neben den pharmakologischen Inhibitoren der Src-Familien-Kinase Yes auch der durch Antisense-Oligonukleotide induzierte Yes-Protein-*knockdown* zu einer signifikanten Hemmung der EGFR-Transaktivierung (#9,#10,#12).

(\*) Bezeichnung der Tyrosinreste entsprechend der Nomenklatur des humanen EGFR



**Abbildung 4: Aktivierung des epidermal growth factor-Rezeptors (EGFR) durch pro-apoptische Stimuli**

Die Phosphorylierung des EGFR an den Tyrosinresten Y<sup>845(\*)</sup> (Src-target innerhalb der Tyrosinkinasedomäne), Y<sup>1045(\*)</sup> (Anbindungsstelle für cbl) und Y<sup>1173(\*)</sup> (Indikator der Autophosphorylierung) wurden mittels phosphospezifischer Antikörper und Western Blot-Analyse in 24 h-kultivierten Leberparenchymzellen bestimmt. [(\*) Nomenklatur des humanen EGFR]

Die hydrophobe Gallensäure TLCS führt binnen 1 min zu einer Phosphorylierung am Tyrosinrest Y<sup>845(\*)</sup> und Y<sup>1173(\*)</sup>. Durch Hemmung der Src-Familien-Kinase Yes mittels SU6656 unterbleibt die Yes-vermittelte Phosphorylierung an Y<sup>845(\*)</sup> und somit auch die Autophosphorylierung an Y<sup>1173(\*)</sup>. Eine Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität mittels AG1478 hemmt zwar die Autophosphorylierung an Y<sup>1173(\*)</sup>, nicht aber die Yes-vermittelte Phosphorylierung an Y<sup>845(\*)</sup>.

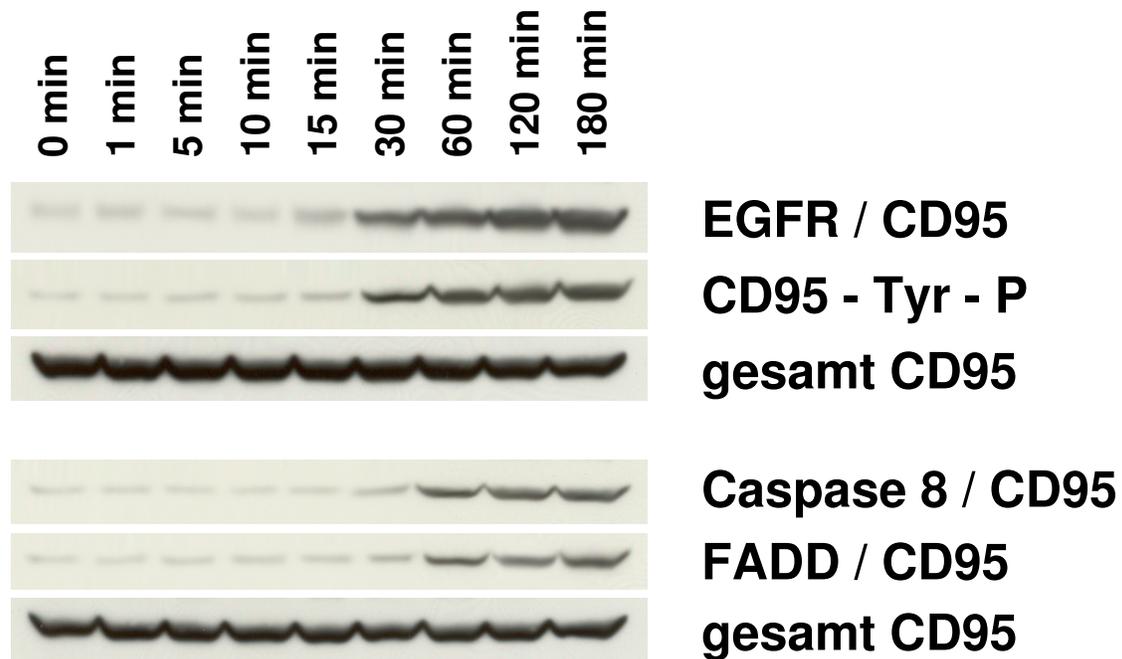
Für CD95L und Hyperosmolarität ergab sich ein vergleichbares Phosphorylierungsmuster und Inhibitorprofil.

Während die Aktivierung des EGFR durch EGF selber zu einer Rezeptor-Dimerisierung und Internalisierung führt (Haj et al., 2002; Gill 2002), kommt es nach EGFR-Transaktivierung nicht zwingend zu einer Deaktivierung am ER (Leserer et al., 2000; Gill 2002) (#11). Nach EGF-induzierter EGFR-Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung am Tyr<sup>1045(\*)</sup> und zur nachfolgenden Anlagerung des *docking*-Proteins cbl (#10). Die Anlagerung von cbl an den EGFR ist mit dessen Internalisierung vergesellschaftet (Levkowitz et al, 1998; De Melker et al., 2001; Soubeyran et al. 2002). Nach Yes-vermittelter EGFR-Transaktivierung kommt es weder zu einer Phosphorylierung des Tyr<sup>1045(\*)</sup> (Abbildung 4), noch zur Anlagerung von cbl (#10). Im Weiteren konnte durch immunzytochemische Färbung gezeigt werden, daß der EGFR in Leberparenchymzellen zum Teil membranständig und zum Teil intrazellulär lokalisiert ist und nach Yes-vermittelter Transaktivierung zur Plasmamembran transloziert (#11). Binnen 1 h ist Yes wieder vollständig vom EGFR abdissoziiert, wie durch Koimmunpräzipitationsstudien gezeigt werden konnte (#9,#10,#12). Cyclisches AMP induziert über die Proteinkinase A (PKA) eine Serin/Threoninphosphorylierung von Yes. Diese verhindert die Assoziation von Yes mit dem EGFR und hemmt somit die durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierte EGFR-Transaktivierung (#10).

#### 4.4 Kovalente Modifikationen des CD95-Rezeptors

Nachdem es durch Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität zu einer über die ROS-Bildung vermittelten Yes-Aktivierung und nachfolgender EGFR-Transaktivierung kam, konnte nunmehr durch Koimmunpräzipitationsstudien gezeigt werden, daß es JNK-vermittelt zu einer Assoziation des EGFR mit dem CD95 kommt (#4,#6), es gelang also der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion zwischen einem (sogenannten) Wachstumsfaktor- und einem (sogenannten) Todesrezeptor. Im Weiteren konnte gezeigt werden, daß der CD95 nunmehr Substrat für die Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR war, der CD95 also Tyrosin-phosphoryliert wurde (#4,#6) (Abbildung 5). Neben der pharmakologischen Hemmung der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität mittels AG1478 (#4,#6) führte auch der EGFR-Protein-*knockdown* mittels Antisense-Oligonukleotiden zu einer signifikanten Abnahme der durch CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierten CD95-Tyrosinphosphorylierung (#9, #10).

## CD95 Ligand



**Abbildung 5: EGFR-vermittelte Tyrosinphosphorylierung des CD95 durch pro-apoptotische Stimuli**

Der CD95 von 24 h-kultivierten Leberparenchymzellen wurde nach entsprechender Stimulation immunpräzipitiert. Eine Assoziation des EGFR, Tyrosinphosphorylierung des CD95 und Assoziation von FADD und Caspase 8 an den CD95 wurden mittels Western Blot-Analyse detektiert. Zur Beladungskontrolle wurde die Gesamt-CD95-Auftragsmenge bestimmt.

Binnen 30 min kommt es nach Stimulation mit CD95L zu einer CD95/EGFR-Assoziation und zu einer (EGFR-vermittelten) CD95-Tyrosinphosphorylierung. Binnen 60 min kommt es dann zu einer Anlagerung von FADD und Caspase 8 (DISC-Bildung) an den CD95.

Für hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität wurden vergleichbare Daten erhoben.

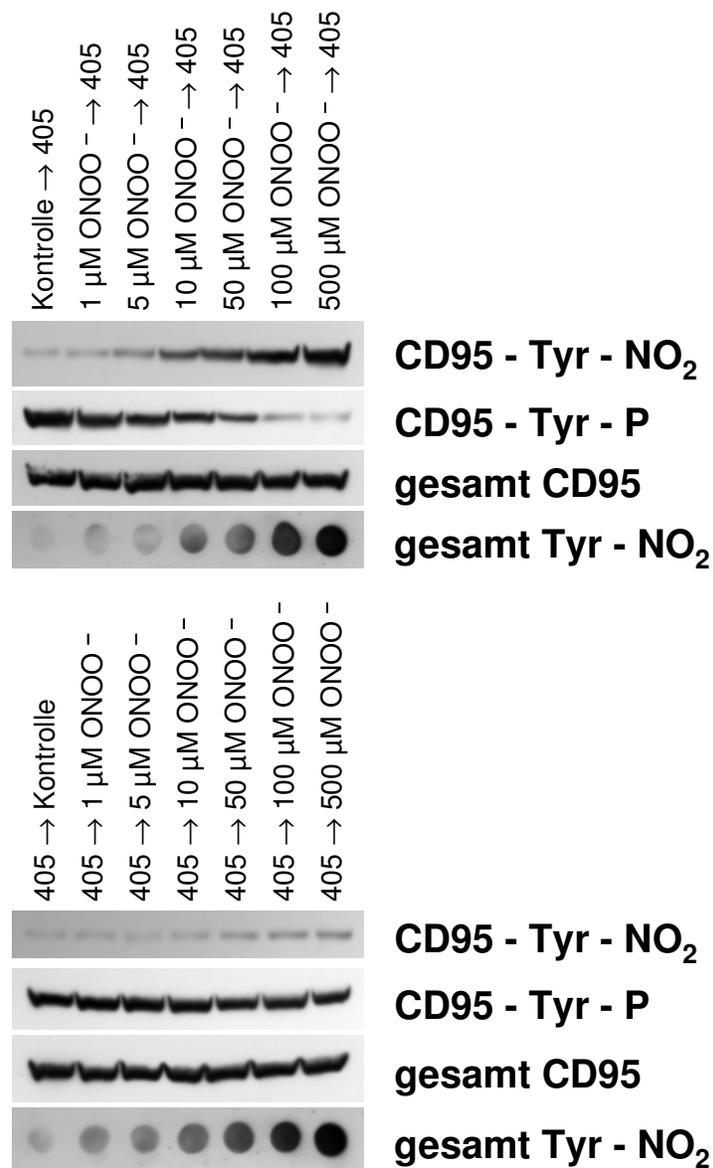
Die CD95-Tyrosinphosphorylierung konnte als notwendige Bedingung für die Translokation des CD95 zur Plasmamembran identifiziert werden, da alle pharmakologischen Inhibitoren der CD95-Tyrosinphosphorylierung ebenso wie der Protein-*knockdown* von p47<sup>phox</sup>, Yes und EGFR zu einer Hemmung der Translokation des CD95 zur Plasmamembran führten (#1,#2,#4-#13). Es konnte bereits gezeigt werden, daß Colchizin Mäuse *in vivo* vor der CD95L-vermittelten Apoptose schützt,

---

wobei der molekulare Mechanismus unklar blieb ([Feng & Kaplowitz, 2000](#)). In unserem System führte die Hemmung des Mikrotubulusapparates der Leberparenchymzellen durch Colchizin oder Taxol nicht zu einer Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung, aber die Translokation des CD95 zur Plasmamembran und die Anlagerung von FADD und Caspase 8 (DISC-Bildung) blieben aus (#11,#12). Somit setzt die CD95-Translokation einen intakten Mikrotubulusapparat voraus und die Bildung des DISC die Translokation des CD95 zur Plasmamembran.

Um die Spezifität der CD95-Tyrosinphosphorylierung für die Translokation des CD95 zur Plasmamembran, DISC-Bildung und Apoptose weiter zu klären, wurde ein weiteres experimentelles Modell zur Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung etabliert. Wird ein Tyrosinrest an 3'-Position des aromatischen Ringes nitriert, so kann er an 4'-Position nicht mehr phosphoryliert werden ([Kong et al., 1996](#); [Brito et al., 1999](#)). Eine unselektive Protein-Tyrosinnitrierung wurde durch die Gabe von Peroxynitrit erzielt ([Goldstein et al., 2000](#)) (#8). Durch CD95-Immunpräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß auch der CD95 durch Peroxynitrit an seinen Tyrosinresten nitriert wird (#6). Eine zuvor induzierte CD95-Tyrosinnitrierung schloß eine CD95-Phosphorylierung aus und umgekehrt (*Abbildung 6*). Somit ließ sich auch die Translokation des CD95 zur Plasmamembran, DISC-Bildung und Apoptose durch Peroxynitrit hemmen (#8). Neben diesem *in vitro*-Modell ließ sich die CD95-Tyrosinnitrierung auch *in vivo* nachweisen. Eine 24-stündige intraperitoneale Gabe von Endotoxin (4 mg / kg Körpergewicht) führte zu einer deutlichen Zunahme der Gesamtprotein-Tyrosinnitrierung wie auch der CD95-Tyrosinnitrierung (#8). Somit konnte die CD95-Tyrosinnitrierung auch *in vivo* als möglicher Regulationsmechanismus der CD95-vermittelten Apoptose identifiziert werden.

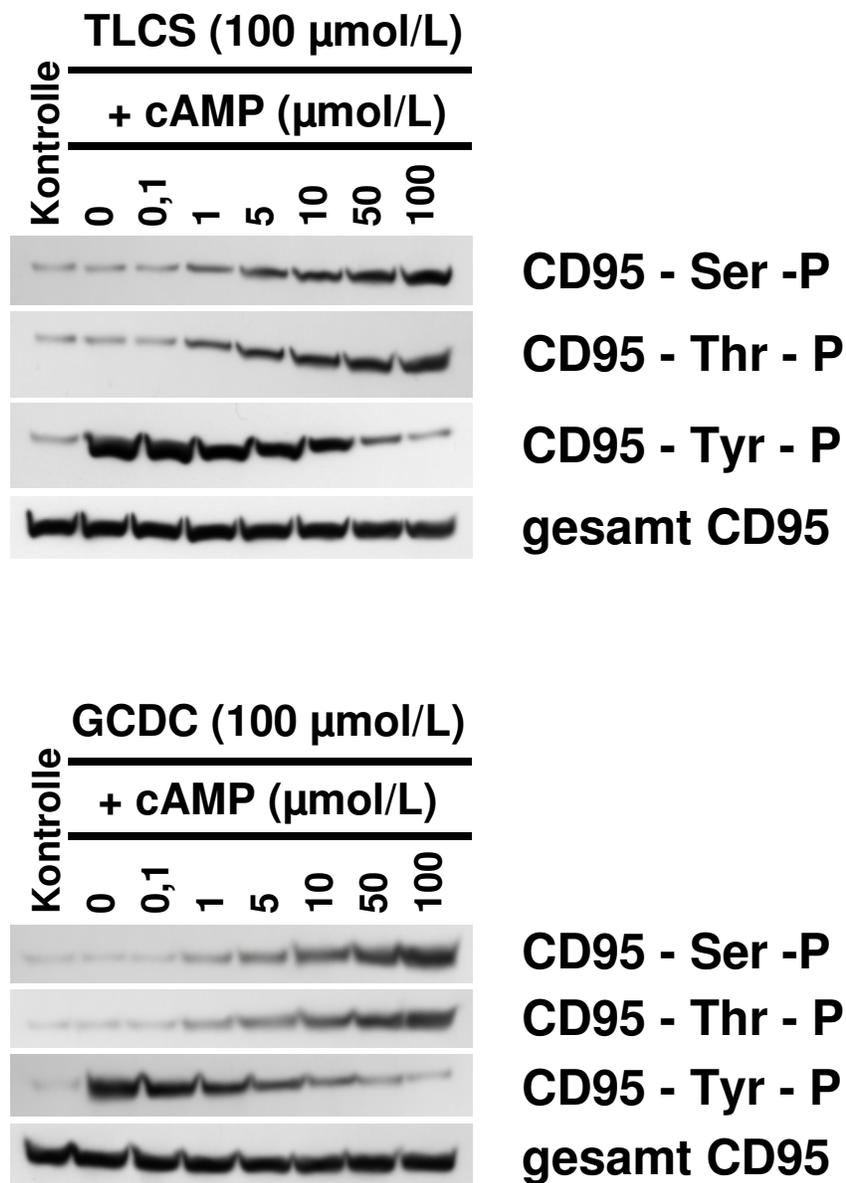
Cyclisches AMP hemmt die CD95L- (#1,#4) und die durch hydrophobe Gallensäuren induzierte Apoptose ([Webster & Anwer, 1998](#), [Martin et al., 2001](#); [Webster et al., 2002](#)) (#5,#7,#10). Neben der Hemmung der Yes-vermittelten EGFR-Transaktivierung (siehe oben) kommt es nach Inkubation von cAMP zu einer PKA-vermittelten Serin/Threoninphosphorylierung des CD95 (#7) (*Abbildung 7*). Diese Serin/Threoninphosphorylierung führt zu einer Internalisierung des CD95.



**Abbildung 6: Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>)-induzierte CD95-Tyrosinnitrierung**

Der CD95 von 24 h-kultivierten Leberparenchymzellen wurde nach entsprechender Stimulation immunpräzipitiert. Nitrierung (-NO<sub>2</sub>) und Phosphorylierung (-P) der CD95-Tyrosinreste wurden mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Zur Beladungskontrolle wurde die Gesamt-CD95-Auftragsmenge bestimmt, zur Kontrolle der Induktion der Nitrierung die Gesamtprotein-Tyrosinnitrierung im Dot Blot detektiert.

24 h-kultivierte Leberparenchymzellen wurden entweder zuerst mit aufsteigenden Konzentrationen von Peroxynitrit inkubiert und dann mit hyperosmolarem Medium stimuliert oder umgekehrt. Es zeigte sich, daß bei zunehmender Induktion einer CD95-Tyrosinnitrierung die durch Hyperosmolarität induzierbare CD95-Tyrosinphosphorylierung abnimmt. Wurde durch Hyperosmolarität zuerst eine CD95-Tyrosinphosphorylierung induziert, war durch Peroxynitrit keine CD95-Tyrosinnitrierung mehr induzierbar. CD95-Tyrosinnitrierung und -phosphorylierung schließen sich somit aus.



**Abbildung 7: Cyclisches AMP induziert eine CD95-Serin/Threoninphosphorylierung**

Der CD95 von 24 h-kultivierten Leberparenchymzellen wurde nach entsprechender Stimulation immunpräzipitiert und mittels Western Blot-Analyse eine Phosphorylierung an seinen Serin (Ser)-, Threonin (Thr)- und Tyrosin (Tyr)-Resten detektiert. Zur Beladungskontrolle wurde die Gesamt-CD95-Auftragsmenge bestimmt.

Die hydrophoben Gallensäuren TLCS und GCDC wurden in fester Dosierung (100  $\mu\text{mol/L}$ ) zusammen mit cAMP in aufsteigender Konzentration (0-100  $\mu\text{mol/L}$ ) inkubiert. TLCS und GCDC induzieren in Abwesenheit von cAMP eine CD95-Tyrosinphosphorylierung. Aufsteigende Konzentrationen von cAMP hemmen diese Tyrosinphosphorylierung (durch Hemmung der Yes-vermittelten EGFR-Transaktivierung) und bedingen eine Ser/Thr-Phosphorylierung des CD95.

Für CD95L und Hyperosmolarität wurden vergleichbare Daten erhoben.

---

Gibt man z.B. cAMP nachdem eine CD95-Translokation durch eine hydrophobe Gallensäure bereits induziert wurde, so kommt es zu einer deutlich beschleunigten Internalisierung des CD95 von der Plasmamembran in das Zytosol vergesellschaftet mit einer Hemmung der Apoptoserate (#7).

Die hydrophobe Gallensäure Taurochenodesoxycholat (TCDC) stellt einen Sonderfall der durch hydrophobe Gallensäuren induzierten CD95-Aktivierung dar. Frühere Studien hatten gezeigt, daß es nach TCDC-Gabe zur Aktivierung eines sogenannten Phosphoinositid (PI)-3-Kinase-Überlebenssignalwegs (*PI-3-kinase survival pathway*) kommt und daß nur bei gleichzeitiger Gabe von TCDC und Inhibitoren der PI-3-Kinase die Apoptose auch exekutiert wird (Takikawa et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, daß es nach Stimulation mit TCDC zur EGFR-vermittelten CD95-Tyrosinphosphorylierung und CD95-Translokation zur Plasmamembran kommt (#4). Nur bei gleichzeitiger Inkubation von LY294002 oder Wortmannin als Inhibitoren der PI-3-Kinase findet hingegen die Anlagerung der FADD und der Caspase 8 an den CD95 statt, d.h. die PI-3-Kinase hemmt die CD95-vermittelte Apoptose auf Höhe der DISC-Bildung (#6).

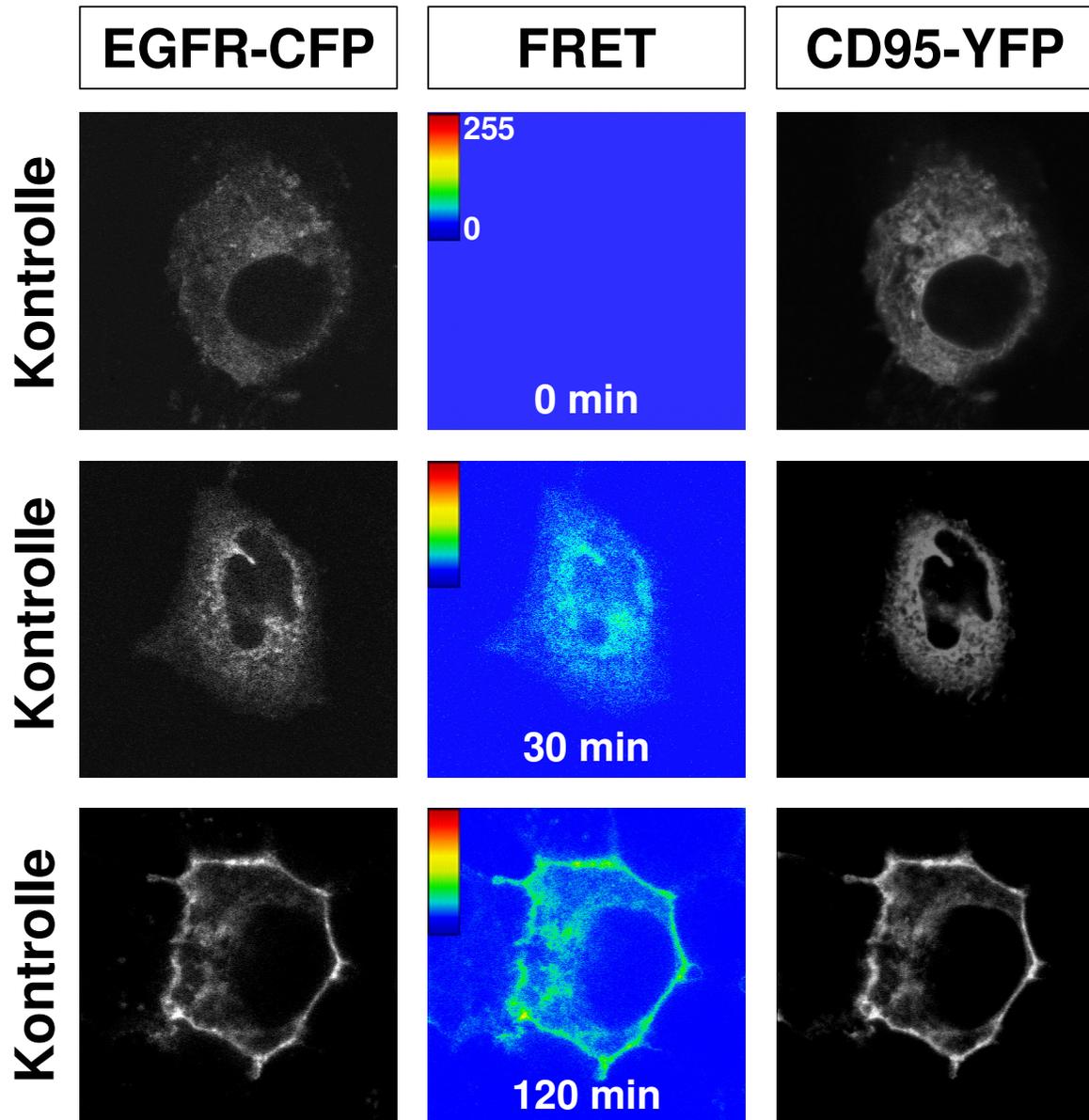
Nach Bildung des DISC kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspase 8 (#1,#4,#6,#12) mit nachfolgender Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (#3,#12), was wiederum zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 führt (#1,#4,#6,#12). Es konnte im Modell der Gallengangsligatur (*bile duct ligation*, BDL) gezeigt werden, daß die sonst beobachtete Leberschädigung durch Cholestase-bedingte Apoptose durch Beimengung des organischen Osmolytes Betain zum Trinkwasser der Ratten deutlich gehemmt werden konnte (#3). In Zellkulturversuchen zeigte sich, daß Betain weder die durch hydrophobe Gallensäuren induzierte, EGFR-vermittelte CD95-Tyrosinphosphorylierung noch die Translokation des CD95 zur Plasmamembran mit nachfolgender DISC-Bildung hemmen konnte, während hingegen die Aktivität der Caspase 8 und die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien durch Betain deutlich gehemmt wurden (#3).

Somit konnten insgesamt drei kovalente Modifikationen des CD95 im Rahmen dieser Arbeit erstbeschrieben werden: 1) CD95-Tyrosinphosphorylierung führt zur Translokation des CD95 zur Plasmamembran und nachfolgenden DISC-Bildung, 2) CD95-Tyrosinnitrierung verhindert dessen Tyrosinphosphorylierung und damit Translokation, DISC-Bildung und Apoptose und 3) CD95-Serin/Threoninphosphorylierung führt zur CD95-Internalisierung und hemmt die Apoptose.

#### 4.5 Darstellung der CD95/EGFR-Interaktion mittels FRET

Um die Frage zu klären, wo in der Zelle es zur CD95/EGFR-Assoziation kommt und ob beide Rezeptoren einzeln oder als Komplex zur Membran translozieren, wurden CD95-YFP- und EGFR-CFP-Konstrukte generiert und in humane Hepatom (Huh)7-Zellen transfiziert (#8,#9,#11-#13). Huh7-Zellen exprimieren keinen CD95 (Seki et al., 1999). Somit konnte man in untransfizierten Huh7-Zellen auch mit CD95L keine Apoptose induzieren (#11). Nach Transfektion mit dem CD95-YFP-Konstrukt hingegen ließ sich sowohl eine durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität induzierte CD95-YFP-Translokation zur Plasmamembran (#8,#9,#11-#13) wie auch eine CD95L-induzierte Apoptose (#11) und somit die Funktionalität des CD95-YFP-Konstruktes nachweisen. Die Funktionalität des EGFR-CFP-Konstruktes wurde durch EGF-induzierte EGFR-Internalisierung gezeigt (#11). Bei gleichzeitiger Transfektion von CD95-YFP und EGFR-CFP in Huh7-Zellen ließ sich die Interaktion der beiden Rezeptoren in Einzelzellen nachweisen. Nach Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität kam es binnen 30 min zu einer JNK-vermittelten intrazellulären Assoziation der beiden Rezeptoren (intrazellulärer FRET-Effekt). Binnen 120 min kam es zur Umverteilung der beiden Rezeptoren als Protein-Protein-Komplex an die Plasmamembran (membranständiger FRET-Effekt) (#11) (*Abbildung 8-1*). Pharmakologische Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung hatte keinen Einfluß auf die intrazelluläre Assoziation der beiden Rezeptoren, hemmte aber deren Translokation zur Plasmamembran (#11-#13). Colchizin und Taxol, 2 Hemmstoffe des Mikrotubuliapparates, hemmten ebenfalls die Translokation des Proteinkomplexes, hatten aber keinen Einfluß auf die CD95-Tyrosinphosphorylierung (#11,#13) (*Abbildung 8-2*).

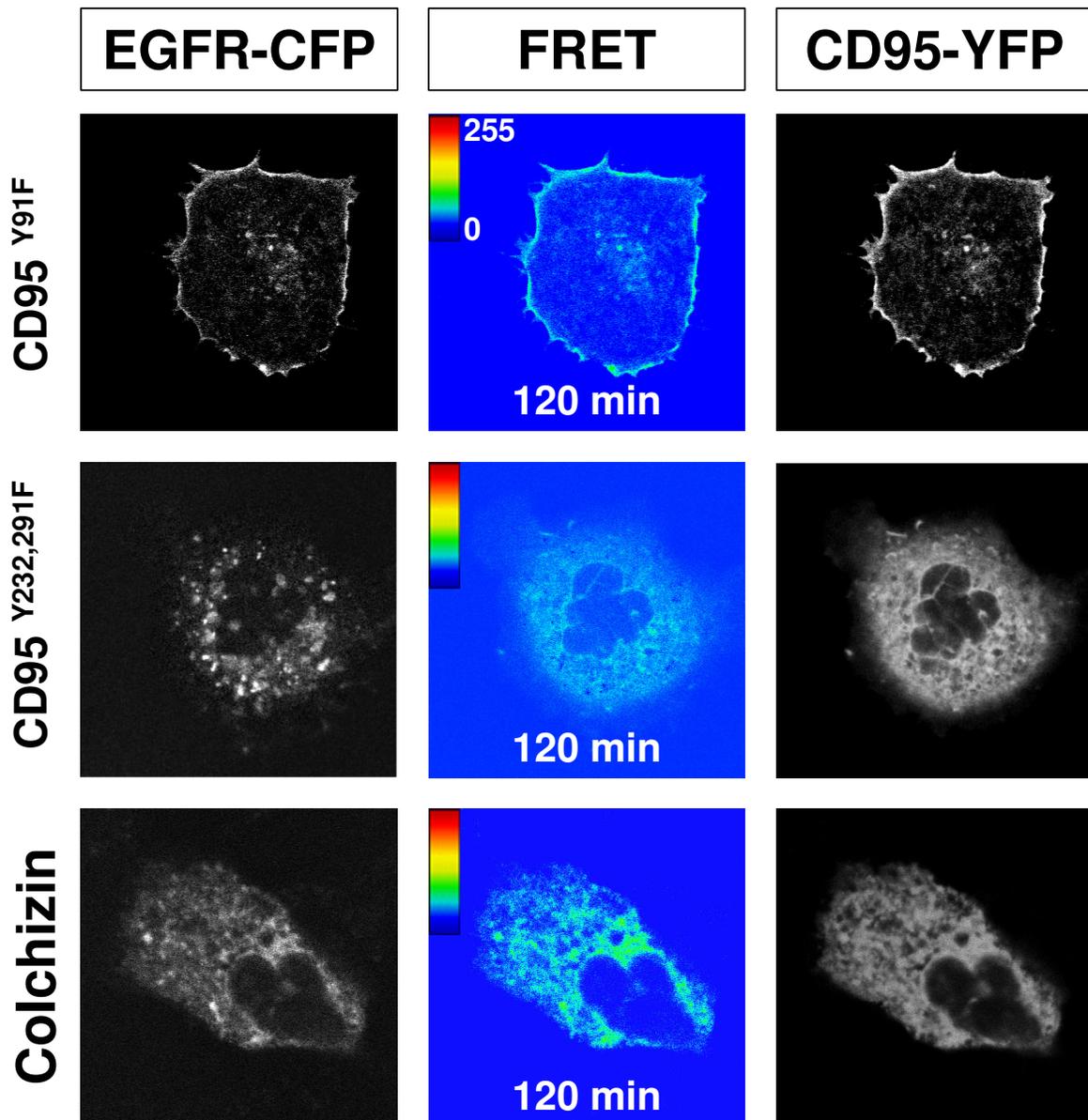
Da der CD95 insgesamt nur drei Tyrosinreste (Tyr<sup>91</sup>, Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup>) aufweist, wurden alle möglichen Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten mit Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin generiert (#11). Phenylalanin fehlt die Hydroxylgruppe an 4'-Position des aromatischen Ringes und somit die Möglichkeit zur Phosphorylierung bei vergleichbaren elektrostatischen Eigenschaften gegenüber dem Tyrosin.



**Abbildung 8-1: Darstellung der CD95/EGFR-Interaktion mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Mikroskopie**

Huh7-Zellen wurden mit den fluoreszierenden CD95-YFP- und EGFR-CFP-Konstrukten kotransfiziert. Die Zellen wurden dann mit der hydrophoben Gallensäure TLCS stimuliert und die CD95/EGFR-Interaktion mittels FRET visualisiert.

Zum Zeitpunkt 0 min werden die CD95-YFP- und EGFR-CFP-Konstrukte nebeneinander in der Zelle exprimiert, es ist kein FRET-Phänomen meßbar. Innerhalb von 30 min kommt es zu einer intrazellulären Assoziation der beiden Rezeptoren, gemessen an dem intrazellulär detektierbaren FRET-Phänomen. Nach 120 min ist auch an der Plasmamembran ein FRET-Phänomen meßbar und ein Indiz dafür, daß der CD95/EGFR-Proteinkomplex zur Plasmamembran transloziert ist.



**Abbildung 8-2: Darstellung der CD95/EGFR-Interaktion mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Mikroskopie**

Huh7-Zellen wurden mit den fluoreszierenden CD95-YFP- und EGFR-CFP-Konstrukten kotransfiziert. Die Zellen wurden dann mit der hydrophoben Gallensäure TLCS stimuliert und die CD95/EGFR-Interaktion mittels FRET visualisiert.

Während ein Austausch des Tyrosinrestes Y<sup>91</sup> des CD95 gegen Phenylalanin keinen Einfluß auf die intrazelluläre Assoziation mit dem EGFR und die anschließende Translokation des Proteinkomplexes zur Plasmamembran hatte, wird durch Austausch der beiden Tyrosinreste innerhalb der Todesdomäne des CD95 (Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup>) gegen Phenylalanin die Translokation des CD95 zur Plasmamembran verhindert. Ebenso vermag eine Vorinkubation mit Colchizin und die daraus resultierende Hemmung der Mikrotubuli die Translokation des Wildtyp-CD95 zur Plasmamembran zu hemmen. Für CD95L und Hyperosmolarität wurden vergleichbare Daten erhoben.

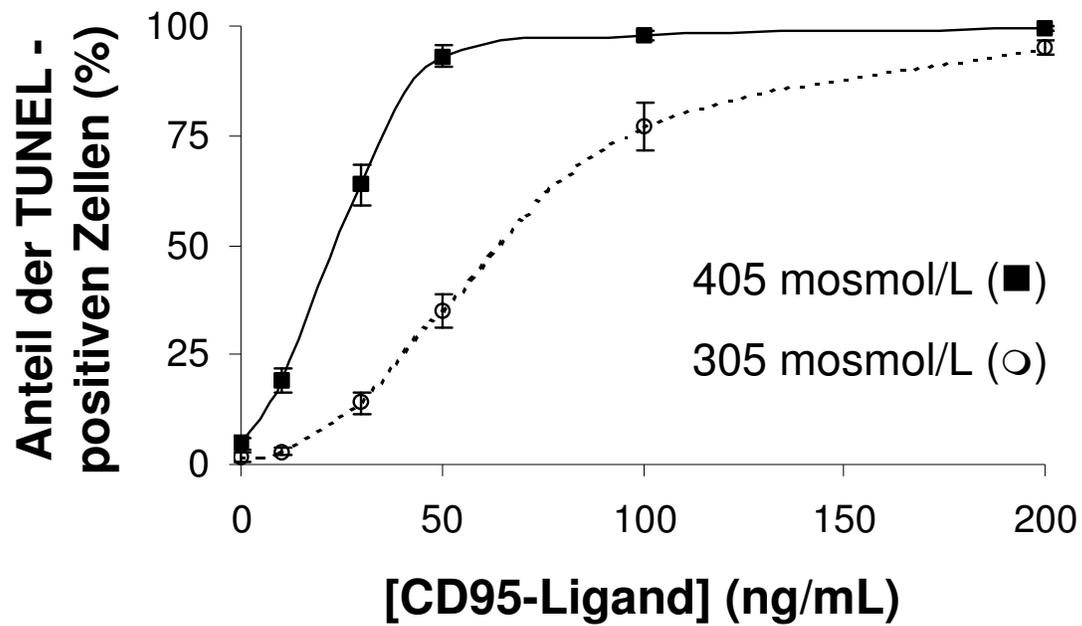
---

Während der Tyr→Phe-Austausch an Tyr<sup>91</sup> keinen Einfluß auf die Translokation des CD95 zur Plasmamembran hat, kommt es nach Tyr→Phe-Austausch in Position Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup> zu einer Hemmung der Translokation des CD95/EGFR-Komplexes zur Plasmamembran, nachfolgenden DISC-Bildung und Apoptose (#11,#13) (*Abbildung 8-2*). Somit wurden die beiden Tyrosinreste innerhalb der Todesdomäne des CD95 (Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup>) als kritisch für die CD95-vermittelte Apoptose identifiziert.

#### **4.6 CD95-vermittelte Apoptoseinduktion**

CD95L und hydrophobe Gallensäuren induzieren in Leberparenchymzellen nach der Bildung des DISC eine Aktivierung der Caspase 8, gefolgt von einer mitochondrialen Amplifikation, Aktivierung der Caspase 3 und schließlich der Exekution des apoptotischen Zelltodes ([Lemasters, 1999](#); [Higuchi & Gores 2003](#)) (#1-#13). Es konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, daß alle Manöver (pharmakologische Inhibitoren, Protein-*knockdown* von Signaltransduktionselementen), die zu einer Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung und Translokation des CD95 zur Plasmamembran führten, auch die CD95-vermittelte Apoptose hemmen (#1,#2,#4-#13). Eine Ausnahme bildet hierbei die Aktivierung des CD95-Systems durch hyperosmolare Stimulation. Hierbei kam es zwar auch zu einer CD95-Tyrosinphosphorylierung, Translokation zur Plasmamembran, Bildung des DISC mit Aktivierung der Caspase 8 und sogar Aktivierung der Caspase 3, der apoptotische Zelltod hingegen wird nicht exekutiert (#1,#4,#8,#9,#11). Somit gibt es im Falle der hyperosmolaren CD95-Aktivierung entweder Mechanismen unterhalb der Caspase 3, die den apoptotischen Zelltod verhindern, oder es existieren im Falle von CD95L und hydrophoben Gallensäuren bisher unbekannte Kosignale, deren Vorhandensein für die Exekution der Apoptose zwingend notwendig ist.

Funktionelle Konsequenz der hyperosmolar induzierten CD95-Aktivierung in Leberparenchymzellen ist somit nicht die Apoptose *per se*, sondern die (potenziell reversible) Sensibilisierung der Zellen gegenüber der CD95L-vermittelten Apoptose (*Abbildung 9*).



**Abbildung 9: Hyperosmolarität steigert die Sensitivität von Leberparenchymzellen gegenüber der CD95-Ligand-induzierten Apoptose**

Leberparenchymzellen wurden für 24 h kultiviert und dann für 3 h mit normoosmolarem (305 mosmol/L; ○) oder hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L; ■) stimuliert. Dann wurde CD95L in verschiedenen Konzentrationen für weitere 12 h inkubiert und der Anteil der apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Assay bestimmt.

## 5. Diskussion

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunden im Hinblick auf die Literaturlage und die möglichen, sich ableitenden Schlußfolgerungen diskutiert. Ein Schwerpunkt liegt hierbei auf den Signaltransduktionsmechanismen der CD95-vermittelten Apoptose in Leberparenchymzellen.

### 5.1 Eine schnelle Bildung von oxidativem Stress ist der Initiator der CD95-vermittelten Apoptose

Pro-apoptotische Stimuli, wie CD95L, hydrophobe Gallensäuren oder hyperosmotische Zellschrumpfung induzieren eine sofortige ROS-Bildung. Eine Hemmung dieser ROS-Bildung führte auch zu einer Hemmung der Apoptose, als Indiz dafür, daß diese „schnelle“ ROS-Bildung notwendige Bedingung der CD95-vermittelten Apoptose ist (#3,#4,#6,#7,#12,#13). Bisher galten vor allem die Mitochondrien als Ursprung der durch pro-apoptische Stimuli (Lemasters et al., 1998; Jaeschke et al., 2002) ausgelösten ROS-Bildung, inklusive der durch Liganden der TNF-Rezeptorfamilie (Stadler et al., 1992). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität ausgelöste ROS-Bildung die Aktivierung der NADPH-Oxidase miteinbezieht (#12,#13). Die Expression von Isoformen der NADPH-Oxidase konnte erstmals in Leberparenchymzellen beschrieben werden: es gelang der Nachweis von mRNA für die p47<sup>phox</sup>-Untereinheit, die Nox 1,2 und 4, sowie für die Duox 1 und 2, sowie der Nachweis der Proteinexpression für die p47<sup>phox</sup> und die gp91<sup>phox</sup> (= Nox 2) (#12,#13). Ein weiterer Hinweis für die NADPH-Oxidase als Ursprung der beobachteten ROS-Bildung gelang durch den Nachweis einer aktivierenden Serin-Phosphorylierung der regulatorischen p47<sup>phox</sup>-Untereinheit nach Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität. Im Weiteren konnte ein p47<sup>phox</sup>-Protein-*knockdown* die ROS-Bildung ebenso effektiv hemmen, wie pharmakologische Inhibitoren der NADPH-Oxidase (#12,#13). In Jurkat-Zellen war eine Diphenyl-iodonium-sensitive ROS-Bildung durch CD95-aktivierende Antikörper bereits beschrieben (Suzuki et al., 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten schließen die Mitochondrien als Ursprung einer im Rahmen der Apoptose beobachteten ROS-Bildung nicht aus (Sokol et al., 1995; Lemasters, 1999; Yerushalmi et al., 2001; Higuchi & Gores 2003), doch scheint den Mitochondrien eher die Rolle eines Amplifikators und Perpetuators

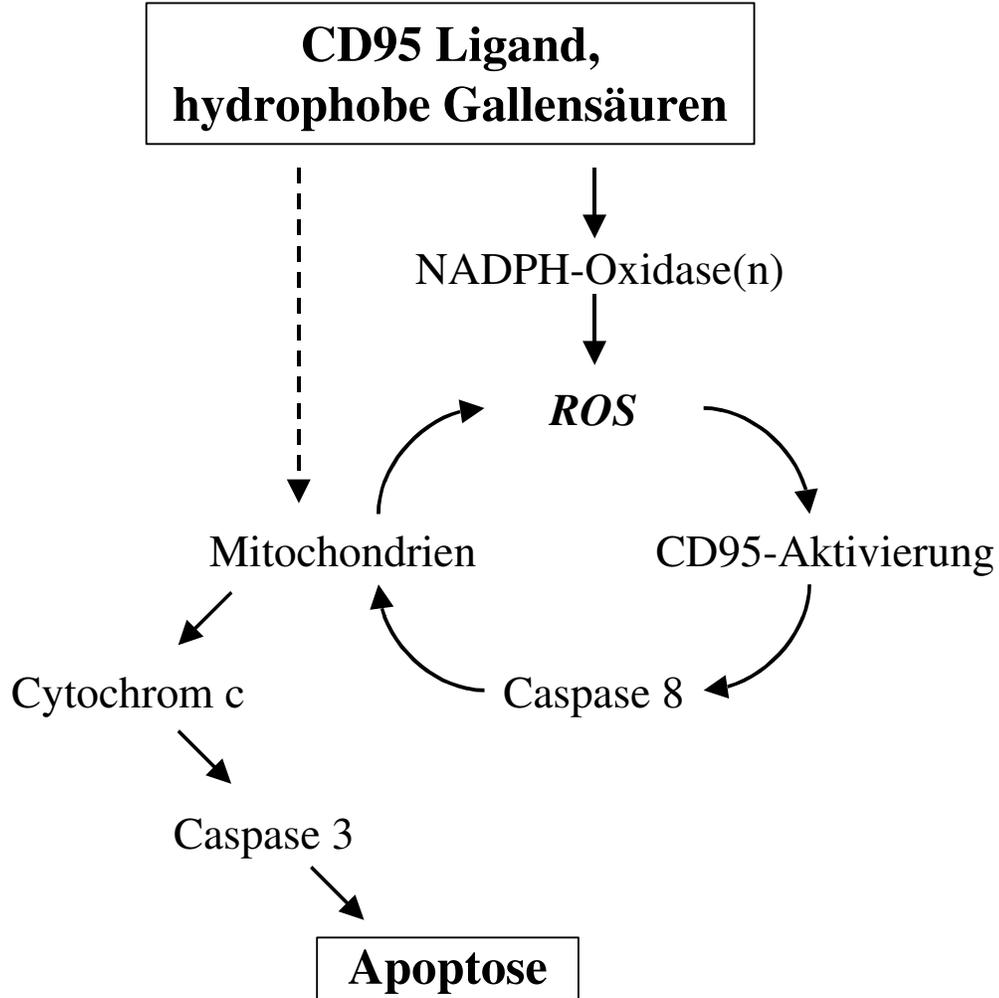
---

der ROS-Bildung und CD95-Aktivierung zuzukommen (Lemasters, 1999; Higuchi & Gores 2003), während die NADPH-Oxidase als Initiator agiert (Abbildung 10).

Welche Nox/Duox-Isoform in Leberparenchymzellen die beobachtete ROS-Bildung vermittelt, ist noch unklar. Eine eindeutige Notwendigkeit der regulatorischen p47<sup>phox</sup>-Untereinheit für die Aktivierung der gp91<sup>phox</sup> (= Nox 2) konnte bereits *in vivo* demonstriert werden (Nauseef 2004), ob dies aber auch für die anderen NADPH-Oxidase-Isoformen gilt, ist bisher nicht bekannt.

Sphingomyelinasen, Ceramide und die PKC $\zeta$  konnten im Rahmen dieser Arbeit als der Aktivierung der NADPH-Oxidase durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität vorgeschaltete Signaltransduktionselemente identifiziert werden (#12,#13). Die p47<sup>phox</sup> war bereits als Substrat für die Kinase-Aktivität der PKC $\zeta$  identifiziert worden (Dang et al., 2001). Im Weiteren konnte eine Beteiligung dieser PKC-Isoform am *respiratory burst* der Neutrophilen nachgewiesen werden (Fontayne et al., 2002, Dang et al., 2001). Für die PKC $\zeta$ , ein Mitglied der sogenannten atypischen PKCs, ist eine Vielzahl von Funktionen innerhalb der Signaltransduktion beschrieben (Hirai et al., 2003). Ferner konnte gezeigt werden, daß Ceramide an die PKC $\zeta$  binden können und sie dadurch aktivieren (Mathias et al., 1998).

Eine Beteiligung der Ceramide im Rahmen der durch Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie vermittelten Apoptose wurde wiederholt diskutiert (Jaeschke et al., 2002). In Lymphozyten und leukämischen Zelllinien konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die durch die saure Sphingomyelinase vermittelte Ceramidbildung an der CD95-vermittelten Apoptose beteiligt ist (Kirschnek et al., 2000), ebenso wie die Abhängigkeit des CD95-Clusterings, einer Anreicherung des CD95 an der Zellmembran innerhalb von Mikrodomänen, in Lymphozyten (Cifone et al., 1994). Darüber hinaus kann die Gabe von Ceramiden die Apoptoseresistenz in ASMase-defizienten Leberparenchymzellen und Lymphozyten der ASMase-*knock out*-Maus aufheben (Paris et al., 2001; Grassme et al., 2003). Eine Ceramid-abhängige JNK-Aktivierung konnte in verschiedenen Zelltypen als frühes Ereignis im Rahmen der Apoptose nachgewiesen werden (Mathias et al., 1998; Verheij et al., 1996; Huang et al., 1997; Brenner et al., 1997). Auch die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene JNK-Aktivierung ist von der Ceramidfreisetzung, der Aktivierung der NADPH-Oxidase und der daraus resultierenden ROS-Bildung abhängig (#4,6#, #12, #13).



**Abbildung 10: Oxidativer Stress als Initiator (NADPH-Oxidase) und Amplifikator (Mitochondrien) der CD95-vermittelten Apoptose**

Stimulation mit CD95-Ligand, hydrophoben Gallensäuren und Hyperosmolarität führt zu einer sofortigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADPH-Oxidase. In der Folge kommt es dann zu einer Aktivierung des CD95-Systems inklusive Aktivierung der Caspase 8, die im Weiteren eine mitochondriale ROS-Bildung auslöst. Die mitochondriale ROS-Bildung führt dann zu einer weiteren CD95-Aktivierung im Sinne eines sich selbst verstärkenden Regelkreises.

Folge der mitochondrialen ROS-Bildung ist aber auch die Cytochrom c-Freisetzung und die daraus resultierende Caspase 3-Aktivierung und Apoptoseinduktion.

---

Wie es aber zur Aktivierung der SMase mit nachfolgender Abspaltung von Ceramiden kommt, ist bisher unklar. Ein möglicher Aktivierungsmechanismus sind Veränderungen des pH-Wertes, der die Aktivität der sauren (ASMase), neutralen (NSMase) und alkalischen Sphingomyelinase im Wesentlichen bestimmt (Mathias et al., 1998; Marchesini et al., 2004). Die Expression der ASMase in Leberparenchymzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (#12). Darüber hinaus zeigt die ASMase-*knock out*-Maus eine Apoptoseresistenz, so daß deren Beteiligung an der CD95-vermittelten Apoptose wahrscheinlich erscheint, eine Beteiligung der NSMase aber keinesfalls ausschließt. Der Nachweis der Expression einer SMase-Isoform mit pH-Optimum im alkalischen Bereich gelang bisher in der Leber nicht. Frühere Arbeiten konnten zeigen, daß es nach hyperosmolarer Zellschrumpfung zu einer zytosolischen Alkalinisierung, begleitet von einer vesikulären Azidifizierung, wahrscheinlich bedingt durch eine verminderte Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit, kommt (Schreiber et al., 1994). Es wäre also denkbar, daß die ASMase in Vesikeln/Endomembranen lokalisiert ist (vgl. auch Expression der ASMase in Lysosomen), deren pH sich im Rahmen der Zellschrumpfung ins saure Milieu verschiebt, wodurch die Ceramid-bildende Aktivität der ASMase induziert wird.

Neben der ROS-vermittelten Aktivierung der JNK kommt es zur Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes. Die Hemmung der durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierten ROS-Antwort hemmt auch die Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes (#9,#10,#12). Die Möglichkeit der Regulation von Proteintyrosinphosphatasen durch oxidativen Stress und UV-Licht-Bestrahlung wurde bereits in HeLa- und A431 (humane epidermale Karzinomzelllinie)-Zellen beschrieben. Oxidativer Stress induziert hierbei durch Alkylierung kritischer SH-Gruppen eine Deaktivierung von Proteintyrosinphosphatasen (Knebel et al. 1996; Jin et al., 1998). Eine Regulation von Yes durch eine Proteintyrosinphosphatase war bisher unbekannt. Eine Aktivierung von Yes konnte nunmehr in Leberparenchymzellen auch durch eine Inkubation mit dem Phosphataseinhibitor Vanadat (#10) oder mit extrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (#12) induziert werden, als Hinweis darauf, daß es durch die ROS-Bildung zur Inaktivierung einer Phosphatase und daraus resultierend zu einer Aktivierung von Yes kommt. Neben Yes wird auch c-Src als weitere Kinase der Src-Familie durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität reguliert (#9,#10,#12). Ihre Funktion für die CD95-vermittelte Apoptose in Leberparenchymzellen ist aber bisher unklar.

Die Src-Familie besteht aus 9 Kinasen, von denen Src, Fyn und Yes ubiquitär exprimiert werden (Thomas & Brugge, 1997; Bjorge et al., 2000). Src-Kinasen werden vor allem durch (extrazellulären) Stress aktiviert, wie UV-Licht-Bestrahlung (Kitagawa et al., 2002), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hardwick & Sefton, 1995; Chen et al., 2001) oder Anisoomolarität (Kapus et al., 1999; Sanguinetti et al., 2003; Feranchak et al., 2003). In einigen nicht-hepatischen Zelltypen konnte gezeigt werden, daß oxidativer Stress Src, Fyn und Lck aktiviert (Nakamura et al., 1993; Hardwick & Sefton, 1995; Gonzales-Rubio et al., 1996; Abe et al., 1997; Yoshizumi et al., 2000; Chen & Resh, 2001). Die Beteiligung von Fyn an der CD95-vermittelten Apoptose in T-Lymphozyten wurde bereits beschrieben (Atkinson et al., 1996). Über die spezifische Funktion von Yes war bisher wenig bekannt. Jüngere Arbeiten zeigen, daß die *unique*-Domäne der Src-Familien-Kinasen, die den allgemeinen Aufbau SH4-Unique-SH3-SH2-Domäne aufweisen, deren Spezifität in der Signaltransduktion bestimmen (Summy et al., 2003). Es gibt aber auch redundante Funktionen der Src-Kinasen, da z.B. die *Yes-knock out*-Maus nahezu keinen Phänotyp zeigt, da scheinbar andere Kinasen der Src-Familie deren Funktion übernehmen können (Luton et al., 1999). Eine Beteiligung von Yes an der Apoptose war bisher nur für den Shiga-Toxin-induzierten Zelltod in der humanen Nierentubulus-Zelllinie ACNH beobachtet worden (Katagiri et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte nunmehr gezeigt werden, daß die in Leberparenchymzellen durch oxidativen Stress aktivierte Src-Familien-Kinase Yes den EGFR transaktiviert. Bisher war eine Src-vermittelte EGFR-Transaktivierung nach Bindung von Src an den EGFR (Tice et al., 1999) durch UV-Licht-Bestrahlung (Kitagawa et al., 2002) und durch Stimulation mit Cholezystokinin (Piiper et al., 2003) beschrieben. Die Position Tyr<sup>845</sup> des humanen EGFR ist als Substrat der Src-Familien-Kinase Src beschrieben (Biscardi et al., 1999). Der Tyrosinrest Tyr<sup>845</sup> des humanen EGFR entspricht mit seinen umgebenden Aminosäuren hierbei exakt der Aminosäureabfolge in der Umgebung des Tyrosinrestes Tyr<sup>416</sup> der Src-Familien-Kinase c-Src. Der Tyrosinrest Tyr<sup>416</sup> befindet sich innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne und ist bei allen bisher bekannten Mitgliedern der Src-Kinasen-Familie konserviert. Da es an der Position Tyr<sup>416</sup> der Src-Familien-Kinasen nach deren Aktivierung auch zu einer Autophosphorylierung kommt, erscheint eine Src-Familien-Kinasen-vermittelte Phosphorylierung des humanen EGFR an Position Tyr<sup>845</sup> nach Assoziation einer Src-Familien-Kinase an den EGFR wahrscheinlich (Biscardi et al., 1999). Eine Regulation

des EGFR durch die Src-Familien-Kinase Yes war bisher nicht beschrieben. Es konnte zunächst gezeigt werden, daß auch Yes direkt an den EGFR binden kann. Durch Inhibitorstudien fand sich im Weiteren, daß Yes den EGFR an Position Tyr<sup>845(\*)</sup>, also innerhalb der EGFR-Tyrosinkinase-Domäne, phosphoryliert und somit transaktiviert (#9,#10,#12). Der EGFR erlangt durch die Phosphorylierung an Position Tyr<sup>845(\*)</sup> Tyrosinkinase-Aktivität und es kommt zur EGFR-Autophosphorylierung, gemessen an der Phosphorylierung der Position Tyr<sup>1173(\*)</sup> (Poppleton et al., 1999) (#10,#12). Nach Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität konnte keine Phosphorylierung an Position Tyr<sup>1045(\*)</sup> des EGFR nachgewiesen werden (#10,#12). Die Phosphorylierung an Position Tyr<sup>1045(\*)</sup> ist mit der Bindung des *docking*-Proteins cbl an den EGFR verbunden, das dessen Internalisierung (Levkowitz et al, 1998; De Melker et al., 2001; Soubeyran et al. 2002) und Deaktivierung am ER (Haj et al., 2002; Gill 2002) vermittelt und typischerweise nach Stimulation des EGFR mit EGF auftritt (Levkowitz et al, 1998; De Melker et al., 2001; Soubeyran et al. 2002) (#10). Dies mag erklären, warum der EGFR nach Transaktivierung durch Yes und nach Dissoziation von Yes aus dem Yes/EGFR-Proteinkomplex (#10,#12,13) mit seiner Kinase-Aktivität weiteren Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung steht (#11).

Im Folgenden kommt es dann zu einer JNK-vermittelten Assoziation des EGFR mit dem CD95, der dann Substrat für die EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität ist (#4,#6).

## **5.2 Posttranskriptionelle Modifikationen des CD95 regulieren dessen Aktivierung und Translokation zur Plasmamembran**

Bisher waren weder in Typ I- noch in Typ II-Zellen kovalente Modifikationen des CD95 beschrieben worden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es nach Transaktivierung des EGFR durch die Src-Familien-Kinase Yes zu einer JNK-vermittelten Assoziation des (sogenannten) Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR mit dem (sogenannten) Todesrezeptor CD95 kommt. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ist hierbei sowohl für die Yes- wie auch für die JNK-Aktivierung notwendige Bedingung (#4,#6,#10,#12).

Die Interaktion von EGFR und CD95 ergibt neue Einsichten in die Regulation von Zellproliferation und Apoptose. Jüngere Arbeiten beschreiben, daß Todesrezeptoren sowohl in die Signaltransduktion von Zelltod wie auch in die der Zellproliferation

---

(\*) Bezeichnung der Tyrosinreste entsprechend der Nomenklatur des humanen EGFR

---

eingebunden sein können (Budd, 2002), und die Sequestration des CD95 durch den HGF-Rezeptor Met wurde kürzlich als Überlebensmechanismus der Zelle durch „Abschirmung“ des Todesrezeptors durch den Wachstumsfaktor-Rezeptor und damit Verhinderung der Apoptose beschrieben (Wang et al., 2002).

Wie durch Koimmunpräzipitationsstudien in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann der EGFR erst dann mit dem CD95 assoziieren, wenn Yes vom Yes/EGFR-Proteinkomplex abdissoziiert ist, da zu keinem Zeitpunkt eine Assoziation von Yes und CD95 in einem Proteinkomplex nachweisbar war (#10,#12,#13).

Die CD95/EGFR-Assoziation ist gefolgt von einer durch die Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR-vermittelten Tyrosinphosphorylierung des CD95, wie sowohl durch Inhibitoren (#4,#6) als auch durch EGFR-Protein-*knockdown* (#9,#10) gezeigt werden konnte. Der CD95 besitzt drei Tyrosinreste (Oehm et al., 1992): Tyr<sup>91</sup> im Bereich des N-Terminus und Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup> im Bereich der Todesdomäne, also dem Bindungsbereich von FADD (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Durch Mutationsexperimente, in denen die Tyrosinreste des CD95 einzeln, doppelt oder alle drei gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden (Tyr→Phe), konnte zunächst gezeigt werden, daß alle drei Tyrosinreste des CD95 phosphoryliert werden (#11). Doch was ist nun die funktionelle Konsequenz der CD95-Tyrosinphosphorylierung? Alle Inhibitoren, ebenso wie p47<sup>phox</sup>-, Yes- oder EGFR-Protein-*knockdown*, die zu einer Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung führten, hemmten auch die Translokation des CD95 zur Plasmamembran, ebenso wie die DISC-Bildung und die Apoptose (#4,#6-#13). Somit scheint die CD95-Tyrosinphosphorylierung notwendige Bedingungen für dessen Aktivierung zu sein.

Um diese These zu untermauern, wurde ein weiteres Modell zur Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung etabliert. Nach Stimulation von Leberparenchymzellen mit Peroxynitrit kam es neben einer allgemeinen Zunahme der Gesamt-Protein-Tyrosinnitrierung zu einer Tyrosinnitrierung des CD95 als weitere kovalente Modifikation (#8). Eine CD95-Tyrosinnitrierung verhinderte dessen Tyrosinphosphorylierung und im Weiteren auch dessen Translokation zur Plasmamembran, DISC-Bildung und Apoptose (#8). Neben dieser „exogenen,“ durch Peroxynitrit induzierten CD95-Tyrosinnitrierung, gelang auch die Induktion einer quasi „endogenen“ CD95-Tyrosinnitrierung durch intraperitoneale Applikation von Endotoxin für 24 h (#8). Somit stellt die CD95-Proteintyrosinnitrierung eine mögliche Deaktivierung des CD95-Systems im Rahmen von entzündlichen Prozessen der

---

Leber dar. Es ist eine interessante Spekulation, ob es im Rahmen von chronisch entzündlichen Prozessen der Leber, die regelhaft der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) vorausgehen, zu einer Deaktivierung des CD95-Systems durch Tyrosinnitrierung und damit zur Promotion der Kanzerogenese kommt.

Nachdem der Nachweis der CD95-Tyrosinphosphorylierung als notwendige Bedingung für die Aktivierung des CD95-Systems gelungen war, konnten mit Hilfe der CD95-Tyr→Phe-Mutanten die Tyrosinreste innerhalb der Todesdomäne als die für die Apoptose entscheidenden identifiziert werden: nur bei Austausch von allen drei Tyrosinresten oder den beiden Tyrosinresten innerhalb der Todesdomäne des CD95 (Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup>) gegen Phenylalanin kam es zur vollständigen Hemmung der Translokation des CD95 zur Plasmamembran, DISC-Bildung und Apoptose (#11). Die Assoziation des EGFR mit dem CD95 blieb davon unbeeinflusst. Somit ist die CD95/EGFR-Assoziation vor allem JNK-vermittelt und unabhängig von der EGFR-vermittelten CD95-Tyrosinphosphorylierung (#4,#6,#11).

Wie durch FRET-Mikroskopie gezeigt werden konnte, kommt es binnen 30 min zur Assoziation von CD95 und EGFR in einem intrazellulären Kompartiment, bevor beide Rezeptoren zusammen als Proteinkomplex zur Membran translozieren. Diese CD95/EGFR-Assoziation hält im Falle eine Stimulation mit CD95L für mindestens 6 h an, also noch bis zu einem Zeitpunkt, zu dem schon das Auftreten von apoptotischen *blebs* beobachtet wurde (#11).

Durch Hemmung des Mikrotubulusapparates mit Colchizin oder Taxol wurde die durch CD95L, hydrophobe Gallensäuren oder Hyperosmolarität induzierte CD95/EGFR-Translokation zur Plasmamembran gehemmt, ohne daß die CD95-Tyrosinphosphorylierung beeinflusst wurde (#11,#13). Somit setzt die Translokation des tyrosinphosphorylierten CD95 einen intakten Mikrotubulusapparat voraus. Gleichzeitig kommt es unter Colchizin und Taxol aber auch zu einer Hemmung der DISC-Bildung, so daß die Anlagerung von FADD und Caspase 8 scheinbar eine Translokation des CD95 zur Plasmamembran voraussetzt (#11,#13).

Cyclisches AMP vermag die Apoptose in Leberparenchymzellen sowohl nach Stimulation mit CD95L (#1,#4) wie auch nach Stimulation mit hydrophoben Gallensäuren zu hemmen (#6,#7). Es konnte gezeigt werden, daß cAMP durch Einführung einer PKA-vermittelten Serin/Threoninphosphorylierung von Yes dessen Assoziation an den EGFR und somit die EGFR-Transaktivierung verhindert (#10). Im

---

Folgenden unterbleibt daher auch die CD95-Tyrosinphosphorylierung (#7,#10). Darüber hinaus kommt es cAMP-vermittelt über die PKA aber auch zur Serin/Threoninphosphorylierung des CD95 (#7). Die CD95-Serin/Threoninphosphorylierung ist mit der Internalisierung des CD95 und einer Hemmung der Apoptose verbunden. Das nachträgliche Einführen einer Serin/Threoninphosphorylierung in den durch hydrophobe Gallensäuren bereits stimulierten, d.h. Tyrosin-phosphorylierten und an die Membran translozierten CD95, führt zu dessen beschleunigter Internalisierung und Hemmung der Apoptose (#7). Somit besitzt cAMP auch bei schon initiiertem Apoptose anti-apoptotisches Potenzial. Pharmakologische Manöver, die zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bzw. zur Aktivierung der PKA führen, sollten daher auch eine anti-apoptotische Wirkung im Rahmen von durch Apoptose gekennzeichneten Lebererkrankungen aufweisen.

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit insgesamt drei verschiedene kovalente Modifikationen des CD95 aufgezeigt werden, die dessen Funktion regulieren: 1) die den CD95 aktivierende Tyrosinphosphorylierung, die notwendige Bedingung für die CD95-Membrantranslokation und nachfolgende DISC-Bildung und Caspase 8-Aktivierung ist, 2) die den CD95 hemmende Tyrosinnitrierung, die eine Tyrosinphosphorylierung und damit CD95-Aktivierung verhindert und auch *in vivo* im Rahmen von entzündlichen Prozessen innerhalb der Leber gefunden wird und 3) die CD95-Serin/Threoninphosphorylierung, die zu einer vermehrten Internalisierung des CD95 führt und mit einer Hemmung der Apoptose, auch bereits nach deren erfolgter Initiation, verbunden ist.

Abbildung 11 faßt die im Rahmen dieser Arbeit in Leberparenchymzellen identifizierten Signaltransduktionsschritte der CD95-Aktivierung durch Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren und Hyperosmolarität schematisch zusammen.

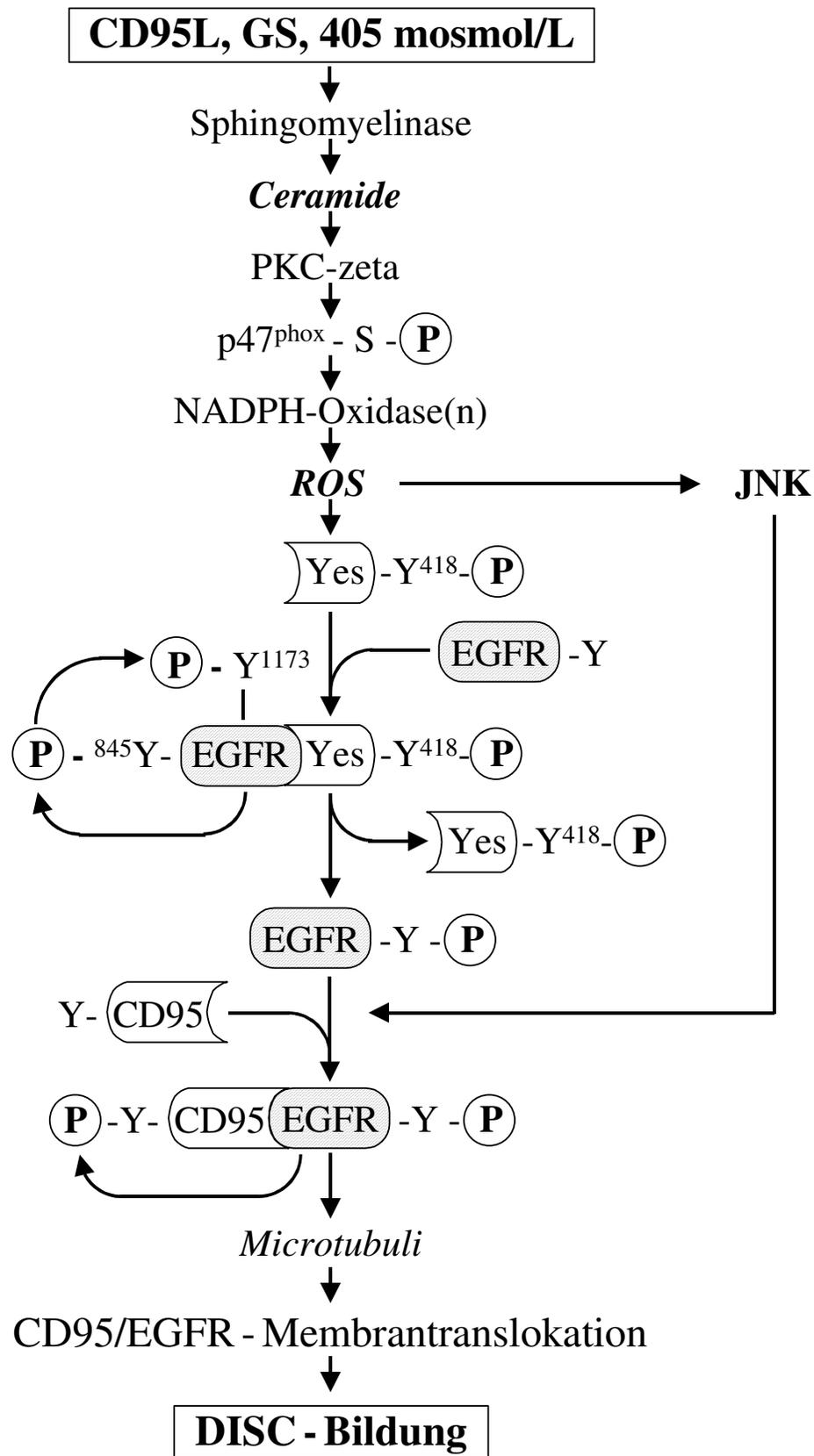


Abbildung 11: Molekulare Mechanismen der CD95-Aktivierung in Leberparenchymzellen

---

### ← **Abbildung 11: Molekulare Mechanismen der CD95-Aktivierung in Leberparenchymzellen**

Nach Stimulation von Leberparenchymzellen mit CD95-Ligand, hydrophoben Gallensäuren (GS) oder Hyperosmolarität kommt es zur umgehenden Aktivierung einer Sphingomyelinase mit Erhöhung der intrazellulären Ceramidkonzentration, gefolgt von einer PKC $\zeta$ -vermittelten Serinphosphorylierung der regulatorischen NADPH-Oxidase-Untereinheit p47<sup>phox</sup>. Hierdurch kommt es zur Anlagerung von anderen Untereinheiten der NADPH-Oxidase und nachfolgender Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die ROS-Bildung führt zum einen zu einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK und zum anderen zu einer Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes, die dann mit dem EGFR assoziiert und diesen aktivierend am Tyrosinrest Y<sup>845</sup> [entsprechend der Nomenklatur des humanen EGFR] phosphoryliert. Nach Dissoziation von Yes assoziiert der EGFR dann JNK-vermittelt mit dem CD95, der dann Substrat der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität ist. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste Y<sup>232</sup> und Y<sup>291</sup> innerhalb der Todesdomäne des CD95 ist dann notwendige Bedingung für dessen Mikrotubuli-abhängige Translokation zur Plasmamembran. Im Folgenden kommt es dann zur Anlagerung von FADD und Caspase 8 an den CD95 (DISC-Bildung) und Initiation der Apoptose.

---

### **5.3 Mögliche therapeutische Ansätze**

Cyclisches AMP hemmt die Gallensalz-induzierte Apoptose in isolierten Leberparenchymzellen ([Webster & Anwer, 1998](#)) (#5,#7) wie auch in anderen Zelltypen ([Martin et al., 1998](#)). cAMP-vermittelte Hemmung der Gallensalz-induzierten Apoptose beinhaltet die Aktivierung der PKA und der PI-3-Kinase ([Webster & Anwer, 1998](#), [Webster et al., 2002](#)). Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, daß hydrophobe Gallensalze selbst nach prolongierter Inkubation eine Aktivierung der PKA und damit eine CD95-Serin/Threoninphosphorylierung und -Internalisierung induzieren (#7). Dies mag einer späten kompensatorischen Gegenregulation mit protektivem Potential der Leberparenchymzellen bei prolongierter Cholestase entsprechen. Dies suggeriert aber auch, daß die Kinetik und das Ausmaß der intrazellulären Gallensalzzakkumulation im Rahmen cholestatischer Lebererkrankungen das Ausmaß der Apoptose bestimmen. Auch bei bereits initiiertes CD95-vermittelter Apoptose vermag eine Aktivierung der PKA, z.B. durch intrazelluläre cAMP-Erhöhung, anti-apoptotisch zu wirken.

Ursodesoxycholsäure (UDCA) ist eine hydrophile Gallensäure, die eine Reihe von cholestatischen Lebererkrankungen günstig beeinflusst ([Poupon et al., 1991](#); [Lindor et al., 1994](#); [Beuers et al., 1998](#); [Lazaridis et al., 2001](#)). Nach Paumgartner und Beuers (2002) spielen hierbei vor allem drei Mechanismen eine wesentliche Rolle: 1) Stimulation der hepatobiliären Sekretion, 2) Schutz der Leberparenchymzellen vor

der Gallensalz-induzierten Apoptose und 3) Schutz der Cholangiozyten vor der Zytotoxizität der hydrophoben Gallensäuren. Die durch UDCA stimulierte Gallensalzsekretion ist durch einen vermehrten Einbau der Gallensalzexportpumpen Bsep und Mrp2 in die kanalikuläre Membran erklärt (Häussinger et al., 1992; Kubitz et al. 1997; Kurz et al., 2001; Schmitt et al., 2001; Beuers et al., 2001). Durch vermehrte Gallensalzsekretion wird auch deren intrazelluläre Akkumulation und somit die Gallensalz-vermittelte Apoptose gehemmt. Neben dieser indirekten Wirkung durch vermehrte Entfernung der Noxe greift UDCA auch direkt in die Signaltransduktion der CD95-vermittelten Apoptose ein. So hemmt UDCA die Gallensalz-induzierte EGFR-Aktivierung durch Hemmung der Yes-vermittelten EGFR-Transaktivierung (Reinehr & Häussinger, unpublizierte Daten) und die späte JNK-Aktivierung (3-6 h) (#2), ohne dabei Einfluß auf die initiale ROS-Bildung zu nehmen. In der Folge hemmt UDCA die Translokation des CD95 zur Plasmamembran und die Aktivierung der Caspase 8 und 3 (#2). Darüber hinaus wurde berichtet, daß UDCA durch Reduktion der *mitochondrial membrane permeability transition* (MMPT) und der folgenden Cytochrom c-Freisetzung anti-apoptotisch wirkt (Rodrigues et al., 1998a, 1998b). Neuere Arbeiten berichten, daß es durch UDCA zu einer Aktivierung, bzw. Potenzierung, der PKA in Gallenblasen-Epithelzellen kommt (Chignard et al., 2003). Man könnte also spekulieren, daß in Leberparenchymzellen UDCA auch über einer PKA-vermittelte Hemmung der EGFR-Transaktivierung bei gleichzeitiger Induktion einer CD95-Serin/Threonin-phosphorylierung anti-apoptotisch wirkt.

Auch Betain schützt Leberparenchymzellen vor CD95-vermittelter Apoptose. Es konnte gezeigt werden, daß Betain nicht in den komplexen Mechanismus der CD95-Aktivierung bis hin zur DISC-Bildung eingreift, aber sowohl die Aktivität der Caspase 8, wie auch die mitochondriale Cytochrom c-Freisetzung hemmt (#3). Die alkoholische (ASH, Jaeschke et al., 2002; Ribeiro et al., 2004) wie auch die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH, Jaeschke et al., 2002; Feldstein et al., 2003; Ribeiro et al., 2004) sind durch Apoptose von Leberparenchymzellen gekennzeichnete Krankheitsbilder. In beiden Fällen existieren Therapieregime, die die Applikation von Betain und Antioxidanzien, wie z.B. Vitamin E, beinhalten (Jaeschke et al., 2002; Ribeiro et al., 2004). Ein möglicher molekularer Angriffspunkt beider Therapeutika wäre, die CD95-vermittelte Apoptose auf der Ebene der initialen ROS-Bildung durch die NADPH-Oxidase (Vitamin E) und auf der Ebene der perpetuierenden ROS-Bildung durch die Mitochondrien (Betain) zu hemmen.

---

Colchizin ist ein Lebertherapeutikum, das bis vor wenigen Jahren einen festen Stellenwert in der Therapie cholestatischer Lebererkrankungen, wie der primär biliären Zirrhose (PBC) oder der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) hatte (Javitt, 1989; Lee & Kaplan, 1999; Poupon & Poupon, 2000). Ebenso konnte im Tierversuch gezeigt werden, daß Colchizin vor der CD95-vermittelten Apoptose schützt, ohne daß der molekulare Mechanismus identifiziert werden konnte (Feng & Kaplowitz, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nun, mit Hilfe der FRET-Mikroskopie und Koimmunpräzipitationsstudien aufzuzeigen, daß Colchizin die Translokation des CD95/EGFR-Proteinkomplexes zur Plasmamembran hemmt und daß die nachfolgende Bildung des DISC ausbleibt (#11,#13).

N-Acetylcystein (NAC) wird vor allem wegen seiner Fähigkeit zu Bildung von Disulfidbrücken bei der Therapie der Paracetamol-Intoxikation zur Leberprotektion verwendet (Prescott et al., 1977). Darüber hinaus vermag NAC aber auch die CD95-vermittelte Apoptose in Leberparenchymzellen zu hemmen, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (#4,#6).

Ob das trizyklische Antidepressivum Desipramin, das ein potenter Inhibitor von Sphingomyelinasen ist, seine hemmende Wirkung auf die CD95-vermittelte Apoptose in kultivierten Leberparenchymzellen auch *in vivo* aufweist, muß noch geklärt werden. Im perfundierten Organ vermag Desipramin die durch hydrophobe Gallensalze induzierte Zellschrumpfung deutlich zu hemmen (Reinehr & Häussinger, unpublizierte Daten).

#### **5.4 Mögliche Bedeutung von CD95-Modifikationen für die Leberregeneration und Kanzerogenese**

Ähnlich wie die Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom, so folgt auch die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms einem regelhaften Ablauf. Persistiert eine Noxe, wie z.B. Alkohol (ASH), Eisen (Hämochromatose), Virus (HBV/HCV) oder das Aflatoxin in verschimmelten Lebensmitteln, so resultiert daraus zunächst eine akute, dann eine chronische Hepatitis, die u.a. durch die Aktivierung der CD95-vermittelten Apoptose gekennzeichnet ist. Gleichzeitig ist aber auch die Leberregeneration, z.T. auch über den EGFR, zur Kompensation des durch die Apoptose induzierten Zelluntergangs aktiviert. Im Rahmen der chronischen Entzündung kommt es nun zur Induktion der NO-Synthetase (NOS) und der Myeloperoxidase (MPO) (Bogdan, 2001), was mit einem erhöhten Potential zur Protein-

Tyrosinnitrierung einhergeht. Wie in dieser Arbeit gezeigt, vermag die intra-peritoneale Applikation von Endotoxin binnen 24 h eine Induktion der MPO und eine Tyrosinnitrierung des CD95 *in vivo* auszulösen. Hierdurch kann es zu einer Limitierung der CD95-vermittelten Apoptose im Rahmen des Entzündungsgeschehen kommen, wobei der gleichzeitig aktivierte EGFR unbeeinflusst bliebe. Bei gleichzeitig fortgesetzter Proliferation besteht mit zunehmender Zahl von Zellteilungen auch ein zunehmendes Risiko für Mutation, wie z.B. der p53-Mutation. In der Summe könnte also die im Rahmen der chronischen Entzündung gehemmte Apoptose (CD95-Tyrosinnitrierung) bei gleichzeitig ungebremster Proliferation (EGFR-Aktivierung und p53-Mutation) in einer Entartung des Gewebes münden (Lala & Chakraborty, 2001). Darüber hinaus sind sogenannte *trefoil factors* (TFFs), wie pS2 oder das *spasmolytic polypeptide* (SP), im Rahmen chronischer Entzündungen überexprimiert. TFFs verstärken die Tumorinvasivität über die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR insbesondere durch die mit Malignomen assoziierten Varianten EGFRvII/III (Rodrigues et al., 2003a), die eine konstitutiv aktive Tyrosinkinaseaktivität aufweisen und mit einer erhöhten Tumorprogression und -invasivität assoziiert sind (Nishikawa et al., 1994; Moscatello et al., 1999; Rodrigues et al., 2003b). Während eine EGF-induzierte Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität zur Erk-Aktivierung mit nachfolgender gesteigerter Zellproliferation führt, ist in Leberparenchymzellen die EGF-unabhängige EGFR-Transaktivierung ein initialer Schritt der Apoptoseinduktion, bei der eine EGFR/CD95-Assoziation mit nachfolgender CD95-Aktivierung auftritt (#4,#6,#11). Möglicherweise stehen die konstitutiv aktiven EGFR-Mutanten nicht für die EGFR-vermittelte CD95-Aktivierung und damit Apoptoseinduktion zur Verfügung.

Neben Mutanten des EGFR wurden auch Mutanten des CD95 in Malignomen identifiziert. So gibt es beim nasalen natürlichen Killerzellen/T-Zell-Lymphom benigne und maligne Verlaufsformen. Eine Studie konnte bei 9 von 16 Patienten mit nasalem natürlichen Killerzellen/T-Zell-Lymphom Mutationen des CD95 nachweisen. Alle beschriebenen Mutationen, die Todesdomäne inklusive der Tyrosinreste Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup> betrafen, gingen mit einer besonders malignen Verlaufsform des Lymphoms einher (Shen et al., 2002). Man kann also spekulieren, daß diese Tumoren aufgrund des Verlustes der entsprechenden Tyrosinreste innerhalb der Todesdomäne die Fähigkeit zur CD95-vermittelten Apoptose verloren haben und daher die CD95-vermittelte Immunabwehr umgehen können.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung des CD95-Systems durch den CD95-Liganden (CD95L), hydrophobe Gallensäuren und Hyperosmolarität eine Tyrosinphosphorylierung des CD95 beinhaltet, die durch den *epidermal growth factor*-Rezeptor (EGFR) vermittelt wird und zur Umverteilung des CD95 aus dem Zellinneren an die Plasmamembran führt. Die Aufklärung der hieran beteiligten Signaltransduktionselemente und somit Identifizierung möglicher therapeutischer Ansätze war Ziel dieser Arbeit.

Durch Stimulation mit CD95L, hydrophoben Gallensäuren oder Hyperosmolarität kommt es binnen Sekunden zur Aktivierung einer Sphingomyelinase, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Ceramidgehaltes führt. Die durch Ceramide aktivierte Proteinkinase C (PKC) $\zeta$  phosphoryliert die regulatorische p47<sup>phox</sup>-Untereinheit der NADPH-Oxidase an Serinresten, was zu deren Aktivierung führt. Im Folgenden kommt es dann zur Selbstorganisation der NADPH-Oxidase durch Anlagerung weiterer Untereinheiten an die p47<sup>phox</sup> und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ROS-vermittelt kommt es im Weiteren zur Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes, am ehesten durch Hemmung einer Phosphatase, sowie zur Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Die aktivierte Yes-Kinase assoziiert mit dem EGFR und aktiviert diesen durch Phosphorylierung, bevor beide Proteine wieder dissoziieren. JNK-vermittelt assoziiert der aktivierte EGFR dann mit dem CD95 und phosphoryliert diesen an Tyrosinresten, wobei die Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste innerhalb der CD95-Todesdomäne (Tyr<sup>232</sup> und Tyr<sup>291</sup>) notwendige Bedingung für die Mikrotubuli-abhängige Membrantranslokation des CD95/EGFR-Proteinkomplexes und die anschließende Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC) durch Anlagerung der *Fas-associated death domain* (FADD) und der Caspase 8 sind. Die dadurch aktivierte Initiator-Caspase 8 führt zur Betain-sensitiven mitochondrialen Cytochrom c-Freisetzung, die zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 führt. Im Falle der Stimulation mit CD95L oder hydrophoben Gallensäuren wird der apoptotische Zelltod auch exekutiert, während Hyperosmolarität zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber der CD95L-induzierten Apoptose führt.

Die Tyrosinnitrierung des CD95, wie sie auch *in vivo* nach Gabe von Endotoxin induziert werden konnte, verhindert eine weitere Tyrosinphosphorylierung und somit Aktivierung des CD95. Man mag somit spekulieren, ob die Nitrierung des CD95 im Rahmen von entzündlichen Prozessen der Leber zu dessen Deaktivierung führt und dadurch die durch Entzündung begünstigte Kanzerogenese der Leber erklärt.

Eine Serin/Threoninphosphorylierung konnte als weitere kovalente Modifikation des CD95 beschrieben werden, die mit dessen Internalisierung und Inaktivierung vergesellschaftet ist.

Insgesamt haben die vorliegenden Arbeiten zu dem Bild geführt, daß der CD95 durch kovalente Modifikationen (Ser/Thr-, Tyr-Phosphorylierung, Tyr-Nitrierung) *in vitro* und *in vivo* maßgeblich in seiner Funktion und Lokalisation reguliert wird.

---

## 7. Eigene Publikationen

### Originalarbeiten

1. Reinehr R, Kubitz R, Peters-Regehr T, Bode JG and Häussinger D. (1998) Activation of rat hepatic stellate cells in culture is associated with increased sensitivity to endothelin-1. *Hepatology*, 28:1566-1577.
2. vom Dahl S, Bode JG, Reinehr R, Monnighoff I, Kubitz R, Häussinger D. (1999) Release of osmolytes from perfused rat liver on perivascular nerve stimulation: alpha-adrenergic control of osmolyte efflux from parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology*, 29:195-204.
3. Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. (2002) Tauroolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 122:1411-1427.
4. Klonowski-Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Lüthen R, Häussinger D. (2002) Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G819-826.
5. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. (2002) Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36:602-614.
6. Fischer R, Carriers A, Reinehr R, Häussinger D. (2002) Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 123:845-861.
7. Carriers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Häussinger D. (2002) c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem* 12:179-186.
8. Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G, Häussinger D. (2002) Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology* 36:829-839.
9. Reinehr R, Fischer R, Häussinger D. (2002) Regulation of endothelin-A receptor sensitivity by cyclic adenosine monophosphate in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 36:861-873.
10. Görg B, Foster N, Reinehr R, Bidmon HJ, Höngen A, Häussinger D, Schliess F. (2003) Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37:334-342.
11. Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. (2003) Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGFR association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* 17:731-733.
12. Klonowski-Stumpe H, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Lüthen R, Häussinger D. (2003) Production and effects of endothelin-1 in rat pancreatic stellate cells. *Pancreas* 27:67-74.
13. Graf D, Reinehr R, Kurz AK, Fischer R, Häussinger D. (2003) Inhibition of tauroolithocholate 3-sulfate-induced apoptosis by cyclic AMP in rat hepatocytes involves protein kinase A dependent and independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 415:34-42.

14. Reinehr R, Graf D, Häussinger D. (2003) Bile salt-induced apoptosis involves epidermal growth factor-dependent tyrosine phosphorylation of CD95 in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 125: 839-853.
15. Reinehr R, Häussinger D. (2004) Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology*, 126:249-262.
16. Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, Kordes C, Häussinger D. (2004) Effects of Angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. *Pancreas*, 28:129-137.
17. Reinehr R, Görg B, Höngen A, Häussinger D. (2004) CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 279:10364-10373.
18. Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. (2004) Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia*, 47:21-29.
19. Reinehr R, Becker S, Höngen A, Häussinger D. (2004) The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. *J Biol Chem*, 279:23977-23987.
20. Schliess F, Reissmann R, Reinehr R, vom Dahl S, Häussinger D. (2004) Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem*, 279:21294-21301.
21. Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. (2004) Involvement of the Src family kinase yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 127:1540-1557.
22. Eberle A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. (2005) Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. *Hepatology*, 41: 315-326.
23. Fischer R, Reinehr R, Lu TP, Schönicke A, Warskulat U, Dienes HP, Häussinger D. (2005) Interacellular communication via gap junctions in activated rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 128:433-448.
24. Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 280:27179-27194.
25. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology*, 129:2009-2031.

## Übersichtsartikel

1. Häussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG, Schliess F. (2004) Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* 25:221-360
2. Reinehr R, Häussinger D. (2005) Hyperosmotic activation of the CD95 death receptor system. *Acta Physiologica Scandinavica*, *in press*.

## Buchbeiträge

1. Kubitz R, Reinehr RM, Peters-Regehr T, Bode JG and Häussinger D. (1998) The ETA-receptor pathway is upregulated in activated hepatic stellate cells. In: Cells of the hepatic sinusoid. Editors: Wisse, Knowles.
2. Häussinger D, Graf D, Reinehr R, Kurz AK, Saha N, Wettstein M, Schliess F, vom Dahl S, Kubitz R. (2003) Short-term regulation of bile acid transport. In: Bile acids: From Genomics to Disease and Therapy. Editors: Paumgartner G et al. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 133-137.
3. Häussinger D, Bode JG, Saha N, Wettstein M, Reinehr R, Warskulat U, vom Dahl S, Schliess F. (2003) Novel aspects of nitrogen metabolism associated with liver disease. In: Encephalopathy and Nitrogen Metabolism in Liver Failure. Editors: Jones AE, Meijer AJ, Chamuleau RAFM. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
4. Schliess F, Görg B, Foster N, Bidmon HJ, Desjardins P, Warskulat U, Butterworth RF, Reinehr R, Zilles K, Häussinger D. (2003) Astroglial protein tyrosine nitration by ammonia. In: Encephalopathy and Nitrogen Metabolism in Liver Failure. Editors: Jones AE, Meijer AJ, Chamuleau RAFM. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
5. Häussinger D, Eberle A, Becker S, Reinehr R. (2004) Bile acids and CD95 activation. In: Bile Acid Biology and its Therapeutic Implications. Editors: Paumgartner G, Keppler D, Leuschner U, Stiehl A. Springer, Dordrecht, The Netherlands

## Poster

1. Reinehr R, Kubitz R, Peters-Regehr T, Bode J, Häussinger D. (1998) Activation of Ito-cells in culture is preceded by an increase in the sensitivity to endothelin-1 but not to purinergic or  $\alpha_1$ -adrenergic agonists. 33. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft zum Studium der Leber (EASL). Lissabon, Portugal.
2. Reinehr R, Kubitz R, Häussinger D. (1999) Endothelin-1 induziert Calcium-Oszillationen und die Aktivierung hepatischer Sternzellen über den  $ET_A$ -Rezeptor in Wechselwirkung mit cAMP. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Kiel.
3. Reinehr R, Fischer R, Häussinger D. (2002) Regulation der Sensitivität des Endothelin-A-Rezeptors und der Endothelin-1-vermittelten Kontraktionen hepatischer Sternzellen der Ratte durch cAMP über die Proteinkinase A. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Leipzig.
4. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. (2002) Hyperosmolarität führt in Hepatozyten zu einem CD95-Membran trafficking und zu einer erhöhten Sensitivität für die CD95L-induzierte Apoptose. 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Bonn.
5. Reinehr R, Fischer R, Häussinger D. (2002) Cyclisches AMP reguliert die Endothelin-A-Rezeptor-Sensitivität und die Endothelin-1-vermittelten Kontraktionen hepatischer Sternzellen über eine Proteinkinase A-vermittelte Rezeptorphosphorylierung und -internalisierung. 57.

- 
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Bonn.
6. Reinehr R, Höngen A, Fischer R, Häussinger D. (2003) Endothelin-B-Rezeptor-vermittelte Desensibilisierung des Endothelin-A-Rezeptors in aktivierten hepatischen Sternzellen der Ratte. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Berlin.
  7. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. (2003) Hyperosmolarität induziert in Hepatozyten über eine CD95-Tyr-Phosphorylierung ein CD95-Membrane trafficking und eine erhöhte CD95L-Sensitivität. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Berlin.
  8. Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. (2003) CD95-ligand and hyperosmolarity trigger CD95/EGF-receptor-association and tyrosine-phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95-membrane trafficking and DISC formation in rat hepatocytes. 38. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft zum Studium der Leber (EASL). Genf, Schweiz.
  9. Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. (2003) CD95-ligand and hyperosmolarity trigger CD95/EGF-receptor-association and tyrosine-phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95-membrane trafficking and DISC formation. 54. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA.
  10. Reinehr R, Häussinger D. (2004) cAMP hemmt die Gallensalz-induzierte hepatozelluläre Apoptose über eine PKA-vermittelte Serin-/Threonin-Phosphorylierung des CD95. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Freiburg.
  11. Reinehr R, Görg B, Becker S, Höngen A, Häussinger D. (2004) CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. 1<sup>st</sup> International conference on Molecular research in environmental medicine, Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF). Düsseldorf.
  12. Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. (2004) Involvement of the src-family kinase Yes in bile salt-induced apoptosis. 55. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA.
  13. Reinehr R, Becker S, Höngen A, Häussinger D. The src-family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. 55. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA. [Posterpreis]
  14. Reinehr R, Görg B, Höngen A, Häussinger D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. 55. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA. [Posterpreis]
  15. Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. (2005) Die Tyrosinkinase Yes aus der Src-Familie initiiert die Gallensalz-induzierte Apoptose in vitro und in vivo. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Ulm.
  16. Reinehr R, Becker S, Eberle A, Häussinger D. (2005) CD95-Ligand induziert in Hepatozyten über die NADPH-Oxidase eine Aktivierung der Src-Familien-Kinase Yes, die zur CD95-

vermittelten Apoptose führt. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Ulm.

17. Reinehr R, Schliess F, Görg B, Häussinger D. (2005) Hypoosmolarity induces the generation of reactive oxygen species in cultured astrocytes by activation of p47<sup>phox</sup> NADPH-oxidase subunit. 12<sup>th</sup> International Symposium on Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHE). Solingen.

### **Postervorträge**

1. Reinehr R, Fischer R, Häussinger D. (2002) Cyclic AMP regulates hepatic stellate cells Endothelin-A-receptor-sensitivity by receptor-phosphorylation and -internalisation. 37. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft zum Studium der Leber (EASL). Madrid, Spanien.
2. Reinehr R, Fischer R, Häussinger D. (2002) Cyclic AMP regulates hepatic stellate cells Endothelin-A-receptor-sensitivity by receptor-phosphorylation and -internalisation. 53. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA.
3. Reinehr R, Graf D, Häussinger D. (2003) Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95-tyrosine phosphorylation in vitro and in vivo. 54. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA.
4. Reinehr R, Häussinger D. (2004) Hepatozelluläre Apoptose durch hydrophobe Gallensäuren beinhaltet eine EGF-R-vermittelte CD95-Tyrosin-Phosphorylierung in vitro und in vivo. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Freiburg.
5. Höngen A, Reinehr R, Becker S, Bode JG, Häussinger D. (2004) In vivo characterization of CD95/EGFR interactions and phosphorylation of critical CD95-tyrosine residues for apoptosis induction. 55. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). Boston, USA.
6. Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, vom Dahl S, Häussinger D. (2005) Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation and hepatocyte shrinkage. 56. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). San Francisco, USA.
7. Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Involvement of the NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. 56. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Lebererkrankungen (AASLD). San Francisco, USA.

### **Eingeladene Vorträge**

1. Reinehr R. (2002) Osmotic regulation of CD95-membrane trafficking. UNESCO-USA-Caucasus Workshop: The regulation of cell hydration in norm and pathology. Yerevan, Armenien.

- 
2. Reinehr R. (2003) Hyperosmotic signalling via reactive oxygene intermediates. 1<sup>st</sup> International conference of the SFB575 Experimental Hepatology: Signals in the liver. Current topics and recent advances. Düsseldorf.
  3. Reinehr R. (2003) Osmotic regulation of CD95-mediated apoptosis. Symposium der Dänischen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie: Cell signaling in regulation of cell volume, cell growth and cell death. Kopenhagen, Dänemark.
  4. Reinehr R. (2003) Forschungsforum Hepatologie: Apoptosemechanismen in der Leber. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Nürnberg.
  5. Reinehr R. (2005) Molekulare Mechanismen der CD95-induzierten Apoptose in der Leber. Wissenschaftliches Seminar des Instituts für Pathologie der Universität Köln.
  6. Reinehr R. (2005) Posterdiskussion zum Thema Stoffwechsel, Transport, Tumoren. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber (GASL). Ulm.
  7. Reinehr R. (2005) Forschungsforum Gallensäurenmetabolismus und Gallensteinentstehung: Molekulare Pathomechanismen cholestatischer Lebererkrankungen: was ist klinisch relevant ? 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Köln.
  8. Reinehr R. (2005) Hyperosmotic activation of the CD95 system in hepatocytes. August Krogh Institute, International Symposium: Cell volume control in health and disease. Kopenhagen, Dänemark.

---

## 8. Literaturverzeichnis

1. Abe, J., Takahashi, M., Ishida, M., Lee, J.D. & Berk, B.C. (1997) c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol Chem.* 272, 20389-20394.
2. Atkinson, E.A., Ostergaard, H., Kane, K., Pinkoski, M.J., Caputo, A., Olszowy, M.W. & Bleackley, R.C. (1996) A physical interaction between the cell death protein Fas and the tyrosine kinase p59fynT. *J Biol Chem.* 271, 5968-5971.
3. Barnhart, B.C., Alappat, E.C. & Peter, M.E. (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.
4. Benz, C., Angermüller, S., Kloters-Plachky, P., Sauer, P., Stremmel, W. & Stiehl, A. (1998) Effect of S-adenosylmethionine versus tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 577-583.
5. Benz, C., Angermüller, S., Otto, G., Sauer, P., Stremmel, W. & Stiehl, A. (2000) Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* 30, 203-209.
6. Beuers, U., Bilzer, M., Chittattu, A., Kullak-Ublick, G.A., Keppler, D., Paumgartner, G. & Dombrowski, F. (2001) Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 33, 1206-1216.
7. Beuers, U., Boyer, J.L. & Paumgartner, G. (1998) Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology* 28, 1449-1453.
8. Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H. & Parsons, S.J. (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr<sup>845</sup> and Tyr<sup>1101</sup> is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274, 8335-8343.
9. Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H. & Parsons, S.J. (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274, 8335-8343.
10. Bjorge, J.D., Jakymiw, A. & Fujita, D.J. (2000) Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19, 5620-5635.
11. Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916.
12. Bokoch, G.M. & Diebold, B.A. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood* 100, 2692-2696.
13. Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., 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.
14. Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. (1996) Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am.J.Physiol.* 40, C 950-C 961.
15. Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. (2001) Flow cytometric analysis of cell shrinkage and monovalent ions during apoptosis. *Methods Cell Biol.* 66, 49-67.

16. Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. (2002) Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Diff.* 9, 1307-1310.
17. Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F. & Gulbins, E. (1997) Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153. *J Biol Chem* 272, 22173-22181.
18. Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A.C., Mullier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R. & Cayota, A.M. (1999) Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 162, 3356-3366.
19. Brock, R., Hamelers, I.H. & Jovin, T.M. (1999) Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometrie* 35, 353-362.
20. Budd, R.C. (2002) Death receptors couple to both: cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 109, 437-441.
21. Callahan, J.W. & Khalil, M. (1976) Sphingomyelinases and the genetic defects in Niemann-Pick disease. *Adv Exp Med Biol* 68, 397-378.
22. Chen, K., Vita, J.A., Berk, B.C. & Keaney, J.F. Jr. (2001) c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem.* 276, 16045-16050.
23. Chen, X. & Resh, M.D. (2001) Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem.* 276, 34617-34623
24. Chieco, P., Romagnoli, E., Aicardi, G., Suozzi, A., Forti, G.C. & Roda, A. (1997) Apoptosis induced in rat hepatocytes by in vivo exposure to taurochenodeoxycholate. *Histochem. J.* 29, 875-883.
25. Chignard, N., Mergey, M., Veissiere, D., Poupon, R., Capeau, J., Parc, R., Paul, A. & Housset, C. (2003) Bile salts potentiate adenylyl cyclase activity and cAMP-regulated secretion in human gallbladder epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G205-G212.
26. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., 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.
27. Cifone, M.G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A., Testi, R. (1994) Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180, 1547-1552.
28. Dang, P.M., Fontayne, A., Hakim, J., El Benna, J. & Perianin, A. (2001) Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47<sup>phox</sup> and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 166, 1206-1213.

- 
29. De Melker, A.A., van der Horst, G., Calafat, J., Jansen, H. & Borst, J. (2001) c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci* 114, 2167-2178.
  30. Dickinson, M.E., Simbuerger, E., Zimmermann, B., Waters, C.W. & Fraser, S.E. (2003) Multiphoton excitation spectra in biological samples. *J Biomed Opt* 8, 329-338.
  31. Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., Edens, H.A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D.B., Benian, G.M. & Lambeth, J.D. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* 154, 879-891.
  32. Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H. & Gores, G.J. (1999) Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J. Clin. Invest.* 103, 137-145.
  33. Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L.B., Lindor, K.D. & Gores G.J. (2003) Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437-443.
  34. Feng, G. & Kaplowitz, N. (2000) Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. *J Clin Invest* 105, 329-339.
  35. Feranchak, A.P., Kilic, G., Wojtaszek, P.A., Qadri, I. & Fitz, J.G. (2003) Volume-sensitive tyrosine kinases regulate liver cell volume through effects on vesicular trafficking and membrane Na<sup>+</sup> permeability. *J Biol Chem.* 278, 44632-44638.
  36. Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
  37. Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A. & El-Benna, J. (2002) Phosphorylation of p47<sup>phox</sup> sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22<sup>phox</sup> and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry* 41, 7743-7750.
  38. Fumarola, C., Zerbini, A. & Guidotti, G.G. (2001) Glutamine deprivation-mediated cell shrinkage induces ligand-independent CD95 receptor signaling and apoptosis. *Cell Death Diff* 8, 1004-1013.
  39. Gill, G.N. (2002) A pit stop at the ER. *Science* 295, 1654-1655.
  40. Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J. & Merenyi, G. (2000) Tyrosine nitration by simultaneously generation of NO and O<sub>2</sub><sup>-</sup> under physiological conditions. How the radicals do the job. *J Biol Chem* 275, 3031-3036.
  41. Golstein, P., Ojcius, D.M. & Young, J.D. (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121, 29-65.
  42. Gomez-Angelats, M., Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. (2000) Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K<sup>+</sup> and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J. Biol. Chem.* 275, 19609-19619.

- 
43. Gonzales-Rubio, M., Voit, S., Rodriguez-Puyol, D., Weber, M. & Marx, M. (1996) Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation of PDGF alpha-and beta-receptors and pp60c-src in mesangial cells. *Kidney Int.* 50, 164-173.
  44. Grassme, H., Cremesti, A., Kolesnick, R. & Gulbins, E. (2003) Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 22, 5457-5470.
  45. Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Piette, J. & Krutmann, J. (2000) Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. *EMBO J* 19, 5793-5800.
  46. Gupta, S., Natarajan, R., Payne, S.G., Studer, E.J., Spiegel, S., Dent, P. & Hylemon, P.B. (2004) Deoxycholic acid activates the c-Jun N-terminal kinase pathway via FAS receptor activation in primary hepatocytes. Role of acidic sphingomyelinase-mediated ceramide generation in FAS receptor activation. *J Biol Chem* 279, 5821-5828.
  47. Haj, F.G., Verveer, P.J., Squire, A., Neel, B.G. & Bastiaens, P.I. (2002) Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* 295, 1708-1711.
  48. Hallbrucker, C., Ritter, M., Lang, F., Gerok, W. & Häussinger, D. (1992) Hydroperoxide metabolism in rat liver: K<sup>+</sup> channel activation and cell volume changes and eicosanoid formation. *Eur J Biochem* 211, 449-458.
  49. Hardwick, J.S. & Sefton, B.M. (1995) Activation of the Lck tyrosine protein kinase by hydrogen peroxide requires the phosphorylation of Tyr-394. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4527-4531.
  50. Häussinger, D., Hallbrucker, C., Saha, N., Lang, F. & Gerok, W. (1992) Cell volume and bile acid excretion. *Biochem. J.* 288, 681-689.
  51. Higuchi, H. & Gores, G.J. (2003) Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G734-738.
  52. Hirai, T., Chida, K. (2003) Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* 133, 1-7.
  53. Huang, C., Ma, W., Ding, M., Bowden, G.T. & Dong, Z. (1997) Direct evidence for an important role of sphingomyelinase in ultraviolet-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 272, 27753-27757.
  54. Inanami, O., Johnson, J.L., McAdara, J.K., Benna, J.E., Faust, L.R., Newburger, P.E. & Babior, B.M. (1998) Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *J Biol Chem* 273, 9539-9543.
  55. Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D. & Lemasters J.L. (2002) Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sciences* 65, 166-176.
  56. Javitt, N.B. (1989) Cholestatic liver disease and its management. *Bailliers Clin Gastroenterol* 3, 423-430.
  57. Jin, Y.J., Friedman, J. & Burakoff, S.J. (1998) Regulation of tyrosine phosphorylation in isolated T cell membrane by inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 161, 1743-1750.

- 
58. Johnson, J.L., Park, J.W., Benna, J.E., Faust, L.P., Inanami, O. & Babior, B.M. (1998) Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem* 273, 35147-35152.
  59. Jones, B.A., Rao, Y., Stravitz, R.T. & Gores, G.J. (1997) Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 272, G1109-G1115.
  60. Kapus, A., Szaszi, K., Sun, J., Rizoli, S. & Rotstein, O.D. (1999) Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Biol Chem.* 274, 8093-8102.
  61. Katagiri, Y.U., Mori, T., Nakajima, H., Katagiri, C., Taguchi, T., Takeda, T., Kiyokawa, N. & Fujimoto, J. (1999) Activation of Src family kinase yes induced by Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide (Gb3/CD77) in low density, detergent-insoluble microdomains. *J Biol Chem.* 274, 35278-35282.
  62. Kerr, J.F., Harmon, B. & Searle, J. (1974) An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J. Cell Science* 14, 571-585.
  63. Kirschnek, S., Paris, F., Weller, M., Grassme, H., Ferlinz, K., Riehle, A., Fuks, Z., Kolesnick, R. & Gulbins, E. (2000) CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 275, 27316-27323.
  64. Kitagawa, D., Tanemura, S., Ohata, S., Shimizu, N., Seo, J., Nishitai, G., Watanabe, T., Nakagawa, K., Kishimoto, H., Wada, T., Tezuka, T., Yamamoto, T., Nishina, H., Katada, T. (2002) Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J Biol Chem.* 277, 366-371.
  65. Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. & Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* 15, 5314-5325.
  66. Kong, S.K, Yim, M.B., Stadtman, E.R. & Chock, P.B. (1996) Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH<sub>2</sub> peptide. *Proc Natl Acad Sci* 93, 3377-3382.
  67. Kubitz, R., D'Urso, D., Keppler, D. & Häussinger, D. (1997) Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology* 113, 1438-1442.
  68. Kurz, A.K., Block, C., Graf, D., vom Dahl, S., Schliess, F. & Häussinger, D. (2000) Phosphoinositide 3-kinase-dependent Ras activation by tauroursodesoxycholate in rat liver. *Biochem. J.* 350, 207-213.
  69. Kurz, A.K., Graf, D., Schmitt, M., vom Dahl, S. & Häussinger, D. (2001) Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38<sup>MAPK</sup> activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 121, 407-419.

- 
70. Lala, P.K. & Chakraborty, C. (2001) Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2, 149-156.
  71. Lambeth, J.D. (2002) Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol* 9, 11-17.
  72. Lambeth, J.D., Cheng, G., Arnold, R.S. & Edens, W.A. (2000) Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci* 25, 459-461.
  73. Lang, F., Madlung, J., Bock, J., Lukewille, U., Kaltenbach, S., Lang, K.S., Belka, C., Wagner, C.A., Lang, H.J., Gulbins, E. & Lepple-Wienhues, A. (2000a) Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-receptor stimulation. *Pflügers Arch.* 440, 902-907.
  74. Lang, F., Madlung, J., Uhlemann, A.C., Risler, T. & Gulbins, E. (1998) Cellular taurine release triggered by stimulation of the Fas(CD95) receptor in Jurkat lymphocytes. *Pflügers Arch.* 436, 377-383.
  75. Lang, F., Ritter, M., Gamper, N., Huber, S., Fillon, S., Tanneur, V., Lepple-Wienhues, A., Szabo, I. & Bulbins, E. (2000b) Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol. Biochem.* 10, 417-428.
  76. Lazaridis, K.N., Gores, G.J. & Lindor, K.D. (2001) Ursodeoxycholic acid: mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders. *J. Hepatol.* 35, 134-146.
  77. LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. & Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227-231.
  78. Lee, Y.M. & Kaplan, M.M. (1999) Treatment of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: use of ursodeoxycholic acid. *Curr Gastroenterol Rep* 1, 38-41.
  79. Lemasters, J.J. (1999) Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 276, G1-G6.
  80. Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Herman, B. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366, 177-196.
  81. Leserer, M., Gschwind, A. & Ullrich, A. (2000) Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life* 49, 405-409.
  82. Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B. & Yarden Y. (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12, 3663-3674.
  83. Lindor, K.D., Dickson, E.R., Baldus, W.P., Jorgensen, R.A., Ludwig, J., Murtaugh, P.A., Harrison, J.M., Wiesner, R.H., Anderson, M.L., Lange, S.M., LeSage, G., Rossi, S.S. & Hofmann, A.F. (1994) Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 106, 1284-1290.
  84. Luton, F., Verges, M., Vaerman, J.P., Sudol, M. & Mostov, K.E. (1999) The SRC family protein tyrosine kinase p62yes controls polymeric IgA transcytosis in vivo. *Mol. Cell* 4, 627-632.

- 
85. Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A. & Okada, Y. (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 9487-9492.
  86. Mahadev, K., Zilbering, A., Zhu, L. & Goldstein, B.J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem.* 276, 21938-21942.
  87. Marchesini, N. & Hannun, Y.A. (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* 82, 27-44.
  88. Martin, M.C., Dransfield, C., Haslett, A.G. & Rossi, A.G. (2001) Cyclic AMP regulation of neutrophil apoptosis occurs via a novel protein kinase A-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 45041-45050.
  89. Mathias, S., Pena, L.A. & Kolesnick, R.N. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335, 465-80.
  90. Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P.J., Burgart, L.J. & Gores, G.J. (1999) Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves CD95. *Gastroenterology* 117, 669-677.
  91. Moscatello, D.K., Montgomery, R.B., Sundareshan, P., McDanel, H., Wong, M.Y. & Wong, A.J. (1999) Transformational and altered signal transduction by a naturally mutant EGF receptor. *Oncogene* 13, 85-96.
  92. Nakamura, K., Hori, T., Sato, N., Sugie, K., Kawakami, T. & Yodoi, J. (1993) Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene* 8, 3133-3139.
  93. Nauseef, W.M. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* 122, 277-291.
  94. Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K. & Huang, H.J. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci* 91, 7727-7731.
  95. Nobel, C.S., Aronson, J.K., van den Dobbelsteen, D.J. & Slater, A.F. (2000) Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. *Apoptosis* 5, 153-163.
  96. Noé, B., Schliess, F., Wettstein, M., Heinrich, S. & Häussinger, D. (1996) Regulation of taurocholate excretion by a hypo-osmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver. *Gastroenterology* 110, 858-865.
  97. Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., Ponsting, H. & Krammer, P.H. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. *J Biol Chem* 267, 10709-10715.
  98. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 364, 806-809.

- 
99. Ohta, H., Yatomi, Y., Sweeney, E.A., Hakomori, S. & Igarashi Y. (1994) A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett* 355, 267-270.
  100. Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J. & Morishima S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.* 532, 3-16.
  101. Pani, G., Bedogni, B., Colavitti, R., Anzevino, R., Borrello, S. & Galeotti, T. (2001) Cell compartmentalization in redox signaling. *IUBMB Life* 52, 7-16.
  102. Paris, F., Grassme, H., Cremesti, A., Zager, J., Fong, Y., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Gulbins, E. & Kolesnick, R. (2001) Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase(-/-) hepatocytes. *J Biol Chem* 276, 8297-8305.
  103. Paumgartner, G. & Beuers, U. (2002) Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 36, 525-531.
  104. Piiper, A., Elez, R., You, S.J., Kronenberger, B., Loitsch, S., Roche, S. & Zeuzem, S. (2003) Cholecystokinin stimulates extracellular signal-regulated kinase through activation of the epidermal growth factor receptor, Yes, and protein kinase C. Signal amplification at the level of Raf by activation of protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem* 278, 7065-7072.
  105. Poppleton, H.M., Wiepz, G.J., Bertics, P.J. & Patel, T.B. (1999) Modulation of the protein tyrosine kinase activity and autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor by its juxtamembrane region. *Arch Biochem Biophys* 363, 227-236.
  106. Poupon, R. & Poupon, R.E. (2000) Treatment of primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 14, 615-628.
  107. Poupon, R.E., Balkau, B., Eschwege, E. & Poupon, R.A. (1991) A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group. *N. Engl. J. Med.* 324, 1548-1554.
  108. Prescott, L.F., Park, J., Ballantyne, A., Adriaenssens, P. & Proudfoot, A.T. (1977) Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet* 27, 432-434.
  109. Qiao, L., Studer, E., Leach, K., McKinstry, R., Gupta, S., Decker, R., Kukreja, R., Valerie, K., Nagarkatti, P., Deiry, W.E., Molkentin, J., Schmidt-Ullrich, R., Fisher, P.B., Grant, S., Hylemon, P.B. & Dent, P. (2001) Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Fas receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/Mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2609-2645.
  110. Ribeiro, P.S., Cortez-pinto, H., Solá, S., Castro, R.E., Ramalho, R.M., Baptista, A., Moura, M.C., Camilo, M.E. & Rodrigues, C.M.P. (2004) Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- $\kappa$ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 99, 1708-1717.

- 
111. Rodrigues, C.M., Fan, G., Ma, X., Kren, B.T. & Steer, C.J. (1998a) A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 101, 2790-2799.
  112. Rodrigues, C.M., Fan, G., Ma, X., Kren, B.T. & Steer, C.J. (1998a) A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J. Clin. Invest.* 101, 2790-2799.
  113. Rodrigues, C.M., Fan, G., Wong, P., Kren, B. & Steer, C. (1998b). Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol. Med.* 4, 165-178.
  114. Rodrigues, C.M., Fan, G., Wong, P., Kren, B. & Steer, C. (1998b). Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol. Med.* 4, 165-178.
  115. Rodrigues, S., Attoub, S., Nguyen, Q.D., Bruyneel, E., Rodrigue, C.M., Westley, B.R., May, F.E., Thim, L., Mareel, M., Emami, S. & Gerspach, C. (2003a) Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 22, 4488-97.
  116. Rodrigues, S., van Aken, E., van Bocxlaer, S., Attoub, S., Nguyen, Q.D., Bruyneel, E., Westley, B.R., May, F.E., Thim, L., Mareel, M., Gerspach, C. & Emami, S. (2003b) Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 17, 7-16.
  117. Rodriguez, I., Matsuura, K., Ody, C., Nagata, S. & Vassalli, P. (1996) Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med* 184, 2067-2072.
  118. Rosette, C. & Karin, M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274, 1194-1197.
  119. Rust, C. & Gores G.J. (2000) Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 108, 567-574.
  120. Saha, N., Schreiber, R., vom Dahl, S., Lang, F., Gerok, W. & Häussinger, D. (1993) Endogenous hydroperoxide formation, cell volume and cellular K<sup>+</sup> balance in perfused rat liver *Biochem J* 296, 701-707.
  121. Sanguinetti, A.R., Cao, H., Corley Mastick, C. (2003) Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J.* 376, 159-168.
  122. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
  123. Schmitt, M., Kubitz, R., Lizun, S., Wettstein, M., Häussinger, D. (2001) Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 33, 509-518.

- 
124. Schreiber, R., Stoll, B., Lang, F. & Häussinger, D. (1994) Effects of aniso-osmolarity and hydroperoxides on intracellular pH in isolated rat hepatocytes as assessed by (2',7')-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein and fluorescein isothiocyanat-dextran fluorescence. *Biochem J* 303, 113-120.
  125. Seki, S., Kitada, T., Sakaguchi, H., Kawada, N., Iwai, S., Kadoya, H. & Nakatani, K. (1999) Expression of Fas and Bcl-2 proteins and induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Med Electron Microsc* 32, 199-203.
  126. Shen, L., Liang, A.C.T., Lu, L., Au, W.Y., Kwong, Y.L., Liang, R.H.S. & Srivastava, G. (2002) Frequent deletion of Fas gene sequences encoding death and transmembrane domains in nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 161, 2123-2131.
  127. Sodeman, T., Bronk, SF, Roberts, P.J., Miyoshi, H., Gores, G.J. (2000) Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol* 278, G992-G999.
  128. Sokol, R.J., McKim, J.M., Goff, M.C., Ruyle, S.Z., Devereaux, M.W., Han, D., Packer, L., Everson, G. (1998) Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* 114, 164-174.
  129. Sokol, R.J., Winkelhofer-Roob, B.M., Devereaux, M.W. & McKim, J.M. (1995) Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109, 1249-1256.
  130. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y. & Dikic, I. (2002) Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416, 183-187.
  131. Stadler, J., Bentz, B.G., Harbrecht, B.G., Di Silvio, M., Curran, R.D., Billiar, T.R., Hoffman, R.A. & Simmons, R.L. (1992) Tumor necrosis factor alpha inhibits hepatocyte mitochondrial respiration. *Ann Surg* 216, 539-546.
  132. Strand S, Strand D, Seufert R, Mann A, Lotz J, Blessing M, Lahn M, Wunsch A, Broering DC, Hahn U, Grischke EM, Rogiers X, Otto G, Gores GJ, Galle PR. Placenta-Derived CD95 Ligand Causes Liver Damage in Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count Syndrome *Gastroentrology* 2004;126:849–858.
  133. Summy, J.M., Qian, Y., Jiang, B.-H., Guappone-Koay, A., Gatesman, A., Shi, X. & Flynn, D.C. (2003) The SH4-Unique-SH3-SH2 domains dictate specificity in signaling that differentiate c-Yes from c-Src. *J Cell Sci* 116, 2585-2598.
  134. Suzuki, Y., Ono, Y. & Hirabayashi, Y. (1998) Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 425, 209-212.
  135. Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Kaba, K.N., Zoratti, M., Gulbins, E. & Lang, F. (1998) Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6169-6174.

- 
136. Takikawa, Y., Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P., Siegel, R., Mandal, P.K., Millikan, R.E. & Gores, G.J. (2001) The bile acid-activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibits CD95 apoptosis upstream of bid in rodent hepatocytes. *Gastroenterology* 120, 1810-1817.
  137. Thomas, S.M. & Brugge, J.S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.
  138. Thompson, G.J., Langlais, C., Cain, K., Conley, E.C. & Cohen, G.M. (2001) Elevated extracellular K<sup>+</sup> inhibits death-receptor- and chemical-mediated apoptosis prior to caspase activation and cytochrome c release. *Biochem. J.* 357, 137-145.
  139. Tice, D.A., Biscardi, J.S., Nickles, A.L. & Parsons, S.J. (1999) Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 1415-1420.
  140. Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.
  141. Vignais, P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428-1459.
  142. Vom Dahl, S., Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W. & Häussinger, D. (1991) A non-invasive technique for cell volume determination in perfused rat liver. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 372, 411-418.
  143. Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C. & Kerr, J.F. (1988) Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 13, 18-54.
  144. Wang, X., De Frances, M.C., Dai, Y., Pediaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G.K. & Zarnegar, R. A. (2002) Mechanism of cell survival: Sequestration of fas by the HGF receptor Met. *Molecular Cell* 9, 411-421.
  145. Webster, C.R. & Anwer, M.S. (1998) Cyclic adenosine monophosphate-mediated protection against bile acid-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 27, 1324-1331.
  146. Webster, C.R., Usechak, P. & Anwer, M.S. (2002) cAMP inhibits bile acid-induced apoptosis by blocking caspase activation and cytochrome c release. *Am J Physiol* 238, G727-G738.
  147. Wyllie, A.H. (1987) Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153, 313-316.
  148. Yerushalmi, B., Dahl, R., Devereaux, M.W., Gumprich, E. & Sokol, R.J. (2001) Bile acid-induced rat hepatocytes apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 33, 616-626.
  149. Yin, X.M. (2000) Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J Mol Med.* 78, 203-211.
  150. Yoshizumi, M., Abe, J., Haendeler, J., Huang, Q. & Berk, B.C. (2000) Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 275, 11706-11712.
  151. Yu, S.P., Canzoniero, L.M., & Choi, D.W. (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 405-411.

## 9. Lebenslauf

Roland Michael Reinehr, geb. am 21.05.1974 in Köln, verheiratet, 1 Sohn

### Schule

08/80 - 07/84 Erich-Kästner-Grundschule Dormagen

08/84 -06/93 Norbert-Gymnasium-Knechtsteden

### Wehrdienst

07/93-06/94 bei der Luftwaffe in Kerpen und Goose Bay (Canada)

### Studium

10/94 - 05/01 Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

03/99 und 09/99 Famulaturen am „Inselspital“ der Universität Bern (Schweiz) und an der „Mount Sinai School of Medicine“ der City University of New York (USA)

04/00 - 03/01 Praktisches Jahr am Klinikum Krefeld, Lehrkrankenhaus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Wahlfach Neurologie

08/97 - 12/99 Experimentelle Doktorarbeit in der Abt. für Experimentelle Hepatologie der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität (Betreuung: Prof. Dr. D. Häussinger)

09/2001 Promotion zum Dr. med. (*summa cum laude*), Titel der Promotionsarbeit: „Charakterisierung der Endothelin-1-vermittelten Wirkung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hepatischer Sternzellen während deren Transformation vom ruhenden zum Myofibroblast-ähnlichen Phänotyp“

### Berufstätigkeit

06/01 - 12/02 Arzt im Praktikum in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. D. Häussinger)

seit 12/03 Assistenzarzt in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. D. Häussinger)

seit 01/04 Teilprojektleiter im SFB 575 „Experimentelle Hepatologie“ (Sprecher : Prof. Dr. D. Häussinger) im Teilprojekt A3 (Häussinger/Reinehr): „Osmosensoren und osmoregulierte Signalketten in der Leber“

### Auszeichnungen

02/95 - 05/01 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

02/99 Heinz-Kalk-Gedächtnispreis für hepatologische Grundlagenforschung

06/02 Beste Dissertation des Jahres 2001 der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10/03 Hans-Popper-Förderpreis für die beste experimentelle Arbeit mit klinischem Bezug auf dem Gebiet der Hepatologie

03/04 Ulrich-Hadding-Forschungspreis für Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Tumorbilologie

11/04 Posterpreis auf der 55. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft zum Studium der Leber (AASLD) in Boston

04/05 Hendrik Casimir - Karl Ziegler - Forschungspreis der Nordrhein-Westfälischen Akademie der Wissenschaften

---

## 10. Die der Habilitationsschrift zugrunde liegenden Publikationen:

- #1) Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Häussinger D. (2002) Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 36:602-14.
- #2) Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. (2002) Taurolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 122:1411-27.
- #3) Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G, Häussinger D. (2002) Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology* 36:829-39.
- #4) Reinehr R, Schliess F, Häussinger D. (2003) Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGFR association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. *FASEB J* 17:731-733.
- #5) Graf D, Reinehr R, Kurz AK, Fischer R, Häussinger D. (2003) Inhibition of taurolithocholate 3-sulfate-induced apoptosis by cyclic AMP in rat hepatocytes involves protein kinase A dependent and independent mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 415:34-42.
- #6) Reinehr R, Graf D, Häussinger D. (2003) Bile salt-induced apoptosis involves epidermal growth factor-dependent tyrosine phosphorylation of CD95 in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 125: 839-853.
- #7) Reinehr R, Häussinger D. (2004) Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology*, 126:249-262.
- #8) Reinehr R, Görg B, Höngen A, Häussinger D. (2004) CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 279:10364-10373.
- #9) Reinehr R, Becker S, Höngen A, Häussinger D. (2004) The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. *J Biol Chem*, 279:23977-23987.
- #10) Reinehr R, Becker S, Wettstein M, Häussinger D. (2004) Involvement of the Src family kinase Yes in bile salt-induced apoptosis. *Gastroenterology* 127:1540-1557.
- #11) Eberle A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. (2005) Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. *Hepatology*, 41: 315-326.
- #12) Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 280:27179-27194.
- #13) Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. (2005) Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology*, 129:2009-2031.