Untersuchungen zur Interaktion des Todesrezeptors CD95 und des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors in der Leber

Inaugural-Dissertation

zur

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

> vorgelegt von Andrea Eberle aus Lüdenscheid

> > März 2008

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie (Direktor: Prof. Dr. med. D. Häussinger) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Koreferent: Prof. Dr. med. D. Häussinger Prof. Prof. h. c. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Zelltod: Apoptose versus Nekrose	1
1.2 Apoptose in der Physiologie und Pathophysiologie der Leber	2
1.3 Todesrezeptoren und ihre Liganden	3
1.4 Wachstumsfaktoren und ihre Liganden	6
1.5 Ziele dieser Arbeit	7
II. Material & Methoden	8
Material	8
2.1 Chemikalien	8
2.2 Antikörper & Enzyme	10
2.3 Protein- und DNA-Standards	10
2.4 Reagenzienpackungen	11
2.5 Oligonukleotide	11
2.6 Plasmide	12
2.7 Bakterienstämme	15
2.8 Zellkulturen	15
2.9 Puffer	15
2.10 Zellkulturmedien	17
Methoden	18
2.11 Molekularbiologische Standardmethoden	
2.12 Plasmidpräparationen	
2.13 Polymerasekettenreaktion	18
2.14 PCR-basierte Mutagenese	19
2.15 Agarosegelelektrophorese	20
2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.17 Western Blot	20
2.20 Immunopräzipitation	21
2.21 Immuncytochemische Anfärbungen	21
2.22 Transfektion	22
2.23 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-Assay	22
2.24 Konfokale Mikroskopie	23
2.25 FRET Messungen	24
2.26 Statistische Methoden	24

III. Ergebnisse
3.1 Transfektion und Funktionalität der Fusionsproteine25
3.2 Hyperosmolare Aktivierung von EGFR und CD95 in Huh7 Hepatomazellen28
3.3 Studien der CD95-YFP-EGFR-CFP-Interaktion und Membrantranslokation31
3.4 Die Rolle der Mikrotubuli in der CD95-Aktivierung36
3.5 CD95-Mutagenese: Die Rolle der Tyrosinreste
3.6 CD95-Oligomerisierung als Antwort auf proapoptotische Stimuli43
3.7 Abhängigkeit der CD95-Oligomerisierung von der Tyrosinphosphorylierung46
3.8 CD95-Ligand induzierte Oligomerisierung der CD95-Mutanten51
3.9 EGF induzierte EGFR-Oligomerisierung54
IV. Diskussion60
V. Referenzen64
VI. Zusammenfassung77
VI. Zusammenfassung77
VII. Summary78
IIX. Anhang79
8.1 Abkürzungen79
8.2 Lebenslauf81
8.3 Veröffentlichungen
IX. Danksagung84
X. Eidestattliche Erklärung85

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Eberle A, Reinehr R, Becker S, Keitel V and Häussinger D. CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization. Apoptosis **12**:719-29 (2007)

Eberle A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. Hepatology **41**, 315-326 (2005).

I. Einleitung

1.1 Zelltod: Apoptose versus Nekrose

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und umschreibt das Abfallen der Blätter von einem Baum im Herbst oder von Blütenblättern einer verblühten Blume. In der modernen Biologie steht der Begriff Apoptose für den programmierten Zelltod, einem Prozess, bei dem eine Zelle nach einem bestimmten Muster stirbt¹. Diese Form von Zelltod wurde 1972 erstmals von Kerr und Mitarbeitern beschrieben und als Apoptose bezeichnet². Allerdings gibt es bereits aus dem späten 19. Jahrhundert Berichte von einer Form von Zelltod mit den speziellen morphologischen Merkmalen der Apoptose. Während bis 1980 das Interesse an diesem Forschungsgebiet gering war³, hat sich dies in den letzten Jahren geändert. Am eindrucksvollsten wird dies durch die Verleihung des Nobelpreises 2002 in Physiologie und Medizin an Brenner, Horvitz und Sulston "für ihre Entdeckungen, betreffend die genetische Regulation der Organentwicklung und des programmierten Zelltods" dokumentiert⁴.

Die typischen Kennzeichen einer Zelle, die apoptotisch stirbt, umfassen die Kondensation des Kerns mit Auffaltung des Chromatins, Kondensation des Zytoplasmas, Rundung der Zelle, die Bildung sog. Apoptosekörperchen ("blebs") bei voller Membranintegrität (Zeiosis), intranukleosomale DNA-Zerstückelung und den apoptotischen Volumenverlust (apoptotic volume decrease; AVD). AVD findet man in nahezu allen apoptotischen Zellen als frühes Apoptoseereignis⁵⁻⁸. Die Volumenabnahme wird durch Hemmung von Ionentransportern, die das Zellvolumen aufrecht erhalten⁷, oder die vermehrte Aktivierung von Transportern, die Osmolyte aus der Zelle schaffen, erreicht^{9,10}. Durch Hemmung dieser Transporte kann man der Apoptose entgegenwirken¹¹⁻¹³. Die Signalwege, die zu einem veränderten Transport führen, sind noch wenig untersucht. In dieser Arbeit wurde durch Stimulation mit hyperosmolarem Medium der AVD simuliert und Reaktionen der Zelle auf diese veränderten Bedingungen zu untersuchen.

Im Gegensatz zur Apoptose, beschreibt Nekrose – abgeleitet vom griechischen Ausdruck für "tot" oder "sterbend" – eine Art des Zelltodes, der durch Zellschwellung charakterisiert wird, welche letztendlich zum Zerreißen der Zellmembran führt.

Nekrose führt zur Desintegration und Lyse des Kerns, Schwellen von Organellen und der gesamten Zelle, Zerstörung der Plasmamembran, und zufälliger DNA-Degradation¹⁴. Während nekrotischer Zelltod oft eine Leukozyteninvasion und eine allgemeine Entzündungsreaktion auslöst¹⁵, werden apoptotische Zellen von Makrophagen oder angrenzenden Zellen ohne entzündliche Gewebereaktionen phagozytiert.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass einige Zellen während des Absterbens sowohl apoptotische als auch nekrotische Kennzeichen ausbilden können. Neuere Definitionen von Zelltod unterscheiden nicht nur den apoptotischen und nekrotischen Zelltod, sondern auch gemischte Formen wie den nekroseartigen und den apoptoseartigen programmierten Zelltod.

1.2 Apoptose in der Physiologie und Pathophysiologie der Leber

Die Leber ist ein einzigartiges Organ, besonders weil sie die Fähigkeit besitzt, sich nach einer Schädigung oder einer teilweisen Resektion zu erneuern¹⁶. Diese Fähigkeit wird schon in der altgriechischen Legende von Prometheus beschrieben, dessen stets nachwachsende Leber täglich aufs Neue von einem Adler gefressen wurde. Die Leber kann Resektionen von bis zu 70% ihres Eigengewichts unter vollständiger Wiederherstellung des Ausgangsgewichts und der Leberfunktion kompensieren. Ruhende Zellen werden angewiesen, in den Zellzyklus einzutreten und dessen verschiedene Phasen unter dem Einfluss verschiedener Proteine, Wachstumsfaktoren und zellzyklusabhängiger Kinasen, zu durchlaufen¹⁷. Um diese Prozesse zu kontrollieren, interagieren zytokinabhängige und -unabhängige Signaltransduktionswege miteinander. Die Notwendigkeit multipler Signale schützt die Leber vor Hyperplasie, indem sie die Balance zwischen Zelltod und Zellwachstum hält¹⁸.

Zytokine aus der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie spielen bei der Regeneration der Leber eine wichtige Rolle, sind aber auch an der Apoptose von Leberzellen beteiligt¹⁹. Ihre Fähigkeit, verschiedene und sogar vollständig entgegengesetzte Prozesse wie Zellvermehrung und Zelltod zu veranlassen, wird als Pleiotropie bezeichnet. Eine wichtige Rolle in der Induktion von hepatischer Apoptose spielt CD95 Ligand (CD95L) zum Beispiel bei viralen Hepatitiden, dem Morbus Wilson, der Fettleberhepatitis, der Entwicklung der alkoholtoxischen Leberzirrhose, des endotoxininduzierten Leberversagen und des reperfusionsinduzierten Leberschadens²⁰⁻²². Im Modell läßt sich dies durch Gabe von CD95L, hydrophoben Gallensalzen oder Ethanol herbeiführen²³⁻²⁸.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Todesrezeptoren und ihr jeweiliger Agonist pleiotrop wirken, indem sie Zellwachstum und Apoptose regulieren. Dieses stark kontrollierte Gleichgewicht ist eine Voraussetzung für die Organhomöostase und die Funktionsfähigkeit der Leber. Störungen in diesem Gleichgewicht können pathogene oder sogar tödliche Folgen haben.

1.3 Todesrezeptoren und ihre Liganden

Bis heute sind 29 Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie identifiziert worden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Ereignissen und kontrollieren z.B. angeborene und adaptive immunologische Funktionen. Im Mittelpunkt der Forschung stehen dabei die Induktion des Zelltods und die Regulation von Entzündungsprozessen²⁹. Außerdem könnten Todesrezeptorliganden, wie zum Beispiel CD95L, TNF α und TRAIL potenziell therapeutische Anwendung in der Krebstherapie finden, mit Beschränkungen im Fall von TNF α und CD95L aufgrund ihrer systemischen Toxizität³⁰. Todesrezeptoren werden anhand ihrer zytoplasmatischen Sequenzen und Signaltransduktionseigenschaften in drei Hauptgruppen eingeteilt³¹:

Bekannteste Mitglieder der ersten Gruppe, die durch das Vorhandensein einer so genannten Todesdomäne (Death Domain; DD) im zytoplasmatischen C-Terminus charakterisiert wird, sind der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor CD95 und die TRAIL-Rezeptoren 1 und 2. Aktivierung von Rezeptoren dieser Gruppe durch ihren jeweiligen di- oder trimerisierten Liganden führt zur Rekrutierung von DD-enthaltenden Adaptermolekülen wie zum Beispiel Fas associated protein with death domain (FADD) oder TNF-R associated death domain protein (TRADD). Diese Adaptermoleküle können nun mit Hilfe ihrer death effector domain (DED) die Caspasekaskade aktivieren und die Apoptose einleiten.

Die zweite Gruppe der Rezeptoren enthält einen oder mehrere TRAF (TNFR associated factor) – Interacting Motives (TIMs) und schließt zum Beispiel TNF-R2 oder den Lymphotoxin- β Rezeptor ein. Aktivierung dieser Rezeptoren aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege, wie beispielsweise Nuclear Factor κ B (NF- κ B), cJun-N-terminale Kinasen (JNK), p38, oder Phosphoinositide 3-Kinasen (PI3K).

Die dritte Gruppe schließt die TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 und Osteoprotegerin mit ein, die praktisch keine intrazellulären Domänen oder Leitmotive enthalten. Obwohl diese Gruppe keine intrazellulären Signale erzeugen kann, können Mitglieder dieser Gruppe effektiv mit den Rezeptoren aus den anderen zwei Gruppen um ihren entsprechenden Liganden konkurrieren und stellen möglicherweise ein regulatorisches Gegengewicht zu den funktionalen Rezeptoren dar³².



Abbildung 1: Schematische Darstellung des CD95³³.

Der Rezeptor CD95 (auch bekannt als Fas oder Apo1) wird in verschiedenen Geweben exprimiert, besonders stark im Thymus, in der Leber, im Herzen und in der Niere. Sein Ligand CD95L kommt überwiegend in aktivierten T-Lymphozyten oder natürlichen Killerzellen vor. Er ist auch in immunprivilegierten Stellen wie zum Beispiel Hoden und Auge konstitutiv exprimiert, eine Tatsache, die die Bedeutung des CD95/CD95L-Systems in der T-Zellselektion und Immunologie zeigt. Bindung von CD95L an seinen Rezeptor führt zur Ausbildung des death inducing signalling complex (DISC) welcher – im Unterschied zum TNF-R System –hauptsächlich aus dem trimerisierten Rezeptor, FADD und Caspase-8 besteht³⁴.

In dieser Arbeit soll es aber weniger um diese bereits gut untersuchten "downstream"-Kaskaden gehen, sondern um die Aktivierung des CD95 "upstream" des oben beschriebenen Signalweges. So ist die Aktivierung des CD95 durch den EGF-Rezeptor Gegenstand der Forschung unserer Arbeitsgruppe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit hyperosmolarem Medium (405mosmol/l)²³ zu einer Interaktion der beiden Rezeptoren kommt, die zu einer Aktvierung des CD95-Systems über eine Membranrekrutierung des Rezeptors führt³⁵. Außerdem ist eine Tyrosinphosphorylierung des CD95 für deren Aktivierung notwendig³⁶.



Abbildung 2: Aminosäuresequenz des CD95. Rot: Mutantionsstellen Tyrosin \rightarrow Phenylalanin.

Gegenstand dieser Arbeit ist es unter anderem, den bestimmten Tyrosinrest des CD95-Rezeptors zu identifizieren, der bei einer Aktivierung durch den EGF-Rezeptor phosphoryliert wird. Die Proteinsequenz des CD95-Rezeptors³⁷ verfügt nur über drei Tyrosinreste. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils durch PCR-basierte Mutagenese ein, zwei oder drei Tyrosin- durch Phenylalaninreste ersetzt. Die beiden Aminosäuren unterscheiden sich in einer Hydroxylgruppe am resonanzstabilisierten Benzolring, wodurch Phenylalanin im Gegensatz zu Tyrosin nicht phosphoryliert werden kann. Die resultierenden Mutanten wurden auf ihre Funktionalität und Interaktion mit dem EGF-Rezeptor untersucht. Hierzu war die Generierung eines fluorenszenzmarkierten EGFR-Konstruktes notwendig. Eine Einführung zu diesem Wachstumsfaktor wird im nächsten Abschnitt gegeben.

1.4 Wachstumsfaktoren und ihre Liganden

Die Rezeptoren für die meisten Wachstumsfaktoren sind Transmembranproteine mit Tyrosinspezifischer Proteinkinase-Aktivität³⁸. Sie bilden neben Rezeptor-Guanylatcyclasen, Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinphosphatasen und Rezeptor-Serin/Threoninkinasen die fünfte Gruppe der Enzym-gekoppelten Rezeptoren.

Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR wurde 1982 als das erste Rezeptorprotein der Klasse der Tyrosin-spezifischen Proteinkinasen entdeckt³⁹. Der epidermale Wachstumsfaktor EGF ist ein aus 53 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Funktion zunächst als die Stimulation des Wachtums von epidermalen Zellen beschrieben wurde. Es ist aber auch in der Lage, mit anderen Zellen zu interagieren. Der EGF-Rezeptor umfasst 12000 Aminosäuren und enthält eine Transmembrandomäne und eine große glykosylierte, extrazelluläre Domäne, die EGF bindet. Durch die Bindung von EGF wird der intrazelluläre Teil, eine Rezeptor-Tyrosinkinase, aktiviert. Die aktivierte Enddomäne überträgt eine Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat auf andere Proteine. In dieser Arbeit wird durch Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)-Bindungsstudien gezeigt, dass EGFR so mit dem Todesrezeptor CD95 interagiert und dessen Aktivierung auslöst.

Eine Reihe anderer Wachstumsrezeptoren sind ebenfalls Rezeptortyrosinkinasen⁴⁰. So zum Beispiel der aus Thrombozyten gewonnene Wachstumsfaktor (Platelet Derived Growth Factor; PDGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fibroblast Growth Factors; FGF), Hepatozyten-Wachtumsfaktor (Hepatocyte Growth Factor; HGF), Insulin, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like Growth Factor-1; IGF 1), Nerven Wachstumsfaktor (Nerve Growth Factor; NGF) oder der vaskuläre endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF).

All diese Rezeptoren haben trotz kleinerer struktueller Unterschiede gemeinsam, dass sie sich selbst phosphorylieren, um eine intrazelluläre Signalkaskade einzuleiten. Die Signalübertragung vom extrazellulären zum intrazellulären Teil erfolgt hierbei durch Dimerisierung des Rezeptors⁴¹. Dadurch können sich die beiden cytoplasmatischen Domänen gegenseitig phosphorylieren, eine so genannte Autophosphorylierung. Die Dimerisierung kann, wie beim PDGF, über ein dimerisiertes Ligandenpaar erfolgen oder aber durch eine konformationelle Änderung des Rezeptors nach Ligandenbindung. Die autophosphorylierten Tyrosinreste dienen als hochaffine Bindungsstellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine in der Zielzelle. Viele dieser Proteine werden nach der Bindung an den Rezeptor selbst an Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert. Dies kann je nach Zielprotein unterschiedliche Signalkaskaden in der Zelle auslösen⁴².

1.5 Ziele dieser Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der durch hyperosmolares Medium (405 mosmol/l), CD95L oder hydrophobe Gallensalze ausgelösten Interaktion des CD95 mit dem EGFR, die zu einer Aktivierung des CD95-Systems über eine Membranrekrutierung des Rezeptors führt⁴³.

Um diesen Vorgang genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Expressionsplasmide mit einem CD95-gelbfluoreszierenden Protein (YFP) -Fusionsprotein sowie einem EGFR-blaufluoreszierenden Protein (CFP) - Fusionsprotein unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV) -Promotors kloniert. Die Auswahl der Fluoreszenzproteine erfolgte so, dass sie optimal für die Messung von FRET-Ereignissen sind. Die Fluoreszence Resonance Energy Transfer (FRET)-Technik erlaubt Aussagen über die Protein-Protein-Interaktionen zweier Moleküle in der lebenden Zelle^{44,45}: damit die Energieübertragung nach Anregung eines der Proteine durch den Laser von CFP auf YFP möglich ist, müssen sich die beiden Proteine in einem Abstand von weniger als 10 nm befinden^{46,47}. Nur dann ist eine Energieübertragung von CFP auf YFP möglich und es kommt zu einem FRET-Ereignis mit einer mikroskopisch nachzuweisenden Fluoreszenzemission des nicht durch den Laser angeregten Proteins. Unserer Arbeitsgruppe steht im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 575 ein Laserscanningmikroskop mit META-Scankopf zur Verfügung, das speziell für FRET-Messungen konstruiert wurde. So kann die Interaktion der beiden Fusionsproteine nach Stimulation zeitlich und räumlich dargestellt werden.

Es konnte immunbiochemisch gezeigt werden, dass die Translokation des CD95/EGFR-Komplexes abhängig von einer Tyrosinphosphorylierung des CD95 ist. Um diese Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen, wurden durch PCR-basierte Mutagenese Mutanten hergestellt, in denen entweder ein, zwei oder alle drei Tyrosinreste des CD95-YFP-Konstruktes durch Phenylalanin ersetzt wurden. Die Mutante, die anstelle des natürlicherweise phosphorylierten Tyrosinsrests einen Phenylalaninrest besitzt, sollte sich deutlich vom Wildtyp im Translokationsverhalten nach Stimulation unterscheiden, da für die Phosphorylierung kein Reaktionspartner mehr zur Verfügung steht.

Außerdem sind mit diesem Modell Untersuchungen des Bindungsverhaltens der einzelnen Interaktionspartner untereinander möglich, indem FRET-Signale in Zellen, welche mit CFP- und YFP-Fusionsproteinen desselben Proteins transfiziert wurden, untersucht werden. Für CD95 wurden bisher nur indirekte Nachweise einer Oligomerisierung erbracht⁴⁸⁻⁵⁰. Durch FRET-Studien ließ sich eine genaue zeitliche und räumliche Einordnung der Oligomerisierung geben und so wesentlich zum Verständnis dieses Signalweges beitragen.

II. Material & Methoden

<u>Material</u>

2.1 Chemikalien

AG 1478	Calbiochem (Bad Soden)
Agar	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Agarose (Molecular Biology Grade)	Biozym (Oldendorf)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin	Roth(Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bactotrypton	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
cAMP	Calbiochem (Bad Soden)
CD95-Ligand	Alexis (Grünberg)
Colchizin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Dulbeco's modified Eagle's medium Fraktion 12	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Enhanced Chemiluminescent Substrat	Amersham (Braunschweig)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
H89	Calbiochem (Bad Soden)
Hefeextrakt	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
Insulin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropylthio- β -D-galatopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)

Leupeptin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
L-Glutamin	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)	
Lipofektamine 2000	Invitrogen (De Schelp, NL)	
L-JNKI-1nhibitor	Alexis (Grünberg)	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)	
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Optimem	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)	
Pefablock	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)	
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)	
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Sojabohnen Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Taxol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Triton X 100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	
Trypsin	Biomol (Hamburg)	
X-Gal	Roth (Karlsruhe)	
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell	
Bradford-Assay	Bio-Rad (München)	
Andere biochemische Reagenzien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.		

2.2 Antikörper & Enzyme

Anti-CD95	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-FADD	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-GFP	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-Caspase 8	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-EGFR	BioSource (Camarillo, US)
Anti-phospho-Tyrosin	Biomol (Hamburg)
HRP-konjugierte anti-Maus IgG	Bio-Rad (München)
HRP-konjugierte anti-Kaninchen IgG	Bio-Rad (München)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach)
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen (De Schelp, NL)

2.3 Protein- und DNA-Standards

_____ 10

Prestained Precision Plus Protein Standard	SmartLadder	
Bio-Rad (München)	Eurogentec (Köln)	
— 250 kD	Band size	ng/band 100
- 150	8000	80
— — 100	5000	50 50
- 75	3000	30 30
- 50	2000	25 20
	1500	15 100
25	800 600	80 60
- 15		10

Abbildung 3: Verwendete Protein- und DNA-Standards. Quelle: Produktbeschreibung

40

20

400

2.4 Reagenzienpackungen

QIAprep [®] Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
HiSpeed [®] Plasmid Maxiprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep [®] Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
MinElute [™] PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNEasy [™] RNA Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche (Mannheim)
First Strand Synthesis Kit	Roche (Mannheim)
PCR Core Kit	Roche (Mannheim)

2.5 Oligonukleotide

CD95 fwd:	5'- GTC GAC CAC TTC GGA TTG CTC AAC-3'
CD95 rev:	5'- CTC TAG ACT AGA CCA AGC TTT GGA TTT C-3'
CD95 Xho1:	5'- TGC TCG AGA TGC TGG GCA TCT GGA CCC TCC TAC CT-3'
CD95 Kpn 1:	5'- CGG TAC CGT CGA CAC CAA GCT TTG GAT TTC ATT TCT-3'
CD95 A:	5'- GCA GAG CTG GTT TAG TGA AC-3'
CD95 B:	5'- GTC CAG CTC GAC CAG GAT GG-3'
CD95 Y91F-As:	5'- GGA AGG AAT TCA CAG ACA AAG CC-3'
CD95 Y91F-Bas:	5'- CTT TGT CTG TGA ATT CCT TCC CTT C-3'
CD95 Y232F-As:	5'- GAG TAA ATT TAT CAC CAC TAT TGC TG-3'
CD95 Y232F-Bas:	5'- GTG GTG ATA AAT TTA CTC AAG TC-3'
CD95 Y291F -As:	5'- GAA GCG TTT GAC ACA TTG ATT AAA G-3'
CD95 Y291F -Bas:	5'- CAA TGT GTC AAA CGC TTC TTT CTT TCC-3'
EGFR CFP Kpn 1:	5'- GAC GGT ACC CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG G-3'
EGFR CFP Not1:	5'- CAA ATG TGG TAT GGC TGA TTA TG-3'

Alle Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms Primerexpress (Applied Biosystems) ausgewählt, sofern sie nicht, wie im Falle der Mutageneseprimer, bereits durch den experimentellen Aufbau determiniert wurden und von der Firma MWG Biotech (Eberswalde) synthetisiert.

2.6 Plasmide

Verwendete kommerzielle Vektoren:

pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pGEM T-Easy	Promega (Madison, USA)
pE-YFP-N1	Clontech (Palo Alto, USA)
pE-CFP-N1	Clontech (Palo Alto, USA)
pE-GFP-N3	Clontech (Palo Alto, USA)

Namensgebung

Plasmid 1 pTOPO-TA-CD95*
Plasmid 2 CD95-YFP
Plasmid 3 CD95-CFP
Plasmid 4 CD95-Y91F-YFP
Plasmid 5 CD95-Y232F-YFP
Plasmid 6 CD95-Y291F-YFP
Plasmid 7 F7 erb B1-EGFP (freundlicherweise von Prof. Dr. Arndt-Jovin, Göttingen überlassen)
Plasmid 8 EGFR-CFP
Plasmid 9 EGFR-YFP

*Accession-Nummer (PubMed) der CD95 mRNA: NM_000043

Eigenschaften

Um die Eigenschaften dieser Plasmide darzustellen, werden auf den folgenden Seiten die Restriktionskarten unter der oben angegebenen Nummerierung der Plasmide dargestellt und erklärt, welche molekularbiologischen Schritte notwendig waren, um das endgültige Plasmid zu generieren. Alle fertigen Plasmide wurden kommerziell bei MWG Biotech, Eberswalde sequenziert, um den Klonierungserfolg zu überprüfen.

Plasmid 1 pTOPO-TA-CD95:



Abbildung 4: Vektorkarte des pCR2.1-TOPO. Quelle: Invitrogen.com

Das PCR-Produkt aus einer RT-PCR mit den Primern CD95 fwd und CD95 rev und Hep G2 mRNA wurde in die Multiple Cloning Site eingefügt.

Plasmid 2 CD95-YFP; Plasmid 4 CD95-Y91F-YFP; Plasmid 5 CD95-Y232F-YFP; Plasmid 6 CD95-Y291F-YFP:



Abbildung 5: Vektorkarte des pEYFP-N1. Quelle: Clontech.com

Über die Restriktionsschnittstellen Xho1 und Kpn1 wurde eine verkürzte Form (ohne Stop-Codon) des in 1 gewonnenen Inserts integriert.

Plasmid 3 CD95-CFP:



Abbildung 6: Vektorkarte des pECFP-N1. Quelle: Clontech.com

Über die Restriktionsschnittstellen Xho1 und Kpn1 wurde eine verkürzte Form (ohne Stop-Codon) des in 1 gewonnenen Inserts integriert.

Plasmid 7 F7 erb B1-EGFP; Plasmid 8 EGFR-YFP; Plasmid 9 EGFR-CFP:



Abbildung 7: Vektorkarte des pEYFP-N3. Quelle: Clontech.com

Über die Restriktionsschnittstellen Kpn1 und Not1 wurde GFP gegen CFP bzw. YFP ausgetauscht.

2.7 Bakterienstämme

TOP 10 F'

XL1-blue

JM 109

2.8 Zellkulturen

MEF (Embryonale Mausfibroblasten)⁵¹

HepG2 (Humane Hepatomazellen)⁵²

Huh7 (Humane Hepatomazellen)⁵³

NIH 3T3 (Humane Fibroblasten)⁵⁴

2.9 Puffer

Puffer für molekularbiologische Methoden

Flüssigmedien	LB-Medium	
	1% (w/v)	Bactotrypton
	0.5% (w/v)	Hefeextract
	0.5% (w/v)	NaCl
	SOC-Medium	
	2% (w/v)	Bactotrypton
	20 mM	Glukose
	0.5% (w/v)	Hefeextrakt
	2.5 mM	KCI
	10 mM	MgCl2
	10 mM	MgSO4
	10 mM	NaCl
Festmedien	<u>LB-Agar</u>	
	1% (w/v)	Bactotrypton
	0.5% (w/v)	Hefeextract
	0.5% (w/v)	NaCl
	2% (w/v)	Agar
A 111 111 1 1 1 1 1 50		

Antibiotikakonzentrationen: 50 μ g/ml Kanamycin (kan) und 100 μ g/ml Ampicillin (amp).

Stratagene (Heidelberg)

Qiagen (Hilden)

New England Biolabs (Schwalbach)

Puffer für analytische Methoden

Immunoblot	<u>RL-Puffer</u>	Blockierlösun	<u>Blockierlösung</u>	
	10 mM Tris HCl pH 7,4	5 % (w/v) BS	SA in PBS	
	1 % Triton X-100	1 % Triton X-	-100	
	150 mM NaCl			
	10 mM Na₄P ₂ O ₂	Semi-Dry-Blo	t-Puffer	
	1 mM EDTA	1 25 mM SDS	1	
	20 mM NaF	25 mM Tris N	25 mM Tris NaOH	
	1 mM Na-Vanadat	160 mM Glyci	in	
	20 mM β -Glycerophosphat			
	Complete Protease Inhibitor			
Immunopräziptation	Lysispuffer	<u>Waschpuffer</u>		
	136 mM NaCl	136 mM NaCl		
	20 mM Tris HCl pH 7,4	20 mM Tris H	20 mM Tris HCl pH 7,4	
	10% (v/v) Glycerol	10% (v/v) Gly	ycerol	
	2 mM EDTA pH 8	2 mM EDTA p	oH 8	
	50 mM β -Glycerophosphat	50 mM β-Glya	cerophosphat	
	20 mM Na-Pyrophosphat	20 mM Na-Py	rophosphat	
	0,2 mM Pefablock	0,2 mM Pefablock		
	5 µg/ml Aprotinin	5 µg/ml Aprotinin		
	5 µg/ml Leupeptin	5 µg/ml Leupeptin		
	4 mM Benzamidin	4 mM Benzan	4 mM Benzamidin	
	1 mM Na-Vanadat	1 mM Na-Vanadat		
	1 % (v/v) Triton X-100	0,1 % (v/v) T	riton X-100	
Agarosegel	50xTAE	<u>Agarosegel</u>		
	2M Tris base	0.7% (w/v)	Agarose	
	57,1% (v/v) Eisessig	40 mM	Tris HCL pH 7,4	

EDTA

1 mM

50mM EDTA

pH 8

2.10 Zellkulturmedien

Huh7-Medium

Hepatozytenmedium

William's Eagle Medium 5% (v/v) Fetal Calf Serum 1% (v/v) Penecillin/Streptomycin 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) NEAS 1% (v/v) Pyruvat William's Eagle Medium
5% (v/v) Fetal Calf Serum
1% (v/v) Penecillin/Streptomycin
1% (v/v) L-Glutamin
100 nM Insulin
100 nM Dexamethason in DMSO

Methoden

2.11 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden, wie der enzymatische DNA-Restiktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen, Herstellung chemokompetenter Zellen, Ligationen und Transformationen wurden nach Standardmethoden durchgeführt⁵⁵.

2.12 Plasmidpräparationen

Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe verschiedener Kits der Firma Qiagen. In allen diesen Kits wird ein Zelllysat in einer Chromatographiesäule mit Diethylaminoethanol (DEAE) in Kontakt gebracht, das an eine Kieselgelmatrix gebunden ist. An diesen basischen Ionenaustauscher binden die Phosphatgruppen der DNA. Die Bindungsaffinität für DNA, aber auch für Verunreinigungen wie RNA oder Proteine, hängt entscheidend vom pH und der Salzkonzentration des Milieus ab. So wird DNA erst in Gegenwart wesentlich höherer Salzkonzentrationen als andere, verunreinigende Substanzen eluiert. Durch Waschen der beladenen Säule mit Puffern steigender Salzkonzentration werden also zunächst Verunreinigungen und später die nun reine DNA eluiert. Bei der Durchführung der Plasmidpräparationen wurden keine Abweichungen von den Herstellerangaben gemacht.

2.13 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vermehrung von spezifischen DNA-Molekülen in vitro (Amplifikation)⁵⁶. Dabei bindet je ein zuvor synthetisiertes Oligonukleotid (Primer) an einen komplementären Abschnitt an einem Ende der Zielsequenz (Annealing). Daraufhin wird durch eine DNA-Polymerase ein zur Zielsequenz komplementärer DNA-Strang synthetisiert (Extension). Nach Trennung der beiden Stränge durch Erhitzen (Denaturierung) können die neu synthetisierten Stränge dem anderen der beiden Primer als Zielsequenz dienen und in einer Kettenreaktion selbst immer wieder kopiert werden. Der Zyklus aus Annealing, Extension und Denaturieren wird durch Temperaturveränderungen gesteuert, da jeder Schritt bei einer bestimmten Temperatur abläuft. Zur Amplifikation führt man üblicherweise 25 bis 30 solcher Zyklen durch.

In dieser Arbeit wurden, soweit nicht anders vermerkt, 10 ng DNA als Matrize verwendet. Das Reaktionsgemisch, bestehend aus der Matrize, 0,25 mM Desoxynukleotiden, je 0,5 μ M Primer, PCR-Puffer und taq-Polymerase wurde nach einer initialen Denaturierung von 1 min bei 90°C über 25 Zyklen für 30 s bei 60°C, 4 min bei 74°C und 30 s bei 90°C inkubiert. Noch nicht vollständige DNA- Stränge wurden durch eine zehnminütige abschließende Extension verlängert.

2.14 PCR-basierte Mutagenese

In Anlehnung an die Methode der "site-specific mutagenesis by overlap extension" wurde im CD95-YFP-Plasmid je ein Nukleotid ausgetauscht^{57,58}. Dadurch wurde eine Substitution eines spezifischen Tyrosin-kodierenden Triplets zu einem Phenylalanin-kodierenden Triplet in der kodierenden RNA-Sequenz und ein Aminosäureaustausch im translatierten Protein erreicht.

Hierzu wurden die Primer CD95 A und B entworfen, die jeweils zu der das Insert umgebenden pE-YFP-N1-Sequenz komplementär sind. Die Primer CD95 Y91F-As, CD95 Y91F-Bas, CD95 Y232F-As, CD95 Y232F-Bas, CD95 Y291F-As und CD95 Y291F-Bas entsprechen jeweils komplementären Sequenzen, die die Mutation beinhalten und diese Stelle mit mindestens 10 Basenpaaren umschließen.

Bei der ersten PCR wurden nun zwei PCR-Fragmente generiert, welche vom Beginn der codierenden Sequenz bis zur Mutation bzw. von der Mutation bis zum Ende der codierenden Sequenz reichen. In einem zweiten Schritt wurden diese beiden Fragmente nach einer Gelextraktion ebenfalls mittels PCR zu einem Fragment fusioniert.

Mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment, welches die Mutation enthält, gegen das ursprüngliche Fragment ohne Mutation ausgetauscht.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der PCR-basierten Mutagenese nach Sambrook 2001

2.15 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld der Größe nach zum positiven Pol hin aufgetrennt.

Es wurden für die Überprüfung der Plasmidpräparationen und der Restriktionsverdaus 0.7 %-2 % TAE-Agarosegele mit 0,01 % (v/v) Ethidiumbromid verwendet. Dadurch erreicht man eine Auftrennung von DNA-Molekülen zwischen 12 und 0.1 kb. Die DNA Proben wurden in Auftragspuffer geladen. Als Größenstandard wurde SmartLadder (vgl. Material) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V/cm³. Die Banden wurden auf mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienzen oder im Anschluß an eine Immunpräzipitation wurden SDS-PAGE-Gele nach der Methode von Lämmli⁵⁹ hergestellt.

Die Proben wurden in RL-Puffer 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und dann gemeinsam mit dem Molekulargewichtsmarker mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.17 Western Blot

Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Die auf SDS-PAGE-Gelen aufgetrennten Proteine wurden nach der "Semi-Dry"-Methode von Kyhse-Andersen⁶⁰ elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte 120 min mit 0,8 mA/cm².

Ponceau-Färbung

Um die Qualität der Proteinübertragung zu kontrollieren und den Proteinstandard zu markieren, wurde nach dem Transfer 2 min mit Ponceau-Rot-Färbelösung inkubiert und mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen.

<u>Immunfärbung</u>

Die Membranen wurden in 5 % BSA 120 min abgesättigt. Auf dem Schüttler wurden die Membranen über Nacht mit dem primären Antikörper in PBS inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T (je 20 min) entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde 120 min mit der Membran inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T (je 20 min) entfernt. Der gebundene, sekundäre Antikörper wurde mit Enhanced Chemiluminescent Substrat (Amersham, Braunschweig) auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

2.20 Immunopräzipitation

Ungefähr 8 Mio. der zu untersuchenden, adhärenten Zellen wurden in IP-Lysispuffer aufgenommen und homogenisiert. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer 25 min bei 10000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde mit einem Bradford Assay⁶¹ auf seinen Proteingehalt hin untersucht. Gleiche Proteinmengen (500 µg) pro Probe wurden in identischen Puffervolumina verdünnt und 2 h bei 4 °C mit 1:100 verdünntem anti-GFP Antikörper inkubiert, um das Fusionsprotein zu binden. Je 10 µl Protein A und Protein G-Agarose wurden nach Ablauf der Inkubationszeit hinzugegeben und weitere 12 h inkubiert. Der ausgefällte Antikörper wurde durch Waschen mit IP-Waschpuffer gereinigt. Das Präzipitat wurde durch Western Blots mit einem anti-CD95 bzw. anti-EGFR Antikörper spezifiziert.

2.21 Immuncytochemische Anfärbungen

Adhärente Zellen wurden mit 4 % Formaldehyd in PBS 15 min bei Raumtemptempertur fixiert und nach Waschen mit PBS mit Triton-X-100 (0,1 % in PBS) für 10 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen für 30 min in PBS mit 0,1 % (w/v) BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Dann folgte eine Inkubation mit dem Erstantikörper in PBS bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Zellen wurden gewaschen und für 45 min mit dem FITC- bzw. CY3-gekoppelten Zweitantikörper (1:100 bzw. 1:200 in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen und Trocknen wurden sie mit VektorShield Einbettmedium (Vector) auf einem Objektträger fixiert, wobei die Deckgläser mit Nagellack umrandet wurden, um ein Austrocknen der Probe zu verhindern. Zur Überprüfung der Spezifität des ersten Antikörpers wurden Kontrollen ohne den ersten Antikörper durchgeführt. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mittels eines Laserscanningmikroskops 510 META (Zeiss, Jena) durchgeführt.

2.22 Transfektion

Um die hergestellten Fusionproteine in der Zielzelle zu exprimieren, wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamine 2000 verwendet. Abweichungen vom Herstellerprotokoll sind im Folgenden aufgeführt. Ein Transfektionsansatz aus 4 μ g Plasmid-DNA und 6 μ l Lipofektamine 2000 in 300 μ l Optimem pro 6 cm Schale wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurden die Zielzellen trypsiniert, 5 min bei 1000 g zentrifugiert und in einer Konzentration von ca. 5 x 10⁶ Zellen pro Schale ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde, mit zellspezifischem Medium verdünnt, auf die frisch ausgesäten Zellen pipettiert. Nach 12 h wurde das Transfektionmedium durch zellspezifisches Medium ersetzt.

Für Ansätze in einer 24-well Platte wurde jeweils ein Viertel des Ansatzes pro Einkerbung verwendet.

2.23 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-Assay

Der TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)-Assay⁶² dient zum Nachweis der durch Endonukleasen induzierten DNA-Strangbrüche als Merkmal der Apoptose. Die Markierung der so entstandenen freien 3'OH-Enden erfolgt durch die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT), die die Polymerisation von Nukleotiden unabhängig vom Matrizenstrang katalysiert. In dem verwendeten Assay dient biotinyliertes Desoxyuridintriphosphat als Substrat für die TdT. Dieses kann durch ein Streptavidin-TMRed-Konjugat detektiert werden. Die Durchführung erfolgte wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen wurde unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena) ermittelt, indem die TUNEL-positiven transfizierten Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzahl transfizierter Zellen in einem Sichtfeld gesetzt wurden. Für jeden Ansatz wurden mindestens 100 Zellen ausgezählt.

2.24 Konfokale Mikroskopie

Das Prinzip des konfokalen Laserscanning Mikroskops⁶³ ist in Abb. 2 dargestellt. Als Lichtquelle dient ein Laser (1). Die korrekte Wellenlänge für die Beleuchtung eines Fluoreszenzfarbstoffs kann durch einen Eingangssperrfilter ausgewählt werden. Dieser dünne Laserstrahl beleuchtet über einen dichromatischen Farbteilerspiegel (2) durch das Objektiv (3) das fluoreszenzmarkierte Präparat (4). Der dichromatische Teilerspiegel ist in diesem Falle ein optisches Element, welches bis zu einer bestimmten Wellenlänge Licht reflektiert, jedoch Licht von Wellenlängen oberhalb dieser Grenze passieren läßt. Das fluoreszenzmarkierte Präparat emittiert längerwelliges Licht, das durch das Objektiv, den für diese Wellenlänge durchlässigen dichromatischen Teilerspiegel und den Ausgangssperrfilter (zur Selektion des emittierten Wellenlängenbereichs) auf eine konfokale Lochblende (5) fällt. Diese ist so angeordnet, dass sie nur das Licht aus der Fokusebene passieren läßt. Alles andere Licht mit unscharfer Information aus Ebenen unterhalb und oberhalb des Fokus wird durch die Blende abgeschnitten. Das passierende Licht wird in einem Detektor (6) nach seinem Intensitätswert digitalisiert und in einem Computer gespeichert. Ein Scanner (7) bewegt den Laserstrahl auf einen nächsten Punkt des Präparats und wiederholt die gleiche Messung. Viele Punkte in x-Richtung ergeben eine Zeile, viele Zeilen in y-Richtung ergeben ein konfokales Bild einer optischen Schnittebene des Präparats.



Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Laserscanningmikroskops (nach Zeiss).

2.25 FRET Messungen

Die Fluorenscence Resonance Energy Transfer (FRET)-Technik wird eingesetzt, um den Abstand zwischen zwei Molekülen zu bestimmen, die mit verschiedenen Fluorophoren verbunden sind⁶⁴. Durch die Verknüpfung der optischen Mikroskopie mit FRET wird es möglich, zeitlich und räumlich Informationen über die Bindung und Interaktion von Proteinen in vivo zu erhalten. Diese Informationen liegen unterhalb der normalen Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops. In Verbindung mit der Entwicklung einer Vielzahl von Mutanten des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) bietet die FRET Mikroskopie die Möglichkeit, die Interaktionen von intrazellulären Proteinen in intakten lebenden Zellen zu messen. Dabei sind die Donor- und Akzeptor-Fluorophore selbst Teil der Proteine.

Die photophysikalischen Grundlagen des FRET beruhen auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, bei denen Energie vom angeregten Donor auf den eng benachbarten Akzeptor übertragen wird. Die Rate der Energieübertragnung nach Förster ist durch die Gleichung $k_t = \tau_D^{-1} (R_0/R)^6$ gegeben, wobei R (nm) die Distanz der beiden Fluoreszenzzentren, R_0 (nm) die Distanz bei der die Energietransfereffizienz 50% und τ_D (ns) die Lebenszeit der Fluoreszenz in Abwesenheit des Akzeptors ist. Besonders geeignet sind nach dieser Formel die Donor/Akzeptor-Paare BFP/GFP und CFP/YPF, die in einem Abstand von 4 nm bzw. 5 nm über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen interagieren⁴³. Da BFP/GFP aufgrund der schwächeren Fluoreszenz von BFP und dem kleineren Förster-Radius nicht so geeignet ist wie CFP/YFP, haben wir für unsere Experimente CFP und YFP verwendet. Allerdings beinhalten FRET Mikroskopie-Messungen verschiedene Fehlerquellen, die es zu korrigieren gilt. Hierzu gehören die direkte Anregung des Akzeptors durch die Donor Wellenlänge, sowie die Messung eines Donor Signals im Akzeptorkanal. Das in dieser Arbeit verwendete LSM 510 META besitzt eine 405 nm Laserdiode, die gegenüber einem herkömmlichen Argonlaser mit einer Anregung bei 458nm den Vorteil besitzt, das bei 405nm keine Anregung von YFP zu beobachten ist. Der integrierte META-Scankopf nimmt die Emission der Fluorophore über 8 Photomultiplier, die verschiedene Wellenlängen detektieren, getrennt auf und gleicht das entstandene Bild mit einem zuvor eingelesenen Spektrum des reinen Konstruktes ab. Durch diese Detektionsmethode kann der Hintergrund minimiert werden und zudem die Überlappung zwischen dem CFP und dem YFP-Emissionsspektrum rechnerisch eliminiert werden.

2.26 Statistische Methoden

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Jedes Experiment wurde mit mindestens 3 verschiedenen Ansätzen durchgeführt (n = Anzahl der Ansätze). Die Signifikanz wurde mittels Student t-Test berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 5% mit p < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

III. Ergebnisse

3.1 Transfektion und Funktionalität der Fusionsproteine

Primäre Rattenhepatozyten konnten als experimentelles System für Untersuchungen CD95-transfizierter Zellen, aufgrund ihrer allgemein bekannten schlechten Transfektionseigenschaften, nicht herangezogen werden. Daher wurde als Modell die Hepatomazellinie Huh7⁶⁵ verwendet, welche den experimentellen Vorteil aufweist, dass bei der Transfektion, im Vergleich zu Hepatozyten, keine störenden Effekte durch endogenen CD95 zu erwarten sind⁶⁶. EGFR-CFP, CD95-YFP und die CD95-Tyrosin-Mutanten wurden mit einer Transfektionseffizienz von 42 % ± 6 % (n = 3) in Huh7 Hepatomazellen transfiziert.



Abbildung 10: CD95-YFP und EGFR-CFP Transfektion in Huh7 Hepatomazellen¹⁰². Es wurden YFP-, CD95-YFP-, CD95-YFP-, CD95-YFP-Tyrosin→Phenylalaninmutanten- und EGFR-CFP-Konstrukte in Huh7 Hepatomazellen transfiziert. Die Expression der Proteine wurde mit Antikörpern gegen CD95, EGFR, und GFP-Varianten im Western Blot überprüft. Primäre Rattenhepatozyten und nicht transfizierte Huh7 Hepatomazellen dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. In allen Zellen wurde endogener EGFR exprimiert. Endogener CD95 wurde lediglich in Rattenhepatozyten exprimiert. In den mit einem YFP-Konstrukt transfizierten Zellen konnte man bei ca. 74 kDa das CD95-YFP Konstrukt mit einem Antikörper gegen GFP nachweisen. Das EGFR-Konstrukt wurde mit Antikörper gegen EGFR oder einem Antikörper gegen GFP bei ca. 196 kDa nachgewiesen.

Um die Expression der Fusionsproteine und die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden in Abbildung 10 dargestellte Western Blots gemacht. Auf dem oberen Western Blot wurde die Nitrozellulosemembran mit anti-CD95-Antikörper inkubiert. Hier wurden sowohl der endogen exprimierte CD95 in Hepatozyten, als auch das CD95-YFP Konstrukt nachgewiesen. Im mittleren Blot detektiert der anti-EGFR-Antikörper endogenen EGF-Rezeptor und dessen um CFP vergrößertes Fusionsprotein. Der untere Blot zeigt, dass alle Fusionsproteine auch mit anti-GFP nachgewiesen werden können. Dies ist möglich, da CFP und YFP Varianten von GFP sind, die sich nur durch wenige Aminosäuren unterscheiden. Das Antikörperepitop liegt in einer konservierten Region.

Um den Nachweis zu erbringen, dass das von uns verwendete CD95-Konstrukt auch funktionell aktiv ist, wurden die Zellen in Abbildung 11 mit dem natürlichen Liganden CD95L stimuliert. Während sich nicht transfizierte oder mit YFP transfizierte Zellen weitestgehend resistent gegen CD95L-induzierte Apoptose zeigten, führt die Stimulation mit CD95L zu einer dosisabhängigen Apoptoseinduktion in CD95-transfizierten Huh7 Hepatomazellen.



Abbildung 11: CD95L-vermittelte Apoptose in CD95-YFP transfizierten Huh7 Hepatomazellen¹⁰². Huh7 Hepatomazellen wurden mit CD95-YFP (▲) oder YFP (■) transfiziert. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen (○) verwendet. Die Proben wurden nach zwölfstündiger Inkubation mit CD95L im TUNEL-Assay untersucht. Die angegebenen Werte geben den Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen der jeweiligen Probe von drei voneinander unabhängigen Experimenten wieder. Die Tranfektion mit CD95 sensitiviert die Zellen für CD95L-induzierte Apoptose.

Nach einer zwölfstündigen Stimulation mit CD95L (100 ng/ml) waren 42% \pm 5% der CD95-transfizierten Zellen im TUNEL-Assay positiv. Dieser Nachweis von DNA-Strangbrüchen ist ein Indikator für Apoptose. Im Vergleich dazu waren bei der gleichen Stimulation nur 3% \pm 1,3% der mit YFP transfizierten Zellen TUNEL-positiv.

In unstimulierten Zellen befindet sich CD95 im Zytosol. Nach zweistündiger Stimulation mit CD95-Ligand findet man CD95 vermehrt an der Zellmembran (Abbildung 12).

Diese Befunde, sowie Immunpräzipitationsstudien in Abbildung 14, untermauern die These, dass das CD95-Konstrukt funktionell aktiv ist.

Das Fusionsprotein EGFR-GFP ist in Brock et al.⁶⁷ untersucht worden. Die Funktionalität des EGFR-CFP-Konstrukts konnte darüber hinaus über sein Phosphorylierungsmuster nachgewiesen werden (Abbildung 13).



Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CD95-YFP transfizierten Huh7 Hepatomazellen¹⁰². CD95-YFP transfizierte Huh7 Hepatomazellen wurden 2 h mit normoosmolaren Medium (305mosmol/L; links) oder CD95L (50ng/ml; rechts) inkubiert. Während in den Kontrollzellen der Rezeptor ausschließlich im Zytosol nachweisbar ist, fördert CD95L eine Umverteilung an die Zellmembran.

3.2 Hyperosmolare Aktivierung von EGFR und CD95 in Huh7 Hepatomazellen

Die in unserer Arbeitsgruppe erarbeiteten Ergebnisse⁶⁸ zur hyperosmolaren Aktivierung von Hepatozyten ließen sich für Huh7 Hepatomazellen, die mit CD95-YFP und EGFR-CFP transfiziert wurden, reproduzieren (Abbildung 13). Wie bereits mit immunzytochemischen Methoden gezeigt werden konnte, führt hyperosmolare Stimulation in Rattenhepatozyten zu einer schnellen ligandenunabhängigen, aber Yes-abhängigen Aktivierung des EGFR, einer EGFR-CD95-Assoziation, einer CD95-Tyrosinphosphorylierung, einer Membrantranslokation des Komplexes und einer DISC-Formierung⁶⁹. Diese Befunde konnten unter anderem unter Zuhilfenahme von Hemmstoffen an einzelnen Schritten der Kaskade bestätigt werden (Abbildung 14).



Abbildung 13: Hyperosmolare Stimulation aktiviert CD95 in Huh7 Hepatomazellen¹⁰². Nicht transfizierte und EGFR-CFP-transfizierte Huh7 Hepatomazellen wurden eine Minute normoosmolarem Medium (Kontrolle, 305 mosmol/L), hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L) oder EGF (50 ng/mL, 305 mosmol/L) ausgesetzt. Es wurde mit cAMP (100 µmol/L), H89 (5 µmol/L), L-JNKI-1 (5 µmol/L) oder AG1478 (5 µmol/L) jeweils 30 min, mit Colchizin (5 µmol/L) und Taxol (10 µmol/L) jeweils 60 min vorinkubiert. Endogener EGFR (oben) oder transfizierter EGFR-CFP (unten) wurden immunopräzipitiert und die EGFR Tyrosinphosphorylierung im Western Blot mittels EGFR- bzw. spezifischem Phospho-Tyrosin-Antikörper nachgewiesen. Hyperosmolarität und EGF aktivieren den endogenen EGFR und den transfizierten EGFR-CFP innerhalb einer Minute. Die hyperosmolare EGFR-EGFR-CFP Aktivierung war unabhängig von der JNK oder EGFR Tyrosinkinase Aktivität. Darüber hinaus konnte eine Hemmung der Mikrotubulifunktion durch Colchizin und Taxol die EGFR Phosphorylierung nicht verhindern.



Abbildung 14: Hyperosmolare Stimulation aktiviert CD95 in Huh7 Hepatomazellen¹⁰². CD94-YFP–transfizierte Huh7 Hepatomazellen wurden eine Minute normoosmolarem Medium (Kontrolle, 305 mosmol/L), hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L) oder EGF (50 ng/mL, 305 mosmol/L) ausgesetzt. Es wurde mit cAMP (100 μmol/L), H89 (5 μmol/L), L-JNKI-1 (5 μmol/L) oder AG1478 (5 μmol/L) jeweils 30 min, mit Colchizin (5 μmol/L) und Taxol (10 μmol/L) jeweils 60 min vorinkubiert. CD95-YFP wurden immunopräzipitiert und die interagierenden Proteine bzw. Proteinphosphorylierung nachgewiesen.

Untransfizierte und EGFR-CFP transfizierte Huh7 Hepatomazellen wurden eine Minute normoosmolarem Medium, hyperosmolarem Medium oder EGF ausgesetzt. Außerdem wurden Zellen mit cAMP, H89⁷⁰, L-JNKI-1⁷¹, AG1478⁷², Colchizin oder Taxol vorinkubiert (Abbildung 13). Sowohl der endogene EGFR, als auch der transfizierte EGFR-CFP wurden immunpräzipitiert und ihr Aktivierungsstatus über die Detektion der EGFR Tyrosinphosphorylierung mit einem entsprechenden Antikörper im Western Blot überprüft. Hyperosmolarität und EGF aktivieren den endogenen EGFR und den transfizierten EGFR-CFP innerhalb einer Minute. Die hyperosmotisch induzierte EGFR/EGFR-CFP Aktivierung wurde nicht durch die Hemmung der cJun-N-terminalen Kinase (JNK) oder der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität beeinflusst. Auch die Hemmung des Mikrotubuliapparates durch Colchizin oder Taxol hatte keinen Effekt auf die EGFR-Phosphorylierung.

In Abbildung 14 wird mittels Immunpräzipitation gezeigt, wie in CD95-YFP transfizierten Huh7 Hepatomazellen, die mit hyperosmolarem Medium stimuliert wurden, eine JNK-abhängige EGFR-CD95-Assoziation und eine CD95-YFP-Tyrosinphosphorylierung nach 30 min Stimulationsdauer stattfindet.

Hierzu wurden Huh7 Hepatomazellen mit CD95-YFP transfiziert und 30 bzw. 120 min hyperosmolarem, normoosmolaren Medium, CD95L oder EGF ausgesetzt. Durch eine Immunpräzipitation wurde CD95-YFP isoliert und auf seinen Phosphorylierungsstatus, seine Bindung an EGFR und die Bindung an DISC-Komponenten mittels Western Blot untersucht. Als Beladungskontrolle diente die Gesamtmenge an CD95-YFP. Im oberen Blot wurde gezeigt, dass Hyperosmolarität eine L-JNKI-1-Inhibtor-empfindliche, aber AG1478-, Colchizin und Taxolunempfindliche Assoziation mit dem EGFR binnen 30 min auslöst. Diese Assoziation führt zu einer AG1478-sensitiven Tyrosinphosphorylierung, was die Vermutung nahe legt, dass die EGFR-Tyrosinkinaseaktivität eine entscheidende Rolle für die darauf folgende CD95-Tyrosinphosphorylierung spielt. Die Hemmung der EGFR-Aktivierung mit cAMP oder die Verhinderung der CD95/EGFR-Assoziation durch JNK-Hemmung hemmt ebenfalls die CD95-Tyrosinphosphorylierung. Nach 120 min kommt es nach hyperosmolarem Stimulus oder CD95L-Gabe zur DISC-Bildung, hier nachgewiesen über die Koimmunopräzipitation von Caspase 8 und FADD an den CD95. Alle Bedingungen, die die CD95-Tyrosinphosphorylierung verhindern, blockieren auch die DISC-Bildung am CD95-YFP Protein. Die Hemmung der Mikrotubulifunktion durch Colchizin oder Taxol konnte ebenfalls die DISC-Bildung am CD95-YFP verhindern, nicht aber die Assoziation von EGFR und CD95-YFP sowie dessen Tyrosinphosphorylierung.

Die JNK-Abhängigkeit der CD95-EGFR-Assoziation und die Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung wurde bereits in Rattenhepatozyten gezeigt.⁷³⁻⁷⁵

Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch Hyperosmolarität oder durch CD95L-Gabe verursachte Aktivierung des CD95-Systems sich in Huh7 Hepatomazellen mit transfizierten Fusionszielproteinen nicht wesentlich von den für Hepatozyten mit endogenen Zielproteinen erhobenen Befunden unterscheidet⁷⁶⁻⁷⁹.

3.3 Studien der CD95-YFP-EGFR-CFP-Interaktion und Membrantranslokation

Zu Beginn des Versuchszeitraums ist kein FRET-Signal, welches auf eine Interaktion zwischen CD95-YFP und EGFR-CFP hindeuten würde detektierbar (Abbildung 16). 30 min nach hyperosmolarer Exposition wurde ein intrazelluläres FRET-Signal detektiert, was auf eine intrazelluläre Assoziation der beiden Fusionsproteine hindeutet. Nach 120 min sind beide Rezeptoren zur Zellmembran transloziert, ohne dass die Intensität des FRET-Signals geringer wurde, was die Schlussfolgerung zulässt, dass EGFR und CD95 noch immer im Komplex vorliegen. Eine Ausbildung der für Apoptose typischen Bläschenstrukturen ("blebs") wurde nur in Zellen, welche mit CD95L behandelt wurden, nicht aber unter hyperosmolaren Bedingungen, beobachtet. Diese Beobachtung stimmt mit früher erschienenen Publikationen überein, in denen beschrieben wurde, dass Hyperosmolarität in Hepatozyten zu einer CD95-Aktivierung und zur Bildung des DISC, aber nicht zur Apoptose führt ^{80,81}.

Die Translokation des EGFR nach hyperosmolarer Stimulation konnte, wie in Abbildung 16 dargestellt, auch für den endogenen EGFR in CD95-YFP transfizierten Huh7 Hepatomazellen mittels immuncytochemischer Cy3-Färbung gezeigt werden (Abbildung 15). In unstimulierten Zellen befindet sich der endogene Rezeptor im Zytosol verteilt. Nach zweistündiger Stimulation mit hyperosmolarem Medium translozieren die Rezeptorproteine zur Zellmembran. Die durch Hyperosmolarität ausgelösten Effekte unterscheiden sich gänzlich von jenen, die durch EGF ausgelöst werden. Wie bereits von Haj et al.⁸² beschrieben, folgt auf die Stimulation mit dem natürlichen Liganden eine Internalisierung des Rezeptors.



Abbildung 15: Immunfärbung zur EGFR-Lokalisation in Huh7 Hepatomazellen¹⁰². Um eine hyperosmotisch oder EGFinduzierte Umverteilung des EGFR darzustellen, wurden Huh7 Hepatomazellen immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen EGFR angefärbt. In unstimulierten Zellen befindet sich der endogene EGFR in der Plasmamembran und im Zytosol. Durch hyperosmolare Stimulation (405 mosmol/L, oben) kommt es zu einer Anreicherung in der Membran, während EGF (50ng/mL, unten) zu einer Internalisierung des EGFR in vesikuläre Strukturen im Zytosol führt.


Abbildung 16: FRET-Analyse der EGFR-CFP/CD95-YFP-Assoziation nach Inkubation mit hyperosmolarem Medium.¹⁰² Hyperosmolarität führt, wie durch das FRET-Experiment gezeigt werden konnte, zu einer intrazellulären EGFR-CFP– CD95-YFP-Assoziation nach 30 min. Nach 120 min findet eine Translokation des EGFR-CFP–CD95-YFP Komplexes zur Plasmamembran statt. Die EGFR-CFP/CD95-YFP-Assoziation bleibt mindestens 6 h bestehen.

In Abbildung 17 konnte mittels der FRET-Technik gezeigt werden, dass CD95L nach 30 min zu einer EGFR-CFP/ CD95-YFP Assoziation im Zellinnern führt und dass dieser Komplex innerhalb von 2 h an die Plasmamembran transloziert. Im Gegensatz zu der Stimulation mit hyperosmolarem Medium wird hier jedoch die Apoptose exekutiert, wie die Bleb-Bildung nach 6 h Exposition andeutet. Interessanterweise werden auch in diesem Stadium noch FRET-Signale detektiert, was darauf hinweist, dass sich zumindest ein Teil der CD95-EGFR-Komplexe in der Bläschenmembran befindet. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl hyperosmolar- als auch CD95L-induziert CD95-EGFR-Komplexe im Zytosol vorliegen und anschließend zur Plasmamembran gelangen. Dieser Komplex ist über mindestens 6 h stabil. Diese Membrantranslokation des CD95-EGFR-Komplexes und die DISC-Bildung müssen nicht zwingend mit dem Absterben der Zelle einhergehen und könnten ein Hinweis auf eine reversible Reaktion sein.

Wie Abbildung 18 zeigt, vermitteln Hyperosmolarität und CD95L kein FRET Signal, wenn das JNK-hemmende Peptid L-JNKI-1 vorinkubiert wurde. Dies weist darauf hin, dass das JNK-Signal, welches durch Hyperosmolarität oder CD95L ausgelöst wird⁸³, für die Komplexbildung von CD95 und EGFR und die Wanderung dieses Komplexes an die Plasmamembran notwendig ist. AG1478 hat keinen Effekt auf die hyperosmotische EGFR-CD95-Assoziation im Zytosol, aber die Membranrekrutierung des Komplexes findet unter diesen Bedingungen nicht mehr statt. Weil AG1478 die durch Hyperosmolarität oder CD95L ausgelöste CD95-Tyrosinphosphorylierung durch Unterdrückung der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität hemmt, kann man davon ausgehen, dass die CD95-Tyrosinphosphorylierung eine wichtige Rolle für die Membrantranslokation und die DISC Formierung spielt. Dies unterstützt ältere Befunde⁸⁴⁻⁸⁷.



Abbildung 17: FRET-Analyse der CD95L-induzierten EGFR-CFP/CD95-YFP-Assoziation in Huh7 Hepatomazellen ¹⁰². Huh7 Hepatomazellen wurden mit EGFR-CFP und CD95-YFP transfiziert. CD95L führt zu einer intrazellulären Assoziation von EGFR-CFP und CD95-YFP nach 30 min. Dieser Komplex ist nach 120 min zur Plasmamembran transloziert. Nach 6 h zeigten die Zellen bereits Zeichen der Apoptose, wie hier durch die Bleb-Bildung nachgewiesen wird. Auch in diesem Zustand liegen die Rezeptoren zum Teil noch als Komplex vor.



Abbildung 18: FRET-Analyse der hyperosmolar induzierten EGFR-CFP/CD95-YFP Interaktion mit AG1478 und L-JNKI-1¹⁰². Huh7 Hepatomazellen wurden mit EGFR-CFP und CD95-YFP transfiziert. Die Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR durch AG1478 (5µmol/L; Vorinkubationszeit 30 min) führt zu einer Hemmung der EGFR-CFP–CD95-YFP-Membrantranslokation. Die EGFR-CFP–CD95-YFP-Assoziation ist von dieser Hemmung allerdings nicht betroffen. Die Hemmung von JNK durch L-JNKI-1 (5 µmol/L; Vorinkubationszeit 30 min) führt sowohl zu einer Hemmung der Membrantranslokation als auch zu einer Hemmung der intrazellulären EGFR-CFP–CD95-YFP-Assoziation nach 30 Min.

3.4 Die Rolle der Mikrotubuli in der CD95-Aktivierung

Die Vorbehandlung der Huh7 Hepatomazellen mit Colchizin oder Taxol führt, im Gegensatz zum inaktiven Lumicolchizin, in den von uns verwendeten Konzentrationen zu einer Hemmung der Funktionsfähigkeit des Mikrotubuliapparates, wie wir durch immunzytochemische Färbung in dem verwendeten Zelltyp nachgewiesen haben (Abbildung 19).



Abbildung 19: Tubulinfärbung in Huh7 Zellen. Zellen wurden ohne Zusatz (A) mit 5 µmol/L Luminocolchizin (B), 5 µmol/L Colchizin (C) oder 10 µmol/L Taxol (D) eine Stunde vorinkubiert.

Dies keinen Einfluss auf die hyperosmotisch induzierte EGFR-Aktivierung, die EGFR-CD95-Assoziation (Abbildung 13) oder die CD95-Tyrosinphosphorylierung, hingegen auf die DISC-Formierung, wie durch fehlende Anlagerung von FADD und Caspase 8 an CD95 nachgewiesen wurde (Abbildung 14).

In Abbildung 20 konnte Mittels FRET-Mikroskopie gezeigt werden, dass die Assoziation von EGFR und CD95 im Zellinnern zwar nach Colchizinbehandlung noch stattfindet, aber die Verlagerung des Komplexes an die Zellmembran durch die Zerstörung der Mikrotubuli unterbunden wird. Luminocolchizin hat keinen Effekt auf die Umverteilung des Komplexes. Für Taxol hingegen wurden die gleichen Ergebnisse wie für Colchizin gefunde. Allerdings war das FRET-Signal in mit Taxol vorbehandelten Zellen schwächer als in den mit Colchizin behandelten Zellen. Dies mag darauf zurückzuführen sein, das Taxol den Abbau der Mikrotubuli hemmt, und damit zu einer Bündelung von Mikrotubuli führt, während Colchizin die Tubulinpolymerisation

unterbindet (Abbildung 19). Der EGFR-CD95-Komplex könnte also in den mit Taxol behandelten Zellen noch an einzelne Mikrotubulifragmente binden.

Die Hemmung der Membrantranslokation durch die Zerstörung der Mikrotubuli wurde auch erreicht, wenn CD95L als Stimulus verwendet wurde. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, konnte damit die apoptotische Wirkung des Liganden verringert werden.

Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass die Mikrotubuli am Transport des CD95-EGFR-Komlexes zur Membran, aber nicht an der Bildung dieses Komplexes beteiligt sind.

Die Funktionsstörung der Mikrotubuli hat Einfluss auf die DISC-Bildung. Das legt die Vermutung nahe, dass zusätzlich zur CD95-Tyrosinphosphorylierung und der Membranständigkeit des CD95-EGFR-Komplexes ein intakter Mikrotubuliapparat eine Grundvorrausetzung für die DISC-Bildung in den von uns untersuchten Zellen ist.

Transfektionsansatz	TUNEL-positiv [%]
YFP	3,0 ± 1,3
CD95–YFP Wildtyp	42,1 ± 4,6
+ Colchizin	4,6 ± 1,0
+ Luminocolchizin	37,1 ± 3,0
+ Taxol	$12,2\pm1,6$
CD95 ^{Y91F} -YFP	40,3 ± 3,0
CD95 ^{Y232F} -YFP	33,5 ± 6,3
CD95 ^{Y291F} -YFP	34,1 ± 5,3
CD95 ^{Y91F/Y232F} -YFP	34,0 ± 4,3
CD95 ^{Y91F/Y291F} -YFP	33,2 ± 5,1
CD95 ^{Y232F/Y291F} -YFP	6,7 ± 0,9
CD95 ^{Y91F/Y232F/Y291F} -YFP	5,2 ± 1,0

Tabelle 1: CD95L-induzierte Apoptose in mit CD95^{mut}-transfizierten Huh7 Hepatomazellen¹⁰². Huh7 Hepatomazellen wurden mit YFP, Wildtyp CD95 (CD95wt-YFP) oder CD95^{mut}-YFP transfiziert. Zellen wurden soweit angezeigt mit Colchizin (5 µmol/L) oder Taxol (10 µmol/L) eine Stunde vorinkubiert. Luminocolchizin (5 µmol/L, 60 min) diente als Kontrolle. Die Zellen wurden 12 Stunden mit CD95L (100ng/ml) stimuliert und anschließend mit dem TUNEL-Assay untersucht. Angegeben ist der Prozentsatz TUNEL-positiver transfizierter Zellen. Die Transfektion mit CD95wt führt zu einem deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen im Vergleich zu der YFP-Kontrolle. Eine deutliche Senkung der Apoptoserate konnte durch Gabe von Colchizin oder Taxol erreicht werden, was nahe legt, dass der Mikrotubuliapparat für den beschriebenen Vorgang von Bedeutung ist. Einzelmutanten oder Doppelmutanten mit einer Beteiligung von Y91F haben einen geringen oder gar keinen Einfluss auf die Apoptoserate, während CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F} zu einer Abnahme der Apoptoserate führen.



Abbildung 20: Effekt der Mikrotubulizerstörung auf die hyperosmolar induzierte CD95-EGFR-Assoziation.¹⁰² Huh7 Hepatomazellen wurden mit EGFR-CFP und CD95-YFP transfiziert. Die Zellen wurden eine Stunde mit Colchizin (5 µmol/L), Taxol (10 µmol/L), oder Luminocolchizin (5 µmol/L, Kontrolle) vorinkubiert. Dann wurden die Zellen mit hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L) behandelt. Durch Hemmung des Mikrotubuliapparates konnte die Membrantranslokation verhindert werden. Die Assoziation von EGFR und CD95 findet unter diesen Bedingungen noch statt.

3.5 CD95-Mutagenese: Die Rolle der Tyrosinreste

CD95-Tyrosinphosphorylierung wurde im vorangegangenen Abschnitt als essentieller Schritt für die DISC-Formierung nach apoptotischen Stimuli identifiziert. Darum wurden im Rahmen dieser Arbeit Tyrosin-Phenylalanin-Mutanten des CD95-YFP-Rezeptors erzeugt, in welchen je ein, zwei oder alle drei Tyrosinreste durch Phenylalanin ersetzt wurden.

CD95 hat an den Positionen 91, 232 und 291 Tyrosinreste⁸⁸, wobei die letzten beiden in der so genannten Todesdomäne liegen. Abgesehen von den YFP-gekoppelten Einzel ^{Tyr→Phe} Mutanten (CD95^{Y91F}, CD95^{Y232F}, CD95^{Y291F}) wurden auch Doppel- und Dreifachmutanten (CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y291F}, CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F}) erzeugt.

Wie in Abbildung 14 mittels Koimmunpräzipitation, in Abbildung 21 mikroskopisch und Abbildung 16 im FRET-Experiment gezeigt wird, führt eine zweistündige Inkubation in hyperosmolarem Medium zu einer Membrantranslokation des CD95-YFP Wildtyps. Dieses Verhalten wurde, wie in folgenden beschrieben werden soll, auch bei CD95^{Y91F}, CD95^{Y232F}, CD95^{Y291F}, CD95^{Y91F/Y232F} und CD95^{Y91F/Y291F} beobachtet.



Abbildung 21: Membranständigkeit von CD95-Rezeptoren mit Tyrosin-Phenylalanin-Substitutionen nach hyperosmolarer Stimulation.¹⁰² Wildtyp-CD95 und YFP-gekoppelte Einfachmutanten (CD95^{Y91F}, CD95^{Y232F}, CD95^{Y291F}) und Doppel- bzw. Triplemutanten (CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y291F}, CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F}) des CD95 wurden in Huh7 Hepatomazellen transfiziert. Diese wurden dann 2 h normoosmolarem (Kontrolle, 305 mosmol/L) oder hyperosmolarem (405 mosmol/L) Medium ausgesetzt. Die Werte zeigen den prozentualen Anteil membranständiger Rezeptoren nach hyperosmolarer Stimulation. Unter normoosmolaren Bedingungen zeigten nur 1,2 ± 0,2% Membranfärbung. Verglichen mit dem Wildtyp findet durch Transfektion mit CD95^{Y232F/Y291F}-YFP oder CD95^{Y91F/Y232F/Y291F}. YFP ein signifikanter Rückgang der Membranständigkeit (*P < 0,05) statt.



Abbildung 22: CD95^{mut} und Aktivierung des CD95-Systems durch hyperosmolares Medium¹⁰². YFP-gekoppelte Einfachmutanten (CD95^{Y91F}, CD95^{Y232F}, CD95^{Y291F}) und Doppel- bzw. Triplemutanten (CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y291F}, CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F}) des CD95 wurden in Huh7 Hepatomazellen transfiziert und dann 30 min oder 2 h hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L) ausgesetzt. Als Negativkontrollen wurden 24 h kultivierte primäre Rattenhepatozyten, nicht transfizierte Huh7 Hepatomazellen und nur mit YFP transfizierte Zellen verwendet. Über Immunpräzipitation wurden EGFR–CD95-YFP Assoziation, CD95-YFP Tyrosinphosphorylierung, Caspase 8–CD95-YFP Assoziation und FADD–CD95-YFP Assoziation nachgewiesen. Als Beladungskontrolle wurde Gesamt-CD95-YFP verwendet. Obwohl keine der Mutanten die EGFR–CD95-YFP Assoziation nach hyperosmolarer Stimulation beeinflusst (oben), ist die Tyrosinphophorylierung von CD95^{Y232F/Y291F} deutlich verringert und für CD95^{Y91F/Y232F/Y291F} ganz verschwunden (oben Mitte). Nur CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F} sind nicht in der Lage Caspase 8 (unten Mitte) und FADD (unten) zu binden.



Abbildung 23: FRET-Analyse der hyperosmolar induzierten EGFR-CFP Interaktion mit CD95^{mut}-YFP in Huh7 Hepatomazellen.¹⁰² Huh7 Hepatomazellen wurden mit EGFR-CFP und CD95^{Y232F,Y291F}-YFP oder CD95^{Y91F}-YFP transfiziert, um die für die Assoziation und Membrantranslokation entscheidenden Tyrosinreste zu identifizieren.

Bei der mikroskopischen Untersuchng war der Prozentsatz der Zellen mit Membranfluoreszenz geringfügig geringer als beim Wildtyp (Abbildung 21). FRET-Experimente in Zellen, die mit EGFR-CFP und CD95^{mut}-YFP kotransfiziert wurden, zeigen ein intrazelluläres FRET-Ereignis nach 30 min (beispielhaft gezeigt in Abbildung 23), wie schon für den Wildtyp gezeigt (Abbildung 16). Die Mutanten CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F} allerdings zeigen im Unterschied zum Wildtyp nach 2 h Inkubation keine Membrantranslokation, wie für CD95^{Y232F/Y291F} in Abbildung 23 gezeigt wird. Diese Mutanten werden auch nach Stimulation mit CD95L nicht zur Plasmamembran transloziert.

Wie durch Koimmunpräzipitationen mit CD95^{mut}-YFP transfizierten Zellen gezeigt werden konnte, wurde die CD95-Tyrosinphosphorylierung durch Mutation der Tyrosine 232 und 291 stark vermindert und in der Mutante ohne Tyrosine als Kontrolle, da kein Substrat zur Phosphorylierung mehr vorliegt, völlig unterbunden. Beide Mutanten interagierten nicht mehr mit FADD und Caspase 8 nach hyperosmolarer Stimulation oder CD95L-Gabe (Abbildung 22). Ihre Fähigkeit mit EGFR zu interagieren wurde jedoch durch die Mutationen nicht beeinflusst, wie sowohl durch Koimmunopräzipitationsexperimente (Abbildung 22) als auch durch FRET-Experimente (Abbildung 23) gezeigt werden konnte. Dieselben Ergebnisse wurden auch durch Zugabe von CD95L erzielt.

Wie für Rattenhepatozyten gezeigt werden konnte, führt hyperosmolare Stimulation zu einer ähnlichen Antwort wie auf CD95L, aber führt nicht zum programmierten Zelltod⁸⁹⁻⁹², darum wurde CD95L zur Untersuchung der Abhängigkeit der Apoptoseaktivierung von den Tyrosinresten herangezogen. Wie in Tabelle 1 gezeigt werden konnte, zeigen Zellen die mit CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F} nicht jedoch solche, die mit CD95^{Y91F}, CD95^{Y232F}, CD95^{Y291F}, CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y291F} transfiziert wurden, eine verminderte Apoptoserate im TUNEL-Assay.

3.6 CD95-Oligomerisierung als Antwort auf proapoptotische Stimuli

Für die Aktivierung des CD95-Rezeptors ist seine Oligomerisierung zwingend notwendig^{48,93-95}. Es wurden allerdings bisher nur indirekte Beweise dafür gefunden, dass CD95-Rezeptoren nach Bindung des Liganden oligomerisieren. Mit den von uns entwickelten Konstrukten haben wir die Möglichkeit, diese Interaktion der Rezeptoren in der Zelle sichtbar zu machen.

In den folgenden Experimenten zeigten die untersuchten Zellen nach Transfektion mit CD95-CFP/CD95-YFP ohne zusätzliche Stimulation in circa 9 % der Zellen intrazellulär, in 3-4 % an der Zellmembran ein FRET-Signal (Tabelle 2). Diese Prozentsätze blieben über den Untersuchungszeitraum von zwei Stunden stabil (Tabelle 2). Dieses FRET-Signal unter Kontrollbedingungen könnte z.B. durch die Transfektion hervorgerufen werden. Eine andere Erklärung könnte eine Überexpression der heranreifenden CD95-Fusionproteine im endoplasmatischen Retikulum, wie sie für p80 TNF-Rezeptor-Expression in U937, KYM-1, HeLa und MCF-7 Zellen beschrieben wurde, sein⁹⁶.

Nach Zugabe von CD95-Ligand wurden starke intrazelluläre FRET-Signale in 24 % der Zellen gefunden (Tabelle 2), die zeigen, dass es zu einer Oligomerisierung im Zytosol der Zelle kommt (Abbildung 24). 120 min nach CD95-Ligandzugabe wurde das FRET-Signal in der Plasmamembran lokalisiert, was für eine Translokation des Proteinkomplexes zur Plasmamembran spricht (Abbildung 24, Tabelle 2). Ähnliche Resultate wurden durch Zugabe von sulfatiger Taurolithocholsäure (TLCS; 100µmol/l) oder hyperosmolarem Medium erzielt (Tabelle 2).

Wie bereits gezeigt wurde⁹⁷⁻¹⁰³, führen TLCS und Hyperosmolarität zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des CD95-Systems. Daraus folgt, dass die Ligandenbindung keine zwingende Vorraussetzung für die CD95-Oligomerisierung ist.

	% Zellen mit intrazellulärem FRET		% Zellen mit FRET in der Membran			
Bedingungen	0 min	30 min	120 min	0 min	30 min	120 min
Kontrolle	9.7 ± 0.8	9.3 ± 1.1	8.1 ± 1.2	3.0 ± 0.6	3.9 ± 0.7	4.9 ± 0.7
EGF	$\textbf{9.1}\pm\textbf{0.8}$	$\textbf{8.4}\pm\textbf{0.5}$	8.7 ± 2.3	$\textbf{2.3} \pm \textbf{0.7}$	$\textbf{3.4} \pm \textbf{1.0}$	2.7 ± 1.0
CD95L	10.0 ± 1.3	$\textbf{23.8} \pm \textbf{1.5}^{ \#}$	12.3 ± 1.2	3.8 ± 0.5	3.2 ± 0.8	$21.3\pm1.4~^{\#}$
+ AG1478	13.1 ± 0.9	$13.4 \pm 1.9 *$	10.6 ± 1.7	$\textbf{3.4}\pm\textbf{0.9}$	$\textbf{2.2}\pm\textbf{0.8}$	$\textbf{4.5} \pm \textbf{0.4*}$
+ L-JNKI-1	12.1 ± 0.6	$16.1\pm0.6*$	10.1 ± 0.9	4.2 ± 1.3	2.0 ± 0.6	$\textbf{2.5} \pm \textbf{0.3*}$
+ Colchizin	$\textbf{8.1}\pm\textbf{0.4}$	21.3 ± 2.6	$\textbf{24.3} \pm \textbf{1.4*}$	$1.4\pm0.3^{*}$	$\textbf{0.6} \pm \textbf{0.3*}$	$\textbf{2.1} \pm \textbf{0.6*}$
+ Lumicolchizin	12.3 ± 0.8	$\textbf{23.3} \pm \textbf{1.4}^{ \#}$	12.0 ± 2.9	$\textbf{3.2}\pm\textbf{0.8}$	$\textbf{3.3}\pm\textbf{0.8}$	$19.5\pm0.8~^{\#}$
405 mosmol/L	11.0 ± 1.3	$\textbf{22.1}\pm\textbf{2.1}^{~\#}$	12.9 ± 2.2	$\textbf{2.0} \pm \textbf{1.2}$	$\textbf{2.8} \pm \textbf{1.2}$	17.2 \pm 2.2 $^{\#}$
+ AG1478	10.2 ± 0.4	$13.2\pm0.9^{*}$	9.6 ± 1.1	$\textbf{3.2} \pm \textbf{1.2}$	2.9 ± 1.7	$\textbf{7.5} \pm \textbf{0.6*}$
+ L-JNKI-1	$\textbf{9.4} \pm \textbf{1.4}$	$14.1\pm0.8^{\ast}$	11.7 ± 1.3	$\textbf{3.0} \pm \textbf{1.4}$	$\textbf{2.8} \pm \textbf{0.5}$	$\textbf{5.3} \pm \textbf{0.8*}$
TLCS	13.5 ± 0.8	$\textbf{23.6} \pm \textbf{2.2}^{\#}$	13.9 ± 2.1	$\textbf{1.8} \pm \textbf{0.9}$	$\textbf{4.1} \pm \textbf{1.1}$	17.6 \pm 1.7 $^{\#}$
+ AG1478	9.3 ± 2.0	13.6 ± 2.0*	11.6 ± 1.2	2.2 ± 1.7	2.7 ± 0.5	7.8 ± 1.2*
+ L-JNKI-1	10.7 ± 2.1	$13.5\pm0.6*$	10.0 ± 0.9	3.6 ± 0.6	5.2 ± 0.7	6.3 ± 1.8*

Tabelle 2: CD95-Oligomerisierung in Huh7 Hepatomazellen.¹⁴² Huh7 Hepatomazellen wurden CD95-CFP und CD95-YFP transfiziert und anschließend mit normoosmolarem Medium (305 mosmol/L), CD95 Ligand (CD95L; 50 ng/mL), EGF (50 ng/mL), hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L) oder Taurolithocholylsulfate (TLCS; 100 µmol/L) über 0 min, 30 min oder 120 min stimuliert. Mit AG1478 (5 µmol/L) oder L-JNKI-1 (5 µmol/L) wurde 30 min, Colchizin (5 µmol/L) oder Lumicolchizin (5 µmol/L) wurde 60 min vorinkubiert. Angegeben sind die prozentualen Anteile der transfizierten Zellen mit einem FRET-Signal in der Zelle oder an der Zellmembran. Es wurden die Ergebnisse von mindestens 100 Zellen pro Bedingung von 3-5 unabhängigen Experimenten zugrunde gelegt und als Mittelwert ± SEM angegeben. Verglichen mit den Kontrollbedingungen führten CD95L, hyperosmolares Medium und TLCS zu einer intrazellulären EGFR-CFP–CD95-YFP-Assoziation nach 30 min. Nach 120 min findet eine Translokation des EGFR-CFP–CD95-YFP Komplexes zur Plasmamembran statt. (p<0.05, #). EGF-Gabe führte nicht zu einem FRET Ereignis. Sowohl AG1478 als auch L-JNKI-1 führen dazu, dass signifikant weniger FRET-Ereignisse nach proapoptotischen Stimuli (p<0.05, *) stattfinden. Die Zerstörung des Mikrotubuliapparats durch Taxol und Colchizin verringert zwar das Vorkommen von FRET-Ereignissen an der Membran, hat aber keinen Einfluss auf intrazelluläre FRET-Ereignisse.



Abbildung 24: FRET-Analyse der CD95L-induzierten CD95-CFP/CD95-YFP-Assoziation nach CD95L-Stimulation in Huh7 Hepatomazellen¹⁴². Huh7 Hepatomazellen wurden CD95-CFP und CD95-YFP transfiziert und anschließend mit CD95L (50 ng/mL) über 0 min, 30 min oder 120 min inkubiert. CD95L führt nach 30 min zu einer intrazellulären EGFR-CFP–CD95-YFP-Assoziation. Nach 120 min findet man vermehrt FRET-Signale an der Plasmamembran (auch Tabelle 2).

3.7 Abhängigkeit der CD95-Oligomerisierung von der Tyrosinphosphorylierung

Da in den Experimenten mit CD95/EGFR-transfizierten Huh7 Hepatomazellen die Hemmung der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität durch AG1478 zu einer Hemmung der CD95-Tyrosinphosphorylierung und der Rezeptorumverteilung führte und darüber hinaus die Hemmung der JNK durch L-JNKI-1 die Assoziation der beiden Proteine zu verhindern vermochte, wurden im weiteren Verlauf Experimente zur Oligomerisierung von CD95 nach Gabe dieser beiden Inhibitoren durchgeführt. Wie man aus Tabelle 2 entnehmen kann, führen sowohl AG1478 (Abbildung 25) als auch L-JNKI-1 (Abbildung 26) dazu, dass kein FRET-Ereignis nach proapoptotischen Stimuli stattfindet (Tabelle 2). Das zeigt, dass eine EGFR-katalysierte CD95-Tyrosinphosphorylierung eine Grundvoraussetzung für die Oligomerisierung dieses Rezeptors ist. Darüber hinaus kann man daraus schließen, dass EGFR zunächst mit CD95 als Monomer assoziiert, wobei dessen Tyrosinphosphorylierung dann die Oligomerisierung auslöst.

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF führte in Huh7 Hepatomazellen nicht zu einem FRET-Signal von CD95-CFP und CD95-YFP. Wie in unserer Arbeitsgruppe¹⁰⁴ gezeigt werden konnte, ist dies darauf zurückzuführen, dass CD95 nicht phosphoryliert wird, denn EGF-aktivierter EGF-Rezeptor ist nicht in der Lage mit CD95 zu assoziieren und eine CD95-Tyrosinphosphorylierung hervorzurufen¹⁰⁵.

Die Hemmung des Mikrotubuliapparates durch Colchizin hat keinen Einfluss auf die CD95-Ligand-induzierte CD95-Oligomerisierung im Zytosol, verhindert aber eine Translokation des Komplexes zur Plasmamembran (Abbildung 27 und Tabelle 2). Als Kontrolle wurde der Versuch mit Luminocolchizin durchgeführt (Abbildung 28). Luminocolchizin reagiert nicht mit den Mikrotubuli und zeigt keinen Effekt auf die durch proapoptotische Stimuli ausgelöste CD95-Oligomerisierung. Diese Ergebnisse korrelieren mit bereits publizierten Befunden, dass nur die Translokation des EGFR/CD95-Komplexes, nicht aber dessen Bildung, von Mikrotubuli abhängig ist^{100,106}. Die Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist also, dass der Mikrotubuliapparat zwar für die Translokation notwendig ist, nicht aber für die CD95-Oligomerisierung.



Abbildung 25: FRET-Analyse der CD95L-induzierten CD95-CFP/CD95-YFP Interaktion mit AG1478¹⁴². Huh7 Hepatomazellen wurden CD95-CFP und CD95-YFP transfiziert und anschließend für 0 min, 30 min oder 120 min mit CD95L (50 ng/mL) stimuliert. Es wurde 30 min mit AG1478 (5 µmol/L) vorinkubiert. Sowohl AG1478 als auch L-JNKI-1 (siehe Abbildung 24) führen zu einer Hemmung der Membrantranslokation.



Abbildung 26: FRET-Analyse der CD95L-indizierten CD95-CFP/CD95-YFP Interaktion mit L-JNKI-1. Huh7 Hepatomazellen wurden CD95-CFP und CD95-YFP transfiziert und anschließend für 0 min, 30 min oder 120 min mit CD95L (50 ng/mL) inkubiert. Es wurde 30 min mit L-JNKI-1 (5 µmol/L) vorinkubiert. Wie auch AG1478 (siehe Abbildung 23) inhibiert L-JNKI-1 die Translokation des CD95-CD95-Komplexes an die Plasmamembran.



Abbildung 27: Effekt von Colchizin auf die CD95L-induzierte CD95-CD95-Assoziation.¹⁴² Huh7 Hepatomazellen wurden CD95-CFP und CD95-YFP transfiziert und anschließend für 0 min, 30 min oder 120 min mit CD95L (50 ng/mL) inkubiert. Es wurde 60 min mit Colchizin (5 µmol/L) vorinkubiert. Die Hemmung der Mikrotubulifunktion durch Colchizin führt zu einer Hemmung der Membrantranslokation, hat aber keinen Einfluss auf intrazelluläre FRET-Ereignisse.



Abbildung 28: Effekt von Lumicolchizin auf die CD95L-indizierte CD95-CD95-Assoziation.¹⁴² Huh7 Hepatomazellen wurden CD95-CFP und CD95-YFP transfiziert und anschließend für 0 min, 30 min oder 120 min mit CD95L (50 ng/mL) inkubiert. Es wurde 60 min mit Lumicolchizin (5 µmol/L) vorinkubiert. In Anwesenheit von Lumicolchizin, einem Strukturanalogon zu Colchizin, das aber nicht dessen mikrotubulihemmende Wirkung besitzt, zeigen die Zellen eine Umverteilung des CD95-CD95-Komplexes an die Plasmamembran.

3.8 CD95-Ligand induzierte Oligomerisierung der CD95-Mutanten

Da wir in vorangegangenen Experimenten zeigen konnten, dass durch Mutationen von Tyrosinresten in der Todesdomäne des CD95 dessen Translokation zur Plasmamembran unterbunden werden kann, haben wir im Folgenden das Oligomerisierungsverhalten dieser CD95-Rezeptormutanten untersucht.

Als Kontrolle wurden an Position 91 Tyrosin-Phenylalanin-substituierte, mit YFP oder CFP fusionierte CD95-Rezeptoren verwendet. Diese Mutanten, CD95^{Y91F}-YFP und CD95^{Y91F}-CFP, zeigen nach CD95-Ligand-Gabe dieselben Resultate wie der Wildtyp (vergleiche Tabelle 3). Daraus lässt sich schließen, dass der Tyrosinrest an Position 91 nicht wesentlich an der Oligomerisierung beteiligt ist.

Bei den Experimenten mit den CD95^{Y232,291F} und CD95^{Y91,232,291F}-Mutanten war auch 2 Stunden nach Gabe des CD95-Liganden kein signifikantes FRET-Ereignis zu sehen (Tabelle 3, Abbildung 29).

	% Zellen mit intrazellulärem FRET			% Zellen mit FRET in der Membran		
Bedingungen	0 min	30 min	120 min	0 min	30 min	120 min
CD95 ^{wt} -CFP CD95 ^{wt} -YFP	10.0 ± 1.3	23.8 ± 1.5	12.3 ± 1.2	3.8 ± 0.5	3.2 ± 0.8	21.3 ± 1.4
CD95 ^{Y91F} -CFP CD95 ^{Y91F} -YFP	9.8 ± 1.3	21.4 ± 1.3 ^{n.s.}	10.1 ± 1.4	1.7 ± 0.3	$\textbf{3.6} \pm \textbf{0.7}$	$20.8\pm1.7^{\text{ n.s.}}$
CD95 ^{Y232,291F} -CFP CD95 ^{Y232,291F} -YFP	12.1 ± 1.1	15.1 ± 1.3*	13.6 ± 0.5	5.5 ± 1.6	4.6 ± 0.3	5.0 ± 1.6*
CD95 ^{wt} -CFP CD95 ^{Y232,291F} -YFP	9.7 ± 1.4	20.7 ± 1.3 ^{n.s.}	11.2 ± 0.6	3.7 ± 0.9	4.6 ± 0.7	$16.3\pm2.2^{\text{ n.s.}}$
CD95 ^{Y91,232,291F} -CFP CD95 ^{Y91,232,291F} -YFP	12.5 ± 1.9	12.7 ± 0.9*	10.4 ± 1.3	3.4 ± 1.0	3.9 ± 1.6	6.6 ± 2.3*
CD95 ^{wt} -CFP CD95 ^{Y91,232,291F} -YFP	12.1 ± 1.8	20.3 ± 1.0 ^{n.s.}	12.2 ± 1.0	3.0 ± 0.7	6.4 ± 2.2	17.0 ± 0.7 ^{n.s.}

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass die Tyrosinreste an Position 232 und 291 beide an dem CD95L-induzierten Oligomerisierungsprozess beteiligt sind.

Tabelle 3: CD95^{mut} und CD95L-induzierten CD95-Oligomerisierung in Huh7 Hepatomazellen.¹⁴² Huh7 Hepatomazellen wurden mit CFP/YFP Konstrukten des Wildtyp-CD95 oder YFP-gekoppelte Einfachmutanten (CD95^{Y91F}, CD95^{Y232F}, CD95^{Y291F}) und Doppel- bzw. Triplemutatanten (CD95^{Y91F/Y232F}, CD95^{Y91F/Y291F}, CD95^{Y232F/Y291F} und CD95^{Y91F/Y232F/Y291F}) des CD95 (vgl. Abb. 2) kotransfiziert und anschließend CD95L (50ng/mL) ausgesetzt. Angegeben ist der Prozentsatz doppelt-transfizierter Zellen mit einem FRET-Ereignis im Zellinnern oder an der Plasmamembran. Es wurden die Analyse von mindestens 100 Zellen pro Bedingung von 3-5 unabhängigen Experimenten zugrunde gelegt und als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei CD95^{Y91F}-CFP und CD95^{Y91F}-YFP wurde eine CD95L-induzierte intrazelluläre CD95 Oligomerisierung nach 30 min und eine Translokation nach 120 min beobachtet. Mutationen der Tyrosinreste in der Todesdomäne (Y232 und Y291) oder aller Tyrosinreste führen zu einem deutlich vom Wildtyp abweichenden Bindungsverhalten.



Abbildung 29: FRET-Analyse der CD95L-induzierten CD95/CD95-Interaktion mit CD95^{Y232F/Y291F}-CFP und CD95^{Y232F/Y291F}-YFP¹⁴². Huh7 Hepatomazellen wurden mit CFP und YFP-Konstrukten des CD95^{Y232F/Y291F} transfiziert und anschließend mit CD95L (50ng/mL) über einen Zeitraum von 0 min, 30 min und 120 min inkubiert. Mutationen der Tyrosinreste in der Todesdomäne (Y232 und Y291) führen zu einem deutlich vom Wildtyp abweichenden Bindungsverhalten.

Dafür spricht auch die bereits hier beschriebene Beobachtung, dass Zellen, die mit CD95^{Y232F/Y291F} oder CD95^{Y91F/Y232F/Y291F} transfiziert wurden, eine geringe Apoptoserate haben. Während CD95-Mutanten ohne Tyrosin 232 und Tyrosin 291 in der Lage sind, EGFR zu binden, aber nicht oligomerisieren können, ist der Tyrosin-phosphorylierte CD95-Wildtyprezeptor in der Lage, diese Mutanten zu binden und an die Plasmamembran zu transportieren. Bei der Transfektion von Huh7 Hepatomazellen mit einem Wildtypfusionsprotein und einem Mutantenfusionsprotein kommt es zu einem FRET-Ereignis intrazellulär nach 30 min und nach 120 min in der Zellmembran (Tabelle 3, Abbildung 30). Das lässt darauf schließen, dass Tyrosin-phosphorylierter CD95-Rezeptor für mindestens ein den beschriebenen Oligomerisierungsprozess notwendig ist.



Abbildung 30: FRET-Analyse der CD95L-induzierten CD95/CD95-Interaktion mit einer CD95-YFP und CD95^{Y232F/Y291F}-CFP.¹⁴² Huh7 Hepatomazellen wurden mit CFP/YFP Konstrukten des CD95-Wildtyps und CD95^{Y232F/Y291F} transfiziert und anschließend CD95L (50ng/mL) über einen Zeitraum von 0 min, 30 min und 120 min ausgesetzt. In den so behandelten Zellen finden die Oligomerisierung und die Membrantranslokation statt. Statistische Daten ergeben sich aus Tabelle 3¹⁴².

3.9 EGF induzierte EGFR-Oligomerisierung

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch seinen Liganden EGF führt zu einer Rezeptordimerisierung ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, aber es ist unklar, ob bei dem von uns untersuchten Modell durch CD95-Ligand ebenfalls eine Dimerisierung des EGFR hervorgerufen wird.

Zur genaueren Untersuchung wurden MEF-Zellen mit EGFR-CFP und EGFR-YFP transfiziert. MEF-Zellen wurden verwendet, weil sie im Gegensatz zu Huh7 Hepatomazellen endogenen CD95-Rezeptor exprimieren¹¹⁰.



Abbildung 31: CD95L und hyperosmolar--induzierte Aktivierung des CD95-Systems in MEF¹⁴². MEF Zellen wurden mit EGFR-YFP und CD95-CFP transfiziert und anschließend mit CD95L (50ng/mL) oder hyperosmolarem Medium (405 mosmol/L) inkubiert. Es wurde im oberen Abschnitt EGFR-YFP und mittleren und unteren Abschnitt CD95-CFP detektiert. Nach 1 min konnte eine Aktivierung des EGFR, in Form einer Tyrosinphosphorylierung, nachgewiesen werden. Nach 30 min konnte eine Assoziation von EGFR-CFP und CD95-YFP und eine CD95-Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden. Nach 120 min konnte die DISC-Bildung (Umlagerung von FADD und Caspase 8 an den CD95) detektiert werden. AG1478 (5µmol/L) und L-JNKI-1 (5µmol/L) wurden 30 min, Colchizin (5µmol/L) und Luminocolchizin (5µmol/L) 60 min vor dem Hauptstimulus zugegeben.

Oben: CD95L und Hyperosmolarität lösen nach einer Minute eine Tyrosinphosphorylierung des EGFR aus. AG1478, L-JNKI-1 oder Colchizin haben keinen Einfluss auf diese Reaktion.

Mitte: CD95L und hyperosmolares Medium führen nach 30 min zu einer Assoziation von EGFR-CFP und CD95-YFP und einer CD95-Tyrosinphosphorylierung, die durch AG1478 und L-JNKI-1 gehemmt werden kann.

Unten: Eine Anlagerung von FADD und Caspase 8 konnte 120 min nach Stimulationsbeginn gezeigt werden. Über die Abhängigkeit von JNK oder der EGFR Kinaseaktivität hinaus konnte eine Abhängigkeit dieser Reaktion vom Mikrotubuliapparat durch Colchzin dargestellt werden.

Genau wie in Rattenhepatozyten und Huh7 Hepatomazellen führt CD95L in diesen Zellen zu einer schnellen Aktivierung des EGF-Rezeptors, gefolgt von einer L-JNKI-1-sensitiven EGFR/CD95-Assoziation, einer AG1478-sensitiven CD95-Tyrosinphosphorylierung und einer mikrotubuliabhängigen DISC-Bildung (Abbildung 31).

% Zellen mit intrazellulärem FRET						
	0 min	1 min	15 min	30 min	120 min	
Kontrolle	$\textbf{2.7} \pm \textbf{0.6}$	$\textbf{2.4} \pm \textbf{0.4}$	4.6 ± 0.4	$\textbf{3.7} \pm \textbf{0.4}$	$\textbf{3.3} \pm \textbf{1.2}$	
EGF	$\textbf{3.7} \pm \textbf{1.0}$	$\textbf{29.9} \pm \textbf{2.7*}$	65.5 ± 1.9*	76.4 ± 3.2*	73.4 ± 2.9*	
CD95L	$\textbf{1.9} \pm \textbf{1.1}$			$2.8\pm0.9^{n.s.}$	$3.0\pm1.0^{\text{ n.s.}}$	
% Zellen mit FRET in der Membran						
	0 min	1 min	15 min	30 min	120 min	
Kontrolle	$\textbf{2.8} \pm \textbf{1.6}$	$\textbf{4.1} \pm \textbf{0.6}$	$\textbf{3.3} \pm \textbf{1.2}$	$\textbf{2.9} \pm \textbf{1.4}$	$\textbf{3.2}\pm\textbf{0.4}$	
EGF	$\textbf{2.3} \pm \textbf{1.2}$	$\textbf{42.0} \pm \textbf{1.9*}$	$11.3 \pm 0.9 \texttt{*}$	1.8 ± 0.5	$\textbf{3.5}\pm\textbf{0.5}$	
CD95L	$\textbf{2.3} \pm \textbf{0.8}$			$2.5\pm0.9^{n.s.}$	$2.0\pm0.6^{\text{ n.s.}}$	

Tabelle 4: FRET-Analyse der EGFR-CFP/EGFR-YFP-Assoziation in MEF.¹⁴² MEF wurden mit EGFR-CFP/EGFR-YFP kotransfiziert, um die Homodimerisierung des EGF Rezeptors mittels FRET zu untersuchen. Zellen wurden mit Kontrollmedium (305 mosmol/L), EGF (50 ng/mL) oder CD95L (50 ng/mL) stimuliert. Angegeben ist der Prozentsatz doppelt-transfizierter Zellen mit einem FRET-Ereignis im Zellinnern oder an der Plasmamembran. Es wurden die Ergebnisse von mindestens 100 Zellen pro Bedingung von 3-5 unabhängigen Experimenten zugrunde gelegt und als Mittelwert \pm SEM angegeben. Verglichen mit der Kontrolle löst EGF innerhalb einer Minute ein FRET Signal an der Plasmamembran aus.Die Homodimere findet man in weiteren Verlauf des Experiments vermehrt im Zytosol (p<0.05, *). CD95L zeigte diesen Effekt nicht (p>0.05, nicht signifikant, n.s.).

Behandelt man EGFR/EGFR transfizierte MEF-Zellen mit CD95L, so stellt man fest, dass diese Proteine nicht assoziieren. Allerdings wurden die EGF-Rezeptoren nach 2 Stunden in der Plasmamembran nachgewiesen (Abbildung 32).

Wurden die EGFR-CFP/EGFR-YFP transfizierten Zellen mit EGF behandelt, führte das zu einem FRET-Signal an der Plasmamembran. Diese membranständigen Proteinkomplexe werden in Vesikeln internalisiert und verbleiben in diesen über den Beobachtungszeitraum von 2 Stunden (Abbildung 33). Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden von Haj⁸¹.

MEF-Zellen, die mit EGFR/CD95-Fusionsproteinen transfiziert worden sind, zeigen kein FRET-Signal nach EGF-Gabe (Abbildung 34, Tabelle 4), nach Inkubation mit CD95L zeigen sie das für Huh7 Zellen beschriebene Aktivierungsmuster (Abbildung 35).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass EGF zwar zu einer EGFR/EGFR-Dimerisierung führt, aber nicht die Assoziation von CD95 und EGF-Rezeptor auslöst, während in CD95/EGFR-transfizierten Zellen CD95L FRET-Signale hervorruft, EGF jedoch nicht.



Abbildung 32: FRET-Analyse der EGFR-CFP/EGFR-YFP-Assoziation nach CD95L in MEF¹⁴². MEF wurden mit EGFR-CFP/EGFR-YFP kotransfiziert, um die Homodimerisierung des EGF Rezeptors mittels FRET zu untersuchen. Zellen wurden mit CD95L (50 ng/mL) stimuliert und nach 0 min, 1 min, 15 min, 30 min und 120 min ausgewertet. CD95L führt zwar zu einer Membrantranslokation des Rezeptors, es wird jedoch kein FRET-Ereignis ausgelöst.



Abbildung 33: FRET-Analyse der EGFR-CFP/EGFR-YFP-Assoziation nach EGF in MEF¹⁴². MEF wurden mit EGFR-CFP/EGFR-YFP kotransfiziert, um die Homodimerisierung des EGF Rezeptors mittels FRET zu untersuchen. Zellen wurden mit EGF (50 ng/mL) stimuliert und nach 0 min, 1 min, 15 min, 30 min und 120 min ausgewertet. EGF führt innerhalb einer Minute zu einem anhaltenden FRET-Signal. Die Proteinkomplexe translozieren ins Zellinnere.



Abbildung 34: FRET-Analyse der CD95-CFP/EGFR-YFP-Assoziation nach EGF in MEF¹⁴². MEF wurden mit CD95-CFP /EGFR-YFP kotransfiziert, um die Oligomerisierung der Rezeptoren mittels FRET zu untersuchen. Zellen wurden mit EGF (50 ng/mL) stimuliert und nach 0 min, 30 min und 120 min ausgewertet. EGF führt unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht zu einer Oligomerisierung der Rezeptoren.



Abbildung 35: FRET-Analyse der CD95-CFP/EGFR-YFP-Assoziation nach CD95L in MEF. MEF wurden mit CD95-CFP /EGFR-YFP kotransfiziert, um die Oligomerisierung der Rezeptoren mittels FRET zu untersuchen. Zellen wurden CD95L (50 ng/mL) stimuliert und nach 0 min, 30 min und 120 min ausgewertet. CD95L führt unter den gegebenen Versuchsbedingungen in MEF Zellen nach 30 min zu einer Oligomerisierung der Rezeptoren im Zellinnern und einer Membranwanderung nach 120 min.

IV. Diskussion

Hyperosmotisch induzierte Schrumpfung von Hepatozyten führt zu einer Aktivierung des CD95-Systems und zu einer Sensitivierung der Zelle für Apoptose. Dieser Prozess erfordert eine Yes-abhängige Aktivierung des EGFR und dessen Assoziation mit dem CD95, gefolgt von einer EGFR-katalysierten CD95-Tyrosinphosphorylierung. Die vorliegende Arbeit charakterisiert diese Vorgänge in der lebenden Zelle mit Hilfe der FRET-Technik.

Die hyperosmotische EGFR-CD95-Assoziation ist abhängig von einer JNK-Aktivierung. cAMP verhindert eine hyperosmotisch induzierte EGFR-Aktivierung, aber nicht die Assoziation von EGFR und CD95. Eine Folge der EGFR-CD95-Interaktion ist die schnelle Phosphorylierung des CD95, welche durch die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR hervorgerufen wird, was man aus der Hemmbarkeit dieser Reaktion durch AG1478 schließen kann.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, treffen die beiden Rezeptoren schon im Zytosol zusammen. Der Proteinkomplex wandert im Anschluss unter Beteiligung des Mikrotubuliapparates an die Zellmembran, wo die DISC-Formierung stattfindet. Der Komplex aus CD95 und EGFR scheint unter diesen Umständen sehr stabil zu sein.

Während EGF eine schnelle EGFR-Internalisierung hervorruft¹¹¹, welche von einem mitotischen Signal begleitet werden kann¹¹², führt Stimulation mit hyperosmolarem Medium oder CD95 zu einer lang anhaltenden EGFR-Translokation zur Plasmamembran nach Komplexbildung mit dem CD95. Diese Unterschiede geben Hinweise auf eine duale Rolle des EGFR in der Kontrolle der Zellproliferation und des Überlebens auf der einen Seite und des apoptotischen Zelltodes auf der anderen Seite ^{113,114}.

Diverse Proteinkinasesysteme, wie z.B. JNK, Yes und Proteinkinasen A und C sind an dieser differenzierten Regulation beteiligt^{115,116}. So führt eine Aktivierung von EGFR durch CD95L, Taurolithocholat-3-Sulfat¹¹⁷ oder hyperosmolare Stimuli zu einer Tyrosinphosphorylierung an Y845 und Y1173, während Y1045 nur durch Stimulation mit EGF phosphoryliert wird¹¹⁸. Die letztgenannte Phosphorylierungsstelle wurde als Bindungsstelle für das Adapterprotein Cbl beschrieben, welches für eine EGFR-Internalisierung notwendig ist^{119,120,121}. Die Tatsache, dass dieser Tyrosinrest nicht phosphoryliert wird, wenn man oben genannte Stimuli verwendet, könnte eine Erklärung für die andauernde Membranständigkeit des EGFR sein.

Colchizin kann Mäuse vor dem Tod durch einen agonistischen CD95-Antikörper schützen und die Oberflächenexpression von CD95 reduzieren¹²². Die Bildung des CD95-EGFR-Komplexes ist nicht mikrotubuliabhängig, wie durch Experimente mit Colchizin gezeigt werden konnte. Dass Colchizin keinen Einfluss auf die CD95-Tyrosinphosphorylierung hat, lässt den Schluss zu, dass dieses Ereignis vor der Membrantranslokation stattfindet. Nach Zerstörung der Mikrotubuli konnte keine DISC-Bildung mehr beobachtet werden, was zu der Annahme führt, dass für die DISC-Formierung ein intakter Mikrotubuliapparat zur Verfügung stehen muss oder dass die DISC-Formierung nur an der Zellmembran stattfinden kann. Diese Ergebnisse könnten den Effekt von Colchizin in der Behandlung der Cholestase erklären^{123,124}.

Abbildung 35 gibt einen Überblick über einzelne Ereignisse in der Zelle und markiert die Punkte, an denen man mittels eines Inhibitors in die Kaskade eingreifen kann.



Abbildung 36: Modell der CD95/EGFR-Interaktion.

Die molekularen Mechanismen, die den mikrotubuliabhängigen Transport des CD95-EGFR-Komplexes vorantreiben, sind allerdings noch nicht gänzlich geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Tyrosinphosphorylierung des CD95 essentiell ist. Dieses Ergebnis wird durch Experimente mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 gestützt, welcher eine Umverteilung des CD95-EGFR-Komplexes zur Plasmamembran verhindert. Eine Mutante des CD95-Rezeptors, deren Tyrosinreste an den Positionen 232 und 291 durch Phenylalaninreste ersetzt wurden, ist zwar in der Lage EGFR zu binden, gelangt aber nicht mehr zur Membran. Auch die Hemmung der hyperosmotisch induzierten EGFR-Aktivierung durch cAMP¹²⁵ führt zu einer Assoziation von EGFR und CD95, ohne jedoch eine CD95-Tyrosinphosphorylierung auszulösen, weil EGFR nicht mehr aktiviert ist. Außerdem wird die Membrantranslokation des Komplexes und die DISC-Formierung verhindert. Daraus lässt sich ableiten, dass intakte Mikrotubuli und die CD95-Tyrosinphosphorylierung Vorraussetzungen für eine Translokation des CD95-EGFR-Komplexes und eine DISC-Formierung sind.

Die CD95-Mutageneseexperimente zeigen darüber hinaus die herausragende Rolle der Tyrosinreste 232 und 291, welche beide in der Todesdomäne des CD95 liegen¹²⁶⁻¹²⁸, während der Tyrosinrest an Position 91 keine übergeordnete Rolle zu spielen scheint. Allerdings könnte auch dieser Rest phosphoryliert werden, wie aus einer schwachen Immunoreaktivität auf einen Phospho-Tyrosin-Antikörper in Experimenten mit der Mutante CD95^{Y232F/Y291F} hervorgeht.

Die Mutation Position 232 und 291 war darüber hinaus in der Lage, eine CD95Linduzierte Apoptose zu verhindern, was die Bedeutung der CD95-Tyrosinphosphorylierung unterstreicht.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, führten wir FRET-Experimente mit CD95-CFP/CD95-YFP transfizierten Zellen durch. Dabei zeigte sich, dass die CD95-Tyrosinphosphorylierung für die Oligomerisierung des Rezeptors notwendig ist, welche bealeitet^{48,129-131}. bekanntermaßen den Aktivierungsprozess des Rezeptors Durch proapoptotische Stimuli kann ein intrazelluläres FRET-Signal erzeugt werden, welches durch experimentelle Bedingungen, die eine CD95-Phosphorylierung verhindern, unterdrückt wird. Als Beispiele wären hier die Hemmung der EGFR/CD95 Assoziation durch L-JNKI-1 oder die Hemmung der EGFR-Tyrosinkinasaktivität durch AG1478 zu nennen. Darüber hinaus fehlen bei Mutanten, denen die beiden Tyrosinreste in der Todesdomäne fehlen, ebenfalls die intrazellulären FRET-Signale nach Stimulation mit CD95L.

Colchizin hatte in den Versuchen mit den beiden CD95-Rezeptorfusionsproteinen keinen Einfluss auf die Oligomerisierung, aber auf die Translokation des Proteinkomplexes zur Membran. Außerdem ist der Effekt unabhängig von dem natürlichen Liganden CD95L, denn er kann auch durch Stimulation mit hypermolarem Medium oder proapoptotischen Gallensäuren hervorgerufen werden.

Die Tatsache, dass AG1478 bei CD95L stimulierten CD95/EGFR-transfizierten Zellen ein FRET-Signal zulässt, in CD95/CD95-transfizierten jedoch verhindert, untermauert ein Modell, in dem EGFR zunächst nur mit einem monomeren CD95 assoziiert, dessen Phosphorylierung dann zu einer Anlagerung anderer CD95-Proteine führt. Dies scheint unabhängig von deren Phosphorylierungsstatus zu sein, denn Zellen, die mit CD95-Wildtyp und CD95-Tyrosinmutanten kotransfiziert wurden, zeigen ein FRET-Signal, das auf eine Oligomerisierung der beiden Fusionsproteine hindeutet. Obwohl gezeigt werden konnte, dass CD95-Oligomerisierung von der Phosphorylierung des Rezeptors abhängig ist, ist der gesamte Mechanismus der Oligomerisierung noch unklar. Es ist möglich, dass Docking-Proteine eine Rolle spielen, die die einzelnen Proteine miteinander verbinden.

In Jurkat,- U937 und CD16⁺-Zellen ist eine Tyrosinphosphorylierung ein früher und notwendiger Schritt in der Signalweiterleitung des CD95¹³². Andere Studien belegen, dass CD45und p56lck-defiziente Jurkat-Zellen nicht auf eine Phosphorylierung des Rezeptors angewiesen sind¹³³. In unseren Studien konnte nun gezeigt werden, dass in Rattenhepatozyten, Huh7 Hepatomazellen und MEF-Zellen eine Tyrosinphosphorylierung für den proapoptotischen CD95-Signalweg zwingend ist.

Es ist bekannt, das der EGFR nach Bindung seines Liganden EGF dimerisiert und durch eine Autophosphorylierung aktiviert wird¹³⁴⁻¹³⁶. Diesen Effekt konnten wir in EGFR/EGFR transfizierten MEF-Zellen reproduzieren und darüber hinaus feststellen, dass unter dieser Bedingung eine Assoziation mit CD95 nicht erfolgt. Auf der anderen Seite löst CD95L, welcher in vorangegangen Studien eine Transaktivierung des EGFR durch einen Yes-abhängigen Signalweg bewirkt hat^{137,138}, die EGFR-Dimerisierung nicht aus, wie aus Stimulationsexperimenten mit CD95L in EGFR-EGFR-transfizierten Zellen hervorgeht. Trotzdem ist EGFR unter diesen Bedingungen in der Lage, mit CD95 zu assoziieren und die DISC-Formierung einzuleiten. Dies führt zu der abschließenden Annahme, dass die Signale, die auf der einen Seite eine Homodimerisierung mit anderen EGFR oder eine Heterodimerisierung mit CD95 bestimmen, wichtig für die duale Rolle des EGFR in Zellproliferation oder Zelltod sind¹³⁹.

V. Referenzen

- 1. Bleackley,R.C. & Heibein,J.A. Enzymatic control of apoptosis. Nat. Prod. Rep. 18, 431-440 (2001).
- 2. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26, 239-257 (1972).
- 3. Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68, 251-306 (1980).
- 4. Nobelpreiskomitee, Nobelpreis für Medizin und Physiologie 2002
- 5. Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. Flow cytometric analysis of cell shrinkage and monovalent ions during apoptosis. Methods Cell Biol. 66:49-67., 49-67 (2001).
- Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. Cell Death. Differ. 9, 1307-1310 (2002).
- Lang, F., Ritter, M., Gamper, N., Huber, S., Fillon, S., Taneur, V., Lepple-Wienhues, A., Szabo, I., Gulbins, E., Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. Cell Physiol Biochem. 10, 417-428 (2000).
- Yu,S.P., Canzoniero,L.M. & Choi,D.W. Ion homeostasis and apoptosis. Curr. Opin. Cell Biol. 13, 405-411 (2001).
- Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Kaba, K.N., Zoratti, M., Lang, F., 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 (1998).
- Lang, F., Busch,G.L., Ritter,M., Völkl,H., Waldegger,S., Gulbins,E., Häussinger,D., Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol Rev. 78, 247-306 (1998).
- Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A. & Okada, Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 9487-9492 (2000).
- Gomez-Angelats, M., Bortner, C.D. & Cidlowski, J.A. Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K+ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. J. Biol. Chem. 275, 19609-19619 (2000).

- Thompson,G.J., Langlais,C., Cain,K., Conley,E.C. & Cohen,G.M. Elevated extracellular [K+] inhibits death-receptor- and chemical-mediated apoptosis prior to caspase activation and cytochrome c release. Biochem. J. 357, 137-145 (2001).
- 14. Perfettini, J.L. & Kroemer, G. Caspase activation is not death. Nat. Immunol. 4, 308-310 (2003).
- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C. & Kerr, J.F. Patterns of cell death. Methods Achiev. Exp. Pathol. 13, 18-54 (1988).
- 16. Albrecht, J.H., Hoffman, J.S., Kren, B.T. & Steer, C.J. Changes in cell cycle-associated gene expression in a model of impaired liver regeneration. FEBS Lett. 347, 157-162 (1994).
- 17. Minuk,G.Y. Hepatic regeneration: If it ain't broke, don't fix it. Can. J. Gastroenterol. 17, 418-424 (2003).
- Taub,R., Greenbaum,L.E. & Peng,Y. Transcriptional regulatory signals define cytokinedependent and -independent pathways in liver regeneration. Semin. Liver Dis. 19, 117-127 (1999).
- 19. Gaur, U. & Aggarwal, B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem. Pharmacol. 66, 1403-1408 (2003).
- Yin,X.M. & Ding,W.X. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. Curr. Mol. Med. 3, 491-508 (2003).
- 21. Galle, P.R. & Krammer, P.H. CD95-induced apoptosis in human liver disease. Semin. Liver Dis. 18, 141-151 (1998).
- Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Myoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H., Gores, G.J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. J. Clin. Invest 103, 137-145 (1999).
- Lang, F., Ritter, M., Gamper, N., Huber, S., Fillon, S., Taneur, V., Lepple-Wienhues, A., Szabo, I., Gulbins, E., Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. Cell Physiol Biochem. 10, 417-428 (2000).
- Reinehr,R., Graf,D., Fischer,R., Schliess,F. & Häussinger,D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 36, 602-614 (2002).

- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V., Kahn, A., Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. Nat. Med. 2, 80-86 (1996).
- Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Myoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H., Gores, G.J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. J. Clin. Invest 103, 137-145 (1999).
- Castaneda, F. & Kinne, R.K. Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127, 418-424 (2001).
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P., Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. Annu. Rev. Immunol. 17, 331-367 (1999).
- Ozoren, N. & El Deiry, W.S. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. Semin. Cancer Biol. 13, 135-147 (2003).
- 31. Sartorius, U., Schmitz, I. & Krammer, P.H. Molecular mechanisms of death-receptormediated apoptosis. Chembiochem. 2, 20-29 (2001).
- 32. Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., Cheng, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth Factor Rev. 14, 193-209 (2003).
- Castaneda, F. & Kinne, R.K. Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127, 418-424 (2001).
- 34. Hueber, A.O. CD95: more than just a death factor? Nat. Cell Biol. 2, E23-E25 (2000).
- Reinehr,R., Graf,D., Fischer,R., Schliess,F. & Häussinger,D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 36, 602-614 (2002).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).

- 37. Accession-Number: NP_000034.1
- Schlessinger, J. & Ullrich, A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Neuron 9, 383-391 (1992).
- 39. Wahl,M.I. & Carpenter,G. Role of growth factors and their receptors in the control of normal cell proliferation and cancer. Clin. Physiol Biochem. 5, 130-139 (1987).
- 40. Fantl,W.J., Johnson,D.E. & Williams,L.T. Signalling by receptor tyrosine kinases. Annu. Rev. Biochem. 62, 453-481 (1993).
- 41. Honegger,A.M., Schmidt,A., Ullrich,A. & Schlessinger,J. Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. Mol. Cell Biol. 10, 4035-4044 (1990).
- 42. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell 61, 203-212 (1990).
- 43. Reinehr,R., Graf,D., Fischer,R., Schliess,F. & Häussinger,D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 36, 602-614 (2002).
- Siegel,R.M. et al. Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. Sci. STKE. 2000, L1 (2000).
- 45. Squire, A. & Bastiaens, P.I. Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy. J. Microsc. 193, 36-49 (1999).
- 46. Griffin,B.A., Adams,S.R. & Tsien,R.Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. Science 281, 269-272 (1998).
- 47. Wouters,F.S., Bastiaens,P.I., Wirtz,K.W. & Jovin,T.M. FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. EMBO J. 17, 7179-7189 (1998).
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A., Ruberti ,G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. J. Biol. Chem. 274, 38241-50 (1999).
- 49. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a deathinducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 14(22), 5579-88 (1995).
- Fadeel,B., Lindberg,J., Achour,A. & Chiodi,F. A three-dimensional model of the Fas/APO-1 molecule: cross-reactivity of anti-Fas antibodies exlained by structural mimicry of antigenic sites Int. Immunol. 10, 131-140 (1998).
- Kounnas, M.Z. et al. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. Cell 82, 331-340 (1995).
- 52. Knowles, B.B., Howe, C.C. & Aden, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 209, 497-499 (1980).
- Nakabayashi,H., Taketa,K., Miyano,K., Yamane,T. & Sato,J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42, 3858-3863 (1982).
- Andersson, P., Goldfarb, M.P. & Weinberg, R.A. A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection. Cell 16, 63-75 (1979).
- Sambrook, J. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D. W. Russell.
 3rd Edition ISBN 0-87969-577-3
- 56. Mullis,K.B. & Faloona,F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155, 335-350 (1987).
- Higuchi,R., Krummel,B. & Saiki,R.K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res. 16, 7351-7367 (1988).
- 58. Ho,S.N., Hunt,H.D., Horton,R.M., Pullen,J.K. & Pease,L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77, 51-59 (1989).
- 59. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).
- Kyhse-Andersen, J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods 10, 203-209 (1984).

- Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).
- 62. Gavrieli,Y., Sherman,Y. & Ben Sasson,S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 119, 493-501 (1992).
- 63. Schatten, G. & Pawley, J.B. Advances in optical, confocal, and electron microscopic imaging for biomedical researchers. Science 239, G164, G48 (1988).
- 64. Gordon,G.W., Berry,G., Liang,X.H., Levine,B. & Herman,B. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. Biophys. J. 74, 2702-2713 (1998).
- Nakabayashi,H., Taketa,K., Miyano,K., Yamane,T. & Sato,J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42, 3858-3863 (1982).
- Seki, S., Kitada, T., Sakaguchi, H., Kawada, N., Iwai, S., Kadoya, H., Nakatani, K.
 Expression of Fas and Bcl-2 proteins and induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. Med. Electron Microsc. 32, 199-203 (1999).
- 67. Brock, R., Hamelers, I.H. & Jovin, T.M. Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. Cytometry 35, 353-362 (1999).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Reinehr,R., Görg,B., Höngen,A. & Häussinger,D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364-10373 (2004).
- 70. Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito,K., Toshioka, T., Hidaka, H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. J. Biol. Chem. 265, 5267-5272 (1990).

- 71. Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C. & Schorderet, D.F. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. Diabetes 50, 77-82 (2001).
- 72. Levitzki,A. & Gazit,A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. Science 267, 1782-1788 (1995).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Reinehr,R., Görg,B., Höngen,A. & Häussinger,D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364-10373 (2004).
- Reinehr, R., Graf, D. & Häussinger, D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. Gastroenterology 125, 839-853 (2003).
- Reinehr,R., Schliess,F. & Häussinger,D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Reinehr,R., Görg,B., Höngen,A. & Häussinger,D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364-10373 (2004).
- Reinehr,R., Graf,D. & Häussinger,D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. Gastroenterology 125, 839-853 (2003).
- Reinehr,R. & Häussinger,D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. Gastroenterology 126, 249-262 (2004).
- Reinehr,R., Graf,D., Fischer,R., Schliess,F. & Häussinger,D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. Hepatology 36, 602-614 (2002).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).

- Haj,F.G., Verveer,P.J., Squire,A., Neel,B.G. & Bastiaens,P.I. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. Science 295, 1708-1711 (2002).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Reinehr, R., Graf, D. & Häussinger, D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. Gastroenterology 125, 839-853 (2003).
- Reinehr,R., Görg,B., Höngen,A. & Häussinger,D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364-10373 (2004).
- Reinehr,R. & Häussinger,D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. Gastroenterology 126, 249-262 (2004).
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. J. Biol. Chem. 267, 10709-10715 (1992).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- Reinehr,R., Graf,D. & Häussinger,D. Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. Gastroenterology 125, 839-853 (2003).
- Reinehr,R. & Häussinger,D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. Gastroenterology 126, 249-262 (2004).

- Reinehr, R., Görg, B., Höngen, A. & Häussinger, D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364-10373 (2004).
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Möller, P., Krammer, P.H. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. J. Immunol. 149, 3166-3173 (1992).
- 94. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a deathinducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 14(22), 5579-88 (1995).
- Fadeel,B., Lindberg,J., Achour,A. & Chiodi,F. A three-dimensional model of the Fas/APO-1 molecule: cross-reactivity of anti-Fas antibodies exlained by structural mimicry of antigenic sites Int. Immunol. 10, 131-140 (1998).
- Reinehr, R., Becker, S., Keitel, V., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D. Bile saltinduced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation.Gastroenterology. 129, 2009-31 (2005).
- Reinehr, R., Becker, S., Keitel, V., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D. Bile saltinduced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation.Gastroenterology. 129, 2009-31 (2005).
- 98. Reinehr,R., Becker,S., Eberle,A., Grether-Beck,S. & Häussinger,D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in. J. Biol. Chem. 280, 27179-27194 (2005).
- Reinehr, R., Schliess, F. & Häussinger, D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- 100. Eberle, A., Reinehr, R., Becker, S. & Häussinger, D. Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF. Hepatology (2005).
- Faubion,W.A., Guicciardi, M.E., Myoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H., Gores, G.J. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. J. Clin. Invest 103, 137-145 (1999).
- 102. Miyoshi,H., Rust,C., Roberts,P.J., Burgart,L.J. & Gores,G.J. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. Gastroenterology 117, 669-677 (1999).

- Sodeman, T., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Miyoshi, H. & Gores, G.J. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 278, G992-G999 (2000).
- 104. Reinehr,R., Becker,S., Eberle,A., Grether-Beck,S. & Häussinger,D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in. J. Biol. Chem. 280, 27179-27194 (2005).
- 105. Reinehr,R., Schliess,F. & Häussinger,D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation. FASEB J. 17, 731-733 (2003).
- 106. Feng,G. & Kaplowitz,N. Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. J. Clin. Invest 105, 329-339 (2000).
- 107. Biswas, R., Basu, M., Sen-Majumdar, A. & Das, M. Intrapeptide autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Biochemistry. 24, 3795-3802 (1985).
- Yarden,Y., Schlessinger, J., Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. Biochemistry, 26, 1443-51 (1987).
- Cochet, C., Kashles, O, Chambaz, E.M., Borrello, I., King, C.R., Schlessinger J. Demonstration of epidermal growth factor-induced rec.eptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. J. Biol. Chem. 263, 3290-3295 (1988).
- Vij,N., Roberts,L., Joyce,S. & Chakravarti,S. Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea. Exp. Eye Res. 78, 957-971 (2004).
- 111. Gill,G.N. A pit stop at the ER. Science 295, 1654-1655 (2002).
- 112. Kim, J., Ahn, S., Guo, R. & Daaka, Y. Regulation of epidermal growth factor receptor internalization by G protein-coupled receptors. Biochemistry 42, 2887-2894 (2003).
- 113. Budd,R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. J. Clin. Invest 109, 437-441 (2002).
- Wang, X., DeFrances, M.C., Dai, Y., Pediaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G.K., Zarnegar, R. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. Mol. Cell 9, 411-421 (2002).

- Reinehr,R. & Häussinger,D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. Gastroenterology 126, 249-262 (2004).
- 116. Schwabe, R.F., Uchinami, H., Qian, T., Bennett, B.L., Lemasters, J.J., Brenner, D.A. Differential requirement for c-Jun NH2-terminal kinase in TNFalpha- and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. FASEB J. 18, 720-722 (2004).
- Reinehr,R. & Häussinger,D. Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. Gastroenterology 126, 249-262 (2004).
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., Yarden, Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. Genes Dev. 12, 3663-3674 (1998).
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., Yarden, Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. Genes Dev. 12, 3663-3674 (1998).
- 120. de Melker,A.A., van der,H.G., Calafat,J., Jansen,H. & Borst,J. c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. J. Cell Sci. 114, 2167-2178 (2001).
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y. & Dikic, I. Cbl-CIN85endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. Nature 416, 183-187 (2002).
- 122. Feng,G. & Kaplowitz,N. Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. J. Clin. Invest 105, 329-339 (2000).
- Javitt, N.B. Cholestatic liver disease and its management. Baillieres Clin. Gastroenterol. 3, 423-430 (1989).
- 124. Lee, Y.M. & Kaplan, M.M. Treatment of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: use of ursodeoxycholic acid. Curr. Gastroenterol. Rep. 1, 38-41 (1999).
- Reinehr,R., Görg,B., Höngen,A. & Häussinger,D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 279, 10364-10373 (2004).

- 126. Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. J. Biol. Chem. 267, 10709-10715 (1992).
- 127. Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D. 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 (1995).
- 128. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V.M. FADD, a novel death domaincontaining protein, interacts with the death. Cell. 81, 505-512 (1995).
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a deathinducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO J. 14(22), 5579-88 (1995).
- Fadeel,B., Lindberg,J., Achour,A. & Chiodi,F. A three-dimensional model of the Fas/APO-1 molecule: cross-reactivity of anti-Fas antibodies exlained by structural mimicry of antigenic sites Int. Immunol. 10, 131-140 (1998).
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Möller, P., Krammer, P.H. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. J. Immunol. 149, 3166-3173 (1992).
- 132. Eischen, C.M., Dick, C.J. & Leibson, P.J. Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. J. Immunol. 153, 1947-1954 (1994).
- Schraven, B. & Peter, M.E. APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src. FEBS Lett. 368, 491-494 (1995).
- 134. Biswas, R., Basu, M., Sen-Majumdar, A. & Das, M. Intrapeptide autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Biochemistry. 24, 3795-3802 (1985).
- Cochet, C., Kashles, O., Chambaz, E.M., Borrello, I., King, C.R., Schlessinger, J. Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. J. Biol. Chem. 263, 3290-3295 (1988).
- 136. Yarden,Y., Schlessinger, J., Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. Biochemistry, 26, 1443-51 (1987).

- 137. Reinehr, R., Becker, S., Braun, J., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. J Biol Chem. 281, 23150-66 (2006)..
- Reinehr, R., Becker, S., Keitel, V., Eberle, A., Grether-Beck, S., Häussinger, D. Bile saltinduced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation.Gastroenterology. 129, 2009-31 (2005)..
- 139. Budd,R.C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. J. Clin. Invest 109, 437-441 (2002).

VI. Zusammenfassung

Mittels Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET) und Koimmunpräzipitationsstudien an mit Yellow Fluorescent Protein (YFP)- oder Cyan Fluorescent Protein (GFP)-markierten Fusionsproteinen wurde die durch Hyperosmolarität oder CD95-Ligand hervorgerufene Interaktion des Todesrezeptors CD95 und des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) nachgewiesen.

Huh7 Hepatomazellen, die mit EGFR-CFP und CD95-YFP kotransfiziert wurden, zeigen in FRET-Studien eine schnelle, durch hyperosmolares Medium induzierte c-Jun-N-terminale Kinase (JNK)-abhängige Assoziation der beiden Proteine im Zytosol. Dieser Proteinkomplex transloziert mikrotubuliabhängig zur Plasmamembran. Wird die EGFR-Tyrosinkinaseaktivität durch AG1478 gehemmt, verhindert das die Phosphorylierung von CD95, die Translokation des Proteinkomplexes zur Plasmamembran und die Bildung des Death Inducing Signalling Complex (DISC).

Es wurde die Notwendigkeit der EGFR-abhängigen Tyrosinphosphorylierung des CD95 für die durch Hyperosmolarität und CD95-Ligand induzierte Membranumverteilung und die DISC-Bildung gezeigt: Fluoreszenzmarkierte CD95-Mutanten, in denen an den potentiellen Phosphorylierungsstellen in Aminosäureposition 232 und 291 Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde, translozieren nicht zur Membran und bilden keinen DISC, obwohl sie im Zytosol nach hyperosmolarer Stimulation oder Behandlung mit CD95-Ligand noch an EGFR gebunden vorliegen. Zellen, die mit diesen Mutanten transfiziert wurden, sind verglichen mit Zellen, die mit dem Wildtyp transfiziert wurden, resistenter gegenüber CD95-induzierte Apoptose. Ein alleiniger Austausch von einem der drei Tyrosinreste an Position 91, 232 oder 291 führt hingegen nicht zu einem signifikant vom Wildtyp abweichenden Verhalten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CD95-Phosphorylierung für die CD95-Oligomerisierung notwendig ist. CD95-YFP/CD95-CFP transfizierte Huh7 Hepatomazellen zeigen 30 Minuten nach Stimulation mit CD95-Ligand oder hyperosmolaren Bedingungen ein intrazelluläres FRET-Signal. Nach 120 Minuten transloziert der CD95/CD95-Komplex zur Plasmamembran. Die CD95/CD95-Oligomerisierung konnte durch AG 1478 oder L-JNKI-1 verhindert werden, also durch Unterbindung der EGFR-katalysierten CD95-Phosphorylierung. Untersuchungen mit CD95-Mutanten in denen an den potentiellen Phosphorylierungsstellen in Aminosäureposition 232 und 291 Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde, zeigten, dass diese Reste für eine Oligomerisierung der beteiligten Proteine notwendig sind.

In Zellen, die endogen CD95 exprimieren, konnte gezeigt werden, dass durch EGF eine EGFR/EGFR-Homodimerisierung induziert wird, die der durch CD95 Ligand hervorgerufenen CD95/EGFR-Heterodimerisierung entgegensteht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit eine Interaktion von EGFR und CD95 durch FRET nachgewiesen wurde. Außerdem wurden zwei Phosphorylierungsstellen des CD95 identifiziert, die für die frühen Ereignisse in der durch Hyperosmolarität und CD95-Ligand induzierten CD95-Aktivierung und Einleitung der Apoptose durch die Rezeptoroligomerisierung essentiell sind. Durch Inhibitorstudien konnten die an der Interaktion beteiligten Proteine erfolgreich eingegrenzt werden.

VII. Summary

Hyperosmolarity- and CD95ligand (CD95L)-induced interactions between CD95 (Fas/APO-1) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) involve EGFR-catalyzed CD95 tyrosine phosphorylation. Such interactions were studied by means of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and CD95 receptor mutagenesis in Huh7 hepatoma cells.

In cells cotransfected with EGFR–cyan fluorescent protein and CD95–yellow fluorescent protein, FRET studies showed a rapid, hyperosmolarity-induced, c-Jun-N-terminal kinase–dependent CD95–EGFR association in the cytosol with subsequent microtubule-dependent translocation of the protein complex to the plasma membrane. Inhibition of EGFR tyrosine kinase activity by AG1478 and cyclic adenosine monophosphate had no effect on hyperosmotic CD95–EGFR association in the cytosol but prevented CD95 tyrosine phosphorylation, targeting of the protein complex to the plasma membrane, and formation of the death-inducing signaling complex (DISC).

The requirement of EGFR-mediated CD95 tyrosine phosphorylation for hyperosmotic and CD95Linduced CD95 membrane targeting and DISC formation was also shown in CD95 mutagenesis experiments. CD95 mutants with tyrosine–phenylalanine exchanges at positions 232 and 291 failed to translocate to the plasma membrane and to recruit Fas-associated death domain and caspase 8, although these mutants still associated with the EGFR in the cytosol in response to hyperosmolarity and CD95L. Cells transfected with these mutants were also resistant to CD95L-induced apoptosis. Single mutations of tyrosine 91, 232, and 291 failed to inhibit CD95 membrane targeting, DISC formation, or CD95L-induced apoptosis.

The present study shows that CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis in Huh7 hepatoma cells, which were cotransfected with CD95-YFP/CD95- CFP revealed that stimulation of these cells with CD95 ligand (CD95L), proapoptotic bile acids or hyperosmolarity resulted within 30 min in an intracellular FRET signal, suggestive for CD95 oligomerization. After 120 min the FRET signal was detected in the plasma membrane, indicating translocation of the CD95 oligomer to the plasma membrane. CD95 oligomerization was abolished in presence of AG1478 or a c-Jun-Nterminal kinase (JNK) inhibitory peptide, i.e. maneuvres known to prevent EGFR-catalyzed CD95 tyrosine phosphorylation. Transfection studies with YFP/CFP-coupled CD95 mutants, which contain tyrosine/phenylalanine exchanges in positions 232 and 291 (CD95Y232,291F), revealed that at least one tyrosine (Y232,291)-phosphorylated CD95 is required for CD95 oligomerization. FRET studies in mouse embryonic fibroblasts (MEF), which in contrast to Huh7 cells express endogenous CD95, revealed that EGF, but not CD95L induced EGFR homomerization, whereas CD95L, but not EGF resulted in EGFR/CD95 heteromerization.

In conclusion, we identify EGFR–CD95 interaction and phosphorylation of critical CD95 tyrosine residues as important early events in hyperosmotic and CD95L-induced CD95 activation and apoptosis induction. EGFR catalyzed CD95 tyrosine phosphorylation is involved in the CD95 oligomerization process, which is induced by proapoptotic stimuli and is required for apoptosis induction. EGFR homomerization occurs in response to EGF, whereas CD95L induces heteromerization of the EGFR with CD95.

IIX. Anhang

8.1 Abkürzungen

AP-1	Associated Protein 1		Assoziiertes Protein 1
APS			Ammoniumpersulfat
BFP	Blue fluorescence protein		Blaufluoreszierendes Protein
BSA	Bovine Serum Albumin		Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclic Adenosinmonophosphate		Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD95	Cluster of differentiation 95		Zelloberflächenmarker 95
CD95L	CD95-ligand		CD95-Ligand
CD95 ^{Y232F}	CD95-Mutante mit Tyros		in an Position 232 Phenylalanin
CD95 ^{Y232F/Y291F}		CD95-Mutante mit Tyrosin an Position 232, 291 Phenylalanin	
CD95 ^{Y291F}		CD95-Mutante mit Tyros	in an Position 291 Phenylalanin
CD95 ^{Y91F}		CD95-Mutante mit Tyros	in an Position 91 Phenylalanin
CD95 ^{Y91F/Y232F}		CD95-Mutante mit Tyrosin an Position 91, 232 Phenylalanin	
CD95 ^{Y91F/Y291F}		CD95-Mutante mit Tyrosin an Position 91, 291 Phenylalanin	
CD95 ^{Y91F/Y2}	232F/Y291F	CD95-Mutante mit Tyros	in an Position 91, 232, 291 Phenylalanin
CFP	Cyan Fluor	rescent Protein	Cyanfluoreszierendes Protein
cJNK	c-Jun-N-terminale kinase		c-Jun-N-terminale Kinase
DAXX	Death domain associated protein		Todesdomänen assoziiertes Protein
DD	Death Domain		Todesdomäne
DEAE			Di-Ethyl-Amino-Ethanol
DED	Death effector domain		Todeseffektor Domäne
DISC	Death inducing signalling complex		Zelltod induzierender Signalkomplex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle		Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetraacetic Acid		Ethylen-Diamine-Tetraazetische Säure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor		Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FADD	Fas associated protein with death		Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne
	domain		
FCS	Fetal calf serum		Fötales Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy		Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
	Transfer		
GFP	Green Fluorescent Protein		Grünfluoreszierendes Protein
IPTG			Isopylthio- β -D-Galactopyranosid
LSM			Laserscanningmikroskop
NF-ĸB	Nuclear fa	ctor κB	Kernfaktor кВ
p38			Phosphoprotein 38

79

p53		Phosphoprotein 53
PBS	Phosphate buffered Saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor	aus Thrombozyten gewonnener
		Wachstumsfaktor
PI3K		Phosphoinositide 3-Kinase
RIP	Receptor interacting protein	Receptorinteragierende Proteinkinase
	kinase	
RT-PCR		Reverse Transkriptase – PCR
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Natriumdodecylsulphat
SDS-PAGE		SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean	Standardfehler des Mittelwertes
TEMED		N,N,N',N'-Teramethylendiamin
TNF	Tumor necrosis factor	Tumornekrosefaktor
TNF-R	TNF receptor	TNF Rezeptor
TRADD	TNF-R associated protein with DD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein
TRAF	TNF associated factor	TNF assoziierter Faktor
TRAIL	TNF related apoptosis inducing	TNF verwander Apoptose induzierender
	ligand	Ligand
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End	TdT-vermittelte dUTP-
	Labeling	Bruchstellenmarkierung
YFP	Yellow Fluorenscent Protein	Gelbfluoreszierendes Protein

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Andrea Eberle, geb. Höngen
Geboren am:	8. September 1975
Familienstand:	verheiratet mit Dr. med. Holger-Carsten Eberle
Kinder:	Benedikt Sebastian Eberle, geb. am 17. Januar 2005
	Victoria Isabel Eberle, geb. am 23. Mai 2006

Ausbildung:

1982-1984	Pestalozzi Schule, Lüdenscheid
1984-1986	Knapper Schule, Lüdenscheid
1986-1995	Zeppelin Gymnasium Lüdenscheid
1995	Allgemeine Hochschulreife
1995-1996	Studienreise nach Afrika, Asien, Australien und in die USA
1996-2001	Studium an der Universität Konstanz
1998	Vordiplom
2001	Diplom
	Thema der Diplomarbeit: "Isolierung und Charakterisierung von
	Cystein-Alanin-Mutanten der Proteinphosphatase Calcineurin" am
	LS Medizinische Chemie von Prof. Dr. Ullrich
2001-2007	Promotionsstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der
	Arbeitsgruppe "Experimentelle Hepatologie" von Prof. Dr. Häussinger

8.3 Veröffentlichungen

Publikationen:

Eberle A, Reinehr R, Becker S, Keitel V and Häussinger D. CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization. Apoptosis **12**:719-29 (2007)

Eberle A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. Hepatology **41**, 315-326 (2005).

Reinehr R, Becker S, Braun J, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. J Biol Chem. **281**, 23150-66 (2006).

Reinehr R, Becker S, Keitel V, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation.Gastroenterology. **129**, 2009-31 (2005).

Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. J Biol Chem. **280**, 27179-94 (2005).

Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Häussinger D. Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. J Biol Chem; **280**, 27179-27194 (2005).

Reinehr R, Becker S, Höngen A, Häussinger D. The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. J Biol Chem; **279**, 23977-23987 (2004).

Reinehr R, Görg B, Höngen A, Häussinger D. CD95-tyrosine nitration inhibits hyperosmotic and CD95 ligand-induced CD95 activation in rat hepatocytes. J Biol Chem; **279**, 10364-10373 (2004).

Görg B, Foster N, Reinehr R, Bidmon HJ, Höngen A, Häussinger D. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. Hepatology; **37**, 334-342 (2003).

Poster/Vorträge:

Höngen A, Reinehr R, Bode J, Häussinger D. Darstellung der hyperosmolar und CD95 Ligandinduzierten EGF-R/CD95-Assoziation und CD95-Membrantranslokation mittels FRET-Technik. 20. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Zeitschrift für Gastroenterologie **42** DOI: 10.1055/s-2004-816038 Freiburg (2004) Höngen A, Reinehr R, Bode J, Häussinger D. Visualization of the hyperosmotic and CD95 ligandinduced EGFR/CD95 association and subsequent CD95 activation by FRET technique.

1st International conference on Molecular research in environmental medicine, Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF). Düsseldorf (2004)

Höngen A, Reinehr R, Bode J, Häussinger D. 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 (2004)

Höngen A, Reinehr R, Becker S, Häussinger D. CD95 Ligand induziert eine intrazelluläre CD95/EGFR-Assoziation gefolgt von einer Mikrotubuli-abhängigen Membrantranslokation des CD95/EGFR-Komplexes. 21. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Zeitschrift für Gastroenterologie **43** DOI: 10.1055/s-2005-861626 Ulm (2005)

IX. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2001 bis September 2007 unter der Leitung von Prof. Dr. Dieter Häussinger in der Abteilung für Experimentelle Hepatologie im Fachbereich Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Häussinger besonders für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und die Schaffung hervorragender Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl bedanken. Prof. Dr. Wunderlich danke ich dafür, dass er sich als Koreferent zur Verfügung gestellt hat.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Roland Reinehr, der durch intensive und kritische Betreuung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich danke ihm für seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine motivierenden Anregungen und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, von der ich im hohen Masse profitiert habe.

Als Mitglied des von Prof. Dr. Dieter Häussinger geleiteten Sonderforschungsbereichs 575 "Experimentelle Hepatologie" hatte ich die Möglichkeit, an exzellenten Fortbildungskursen, Seminaren und Kongressen im In- und Ausland teilzunehmen. Ich habe dies, ebenso wie die Kontakte und Freundschaften im Sonderforschungsbereich 575, stets als große Bereicherung meiner Promotion empfunden.

Den Mitgliedern des Lehrstuhls und insbesondere meinen Laborkollegen danke ich für die herzliche Aufnahme und ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Namentlich möchte ich mich an dieser Stelle bei PD Dr. Johannes Bode für seine Diskussionsbereitschaft und technischen Hilfestellungen bedanken. Das gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre während meiner Promotion werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, meinen Kindern, meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre Liebe, ihr Vertrauen und die stete Unterstützung meiner Arbeit.

84

X. Eidestattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den