

**Charakterisierung der molekularen Rolle
von Caspasen bei der Proliferation von Fibroblasten
und T-Lymphozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Markus Falk
aus Niebüll

2004

**Charakterisierung der molekularen Rolle
von Caspasen bei der Proliferation von Fibroblasten
und T-Lymphozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Markus Falk
aus Niebüll

2004

1. Referentin: Prof. Dr. Dr. Bulfone-Paus

2. Referent Prof. Dr. Bosch

für Annika

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	1
1. EINLEITUNG	4
1.1 Das Immunsystem	4
1.2 Signaltransduktion in T-Lymphozyten	6
1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex	6
1.2.2 Aktivierung ruhender T-Zellen	7
1.3. Der Zellzyklus	10
1.4 Der programmierte Zelltod	12
1.4.1 Caspasen (<i>cystine dependent aspartate specific protease</i>)	13
1.4.2 Aktivierungs-induzierter Zelltod	14
1.4.3 Caspase-Inhibitoren	15
1.4.4 Nicht-apoptotische Rolle von Caspasen	15
1.5 Fragestellung	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Geräte und Materialien	18
2.2 Chemikalien und Reagenzien	19
2.3 Biologische Reagenzien, Oligonukleotide und Luziferasekonstrukte	20
2.4 Zelllinien und Zellkultur	20
2.4.1 Zellkultur	20
2.4.2 Kryokonservierung von Zellen	20
2.4.1 Isolierung von Leukozyten-Subpopulationen aus peripherem Blut	21
2.5.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	21
2.5.2 Magnetische Negativ-Isolierung humaner T-Zellen	21
2.5.3 Positivselektion humaner T-Zellen durch Rosettierung mit Schaferythrozyten.	22
2.5.4 Isolierung humaner Monozyten	23

2.6	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	23
2.7	Stimulation von Zellen	23
2.8	Western-Blot Analyse	24
2.8.1	Herstellung von TNE-Lysaten	24
2.8.2	Proteinbestimmung (Coomassie)	24
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.8.4	Western Blot-Analyse	25
2.9	Bestimmung der Luziferase-Aktivität	27
2.10	Lokalisation aktiver Caspasen 3 und 8 in PBMZ durch Immunfluoreszenzfärbung	27
2.10.1	DAPI-Färbung von Zellen	28
2.11	³[H]-Thymidin-Proliferationsassay	29
2.12	Messung der Cytokin-Freisetzung durch ELISA	29
2.12.1	IL-2 ELISA	29
2.12.2	TNF-ELISA	30
2.13	Zellzyklusanalyse	30
2.14	Messung der Caspase-3-Enzymaktivität mit Hilfe eines fluorogenen Enzymsubstrats (PhiPhiLuxTMG₂D₂)	31
2.15	Bestimmung des IL-2 mRNA-Gehalts durch quantitative RT-PCR	31
2.16	Durchflusszytometrische Analyse	33
2.17	Gelretardationsanalyse	34
2.17.1	Herstellung von Kernextrakten	34
2.17.2	³² [P] -Markierung des Oligonukleotids	34
2.17.3	Gelretardationsansatz	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Untersuchungen zur Rolle des FADD/Caspase-Signalweges bei der Proliferation von murinen Fibroblasten	36
3.2	Caspase-Inhibition bewirkt eine Blockierung der Antigen-vermittelten Proliferation von T-Zellen	39
3.2.1	Reinigung und Zusammensetzung von PBMZ und T-Zellen	39
3.2.2	Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk verhindert die antigen-induzierte Proliferation von PBMZ und T-Zellen	41
3.2.3	Dosisabhängige Proliferationsinhibition durch Caspase-Inhibitoren	43

3.2.4	Das Caspasesubstrat zVAD.amc hat keinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von T-Zellen	46
3.2.5	Caspase-Inhibition blockiert die Mitogen-induzierte Proliferation von PBMZ	47
3.2.6	Caspase-Inhibition blockiert die PPD-induzierte Proliferation von T-Zellen	48
3.2.7	Caspase-Inhibition führt zu einem Arrest des Zellzyklus in der G ₀ /G ₁ -Phase	49
3.2.8	Caspase-Inhibition verhindert die adäquate Regulation verschiedener Zellzyklusproteine	50
3.2.9	Auswirkungen der Caspase-Inhibition auf die Tyrosin-Phosphorylierung	53
3.2.10	Caspase-Inhibition reduziert die Degradation von IκB-α, aber nicht die Phosphorylierung von Akt oder Erk1/2	55
3.3	Nachweis aktiver Caspasen in nichtapoptotischen, proliferierenden T-Zellen	57
3.3.1	Nachweis aktiver Caspase-3 in proliferierenden T-Zellen	57
3.3.2	Nachweis aktiver Caspasen-3 und -8 in proliferierenden T-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen	58
3.4	Untersuchungen zur Beteiligung von Caspasen an der Induktion des autokrinen IL-2/IL-2-Rezeptor Systems	61
3.4.1	Exogenes IL-2 hebt die zVAD.fmk vermittelte Proliferationsinhibition zum Teil auf	61
3.4.2	Exogenes IL-16 hebt die zVAD.fmk vermittelte Proliferationsinhibition nicht auf	63
3.4.3	Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk führt zu einer starken Beeinträchtigung der Antigen-induzierten IL-2 Sekretion	64
3.4.4	Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk unterdrückt die PMA/Ionomycin-induzierte IL-2-Produktion	65
3.4.5	Der beobachtete inhibitorische Effekt auf die IL-2 Produktion findet auf transkriptioneller Ebene statt	66
3.4.6	zVAD.fmk verhindert die vollständige Hochregulation bestimmter Aktivierungsmarker	67

3.5	Untersuchungen zur Caspase-8-Defizienz in Jurkat T-Zellen	71
3.5.1	Das Fehlen funktionaler Caspase-8 führt zu einer deutlich reduzierten IL-2-Freisetzung in Jurkat T-Zellen	71
3.5.2	Auswirkungen des Fehlens funktionaler Caspase-8 auf die Aktivität wichtiger Transkriptionsfaktoren	72
3.5.3	Die Bindung von nukleärem cRel an seine entsprechende DNA-Zielsequenz ist im Caspase-8-defizienten Subklon herabgesetzt	73
3.6	Einfluss von zVAD.fmk auf die Aktivierung humaner Monozyten	75
4.	DISKUSSION	76
4.1	Bedeutung des FADD-Adaptermoleküls im Zellzyklus muriner Fibroblasten	77
4.2	Auswirkungen der Inhibition von Caspasen auf die Proliferation von T-Zellen	78
4.3	Auswirkungen der Inhibition von Caspasen auf die Induktion des autokrinen IL-2/IL-2R-Systems	80
4.4	Regulation von Aktivierungsmarkern	81
4.5	Regulation von Transkriptionsfaktoren in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen	82
4.6	Differentielle Substratspaltung	83
4.7	Caspase-Inhibition in Monozyten	86
5.	LITERATUR	88
	Zusammenfassung	96
	Summary	97
	Danksagung	98
	Publikationen	99
	Lebenslauf	100
	Erklärung	101

Abkürzungsverzeichnis

AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
ALPS	Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom
anti-CD3 mAk	monoklonaler anti-CD3-Antikörper
anti-CD28 mAk	monoklonaler anti-CD28-Antikörper
AP-1	<i>Activating protein 1</i>
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR1	<i>Complementary determining region 1 und 2</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DCs	Dendritische Zellen
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence light</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EK	Endkonzentration
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
EtOH	Ethanol
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluoreszin-iso-thiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G3PDH-2	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase
Grb2	<i>Growth factor receptor binding protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of kappa B kinase</i>
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IL-2	Interleukin-2
IL-2R	IL-2-Rezeptor
IP ₃	Inositol (1,4,5) Trisphosphat
ITAM	<i>Immunreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
λ	Wellenlänge
LAT	<i>Linker of activated T cells</i>
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minuten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Messenger Ribonukleinsäure
NFAT	<i>Nuclear Factor of activated T-cells</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	<i>Nuclear localisation sequence</i>
PBMZ	Periphere Blut Mononukleäre Zellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Phytoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphat
PKC θ	Protein Kinase C θ
PLC γ	Phospholipase C γ
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Azetat
PPD	<i>Purified protein derivative</i>
PTK	Phosphotyrosin-Kinase
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

r α m	monoklonaler Kaninchen-gegen-Maus Antikörper
RB-Protein	Retinoblastom-Protein
RE/AP	<i>CD28-responsive element</i> /NF-IL-2B AP-1
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SH2	<i>Src homology 2</i>
SOS	<i>Sons of sevenless</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
ZAP70	<i>Zeta-associated protein, 70kDa</i>
zIETD.fmk	Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp- Fluoromethylketone
zVAD.amc	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-7-amido-4- methylcoumarin
zVAD.fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp- Fluoromethylketone

1. EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (lat. *immunis* = frei, unberührt) dient dem Organismus in erster Linie zur Abwehr körperfremder Krankheitserreger und Substanzen, die von außen in ihn eingedrungen sind. Darüber hinaus besitzt es die Fähigkeit, krankhaft veränderte, körpereigene Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Dem Organismus stehen dafür spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen zur Verfügung, denen verschiedene Funktionsweisen zu Grunde liegen und die sich bei einer Immunantwort gegenseitig ergänzen. Es besteht aus einem äußerst komplexen und hochspezialisierten Netzwerk aus Organen, Zellen und löslichen Bestandteilen, das sich in dieser Form erst auf der Stufe der Wirbeltiere entwickelt hat. Unterstützt wird das Immunsystem durch verschiedene biochemische und physikalische Barrieren (Haut, Schleimhäute), die das Eindringen der meisten Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten und Fremdstoffe in den Organismus verhindern.

Die angeborene (native) Immunität stellt eine Sofortmaßnahme des Organismus dar, auf Fremdstoffe zu reagieren und bildet eine erste Verteidigungslinie, die vorwiegend durch phagozytierende Zellen der myeloiden Reihe getragen wird. In den Körper eingedrungene Krankheitserreger werden durch sie unspezifisch innerhalb weniger Minuten erkannt und bekämpft. Die angeborene Immunantwort bietet allerdings keinen andauernden Schutz gegen erneute Infektionen mit dem gleichen Erreger. Die erworbene (adaptive) Immunität hingegen ist hoch spezifisch für den sie auslösenden Krankheitserreger und wird hauptsächlich durch Zellen der lymphatischen Reihe vermittelt. Die Aufgabe dieser Zellen besteht in der gezielten Vernichtung eingedrungener Krankheitserreger und ihrer Giftstoffe. Aufgrund der zerstörerischen Wirkung des adaptiven Immunsystems besteht die Notwendigkeit, zwischen körpereigenen und fremden Strukturen unterscheiden zu können. Darüber hinaus ist die erworbene Immunität durch die Fähigkeit gekennzeichnet, langlebige Gedächtniszellen ausbilden zu können, die bei einer wiederholten Infektion eine schnellere und spezifischere Abwehr ermöglichen. Der Großteil der Immunzellen ist jedoch in seiner Lebensdauer begrenzt und muss vom Organismus ständig erneuert werden. Wie alle Blutzellen leiten sie sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Aus diesen undifferenzierten Vorläuferzellen entwickeln sich die Zellen der myeloiden und der lymphatischen Reihe. Zur Differenzierung tragen verschiedene Wachstumsfaktoren und Cytokine bei. Die myeloide Reihe umfasst Erythroblasten (Vorläufer der Erythrozyten), Megakaryozyten (Vorläufer der Thrombozyten), Granulozyten (Basophile, Eosinophile,

Neutrophile) sowie Monozyten, die über die Blutbahn in unterschiedlichste Organe einwandern und dort als Gliazellen (Gehirn), Kupfferzellen (Leber) oder Makrophagen bezeichnet werden. Granulozyten und monozytäre Zellen sind in erster Linie an der unspezifischen Abwehr beteiligt. Sie können jedoch über die Sekretion von Cytokinen auch die adaptive, spezifische Immunantwort beeinflussen. Zum Beispiel sind Monozyten bzw. Makrophagen wichtige Komponenten der unspezifischen Immunabwehr, weil sie zur Phagozytose von Pathogenen und körperfremden Stoffen befähigt sind. Sie leisten zudem aber auch einen wichtigen Beitrag zur spezifischen Immunantwort, indem sie Antigene prozessieren und dann den Zellen der adaptiven Immunantwort präsentieren können. Über die Ausschüttung von Cytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), IL-6, IL-10, IL-12 und Prostaglandinen wirken aktivierte Makrophagen zusätzlich stimulierend oder supprimierend auf die Proliferation und Differenzierung immunkompetenter Zellen.

Träger der spezifischen Immunantwort sind Zellen, die aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen. Sie werden nach Herkunft und Funktion in die zwei Hauptklassen der B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) unterteilt. Beide Zelltypen zeichnen sich durch strukturell homologe, hochspezifische Antigenrezeptoren aus, dem B-Zell-Rezeptor bzw. dem T-Zell-Rezeptor. Beide Rezeptortypen werden mit weiteren Mitgliedern zur Immunglobulin (Ig) –Superfamilie zusammengefasst (Hood et al., 1985). Die durch Genumlagerung entstehende hohe Diversität der für die Antigenerkennung verantwortlichen Bereiche dieser Rezeptoren ermöglicht die Erkennung fast aller potentieller Krankheitserreger.

B-Zellen sind Vermittler der spezifischen humoralen Immunantwort. Nachdem ihre Reifung im Knochenmark abgeschlossen ist, wandern sie in die sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Milz, Appendix, Tonsillen oder Peyersche Plaques aus. Jede B-Zelle exprimiert Immunglobuline einer einzigen Spezifität. Die charakteristischen Antigen-Rezeptoren auf den B-Lymphozyten (B-Zell-Rezeptor, BZR) sind Zellmembran-assoziierte Immunglobuline. B-Zellen differenzieren nach Aktivierung zu Plasmazellen aus, die lösliche Antikörper sezernieren. Diese sind nun in der Lage die Beseitigung von Pathogenen zu initiieren oder lösliche Toxine zu neutralisieren.

1.2 Signaltransduktion in T-Lymphozyten

1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

Der erste Schritt einer jeden adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung von naiven T-Zellen in lymphatischen Organen. Diese Aktivierung wird über professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) vermittelt. Dendritische Zellen (DCs) sind potente Vertreter dieser Gruppe und dazu befähigt, primäre zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren. Im nicht lymphoiden Gewebe befinden sich die DCs in einem unreifen Zustand und sind in der Lage, unterschiedliche Antigene (Mikroorganismen, Antigen-Antikörperkomplexe, apoptotische und nekrotische Zellen) aufzunehmen. Die aufgenommenen antigenen Strukturen werden prozessiert und über die MHC (*major histocompatibility complex*) Moleküle der Klasse I und II naiven T-Lymphozyten präsentiert. Dabei sind $CD8^+$ T-Zellen hauptsächlich auf die Erkennung endogen prozessierter Antigene (z.B. viraler Proteine) spezialisiert, die über MHC-Moleküle der Klasse I präsentiert werden (Klasse I-Restriktion). Dagegen sind $CD4^+$ T-Zellen meist Klasse II-restringiert. Der T-Zellrezeptor ist als Heterodimer aus zwei transmembranen Glykoproteinen aufgebaut, die der Antigenerkennung dienen. Über Disulfidbrücken sind diese membranproximal miteinander verbunden. Je nach Struktur dieses Heterodimers kann man $\alpha\beta$ -T-Zellen (mehr als 90% aller T-Zellen) von $\gamma\delta$ T-Zellen (1-10%) unterscheiden. Diese T-Zellrezeptoruntereinheiten weisen eine variable und eine konstante Immunglobulin ähnliche Domäne auf. Die Loci, die für die Gensegmente der verschiedenen Ketten kodieren, liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Im Zuge der Thymus-Entwicklung werden V-, D- und J-Gensegmente des T-Zell-Rezeptors durch sequenzspezifische Rekombination aneinandergelagert. Die T-Zellrezeptor-Untereinheiten besitzen im extrazellulären Bereich zwei unterschiedliche Domänen. Eine aminoterminal, weniger variable Region (*complementary determining region 1 und 2*, CDR1 und CDR2) ist für die „selbst“-MHC-Erkennung verantwortlich, eine zweite Domäne enthält die hypervariablen Bereiche (CDR3) für die Antigenerkennung. Die Mannigfaltigkeit des T-Zell-Rezeptor Repertoires entsteht durch Reorganisation dieser CDR3 Region. Der helikale Transmembran-Bereich ist durch das Vorhandensein mehrerer positiv geladener Aminosäurereste charakterisiert, die einerseits destabilisierend in der hydrophoben Membran wirken, den TZR jedoch gleichzeitig mit den flankierenden CD3-Untereinheiten verbinden, die in ihrem Transmembranbereich negative Ladungen enthalten. Die Untereinheiten des TZR selbst verfügen nur über einen kurzen cytoplasmatischen Bereich, die Signalweiterleitung findet über die CD3-Untereinheiten statt. Der gesamte T-Zell-Rezeptor besteht insgesamt aus

acht Ketten. Das α : β -Heterodimer ist an der Zelloberfläche mit einer CD3 γ , einer CD3 δ , und zwei CD3 ϵ -Untereinheiten assoziiert, die eine extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domäne besitzen. Erweitert wird dieser Komplex durch ein cytoplasmatisches ζ -Homodimer. Jede CD3-Untereinheit besitzt entweder ein (im Fall von CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ) oder drei (im Fall von CD3 ζ) Tyrosin- und Leucin-Motive, die als ITAMs bezeichnet werden (*immunreceptor tyrosine-based activation motifs*) (Reth, 1989). Wenn die TZR α : β -Ketten mit einem Antigen/MHC-Komplex interagieren, wird die Information an die CD3-Komponenten weitergeleitet. Insbesondere die CD3 ϵ -Ketten sind an der Signalweiterleitung und damit an der Initiation des Proliferationssignals beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper zur Stimulation von T-Zellen eingesetzt, der spezifisch mit dieser CD3 ϵ -Untereinheit interagiert.

1.2.2 Aktivierung ruhender T-Zellen

Im Gegensatz zu Rezeptor-Protein Tyrosin-Kinasen (RTK) besitzt der TZR keine intrinsische Kinaseaktivität, sondern assoziiert mit cytosolischen Phosphotyrosin-Kinasen (PTKs) der Familien Src, Syc und Tec. Nach antigener Stimulation sind es insbesondere die Src-Kinasen Fyn und Lck, die an der Phosphorylierung der ITAM-Tyrosinreste beteiligt sind und so das proximale Aktivierungssignal induzieren. Die entstehenden Phosphotyrosine stellen nun Bindungsstellen für verschiedene Proteine dar, die über SH2- (*Src* homology 2) Domänen assoziieren, wie z.B. die Tyrosinkinase ZAP70 (*zeta-associated protein 70kDa*) (Lin und Weiss, 2001). Die Rekrutierung von ZAP70 an den TZR bildet die Voraussetzung für seine Phosphorylierung durch Src-Kinasen. Das so aktivierte ZAP70 phosphoryliert wiederum Folgesubstrate. So werden Signalkaskaden initiiert, die sich zum einen in veränderter Genexpression und zum anderen in morphologischen Änderungen äußern. Signale von anderen Oberflächenrezeptoren kooperieren mit dem TZR-Signal, um eine vollständige T-Zellaktivierung auszulösen. Das wohl wichtigste kostimulatorische Signal wird dabei durch den Rezeptor CD28 vermittelt, einem Homodimer, welches nach Bindung von Liganden der B7-Rezeptorfamilie eine entscheidende Funktion bei der Signaltransduktion innehat. Natürliche Liganden für CD28 sind B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86), die von aktivierten B-Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert werden (Greenfield, 1998). Fehlende Kostimulation kann zur Anergie führen, einem Zustand, in dem die T-Zelle zu keiner Antwort auf Aktivierungssignale mehr befähigt ist. Ultimativ führt die Gesamtheit der Signale zur T-Zelldifferenzierung, zum Eintritt in den Zellzyklus und zur Produktion von Wachstumsfaktoren, wie dem für die Proliferation von T-Zellen entscheidenden Interleukin 2

(IL-2). Ein wichtiges Zielprotein der Kinase ZAP70 ist die Phospholipase C γ (PLC γ) (Sedwick und Altman, 2004). Zunächst jedoch ist eine Phosphorylierung des in Lipidflößen organisierten Transmembranproteins LAT (linker of activated T cells) durch ZAP70 nötig (Koretzky und Myung, 2001). Daraufhin katalysiert PLC γ die Spaltung von PIP₂ (Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphat) zu Diacylglycerol (DAG), welches in der Membran verbleibt, und dem Calcium-Ionophor IP₃ (Inositol (1,4,5) Trisphosphat). Dieses führt zur raschen Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Eine Funktion dieser Kationen ist die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin. Dies geschieht indirekt über die Bindung an Calmodulin, der regulatorischen Untereinheit des Calcineurin (Jorgensen et al., 2003). Calcineurin dephosphoryliert in der Folge den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells). Die Kern-Lokalisierungssequenz (NLS, nuclear localisation sequence) von NFAT liegt im unphosphorylierten Zustand exponiert vor und vermittelt die nukleäre Translokation (Rao et al., 1997). Eine entscheidende Funktion des in der Membran verbleibenden DAG besteht in der Aktivierung der Protein Kinase C θ (PKC θ), eines ebenfalls Calcium abhängigen Enzyms, dem eine zentrale Rolle bei der Vermittlung des Proliferationssignals zugesprochen wird (Sedwick und Altman, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass PKC θ die einzige PKC-Isoform ist, die zur immunologischen Synapse rekrutiert wird (Monks et al., 1997). Die Bedeutung der PKC θ liegt vor allem in der Aktivierung der IKK (inhibitor of kappa B kinase). Dieser Enzymkomplex phosphoryliert I κ B (inhibitor of kappa B), der daraufhin ubiquitinyliert und im Proteasom degradiert wird (Karin et al., 2000; Karin et al., 2004). Analog zur Dephosphorylierung von NFAT wird durch die Degradation von I κ B eine NLS im Transkriptionsfaktor NF κ B freigelegt, die zur Translokation von NF κ B in den Kern führt.

Die zuvor erwähnte Tyrosin-Phosphorylierung von LAT hat neben der PLC γ -aktivierenden noch weitere Funktionen. So vermittelt das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) die Rekrutierung des SOS- (son of sevenless) Proteins, welches das kleine G-Protein Ras durch einen GDP/GTP-Austausch aktiviert (Leo und Schraven, 2001). Durch eine Konformationsänderung in Ras-GTP wird die MAP (mitogen activated protein) Kinase Kinase Raf aktiviert. Die darauf folgende MAP Kinase-Kaskade führt zur verstärkten Expression von Fos, einer Untereinheit des AP-1-Heterodimers (Karin et al., 1997). Die zweite Untereinheit von AP-1 bildet Jun, welches über das kostimulatorische CD28-Signal aktiviert wird. Die CD28-Signaltransduktion verläuft ebenfalls über eine Ras-induzierte MAP Kinase-Kaskade (Michel und Acuto, 2002).

Zusammengefasst führen die oben beschriebenen Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, NFκB und AP-1. Durch sie wird die Transkription von Genen aktiviert, deren Produkte Proliferation induzieren. Neben dem bereits beschriebenen anti-CD3 mAk wurde in dieser Arbeit PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)/Ionomycin zur Induktion der Proliferation eingesetzt. PMA ist ein Phorbol ester, der wie DAG eine aktivierende Wirkung auf PKCθ ausübt. Ionomycin ist wie IP₃ ein Calciumionophor und induziert entsprechend die Freisetzung von Ca²⁺. Die Haupt-Signalwege zur Aktivierung ruhender T-Zellen sind schematisch in **Abb.1** zusammengefasst.

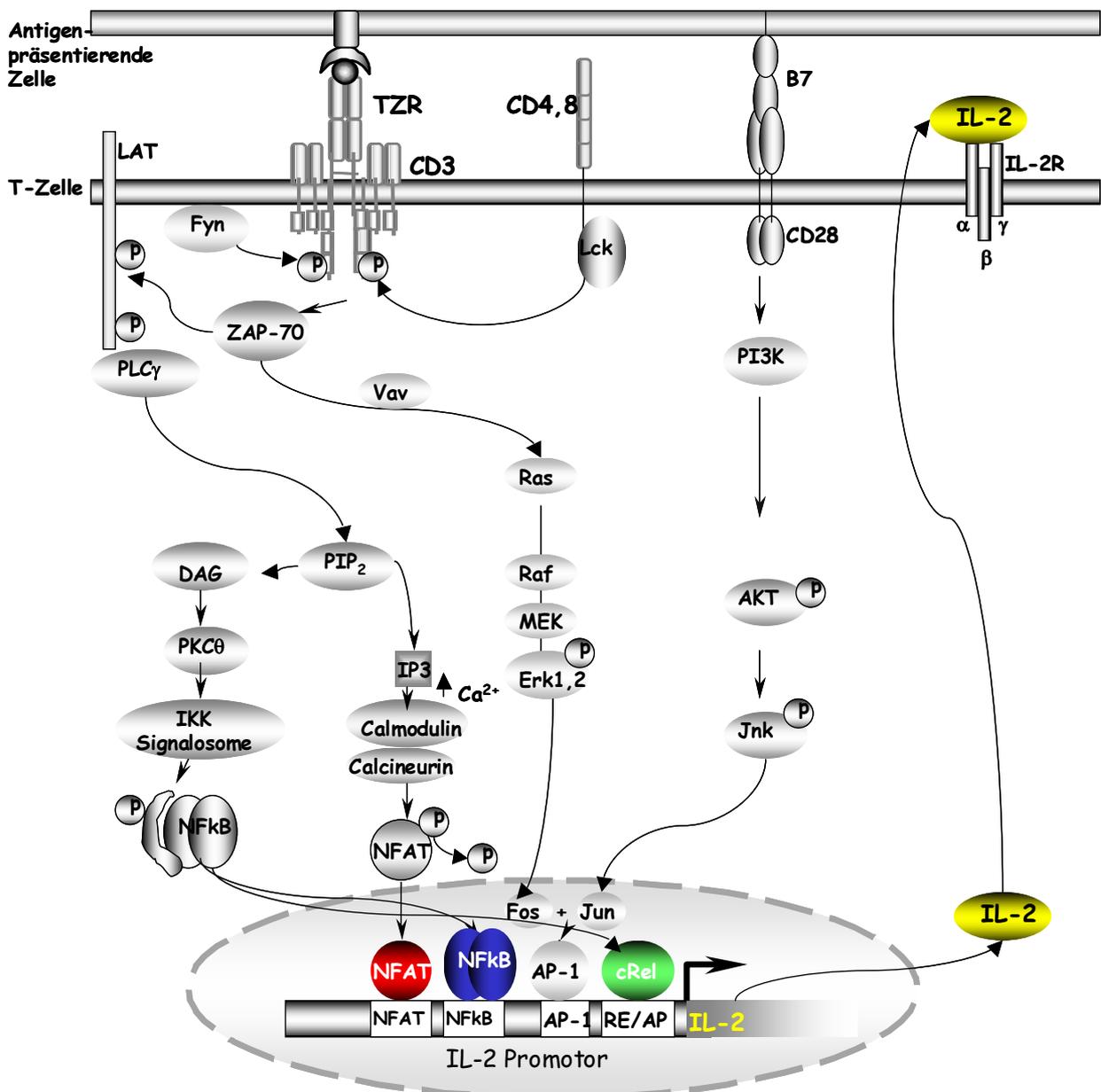


Abb. 1: Schematische Übersicht über Haupt-Signalwege, die zur Aktivierung von T-Zellen führen. Eine ausführliche Beschreibung ist im Text angegeben.

Wichtige Unterschiede bestehen offensichtlich in der Bedeutung des IL-2 bei der Proliferation *in vivo* und *in vitro*. IL-2 scheint für die *in vitro* Proliferation essentiell zu sein. Dagegen sind IL-2 Knock-out-Mäuse generell immunkompetent und zeigen erst nach 4-6 Wochen massive lymphoproliferative Komplikationen aufgrund des defekten Aktivierungs-induzierten Zelltodes.

1.3 Der Zellzyklus

Die Aktivierung ruhender T-Zellen durch mitogene Stimulation bewirkt das Verlassen der G₁/G₀-Phase und den Eintritt in die S-Phase, in der durch Neusynthese die DNA verdoppelt und so die mitotische Teilung vorbereitet wird. Ursprünglich wurde die Zellteilung in zwei Stadien unterteilt, in Mitose und Interphase. Die Mitose lässt sich in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase untergliedern. Die Interphase fasst die Ruhephasen G₁ und G₂ und die Replikations- (S-) Phase zusammen. Die Ruhephase kann eine kurze Pause zwischen zwei Zellteilungen darstellen oder länger andauern und wird dann auch als G₀-Phase bezeichnet. Der größte Teil der im Körper befindlichen nicht-wachsenden, sich nicht teilenden Zellen befinden sich in dieser Phase.

Fast jede Zelle des Körpers hat das Potential, das Leben des Individuums zu bedrohen, wenn sie zu einer Krebszelle wird. Deshalb ist die Zellteilung ein äußerst streng kontrollierter Prozess mit multiplen Kontrollpunkten. Die Komplexität des Zellzyklus spiegelt sich in den zahlreichen Fehlregulationen wider, die zur anormalen Zellproliferation und zum Krebs führen können. Die Zellteilung besteht prinzipiell aus zwei aufeinanderfolgenden Prozessen, der DNA-Replikation und der Verteilung der replizierten Chromosomen auf die Tochterzellen. Der Zellzyklus wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert, um eine korrekte Zellteilung zu gewährleisten. Dies wird unter anderem durch die Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk, *cyclin dependent kinases*), durch Cycline, Cdk-Inhibitoren oder Phosphorylierung erreicht. Cycline stellen die regulatorische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinasen dar. Sie wurden nach ihrer zyklischen Regulation benannt und werden, nachdem sie ihre Aufgabe während einer spezifischen Zellzyklusphase wahrgenommen haben, rasch ubiquitinyliert und darauf folgend im Proteasom degradiert. Die Proteinmenge der Cycline schwankt im Verlauf des Zellzyklus, was zur periodischen Aktivierung der Cdk's führt (Evans et al., 1983; Pines, 1991). Die D-Cycline (D₁, D₂, D₃) bilden unter den Cyclinen eine Ausnahme, denn sie werden nicht periodisch exprimiert, sondern konstitutiv, solange die Stimulation mit einem Wachstumsfaktor andauert (Assoian und Zhu, 1997). Insgesamt sind

16 Cycline bekannt, die jedoch wie die Cdks nicht alle am Zellzyklus beteiligt sind (Peng et al., 1998; Okamoto und Beach, 1994). Die Cdk/Cyclin-Komplexe variieren in ihrer Zusammensetzung phasenspezifisch. Bis heute sind neun verschiedene Cdks (Serin/Threonin Protein Kinasen) identifiziert worden, von denen 5 aktiv am Zellzyklus beteiligt sind. Cdk4,6 und 2 regulieren die G_1 -Phase (Sherr, 1994), Cdk2 die S- und Cdk1 die M-Phase (Abb. 2).

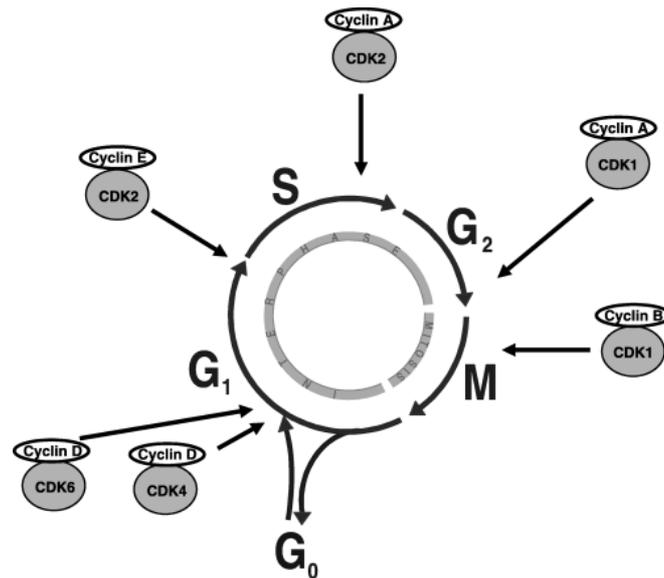


Abb. 2: Die Phasen des Zellzyklus (Vermeulen et al., 2003)

Nach Aktivierung phosphorylieren Cdks spezifische Substrate, die für die Progression des Zellzyklus essentiell sind. Dazu gehören zum Beispiel für die Mitose wichtige cytoskelettale, nukleäre Proteine wie Lamine, Mikrotubuli und Vimentin, aber auch die Regulatoren WEE1 und Cdc25 (Blangy et al., 1995; Hoffmann et al., 1993). Auch das Retinoblastom-Protein (RB-Protein), ein wichtiger Regulator des $G_1 \rightarrow S$ Phasenübergangs, ist ein Cdk-Substrat (Paggi et al., 1996; Herwig und Strauss 1997). Durch Cdk-vermittelte Phosphorylierung spezifischer Serinreste ändert sich seine Konformation, was zur Freisetzung eines zuvor assoziierten E2F-Transkriptionsfaktors führt, der nun die DNA-Synthese und damit den Start der S-Phase induziert.

Der Cdk-Aktivität kann durch Cdk-Inhibitoren (CKI) entgegengewirkt werden. Man unterscheidet zwei unterschiedliche CKI-Familien. Eine beinhaltet p15, p16, p18 und p19, welche spezifisch die G_1 -Cdks binden und so die Komplexbildung mit Cyclin D verhindern

(Carnero und Hannon, 1998). p21^{WAF1} und p27^{Cip2} bilden eine zweite Familie von CKIs, die Cdk-Cyclin-Komplexe inhibieren können (Polyak et al., 1994; Harper et al., 1995; Lee et al., 1995). Die Expression von p21^{WAF1} wird durch das Tumorsuppressor-Gen p53 induziert. Die resultierende Inhibition des Zellzyklus ermöglicht es der Zelle, eine Entscheidung über DNA-Reparatur oder Apoptose zu fällen (Gomyo et al., 1997). So wird sichergestellt, dass nur solche Zellen den nächsten Teilungszyklus beginnen, die eine komplette und fehlerfreie DNA aufweisen. Das p53-Gen ist das in humanen Tumoren am häufigsten mutierte Gen (Miller und Köffler, 1993; Greenblatt et al., 1994).

1.4 Der programmierte Zelltod

Zelltod kann durch zwei grundlegend verschiedene Mechanismen erreicht werden, durch Apoptose und Nekrose. Der als Nekrose bezeichnete pathologische Zelltod kann als Unfalltod der Zelle bezeichnet werden und hat seine Ursache zum Beispiel in mechanischer oder chemischer Reizung. Im Gegensatz dazu kann der apoptotische Zelltod als Selbstmordprozess der Zelle definiert werden, welcher durch ein evolutionär konserviertes Programm kontrolliert wird. Dieses physiologische Zellsterben ist sowohl für die Entwicklung als auch für die Aufrechterhaltung (Homöostase) eines vielzelligen Organismus von lebenswichtiger Bedeutung. Der apoptotische Zelltod äußert sich morphologisch in einem Schrumpfen der Zellen, in der Kondensation der Nuklei und der internukleosomalen Degradation der DNA. Als Haupteffektoren apoptotischer Signale fungieren dabei Mitglieder einer Protease-Familie, die als Caspasen bezeichnet werden. Ein klassisches Beispiel für Apoptose bilden zytotoxische T-Lymphozyten, die über die Protease Granzym B die Apoptose virusinfizierter Zielzellen induzieren können. Parallel zu diesem Prozess kann der auf Effektor-T-Zellen exprimierte Fas Ligand nach Ligation an den Todesrezeptor Fas eine Caspase-abhängige Signalkaskade auslösen, die zum Tod der Zielzelle führt. Das Adaptermolekül FADD (*Fas associated death domain protein*) bindet nach Ligation an die intrazelluläre Todesdomäne von Fas, was die Bindung und Aktivierung der Caspase-8 zur Folge hat. Diese ist nun in der Lage sogenannte Effektor-Caspasen (wie Caspasen-3,-6,-7) zu aktivieren, die dann das apoptotische Programm exekutieren, indem sie eine Reihe spezifischer Substrate schneiden. Dazu gehören PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase), Lamin B und Histon 1 (Kaufmann, 1989). Die Anzahl der bis heute identifizierten Caspase-Substrate liegt bei 280. Dahinter verbergen sich Proteine, die den unterschiedlichsten Familien angehören, wie Cytoskelett-Komponenten, Cytokine, DNA-Reparaturenzyme und Zellzyklusproteine (Fischer et al., 2003).

Grundsätzlich kann Apoptose durch zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Zum einen können intrinsische Signale durch zellulären Stress wie radioaktive Strahlung, Chemikalien oder virale Infektion ausgelöst werden. Auch oxidativer Stress oder Entzug von Wachstumsfaktoren kann eine Ursache dafür sein. Intrinsische Signale initiieren im Allgemeinen den Zelltod über die Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien. Die kooperative Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (Apoptotische Proteasen aktivierender Faktor-1) verursacht eine Konformationsänderung des Proteins. Dadurch wird die Domäne CARD (Caspase Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 frei zugänglich, Caspase-9 kann daran binden und wird aktiviert. In Analogie zum Caspase-8-Signalweg werden nun Effektor-Caspasen (Caspase-3 und -7) gespalten, die das apoptotische Programm aktivieren. Ein Beispiel für die extrinsisch ausgelöste Apoptose ist der bereits erwähnte Fas-Signalweg. Fas gehört zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren. Weitere wichtige Vertreter dieser Gruppe sind TR55 (TNF-Rezeptor I), TR75 (TNF-Rezeptor II) (Aggarwal, 2003) und die TRAIL-Rezeptoren 4 und 5 (Smith et al., 1994).

1.4.1 Caspasen (*cysteine dependent aspartate specific protease*)

Die Protease-Familie der Caspasen hat zwei Hauptaufgaben. Sie sind zum einen an der Generation von Cytokinen beteiligt und zum anderen, wie beschrieben an der Exekution des apoptotischen Zelltodes als Antwort auf unterschiedliche todesinduzierende Stimuli (Cohen, 1997; Wang und Lenardo, 2000). Caspasen sind strikte Endopeptidasen und werden zu einer Familie von Cystein-Aspartat Proteasen zusammengefasst, die am programmierten Zelltod bei Metazoen und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Lamkanfi et al., 2002). Zuerst wurden Caspasen in Verbindung mit Zelltod bei *Caenorhabditis elegans* gefunden. Nach der Entdeckung, dass das dabei relevante Ced-3 Protein Interleukin-1 β -konvertierendem Enzym (ICE; Caspase-1) der Säugetiere ähnelt, hat sich die proteolytische Aktivierung der Caspase-Kaskade als zentraler Schritt der Apoptose abgezeichnet. Seither sind in der Gruppe der Säugetiere 14 Caspasen identifiziert worden, von denen 8 mit unterschiedlichen Aspekten des Zelltodes assoziiert sind. (Los *et al.*, 2001). Caspasen sind phylogenetisch weit verbreitete Enzyme, so sind bis heute 11 humane und 10 murine Caspasen bekannt. Auch in den Gruppen der Fische, der Amphibien, Vögel, Insekten und Nematoden sind jeweils mehrere Caspasen beschrieben. Selbst in Pflanzen, Pilzen und Protozoen findet sich eine mit den Caspasen verwandte Enzymfamilie, die als Metacaspasen bezeichnet wird. Auch die sogenannten Paracaspasen (in Metazoen identifiziert) zeichnen sich durch ein konserviertes aktives Zentrum (Cys-His) aus (Uren *et al.*, 2000). Caspasen tragen, wie andere Cystein-Proteasen,

ein katalytisches Cystein-Histidin Zentrum (Cys285 und His237), wobei das Cystein als Nukleophil fungiert und das Histidin als Base, die das katalytische Cystein aktiviert (Stennicke, 1999). Sie werden als relativ inaktive Zymogene synthetisiert. Diese Proformen werden entweder durch Proximitäts-induzierte Autoproteolyse aktiviert (z.B. Caspase-8) oder von vorgelagerten Initiator-Caspasen in den aktiven Zustand versetzt (z.B. Caspase-3). Diese Spaltvorgänge finden grundsätzlich an Carboxylstellen von Aspartatresten statt. Die einzigen bekannten eukaryontischen Proteasen mit dieser Spezifität sind die Caspasen selbst und das bereits angesprochene Granzym B, eine Serin-Protease, die in cytotoxischen T-Lymphozyten vorkommt (Greenberg, 1996; Pham und Ley, 1997; Thornberry *et al.*, 1997). Da Caspasen sowohl sich selbst, als auch andere Caspasen spalten, können sie ihre gegenseitige Aktivierung in einem sich selbst verstärkenden Mechanismus bewirken.

1.4.2 Aktivierungs-induzierter Zelltod

Die Aktivierung einer einzigen T-Zelle kann eine Immunantwort auslösen (Milon *et al.*, 1981). Voraussetzung dafür ist die Proliferation, die zur Expansion dieses Klons und damit zur Entstehung eines Pool an Zellen mit der gleichen Spezifität führt. Ist der Körper von einer Infektion befreit, werden die während der Immunantwort generierten Zellen nicht nur überflüssig, sondern könnten dem Organismus auch schaden. Deshalb ist es wichtig, die große Mehrzahl der aktivierten T-Zellen am Ende der Immunreaktion zu eliminieren. Dies geschieht durch einen Prozess, der mit AICD abgekürzt wird (*activation-induced cell, death*) (Dhein *et al.*, 1995; Krammer, 2000; Green *et al.*, 2003). Der zugrunde liegende Signalweg ähnelt dabei dem der oben beschriebenen Tötung einer virusinfizierten Zielzelle. So wird auch die Deletion peripherer maturaer T-Zellen am Ende der Immunreaktion durch Ligandierung von Fas und FasL induziert (Alderson *et al.*, 1995; Renno *et al.*, 1996). Dabei kann sich eine mature T-Zelle entweder durch Sezernierung von löslichem FasL selbst durch Suizid eliminieren, oder über membranständigen FasL eine andere Zelle töten (Fratricid, Brudermord) (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Individuen mit Mutationen im Fas- oder FasL-kodierenden Gen entwickeln ein Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom (ALPS) (Oren *et al.*, 2002). Kinder, die am sogenannten Canale-Smith Syndrom (einer Form des ALPS) leiden, haben massive nicht-maligne Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, veränderte T-Zellpopulationen und andere Merkmale systemischer Autoimmunität.

1.4.3 Caspase-Inhibitoren

Viren sind für ihre Vermehrung auf eine intakte Wirtszelle angewiesen. Der effektivste Mechanismus, die virale Replikation zu verhindern, wäre ein Selbstmord der infizierten Zelle. Um dies zu verhindern, tragen viele Viren Proteine, die an aktive Caspasen binden und diese hemmen. Beispielsweise inhibiert CrmA (*cytokine response modifier 1A*) des Kuhpocken-Virus die Caspase-1 (Ray et al., 1992). p35 ist ein baculoviraler Caspase-Inhibitor, der Apoptose in Insektenzellen verhindert (Clem et al., 1991). Darüber hinaus gibt es zelleigene Caspase-Blocker, zum Beispiel Proteine der IAP- (*inhibitor of apoptosis*) Familie. Zu ihnen gehören Survivin und XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) (Deveraux et al., 1997; Wang et al., 1999). Da unerwünschte Apoptose verschiedenen Krankheiten (Morbus Alzheimer, AIDS) zugrunde liegt, wurde die Entwicklung pharmakologischer Inhibitoren vorangetrieben. In der vorliegenden Arbeit fanden die synthetischen Inhibitoren zVAD.fmk (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon) und zIETD.fmk (Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-Fluoromethylketon) Verwendung. Während zVAD.fmk als Breitband-Caspase-Inhibitor potentiell sämtliche Caspasen inhibiert, ist zIETD.fmk ein selektiver Caspase-8-Inhibitor. Diese Peptide wirken als Pseudosubstrate für Caspasen und sind daher kompetitive Inhibitoren. Die fmk-(Fluormethylketon) Gruppe ist einerseits für die Bindung an das aktive Zentrum und damit für die irreversible Inhibition verantwortlich. Andererseits führt die fmk-Gruppe zu einer hohen Zellpermeabilität dieser Peptide (Ekert et al., 1999).

1.4.4 Nicht-apoptotische Rolle von Caspasen

Obwohl die Prozesse der Zellproliferation und des Zelltodes einander gegenüberstehen und sich augenscheinlich beidseitig ausschließen, gibt es einige Hinweise für eine Rolle von Caspasen bei der Proliferation verschiedener Zelltypen. Die ersten Anzeichen ergaben sich aus *in vitro* Experimenten mit pharmakologischen Inhibitoren. So konnten Kennedy et al. (1999) nachweisen, dass Caspase-Inhibition zu einer Proliferationsblockade in T-Zellen führte. Später wurden diese Daten durch *in vivo* Befunde bestärkt. So beschrieben Chun et al. (2002) Patienten mit einer Mutation im Caspase-8-kodierenden Gen, die zur Immundefizienz führte. T-Zellen und B-Zellen dieser Patienten zeigten *ex vivo* nur eine schwache Antwort auf mitogene Stimulation. Unterstützt wurde die Hypothese einer Beteiligung von Caspasen bei proliferativen Prozessen durch Beobachtungen an Knock-out-Mäusen. Die Geburtenrate Caspase-3-defizienter Mäuse ist geringer und die Mäuse selbst sind kleiner. Caspase-8^{-/-}- bzw. FADD^{-/-}- Mäuse zeigen einen noch drastischeren Phänotyp und sind unter anderem in Folge

gestörter Herzmuskelentwicklung embryonal lethal. Im Immunsystem zeigen hämatopoetische Vorläuferzellen dieser Mäuse eine reduzierte Anzahl an T-Vorläuferzellen, die zur Entwicklung in den Thymus eintreten. In FADD^{-/-}- Mäusen oder in solchen, die ein dominant-negatives FADD exprimieren, ist die Aktivierungs-induzierte Proliferation von T-Zellen trotz normaler IL-2-Produktion gestört. Dagegen zeigten Experimente mit humanen Zellen eine Reduktion der IL-2 Expression aufgrund eines genetischen Caspase-8-Defektes (Chun et al., 2002) bzw. nach Caspase-Inhibition (Kennedy et al., 1999).

Los et al. (2001), diskutieren, dass ein Beitrag von Caspasen bei der Proliferation in der Bereitstellung zusätzlicher Zellzyklus-Kontrollpunkte liegen könnte. Die genaue Rolle der Caspasen bei nicht-apoptotischen Prozessen bleibt jedoch zu klären.

1.5 Fragestellung

Die Enzymfamilie der Caspasen umfasst eine Gruppe von Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen, deren Rolle als Mediatoren des apoptotischen Zelltodes umfassend beschrieben ist (Earnshaw et al., 1999). Eine Inhibition der Caspaseaktivität resultiert in den meisten Fällen folgerichtig in einer Resistenz der Zellen gegenüber apoptotischen Signalen. Seit einigen Jahren verdichten sich jedoch die Hinweise, auf eine Beteiligung von Caspasen an Signalwegen, die zur Proliferation und Differenzierung in verschiedenen Zelltypen führen (Elkon, 1999; Los et al., 2001; Budd, 2002; Algericas-Schimnich et al., 2002). Zelltod und Proliferation sind sicherlich die gegensätzlichsten Antworten einer Zelle auf externe Stimuli. Daher ist die Regulation beider Antworten durch den identischen Signalweg in denselben Zellen außerordentlich erstaunlich und erfordert die genaueste Balance zwischen den beiden Signalereignissen. Eine Störung dieser Balance könnte zu der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen wie Krebs oder Autoimmunität führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Beteiligung von Caspasen bei der TNF-vermittelten Proliferation von murinen Fibroblasten sowie bei der Antigen-vermittelten T-Zell-Aktivierung genauer zu definieren. Als Zellsysteme wurden Subklone der murinen Zelllinie NIH3T3, sowie Subklone der humanen T-Zelllinie Jurkat und humane periphere Blutlymphozyten (PBMZ) gesunder Blutspender verwendet. In Ergänzung wurden die meisten Versuche mit gereinigten T-Zellen reproduziert, um potentielle kostimulatorische Einflüsse anderer Zellen in der PBMZ Mischkultur zu minimieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte und Materialien

Agfa, Gera

Assistant, Burlington USA

Amersham Biosciences UK Ltd.,

Buckinghamshire, England

Becton Dickinson & Co., Heidelberg

Berthold, Pforzheim

Bio Rad, München

Dynal, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Eastman Kodak Comp., USA

Forma Scientific Inc., Marietta, USA

Greiner, Heidolph Instruments, Kehlheim

Hofer scientific instruments, S.F., USA.

IKA-Labortechnik, Staufen

Macheray-Nagel, Düren

Nunc, Nalge Nunc Int., Dänemark

Perkin Elmer, Turku, Finnland

Curix 60 Entwicklermaschine

Mikroskopische Deckgläser

HyperfilmTMECL-Chemilumineszenz-
Film

FACSCalibur Analyser, 100 mm-
Zellkulturschalen, Zellkulturplatten mit 6
Kavitäten für Primärzellkultur (Falcon)

Luminometer

Bio Rad SmartSpecTM 3000, Mini-
PROTEAN II Gelelektrophoresekammern,
Mini Trans-Blot Transfer Cell, Gene
Pulser, Gelrockner

Magnetkammer

Tischzentrifugen 5415D und 5417C,
Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf-
Reaktionsgefäße, Spannungsgerät Power
Pac 300

Biomax-MR-Röntgenfilme

Zellkulturinkubator

Spitzbodenröhrchen 15 ml, 50 ml

Rotamax 120- Schütteltisch

Gelkammer für Retardationsanalyse

Schütteltisch KS250 Basic

Parablot-NCL (Porenweite 0,45 µM)

Zellkulturflaschen, 100 mm-

Zellkulturschalen, bzw. Zellkulturplatten
mit sechs, zwölf und sechsundneunzig
Kavitäten

Filter-Matten Erntegerät

β-Strahlen Zählgerät (β-Counter)

Roche, Penzberg	LightCycler
Sartorius Analytic, Göttingen	Analysewaage
Sarstedt, Nümbrecht	1 x Küvetten zur Proteinbestimmung
Sigma, Deisenhofen	Tischzentrifuge 6K10
Scientific Industries, Inc., New York, USA	Vortex Genie 2
Schleicher & Schuell, Dassel	Gel Blotting Papier GB002
	Luminometer, Pipetten, ELISA-Reader
Tecan, Crailsheim	ELISA-Reader
Wallac, Turku, Finnland	Filtermatte, Scintillationsgel
Zeiss, Jena	Laserscanning Mikroskop

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Grundchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in analytischer Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Active Motif, Rixensart, Belgien	cRel Nushift Assay-Kit
Amersham Life Science, Braunschweig	ECL-Detektions-Kit, [Methyl- ³ H]-Thymidin
Bachem, Heidelberg	zVAD.fmk, zIETD.fmk, zVAD.amc
Bender Med Systems, Wien, Österreich	Human IL-2 Instant ELISA
Biochrom KG, Berlin	Glutamin, PBS, fötales Kälberserum, Ficoll Separating Solution
Dynal, Hamburg	T Cell Negative Isolation Kit,
Frema, Lüneburg	Magermilchpulver
Merck Biosciences, Darmstadt	Ionomycin, Caspase-3 Intracellular Activity Assay Kit II
PAA, Pasching, Österreich	DMEM-Kulturmedium, 1640-RPMI-Kulturmedium
Pierce, Rockford, USA	Coomassie-Färbelösung
Roche, Penzberg	DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)
SERVA, Heidelberg	Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1
Sigma-Aldrich, Steinheim	TEMED, PMA

2.3 Biologische Reagenzien, Oligonukleotide und Luciferasekonstrukte

Humanes, rekombinantes IL-2 wurde von Chiron (Magdeburg) bezogen, IL-1 β von R&D Systems (Wiesbaden) und IL-18 von PeproTech (London, U.K). PHA wurde von Genzyme-Virotech (Rüsselsheim), PPD von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) gekauft. Die Oligonukleotide zur Amplifikation der IL-2 bzw. G3PDH-2 Gene für die RT-PCR wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. NFAT- und NF κ B-spezifische Luciferasekonstrukte wurden von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bestellt. Das IL-2-Promotorabhängige Luciferasekonstrukt wurde freundlicherweise von Dr. T. Abraham zur Verfügung gestellt, das RE/AP-Luciferasekonstrukt wurde von Dr. A. Weiss bereitgestellt.

2.4 Zelllinien und Zellkultur

2.4.1 Zellkultur

Die murine Fibroblasten Zelllinie NIH3T3 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Rockville, USA) bezogen, der FADD-DN überexprimierende Subklon wurde von Silke Lüschen hergestellt (Lüschen et al., 2002). Sowohl die humane Lymphomzelllinie Jurkat als auch der Caspase-8-defiziente Subklon wurden freundlicherweise von Dr. J. Blenis bereitgestellt.

Alle Zelllinien und frisch isolierte PBMZ bzw. T-Zellen wurden im Inkubator bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen gehalten und alle 2-3 Tage subkultiviert. Das DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium*)-Kulturmedium zur Kultivierung der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 wurde mit 10% v/v fötalem Kälberserum (FKS), je 50 μ g/ml Penicillin und Streptomycin, 0,5% v/v β -Mercaptoethanol-Lösung und zusätzlich 2 mM L-Glutamin supplementiert. PBMZ und gereinigte T-Zellen, sowie die humane Lymphom Zelllinie Jurkat wurden in RPMI-Kulturmedium gehalten, dem ebenfalls 10% v/v FKS und je 50 μ g/ml Penicillin und Streptomycin zugesetzt waren.

2.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Vitale Zellen wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO), das in die Zellen diffundiert, wird die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zerstörung der Membran verhindert. Hierzu wurden die Zellen

abzentrifugiert (5min, 340 x g, 20°C) und in 1 ml kaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 20% FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und in flüssigen Stickstoff (-196°C) gelagert.

2.5 Isolierung von Leukozyten-Subpopulationen aus peripherem Blut

2.5.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMZ) wurden aus „Buffy-Coat“ (Lymphozytenkonzentrat) -Präparationen gesunder Spender isoliert, die vom Institut für Transfusionsmedizin, UK-SH, Kiel bereitgestellt wurden. Die Zellen wurden mit Hilfe der Dichtezentrifugation über einen Ficoll-Hypaque Gradienten isoliert. Hierzu wurden 35 ml Vollblut ohne Plasma (1:1 in PBS) über 15 ml Ficoll (1,077 g/ml spez. Dichte) geschichtet. Durch Zentrifugation (20 min, 820 x g, RT, ohne Bremse) reichern sich Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen in der Interphase an, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte sedimentieren. Die in der Interphase lokalisierten Zellen wurden aufgenommen, zweimal in PBS gewaschen (5 min, 300 x g, RT) und in Kulturmedium mit 10% FKS suspendiert.

2.5.2 Magnetische Negativ-Isolierung humaner T-Zellen

Zur gezielten Aufreinigung von T-Zellen aus dem PBMZ-Gemisch wurde das Dynal System für magnetische Separation verwendet. Vorbereitend wurden 100 µl Dynabeads je 2×10^7 eingesetzter PBMZ in ein Zentrifugenröhrchen überführt, welches für 1 min in die Dynal Magnetkammer platziert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Dynabeads in 1 ml PBS/0,1% BSA gewaschen, schließlich in 100µl Waschpuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Zur Gewinnung von mindestens 1×10^7 T-Zellen wurde die doppelte Zellzahl in Waschpuffer suspendierter PBMZ in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 500 x g, RT sedimentiert. Nach Resuspension in 100 µl PBS/0,1% BSA wurden 20µl hitzeinaktiviertes FKS und dieselbe Menge Antikörpermix (monoklonale Maus-Antikörper gegen CD14, CD19, CD16a,b, CD56, HLA Klasse II DR/DP) zugegeben. Das Gemisch wurde für 10 min bei 4°C inkubiert. Durch Verdünnung mit 1 ml Waschpuffer und anschließende Zentrifugation für 8 min bei 500 x g, RT wurde ungebundener Antikörper mit dem Überstand verworfen. Den in 0,9 ml PBS/0,1% BSA resuspendierten Zellen wurden die zuvor gewaschenen Dynabeads zugegeben, die durch 15-minütiges leichtes Schwenken bei RT an die FC-Bereiche der Antikörper binden konnten. Die Rosettenbildung wurde durch vorsichtiges Pipettieren gelöst, bevor das Volumen durch Zugabe von 1 ml PBS/0,1% BSA erhöht wurde. Durch 2-minütiges Platzieren in der Magnetkammer konnten nun die über

Antikörper an die Dynabeads gekoppelten B-Zellen, Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen von den im Überstand befindlichen T-Zellen separiert werden. Nach abschließender Sedimentation (5min, 500 x g, RT) wurden die gereinigten T-Zellen zur weiteren Verwendung in FKS-haltigem RPMI-Medium resuspendiert.

2.5.3 Positivselektion humaner T-Zellen durch Rosettierung mit Schaferythrozyten.

Alternativ zu der in 2.5.2 beschriebenen Methode fand die Isolierung von T-Zellen mittels Positivselektionierung statt. Humane T- Lymphozyten (und NK-Zellen) exprimieren im Gegensatz zu B-Zellen als einen charakteristischen Oberflächenrezeptor den CD2-Rezeptor, der neben seinem natürlichen Liganden (CD58, LFA-3) auch spezifisch das T11TS-Molekül auf Schaferythrozyten bindet (auch SRBC-R, *sheep red blood cell receptor*). T-Zellen und Schaferythrozyten bilden hierbei Rosetten, die aufgrund ihrer höheren Dichte mittels Ficoll-Dichtezentrifugation (siehe oben) von CD2-negativen B-Zellen und Monozyten getrennt werden können. Zur Isolierung wurden Ficoll-gereinigte PBMZ mit einer Schaferythrozyten-Suspension (4×10^7 PBMZ/1 ml Schaferythrozyten) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vermischt. 25 ml dieses Ansatzes wurde über 15 ml Ficoll-Hypaque geschichtet. Durch Zentrifugation für 20 min bei 820 x g ohne Bremse, wurden die rosettierenden Zellen von den nicht-rosettierenden Zellen im Gradienten getrennt. Letztere Zellen wurden abgenommen und verworfen, während die sedimentierten Zellen (E+ -Zellen = T-Zellen/NK-Zellen) zweimal in Kulturmedium gewaschen wurden (5 min bei 500 x g, RT). Danach wurden die an die Zielzellen gebundenen Erythrozyten mit einer 1 M NH_4Cl -Lösung lysiert. Die so angereicherten T-Zellen wurden vor Weiterbehandlung erneut zweimal in Kulturmedium gewaschen.

2.5.4 Isolierung humaner Monozyten

Humane Monozyten wurden aus PBMZ isoliert, die aus Lymphozytenkonzentrat eines gesunden Blutspendes gewonnen wurden (siehe oben). Die PBMZ wurden in einen Gegenstrom-Elutriator geladen. Dabei erfolgte die Auftrennung der Zellen nach Größe durch zwei entgegengesetzte Kräfte, der Zentrifugalkraft nach außen und dem radial nach innen gerichteten Gegenstrom des Zellmediums. Durch Regulation der Pumpgeschwindigkeit bei konstanter Rotorumdrehung können fraktionierte Eluate gewonnen werden, wobei die Monozyten aufgrund ihrer Größe in den Fraktionen 49/50 enthalten sind. Die Reinigung

humaner Monozyten fand in Zusammenarbeit mit Dr. N. Reiling im Forschungszentrum Borstel statt.

2.6 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in Neubauer-Zählkammern mit definiertem Kammervolumen. Zur Auszählung von Zellen und zur Vitalitätsbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Eosin- oder Trypanblaulösung verdünnt. Diese Farbstoffe durchdringen nur die poröse Membran toter Zellen, welche dadurch angefärbt werden. Die Zellzahl ergibt sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen, Kammerfaktor (10^4) und Verdünnungsfaktor.

2.7 Stimulation von Zellen

Die Behandlung von adhärenenten Fibroblasten erfolgte grundsätzlich in Zellkulturschalen. Hierzu wurde die benötigte Anzahl Zellen (2×10^6 für 100 mm-Schalen, 5×10^4 für 6-Well-Platten) in FKS-haltigem Medium ausgesät. Zur Herstellung von TNE-Lysaten für Western-Blots wurden die Zellen zunächst für 2 h angezogen. Nach Adhärenz der Zellen wurde das FKS-haltige Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt und 24 h später für die gewünschte Dauer mit 10 % FKS stimuliert.

PBMZ wurden für Langzeit-Stimulation mit plastikgebundenem monoklonalem anti-CD3-Antikörper (anti-CD3 mAk, Klon OKT3) stimuliert. Die Stocklösung (1mg/ml) wurde 1:50 in PBS verdünnt. Pro Kavität einer 96-Well Platte wurden 100 μ l dieser Verdünnung verwendet. Die Bindung des Antikörpers an die Plastikoberfläche erfolgte für 2 h bei 37°C. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Platte zweimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Pro 96-Well Kavität wurden je 1×10^5 in 200 μ l Medium suspendierte Zellen ausgesät. Gereinigte T-Zellen wurden zusätzlich mit einem kostimulatorisch wirkenden monoklonalen anti-CD28 Antikörper (anti-CD28 mAk) stimuliert, der dem PBS in einer Finalkonzentration von 0,2 μ g/ml zugegeben wurde. Für Versuche in denen höhere Zellzahlen benötigt wurden, fand die Stimulation in 12-Well-Schalen (5×10^5 Zellen in 1 ml Medium) bzw. in 6-Well-Schalen (10^6 Zellen in 2 ml Medium) oder in 100 mm Schalen (10^7 Zellen in 10 ml Medium) statt, wobei die gleiche Endkonzentration an Antikörpern verwendet wurde.

Für Stimulationszeiten unter 24 h wurden die Antikörper in löslicher, nicht gebundener Form zugegeben (10 μ g/ml anti-CD3 mAk, 0,1 μ g/ml anti-CD28 mAk), und durch ein sekundäres gegen Maus gerichtetes Kaninchen-Serum kreuzvernetzt. Die parallele oder alleinige

Stimulation mit den Caspase-Inhibitoren zVAD.fmk bzw. zIETD.fmk erfolgte durch Zugabe zur Zellsuspension direkt vor der Aussaat. PHA wurde ebenfalls direkt vor Aussaat der Zellen in einer Endkonzentration (EK) von 1 µg/ml zugegeben. Alternativ wurden die Zellen mit PMA (EK:10 ng/ml) in Kombination mit Ionomycin (EK: 500 ng/ml) stimuliert. Jurkat-T-Zellen wurden mit PMA/Ionomycin aktiviert. Die Anregung humaner Monozyten zur TNF-Freisetzung erfolgte durch Infektion mit der 5-fachen Anzahl von *Mycobacterium tuberculosis* SE01 oder mit LPS (EK: 10 ng/ml).

2.8 Western-Blot Analyse

2.8.1 Herstellung von TNE-Lysaten

Nach zweimaligem Waschen in eiskaltem PBS wurden die stimulierten, sedimentierten Zellen in TNE-Puffer (50mM Tris, [pH 8], 150 mM NaCl, 1% v/v NP-40, 2 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) mit frisch zugegebenen Proteaseinhibitor-Mix Complete™ resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Lyse auf Eis wurden die unlöslichen Membranbestandteile durch Zentrifugation bei 20.800 x g präzipitiert. Die im Überstand befindlichen löslichen Proteine wurden überführt und deren Konzentration mittels Coomassie-Reagenz photometrisch bestimmt.

2.8.2 Proteinbestimmung (Coomassie)

Die gewonnenen Proteinextrakte wurden 1:1000 in Coomassie Protein Assay Reagent-Lösung verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung der Absorption im Photometer (Bio Rad SmartSpec™ 3000) bei 595 nm.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen innerhalb einer Gelmatrix und wurde nach der Standardmethodik (Lämmli, 1970) durchgeführt. Das negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) führt durch Bindung an hydrophobe Regionen der Proteine zu deren Entfaltung und zu einheitlich negativer Ladung der Polypeptidketten. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol führt zusätzlich zur Denaturierung der Proteine. Die Zell-Lysate wurden nach Standardmethoden (Lämmli, 1970) im SDS-Polyacrylamidgel bei einer konstanten Stromstärke von 25mA/Gel (Minigelsystem) separiert. Hierzu wurden grundsätzlich 20µg Protein eingesetzt. Die Volumina der Lysate wurden durch Zugabe des Lysepuffers

angeglichen. Die Proteine wurden vor Auftrag auf die Gele mit vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 62,5 mM Tris [pH 6,8], 2% w/v SDS, 10% v/v Glycerin, 3% v/v β -Mercaptoethanol, 0,1% w/v Bromphenolblau) versetzt und durch fünfminütiges Kochen denaturiert.

2.8.4 Western Blot-Analyse

Die separierten Proben wurden im Nassblottverfahren (Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% v/v Methanol) in einer Stunde durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V an die gekühlte Blotkammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Vor dem Transfer wurden Membran und Gel in Transferpuffer äquilibriert. Durch reversible Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0,2% w/v in 3% w/v Trichloressigsäure) wurde die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung und des Transfers kontrolliert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen für eine Stunde in PBS mit 0,1% v/v Tween-20 (PBST), dem 5% w/v Trockenmilchpulver zugefügt waren, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST (je 5 min) wurden die Filter über Nacht bei 4 °C mit in PBST verdünntem Primärantikörper, in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen (je 15 min) mit PBST entfernt und die Nitrozellulosemembran für 45 min. bei RT mit Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern (1:10000 in PBST) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran (5 x 5 Minuten) erfolgte die Visualisierung der Immunoreaktivität mittels ECL-Reagenz auf einem Röntgenfilm. Die Expositionsdauer von 5 min bis 1 h variierte in Abhängigkeit von der Stärke der Proteinbanden. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Primärantikörper	Wirt	Hersteller	eingesetzte Konz.
p 21	Maus	Pharmingen	1:500
p 27	Maus	Pharmingen	1:500
Cyclin A	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000
Cyclin B1	Maus	Pharmingen	1:500
Cyclin D1	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000
Cdk 1	Maus	Transduction Laboratories	1:2500
Cdk 4	Maus	Pharmingen	1:500
Cdk 2	Maus	Transduction Laboratories	1:2500
Cdk 6	Kaninchen	Pharmingen	1:1000
Phospho-AKT	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
Phospho-ERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
RB	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
RB Phospho-Ser780	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
RB Phospho-Ser795	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
RB Phospho Ser807/811			
IkBα	Kaninchen	Cell Signaling	1:2000
Sekundärantikörper	Wirt	Hersteller	eingesetzte Konz.
Peroxidase-konjugiert	Ziege gegen Maus	Jackson ImmunoResearch	1:10000
Peroxidase-konjugiert	Ziege gegen Kaninchen	Jackson ImmunoResearch	1:10000

Tab. 2.1: Zusammenstellung der für die Westernblot-Analyse verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

2.9 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Das Luciferase Assay System (Promega) erlaubt die Analyse der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, deren spezifische DNA-Bindesequenzen in ein Luciferase-Reporter-Plasmid subkloniert wurden. Der zu untersuchende Transkriptionsfaktor bindet an seine entsprechende Zielsequenz und induziert somit die Transkription des Luciferase-Gens. Durch die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin kommt es zur Freisetzung von Licht, das im Luminometer detektiert werden kann. Hierbei ist die gemessene Lichtemission ein Maß für die Expression der Luciferase und somit für die Aktivität des entsprechenden Transkriptionsfaktors. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers (Promega). Die entsprechenden Jurkat-Zellklone (Wildtyp bzw. Caspase-8^{-/-}) wurden zu 2×10^6 Zellen /200 µl Medium pro Elektroporationsansatz in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis mit 10 µg Plasmid-DNA vermischt. Daraufhin wurde die Suspension zur Transfektion in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach Elektroporation (280V, 40 kHz, 50 msec.) wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und 24 h inkubiert. Daraufhin wurden die Transfektanten für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, in PBS gewaschen und in 30 µl CCLR (25 mM Tris-Phosphat [pH=7,8], 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 10% Glycerol, 1% Triton[®] X-100) lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 13200 x g für 5 min bei RT präzipitiert und 20 µl des Überstandes in FACS-Röhrchen überführt. Zur Messung im Luminometer wurden die Lysate mit 100 µl LAR (Luciferase Assay Reagent) gemischt.

2.10 Lokalisation aktiver Caspasen 3 und 8 in PBMZ durch Immunfluoreszenzfärbung

Die aus Lymphozytenkonzentrat aufgereinigten, in PBS gewaschenen PBMZ wurden in 300µl PBS resuspendiert und vorsichtig auf mit Poly-L-Lysin (50µg/ml) beschichtete Glasplättchen (Mikroskopische Deckgläser Ø 18 mm) pipettiert. Die Adhäsion der Zellen fand für 10 min auf Eis statt. Daraufhin wurden ungebundene Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Durch fünfminütige Inkubation in eiskaltem Methanol wurden die PBMZ, bei gleichzeitiger Permeabilisierung der Zellmembran, fixiert. Die Deckgläser wurden durch dreimaliges Waschen in PBS von Methanolresten befreit und über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer (PBS/0,2% BSA) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Zur Primärantikörperfärbung wurden die Glasplättchen über Nacht in einer verdunkelten, befeuchteten Kammer bei 4°C mit einem Tropfen in PBS/0,2% BSA

verdünntem Antikörper (siehe Tabelle 2.2) inkubiert. Vor der Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper wurden die Deckgläser zweimal für jeweils 10 Minuten in PBS, zweimal in PBST und wiederum zweimal in PBS gewaschen. Die Sekundärfärbung erfolgte ebenfalls in einer verdunkelten feuchten Kammer für 2 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Deckgläser für je 5 min in PBS, einmal in PBST und schließlich einmal in PBS gewaschen. Zur Ansicht der Präparate unter dem konfokalen Laserscan Mikroskop wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in einem Tropfen Glycerolpuffer/2 mM Azid (Molecular Probes, Oregon, USA) mit Nagellack versiegelt.

Primär-antikörper	Sekundär-antikörper	Herkunft	Eingesetzte Konz.	λ Absorption/ Emission (max)	Hersteller
aktive Caspase-3		Kaninchen, polyklonal	1:250		Promega
	Ziege anti Kaninchen - FITC	Ziege	1:100	488/525	Immuno Research
aktive Caspase-8 (Asp384)		Maus, monoklonal	1:50		Oncogene
	Alexa Flour 488 anti- Maus	Esel	1 :100	495/519	Molecular Probes

Tab. 2.2: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbungen.

2.10.1 DAPI-Färbung von Zellen

Im Anschluss an die oben beschriebene Färbeprozedur wurde in einigen Fällen zusätzlich eine Zellkernfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diaminido-2-Phenylindol) durchgeführt. Hierzu wurden die auf Deckgläsern fixierten und gefärbten Zellen zweimal für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde aus einer 10 mg/ml DAPI-Stocklösung in H₂O die Färbelösung (500 ng/ml in Methanol) hergestellt. Diese wurde 1:100 in PBS verdünnt. Mit einem Tropfen dieser Lösung wurden die Zellen in einer befeuchteten, dunklen Kammer für 15 min inkubiert. Darauf folgten zwei 5-minütige Waschschrte mit PBST und weitere vier Schritte mit PBS. Zur Analyse wurden die Zellen im Konfokalen Laserscan Mikroskop betrachtet.

2.11 ³[H]-Thymidin-Proliferationsassay

PBMZ bzw. hochreine T-Zellen wurden in einer Zellzahl von 1×10^5 in 200 μ l Kulturmedium pro Kavität einer 96-Loch Platte ausgesät, und entsprechend stimuliert. Zum gewünschten Messzeitpunkt wurden die Zellen mit 1 μ Ci ³[H]-Thymidin (20 μ l 10 μ Ci ³[H]-Thymidin/ml Medium) versetzt, und die Zellen wurden für weitere 18 h inkubiert. Danach wurde die Platte bis zur Messung bei -20°C gelagert. Um die eingebaute ³[H]-Thymidin-Menge zu bestimmen, wurden die aufgetauten Zellen mittels Cell Harvester (Perkin Elmer) von der Platte auf eine Filtermatte übertragen. Nach 10-minütigem Trocknen bei 90°C wurde die Filtermatte mit einem Scintillationsgel verschmolzen, welches die Detektion der β -Strahlung des ³[H]-Thymidin als Lichtenergie ermöglicht.

2.12 Messung der Cytokin-Freisetzung durch ELISA

2.12.1 IL-2 ELISA

Der hier verwendete Sandwich-Enzym-Immunoassay für die quantitative Bestimmung von humanem IL-2 (Bender Med Systems) bestand aus bereits vorgefertigten Mikrotiterplatten mit einer Beschichtung aus einem monoklonalen Antikörper gegen das Zytokin. Ein zweiter, Biotin-markierter Antikörper in Kombination mit Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) fungierte als Nachweismethode von IL-2 in den Kulturüberständen. Zur Bestimmung der IL-2-Produktion von PBMZ oder Jurkat T-Zellen wurden diese mit den entsprechenden Stimulantien inkubiert. Nach der gewünschten Stimulationsdauer (in der Regel 1-4 Tage) wurden die Überstände der Doppelansätze abgenommen und kurz zentrifugiert (16200 x g, 15 sek), um sicherzustellen, dass keine Zellen im Überstand verblieben, die einen störenden Einfluss auf die Messung haben könnten. Die Überstände wurden bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Jede Versuchsreihe enthielt eine Negativkontrolle sowie Standardwerte absteigender Konzentration zur Anfertigung einer Standardkurve. 150 μ l Kulturmedium wurde in die Kavitäten der Standards und des Leerwerts pipettiert. Die Überstände wurden verdünnt oder unverdünnt aufgetragen. Die Platte wurde abgedeckt und für 3 h auf einem Schütteltisch (200 upm) bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung des IL-2 an die Antikörper der beschichteten Kavitäten zu ermöglichen. Nun folgten 3 Waschschrte in vom Hersteller mitgeliefertem Puffer, um die nicht gebundenen Substanzen zu entfernen. Daraufhin wurde ein Peroxidase-Substrat zugegeben, welches nach Umsatz einen Farbumschlag bewirkte. Die Farbintensität war proportional zur Menge des umgesetzten Substrats, welche von der Menge des gebundenen Enzyms abhing. Diese war wiederum direkt

proportional zur Menge des gebundenen Zytokins. Nach etwa 5-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch ein vom Hersteller mitgeliefertes saures Reagenz abgestoppt und die Intensität der Farbe photometrisch bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte bei 450 nm bei einer Wellenlängenkorrektur von 570 nm im Tecan -Mikroplatten Photometer bestimmt. Mit der entsprechenden Computer-Software wurde anhand der Standardwerte eine Eichkurve erstellt, die der Auswertung der Proben diene.

2.12.2 TNF-ELISA

Die Analyse der Aktivierungs-induzierten TNF-Freisetzung von Monozyten wurde in Kooperation mit Norbert Reiling im Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Hochreine Monozyten wurden mit bakteriellen Antigenen stimuliert, die Überstände wurden nach 6 h abgenommen und bis zur Bestimmung der TNF-Freisetzung bei -20°C gelagert. Das Versuchsprotokoll ähnelte dem des IL-2-ELISAs.

2.13 Zellzyklusanalyse

Es wurden 10^6 PBMZ der gewünschten Behandlung unterzogen und nach der Inkubationszeit sedimentiert, zweimal mit eiskaltem PBS/5mM EDTA gewaschen und im Anschluss in 1 ml PBS/5mM EDTA resuspendiert. Die Zellen wurden tropfenweise unter sanftem Schütteln mit 1 ml Ethanol versetzt und durch 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur permeabilisiert und fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 600 x g, 4°C) gesammelt und in 0,5 ml PBS/5mM EDTA resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur einem RNase-Verdau (20 μl RNaseA, 1 mg/ml) unterzogen und mit 0,5 ml Färbelösung (500 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid in PBS/5 mM EDTA) eine weitere Stunde zur Interkalation des Propidiumiodids in die DNA bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Der Zellzyklusstatus der behandelten Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bei 560-640 nm bestimmt.

2.14 Messung der Caspase-3-Enzymaktivität mit Hilfe eines fluorogenen Enzymsubstrats (PhiPhiLux™G₂D₂)

Zur intrazellulären Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde ein Kit (Merck) verwendet (Caspase-3 Intracellular Activity Assay Kit II), das Protokoll wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. PhiPhiLux™ ist ein für die Caspase-3 spezifisches Peptidsubstrat, das eine Caspase-Schnittstelle enthält und an ein Fluorogen (G₂D₂) konjugiert ist. Das geschnittene Substrat fluoresziert im roten Spektralbereich ($\lambda_{\text{ex}} = 552 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$), Diese Fluoreszenz kann im Durchflusszytometer gemessen werden. In Zellkultur-Platten mit 6 Kavitäten wurden 10^6 PBMZ oder T-Zellen für 4 Tage der gewünschten Stimulation unterzogen, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und kurz abzentrifugiert (15 sek, 16100 x g, RT). Um eine spätere Substratverdünnung zu verhindern, wurde sichergestellt, dass der Überstand komplett abgesaugt wurde. Jedes Zellsediment wurde jeweils in 50 μl einer 10 μM Substratlösung und 5 μl FKS (EK: 10 %) vorsichtig gelöst. Die Katalysereaktion fand in offenen Reaktionsgefäßen im Inkubator bei 37°C für 60 min statt. Danach wurde dem Ansatz 1 μl eines 1 molaren HEPES-Puffers (pH 7,4) (EK: 20mM) zugegeben. Die Zellen wurden einmal in eiskaltem, vom Hersteller mitgelieferten Verdünnungspuffer gewaschen und nach Verwerfung des Überstandes in frischem Puffer aufgenommen. Bis zu Messung wurden die Proben kalt und dunkel gehalten. Der Substratumsatz lebender Zellen wurde durchflusszytometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm analysiert.

2.15 Bestimmung des IL-2 mRNA-Gehalts durch quantitative RT-PCR

Je 1×10^7 PBMZ wurden in 100 mm Schalen in 20 ml Kulturmedium ausgesät und für 16 h stimuliert. Danach wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei RT für 5 min bei 340 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 1 ml PBS gewaschen, kurz zentrifugiert (15 sek, RT, 16100 x g), der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 200 μl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 400 μl Lyse-/Bindepuffer wurden die Zellen lysiert. Die Probe wurde ins obere Reservoir eines Auffanggefäßes pipettiert. Die Bindung der RNA an die Säule fand für 15 min bei 37 °C statt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die RNA durch Zugabe von 500 μl Waschpuffer und 15-sekündiger Zentrifugation (8000 x g, RT) gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen, worauf zwei weitere Waschschrte (Waschpuffer II) folgten. Durch abschließende Zentrifugation bei 13000 x g wurden Reste des Waschpuffers entfernt. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 50 μl Elutionspuffer und anschließende Zentrifugation (1 min, RT, 8000 x g). Die

RNA-Konzentration der erhaltenen RNA-Lösung wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt ($A_{260\text{nm}}=1$ entspricht einer RNA-Konzentration von 33 $\mu\text{g/ml}$). Über das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ wurde zusätzlich die Reinheit der RNA bestimmt. Das Umschreiben der mRNA auf einzelsträngige cDNA erfolgte mit Hilfe der rekombinanten Reverse-Transkriptase (AMV, *avian myeloblastosis virus*) unter Verwendung eines Oligo-p(dT)₁₅ Primers. Dieser bindet komplementär an die PolyA-Enden der mRNA. Für die reverse Transkription wurde zunächst ein Gesamtansatz (Mastermix) hergestellt (Tabelle 2.3, linke Spalte). Pro Ansatz wurden 0,5 μg aufgereinigte RNA mit H₂O auf 8,2 μl Endvolumen eingestellt und mit 11,8 μl RT-Mastermix inkubiert (Hybridisierung: 25°C, 10 min; Elongation: 42°C, 60 min). Die entstandene cDNA wurde im nächsten Schritt mit Hilfe von für das IL-2-Gen spezifischen Oligonukleotiden in einer quantitativen PCR-Reaktion amplifiziert.

IL-2-Primer (Forward): 5' GTT TCA TAC AGA AGG CG (17mer)

IL-2-Primer (Reverse): 5' ATC CAC TTT AGG GAG AA (17mer)

Dem Reaktionsansatz wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green zugesetzt, der eine direkte Verfolgung der Vermehrung der IL-2 kodierenden cDNA im LightCycler ermöglichte. Zur Standardisierung wurde das Housekeeping-Gen G3PDH-2 (Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase) verwendet.

G3PDH-2-Primer (Forward): 5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC (24 mer)

G3PDH-2-Primer (Reverse) : 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT (17mer)

RT-Mastermix		PCR-Mastermix	
MgCl ₂ 25 mM	4 μl	SYBR Green	14 μl
PCR-Puffer 10 x	2 μl	ddH ₂ O	28 μl
dNTPs je 10 mM	je 1 μl	IL-2 Primer 5'-3'	7 μl
Rnase-Inhibitor (EK: 50 U)	1 μl	IL-2 Primer 3'-5'	7 μl
AMV-RT (EK:20 U)	0,8 μl	Template cDNA	2 μl
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer (1,6 μg)	2 μl		
mRNA	0,5 μg		

Tab. 2.3: Zusammensetzung der für die RT-PCR verwendeten Mastermixe

2.16 Durchflusszytometrische Analyse

Die Immunfluoreszenz ermöglicht den Nachweis zellulärer Oberflächenantigene. Mit Hilfe des Durchflusszytometers können Zellen, welche mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität analysiert werden. Die an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) werden mittels Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Da die Emissionsmaxima beider Farbstoffe in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen liegen, lassen sich beide Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig messen. Die Größe der Zellen kann mittels der Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung und die Granularität mit der Lichtstreuung in Seitwärtsrichtung erfasst werden.

Jeweils 1×10^5 Zellen wurden in einer Spitzboden-Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten abzentrifugiert und einmal mit 100 μ l kaltem Waschpuffer (PBS mit 1% BSA und 0,1% NaN_3) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern (**Tabelle 2.4**) in geeigneter Konzentration resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei direkt konjugierten Antikörpern (FITC oder PE) wurden die Zellen nach zwei weiteren Waschschritten direkt in einer 1%igen PFA (Paraformaldehyd-Lösung) aufgenommen und bis zu Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

m Ak	Isotyp	Konjugat	Firma
CD3/CD8/CD45/CD4	IgG ₁	PE	BD
CD3/CD19/CD45	IgG ₁	PE	BD
CD16/CD56/CD45	IgG ₁	PE	BD
CD3	IgG ₁	FITC	BD
CD25	IgG ₁	PE	Diatec
CD69	IgG ₁	PE	BD
CD95	IgG ₁	PE	Pharmingen
CDw 137	IgG ₁	PE	Pharmingen
HLA-DR	IgG _{2b}	PE	Diatec
Isotypkontrolle γ_1/γ_{2a}	IgG ₁ /IgG _{2 a}	PE/FITC	BD

Tab. 2.4: Zusammenstellung der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper

2.17 Gelretardationsanalyse

Mit der Gelretardationsanalyse lassen sich spezifische Protein/DNA-Interaktionen nachweisen. Protein/DNA-Komplexe besitzen aufgrund ihrer Größe gegenüber den nicht-komplexierten DNA-Sequenzen eine geringere Mobilität in nativen Polyacrylamidgelen. Zum autoradiographischen Nachweis werden radioaktiv markierte Sonden verwendet.

2.17.1 Herstellung von Kernextrakten

PBMZ wurden für 2 h der gewünschten Behandlung unterzogen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sedimentiert (660 x g, 5 min, RT). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und kurz abzentrifugiert (16200 x g, 15 sek). Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellsediment in 400 µl eiskaltem Puffer A (10mM HEPES, 10mM KCL, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1:40 Boehringer Complete) für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Lyse wurden die Zellen nach Zugabe von 25 µl einer 10%igen NP40-Lösung kräftig geschüttelt (2 min, 4°C). Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (16200 x g, 15 sek, 4°C) sedimentiert und nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes in 50 µl Puffer C (20 mM HEPES (pH7,8.), 0,4 M CaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1:40 Boehringer C) resuspendiert. Durch 30-minütiges kräftiges Schütteln bei 4°C wurden die Zellkerne lysiert und die Chromatin-assoziierten Proteine freigesetzt. Die anschließende Sedimentation des Chromatingerüsts fand durch 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16200 x g statt. Der Überstand (Kernextrakt) wurde zur Konzentrationsbestimmung und zur weiteren Bearbeitung in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.17.2 $^{32}\text{[P]}$ -Markierung des Oligonukleotids

Die Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotide erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls (Active Motif), die Oligonukleotide selbst wurden als Bestandteil des cRel Gelshift Kits mitgeliefert.

Reaktionsansatz für die $\gamma\text{-}^{32}\text{[P]}$ -Markierung der Oligonukleotide:

1	µl Oligonukleotid
5	µl $\gamma\text{-}^{32}\text{[P]}$ -ATP (10 pmol, entspricht 50 µCi)
2,5	µl 10 x T4-Kinase Puffer
1	µl T4-Kinase (10 U)
2,5	µl Spermidin (10mM)
13	µl H ₂ O

Nach 2-stündiger Inkubation dieses Gemisches bei 37°C wurde das Oligonukleotid mit Ethanol präzipitiert. Dazu wurden dem Reaktionsansatz 2,5 µl Natriumacetat (3 M) sowie 50 µl Ethanol (1005) zugegeben. Darauf folgte eine Inkubation für 30 min bei -70°C. Nach Zentrifugation (15 min, 16200 x g) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 50 µl STE-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden der markierten DNA-Lösung 2 ml einer 10 %igen Trichloressigsäure (TCA) zugegeben. Der Ansatz wurde nach kurzer Inkubationsdauer durch einen Nitrozellulose-Filter gesaugt, der das markierte Oligonukleotid zurückhält, freies γ -³²[P]-ATP dagegen nicht. Die auf dem Filter gebundene Aktivität wurde in einem γ -Szintillations-Zähler gemessen.

2.17.3 Gelretardationsansatz

Die Proben (2-4 µg Kernextrakt) wurden mit 4 µl Bindungspuffer (25mM HEPES pH=7,8, 25mM MgCl₂, 250mM KCl, 1 mM EDTA, 50% Glycerol, 25 mM DTT) versetzt. Zusätzlich wurden 2µl Poly-dI:dC beigefügt. Diese repetitiven Polymere stellen unspezifische Bindungssequenzen dar und verringern kompetitiv die Bindung von Proteinen, die nicht-selektiv an DNA binden. Nach Zugabe von 1 µl radioaktiv ³²[P]-markiertem Oligonukleotid wurden die Ansätze 20 min bei RT inkubiert, mit 4 µl Auftragspuffer (90 mM EDTA, 30% Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau) gemischt und auf ein nicht-denaturierendes (natives) 6 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,25 x TBE-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 200 V für 1,5 h statt. Zur Visualisierung der DNA-Protein-Komplexe wurde das Gel getrocknet und in einer Kassette mit Röntgenfilm und Verstärkerfolie über Nacht bei -70°C exponiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Rolle des FADD/Caspase-Signalweges bei der Proliferation von murinen Fibroblasten

Der Todesrezeptor-vermittelte FADD/Caspase-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose. Erstaunlicherweise scheint der gleiche Signalweg auch im entgegengesetzten Prozess, der Proliferation, eine bedeutende Funktion zu haben. Um die Bedeutung des FADD/Caspase-Signalweges für die Proliferation zu charakterisieren, wurden zunächst Untersuchungen an der Fibroblasten Zelllinie NIH3T3 durchgeführt, die eine dominant-negativ wirkende Form des FADD Adaptermoleküls überexprimieren. Dies führt zur Unterbrechung des Signalweges auf Rezeptorebene.

Um die Auswirkungen auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden verschiedene NIH3T3 Subklone, nämlich der Wildtyp (WT), sowie Leervektortransfizierte (pBMG Neo), als auch FADD-DN exprimierende Zellen, die für unterschiedlich lange Zeiträume in Kultur gehalten waren (FADD-DN „jung“, FADD-DN „alt“) in einer definierten Zellzahl ausgesät. Nach 1-4-tägiger Kultivierung in Medium wurde die Zellzahl bestimmt. Während NIH3T3 WT einen normalen Wachstumsverlauf zeigte, war die Teilungsrate der NIH3T3 Neo-Zellen etwas geringer (**Abb. 1**). Die Wachstumsgeschwindigkeit des FADD-DN Klons, der wenige Tage vor dem Versuch aufgetaut und in Kultur genommen wurde (FADD-DN „jung“), war im Vergleich zum Wildtyp deutlich herabgesetzt. Die bereits für mehrere Wochen in Kultur gehaltenen Zellen (FADD-DN „alt“) zeigten kein Wachstum mehr. Zusätzlich haben mikroskopische Analysen gezeigt, dass Zellen des Klons NIH3T3 FADD-DN mit zunehmender Kultivierungsdauer ein stark reduziertes Wachstum aufwiesen und schließlich (nach ca. 4 Wochen) starben (Daten nicht gezeigt).

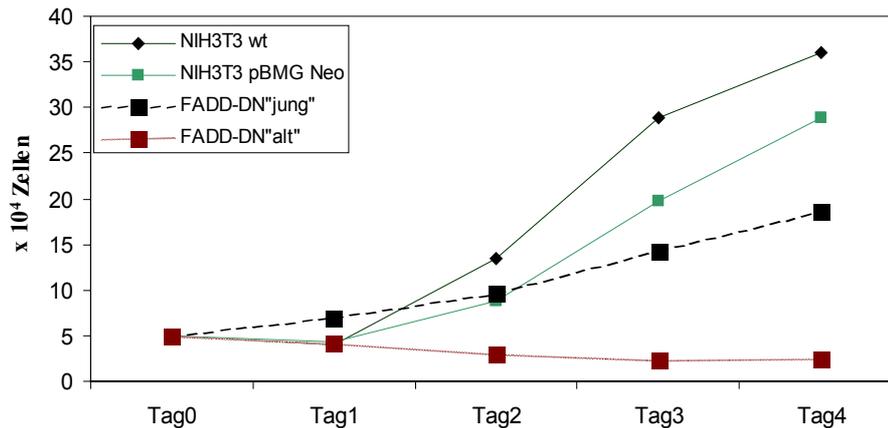


Abb. 1: FADD-DN überexprimierende NIH3T3 Fibroblasten zeigen ein langsames Wachstum als die Wildtyp-Zellen. Murine NIH3T3 Fibroblasten des Wildtyps (NIH3T3 WT), sowie mit dem Leervektor pBMG Neo transfizierte Zellen (NIH3T3 Neo), als auch solche, die eine dominant-negative FADD-Mutante überexprimieren (NIH3T3 FADD-DN), wurden in einer Zellzahl von je 5×10^4 Zellen pro 12 well Kavität ausgesät. NIH3T3 FADD-DN „jung“ wurde direkt nach dem Auftauen ausgesät. Die Zellkultur NIH3T3 FADD-DN „alt“ befand sich vor Aussaat bereits mehrere Wochen in Kultur. Nach 1-4-tägiger Kultivierung in Medium wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt.

Zhang et al. (2001) zeigten, dass eine Blockierung des FADD/Caspase-Signalweges in T-Lymphozyten mit einer Fehlregulation Zellzyklus-assoziiierter Faktoren verbunden ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das verlangsamte Wachstum des NIH3T3 FADD-DN Klons im Zusammenhang mit einer veränderten Regulation Zellzyklus-assoziiierter Proteine steht. Dazu wurden die NIH3T3 WT Zellen, sowie die Klone NIH3T3 pBMG Neo und NIH3T3 FADD-DN für 2 h in FKS-haltigem Medium gehalten, über Nacht serumfrei gesetzt und anschließend für 0-36 h mit 10% FKS-haltigem Medium stimuliert. Die Zellen wurden nach entsprechender Stimulationsdauer abgelöst und lysiert. Gleiche Mengen an Proteinlysaten wurden in Western Blots auf die Expression diverser Zellzyklusproteine untersucht.

Die Cycline A und B₁ zeigten kein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster, weder in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, noch vom NIH3T3 Subklon (**Abb. 2**). Cyclin D₁ wurde in allen drei untersuchten Klonen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer hochreguliert. Der Cdk-Inhibitor p18 wurde erwartungsgemäß entgegengesetzt zu Cyclin D₁ zeitabhängig herunterreguliert, besonders im Falle der Klone NIH3T3 Neo und NIH3T3 FADD-DN. Die Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 lagen in den FADD-DN Zellen deutlich überexprimiert vor.

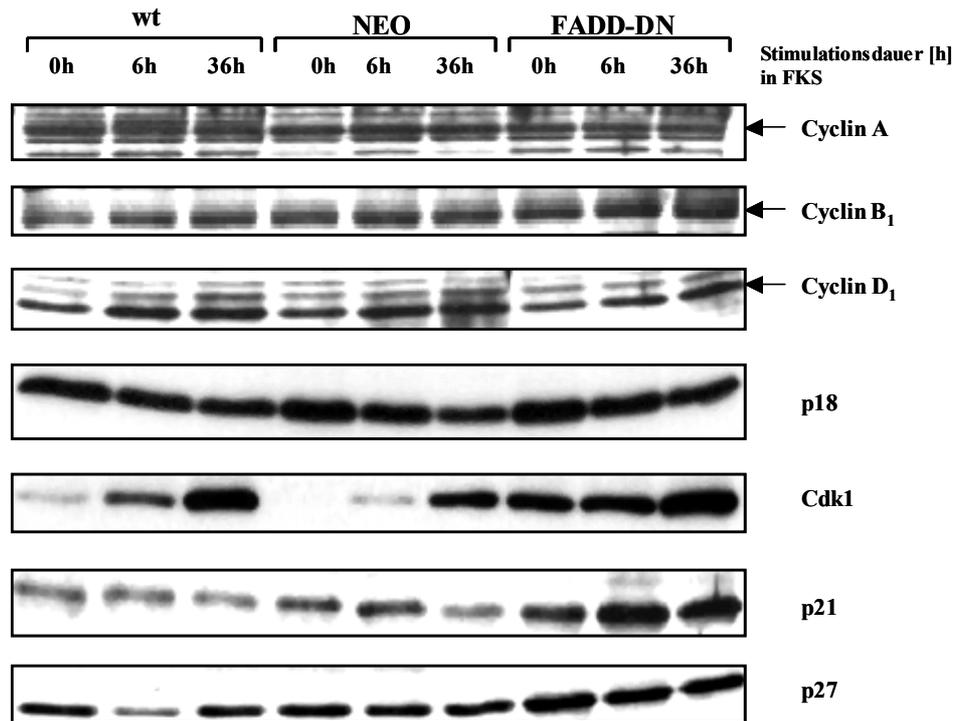


Abb. 2: In FADD-DN exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten liegen die Cdk-Inhibitoren p18, p27, sowie die Kinase Cdk1 hochreguliert vor. Murine NIH3T3 Fibroblasten des Wildtyp (NIH3T3 WT), sowie mit dem Leervektor pBMG Neo transfizierte (NIH3T3 Neo), als auch solche die eine FADD-Mutante dominant negativ überexprimieren (NIH3T3 FADD-DN), wurden für 2 h in einer Zellzahl von je 2×10^6 Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Daraufhin wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium gehalten und entsprechend der angegebenen Zeitintervalle (0-36 Stunden) mit 10 ml FKS-haltigem Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden 20 μ g Protein pro Spur in Western-Blots auf die Expression verschiedener Zellzyklusproteine analysiert (wie angegeben).

Cdk1 zeigte die deutlichste zeitabhängige Induktion. In Lysaten der unstimulierten NIH3T3 WT und NIH3T3 Neo Klone konnten nur minimale Mengen an Cdk1 detektiert werden. Nach 6- bzw. 36-stündiger Stimulationsdauer stieg die Expression stark an. Im Unterschied dazu lag Cdk1 in den FADD-defizienten Fibroblasten selbst in unstimuliertem Zustand deutlich über dem Niveau der Leervektor-Kontrolle und der des Wildtyps.

Die Überexpression von p21 war interessanterweise mit dem Phänomen der Seneszenz in Verbindung gebracht worden (Chen et al., 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch p27 in seneszenten Fibroblasten akkumuliert vorliegt (Wagner et al., 2001). Um festzustellen, ob die Verzögerung des Zellwachstums und das frühe Sterben der FADD-DN Fibroblasten in einer Seneszenz begründet ist, wurde untersucht, ob durch eine X-Gal Färbung eine vermehrte Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität nachzuweisen ist. Da dies nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt), scheint ein irreversibler G₁-Arrest nicht die Ursache für den beobachteten Zelltod zu sein.

3.2 Caspase-Inhibition bewirkt eine Blockierung der Antigen-vermittelten Proliferation von T-Zellen

3.2.1 Reinigung und Zusammensetzung von PBMZ und T-Zellen

Über die Beteiligung des FADD/Caspase-Signalweges an der Proliferation von T-Zellen gab es zunächst nur *in vitro* Daten. Im Verlauf dieser Arbeit wurden diese durch *in vivo* Daten im humanen System unterstützt (Chun et al., 2002) und gewannen dadurch an Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt der Arbeit im Weiteren auf Experimente mit T-Lymphozyten gesetzt. Zunächst wurden PBMZ aus Blutproben gesunder Spender mittels Dichtezentrifugation isoliert. Die weitere Aufreinigung von T-Lymphozyten erfolgte durch magnetische Negativ-Selektion. Dazu wurden PBMZ mit Antikörpern gegen Monozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen inkubiert und mittels magnetischer Separation von der T-Zellpopulation getrennt. Um eine Aussage über die Zusammensetzung der PBMZ-Mischkultur bzw. die Reinheit von isolierten T-Zellen treffen zu können, wurden die jeweiligen Zellpopulationen durchflusszytometrisch analysiert. Die PBMZ enthielten neben Lymphozyten vor allem Monozyten (**Abb. 3A**). Diese sind nach der Negativ-Selektion nicht mehr nachweisbar. Zudem wurde der Anteil an toten Zellen und Zelltrümmern reduziert (**Abb. 3B**).

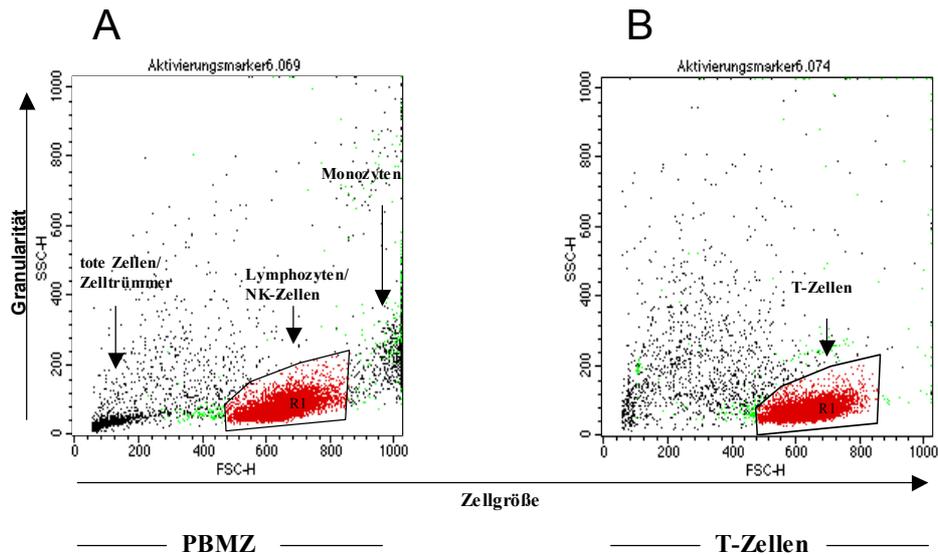


Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse von PBMC (A) und T-Zellen nach Negativ-Isolierung (B). PBMC wurden aus der Blutprobe eines gesunden Spenders durch Ficoll-Separation aufgereinigt. Diese wurden durchflusszytometrisch nach Granularität und Größe analysiert. Dies geschah vor (A) bzw. nach magnetischer Negativ-Isolierung von T-Zellen (B). Die jeweils lebende, in rot dargestellte Lymphozytenpopulation wurde durch den Bereich R_1 markiert.

Zur detaillierteren Bestimmung der Zusammensetzung wurden die Populationen vor bzw. nach Negativ-Selektion mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt (CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE, CD19-PE, CD16-PE, CD56-PE) und durchflusszytometrisch analysiert. Eine Auswertung der Dichtediagramme ergab, dass die PBMC-Mischkultur zu 71 % aus Zellen bestand, die den für T-Zellen charakteristischen CD3-Rezeptor exprimieren, wovon sich 66,4% als T-Helferzellen ($CD4^+$) und 28,7 % als zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$) typisieren ließen (**Tab. 3.1**). Der relative Anteil an B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) lag bei 13,5 bzw. 13,1 %. Nach magnetischer Negativ-Isolierung wurden T-Lymphozyten mit einer relativen Reinheit von 98% gewonnen, bei nur geringer Verunreinigung von NK- bzw. B-Zellen (0,01 bzw. 0,05%) (**Tab. 3.1**).

	PBMZ	T-Zellen
T-Zellen (CD3⁺)	71 %	98 %
CD4⁺ in CD3⁺	66,4 %	72,9 %
CD8⁺ in CD3⁺	28,7 %	25,4 %
B-Zellen	13,5 %	0,05 %
NK-Zellen	13,1 %	0,01 %

Tab. 3.1: Prozentuale Zusammensetzung von PBMZ bzw. T-Zellen nach Negativ-Isolierung. PBMZ wurden aus Blutproben gesunder Spender durch Ficoll-Separation aufgereinigt. Je 2×10^5 PBMZ bzw. durch Negativ-Isolierung gereinigte T-Zellen wurden nach Zusammenführen der Doppelansätze mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen zelltypspezifische Oberflächenantigene gefärbt (anti-CD3 für T-Zellen, anti-CD19 für B-Zellen, anti-CD16 und anti-CD56 für NK-Zellen sowie anti-CD4 und anti-CD8 zur Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen).

3.2.2 Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk verhindert die Antigen-induzierte Proliferation von T-Zellen

Literaturdaten zeigten, dass eine Inhibition der Caspaseaktivität, bei gleichzeitiger antigener Stimulation zu einer verminderten Proliferation insbesondere von T-Lymphozyten führte (Kennedy et al., 1999). Aus diesen und anderen Befunden wurde eine unerwartete Beteiligung dieser Proteasefamilie an wachstumsfördernden Prozessen abgeleitet. Der genaue molekulare Mechanismus ist bis heute jedoch weitgehend ungeklärt. In den folgenden Versuchen wurden zunächst die Auswirkungen von pharmakologischen Caspase-Inhibitoren auf die Proliferation von PBMZ und T-Zellen untersucht. Hierzu wurden frisch isolierte PBMZ bzw. gereinigte T-Zellen für 4 Tage mit immobilisiertem anti-CD3 mAk stimuliert. Gereinigte T-Zellen wurden mit anti-CD28 kostimuliert. Dies geschah in An- oder Abwesenheit des Breitband Caspase-Inhibitors zVAD.fmk, der direkt vor der Aussaat der Zellsuspension zugegeben wurde. Danach wurden die Zellen über Nacht mit $^3\text{[H]}$ -Thymidin inkubiert und der Einbau in die DNA im β -Zähler gemessen. Der anti-CD3 mAk bindet spezifisch an die ϵ -Untereinheit des CD3-TZR-Komplexes, welche für die Weiterleitung des Aktivierungssignals verantwortlich ist und Signalkaskaden aktiviert, die zur Proliferation führen. Der durch den anti-CD3 mAk induzierte $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbau ging mit einer im Mikroskop sichtbaren blastischen Transformation einher (Daten nicht gezeigt). In Vorversuchen wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der zVAD.fmk Zugabe einen Einfluss auf das Ergebnis hatte. Dazu wurde

zVAD.fmk 30 min vor bzw. nach Aussaat der Zellsuspension gegeben. Da dies keinen Unterschied bezüglich der Proliferationsinhibition ausmachte (Daten nicht gezeigt), wurde der Inhibitor in den folgenden Versuchen direkt vor der Aussaat der Zellsuspension zugegeben.

Die Kostimulation mit zVAD.fmk resultierte in einer deutlichen Inhibition des $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus (**Abb. 4A**). Der Wert lag dabei unter dem der unstimulierten Kontrolle. Ohne gleichzeitige antigene Stimulation verhinderte zVAD.fmk die Basisproliferation der Zellen.

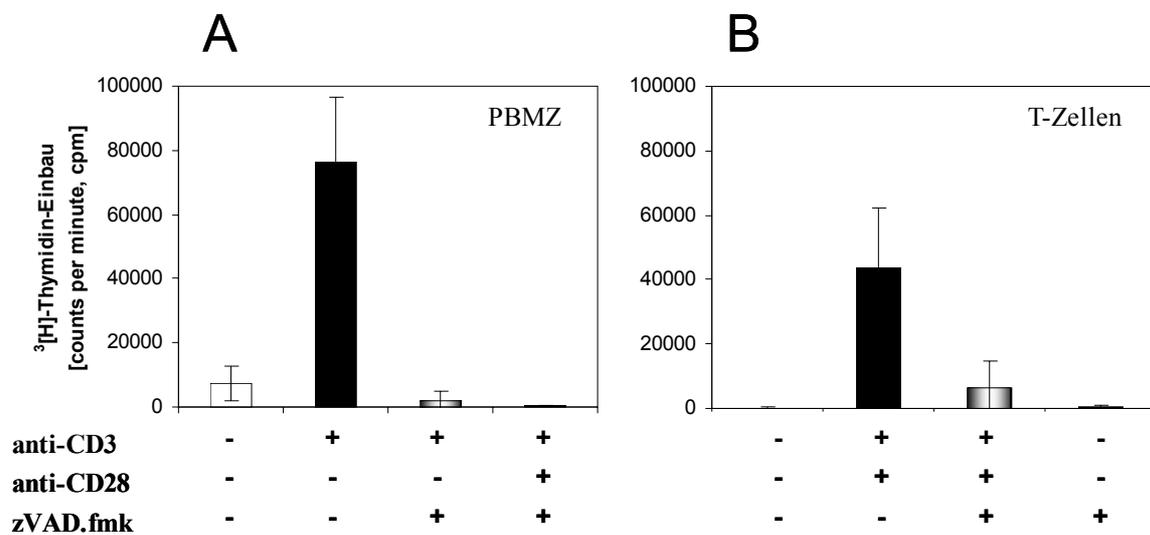


Abb. 4: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk blockiert die anti-CD3-induzierte Proliferation von PBMZ und T-Zellen. PBMZ (A) bzw. T-Zellen (B) wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Dreifachansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität für 4 Tage mit Medium oder immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 $\mu\text{g/ml}$) mit oder ohne 100 μM zVAD.fmk stimuliert. T-Zellen wurden zusätzlich mit immobilisiertem anti-CD28 mAk (2 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. 18 h nach Zugabe von 1 μCi $^3\text{[H]}$ -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Um eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch kostimulatorische Zellen auszuschließen, wurde der Versuch mit gereinigten T-Lymphozyten reproduziert. Die starke Proliferation von PBMZ durch alleinige anti-CD3 Stimulation ist abhängig von Antigen präsentierenden Zellen (APZ), die über B7-Moleküle (wie CD80, CD86) eine kostimulatorische Wirkung vermitteln. Das Fehlen dieser Kostimulation führt zu einer unvollständigen Aktivierung von T-Zellen, was sich funktional in der Anergie äußert und *in vitro* als reduzierte Proliferation nachweisbar ist. Während der magnetischen Negativisolierung werden diese kostimulatorischen Zellen eliminiert. Die verbleibenden T-Zellen wurden daher zusätzlich mit einem plastikgebundenen anti-CD28 mAk inkubiert. Der daraus resultierende $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbau erwies sich im Vergleich zu den PBMZ als etwas schwächer (**Abb. 4B**). Der durch zVAD.fmk vermittelte Proliferationsblock war in T-Zellen ebenfalls etwas schwächer ausgeprägt als in PBMZ, aber dennoch deutlich. Eine weitere Beobachtung konnte für unstimulierte Zellen gemacht werden. Während in Medium kultivierte PBMZ eine gewisse Basisproliferation zeigten, war diese in T-Zellen nicht zu beobachten.

Im direkten Vergleich zwischen PBMZ verschiedener Spender stellte sich heraus, dass sowohl die anti-CD3-induzierte Proliferationsintensität, als auch der Grad der zVAD.fmk vermittelten Inhibition, nur geringfügigen donorspezifischen Schwankungen unterliegen (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Dosisabhängige Proliferationsinhibition durch Caspase-Inhibitoren

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss steigender zVAD.fmk Dosierungen auf die Proliferation von T-Zellen untersucht werden. Dazu wurden aus Spenderblut isolierte PBMZ für 4 Tage mit anti-CD3/CD28 mAk behandelt. Diese wurden wie angegeben mit steigenden Konzentrationen an zVAD.fmk oder zur Kontrolle mit reinem Ethanol, dem Lösungsmittel für zVAD.fmk stimuliert. Nach 4 Tagen wurde der $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbau im β -Zähler gemessen. Während zVAD.fmk Konzentrationen von 10-20 μM kaum einen negativen Einfluss auf die anti-CD3 induzierte Proliferation zeigten, war der Effekt bei 40 μM bereits signifikant (**Abb. 5**). zVAD.fmk Konzentrationen von 60-100 μM bewirkten eine komplette Inhibition des $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbaus. Für spätere Versuche wurde hauptsächlich 100 μM eingesetzt, da dies eine in der Literatur übliche Konzentration (Clayton et al., 1997; Alam et al., 1999) darstellt. Einige Versuche wurden zur Absicherung jedoch auch mit 50 μM zVAD.fmk reproduziert.

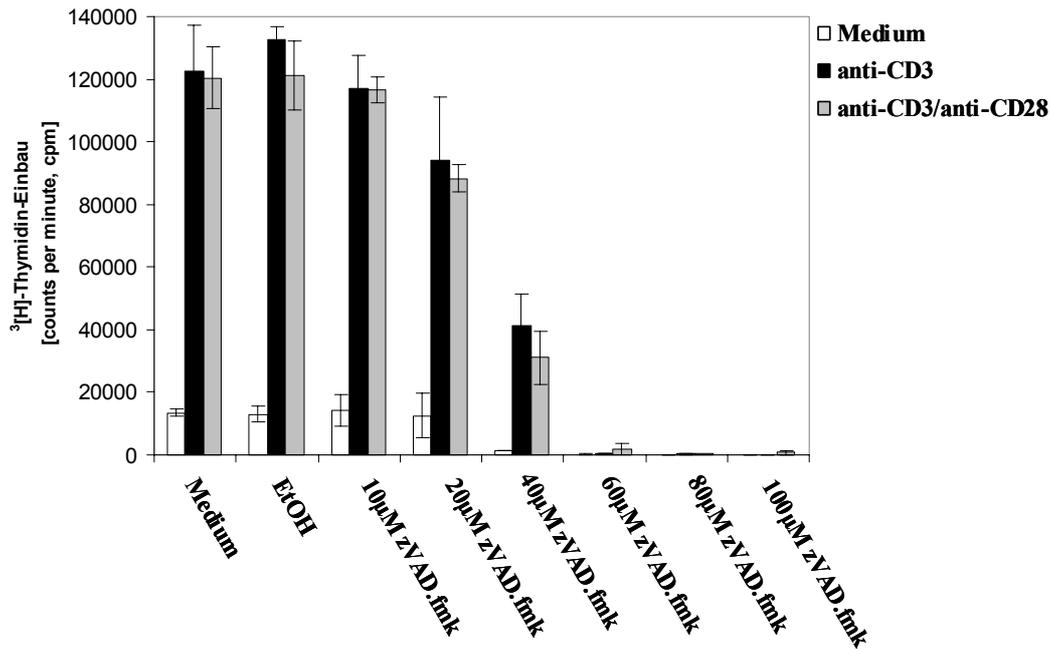


Abb. 5: zVAD.fmk inhibiert die anti-CD3 vermittelte Proliferation von T-Zellen dosisabhängig. PBMZ wurden, wie in Abb.4 beschrieben, für 4 Tage mit immobilisierten Antikörpern und verschiedenen Konzentrationen an zVAD.fmk (10-100µM) stimuliert. 18h nach Zugabe von 1µCi ^3H -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

CD28 gilt als wichtigstes kostimulatorisches Rezeptormolekül auf T-Zellen. Dessen Ligation ist wichtig für eine starke und vollständige Aktivierung. Eine Kostimulation der Zellen mit immobilisiertem anti-CD28 mAk resultierte nicht in einer Aufhebung der Proliferationsinhibition (**Abb. 5** graue Balken). Ethanol fungierte als Lösungsmittel für zVAD.fmk und beeinflusste das Zellwachstum nicht negativ, selbst dann nicht, wenn es in fünffach höheren Konzentrationen eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Datenlage in der Literatur ist eine Involvierung des FADD/Caspase-8/Caspase-3 Signalweges an der Antigen-induzierten T-Zellproliferation wahrscheinlich. Hingegen scheinen andere Caspasen wie Caspase-9 nicht an proliferativen Ereignissen beteiligt zu sein. zVAD.fmk fungiert aufgrund seiner Struktur als Pseudosubstrat für sämtliche Caspasen. Es wirkt daher als Substratfalle und inhibiert die Caspasen irreversibel. Deshalb lassen Versuche mit Breitspektrum-inhibitoren nicht ohne weiteres auf die Beteiligung bestimmter Caspasen schließen, genauso wenig lässt sich eine Beteiligung einzelner Caspasen ausschließen. Daher

wurde im folgenden Versuch ein selektiver Caspase-8-Inhibitor verwendet, um genauere Aussagen treffen zu können. zIETD.fmk ist ein pharmakologischer Caspase-Inhibitor, der aufgrund seiner Struktur spezifisch an das aktive Zentrum der Initiator-Caspase-8 bindet und dieses blockiert. Um die Auswirkungen einer spezifischen Caspase-8-Inhibition zu analysieren, wurden PBMZ für 4 Tage mit anti-CD3 mAk und gleichzeitig mit steigenden Konzentrationen an zIETD.fmk stimuliert. Aus **Abb. 6** geht hervor, dass die anti-CD3-vermittelte Proliferation von T-Zellen durch 10 μ M zIETD.fmk mäßig und ab 30 μ M stark reduziert wurde (graue Balken), während die gleiche Konzentration an DMSO als Lösungsmittel keinen Effekt zeigte.

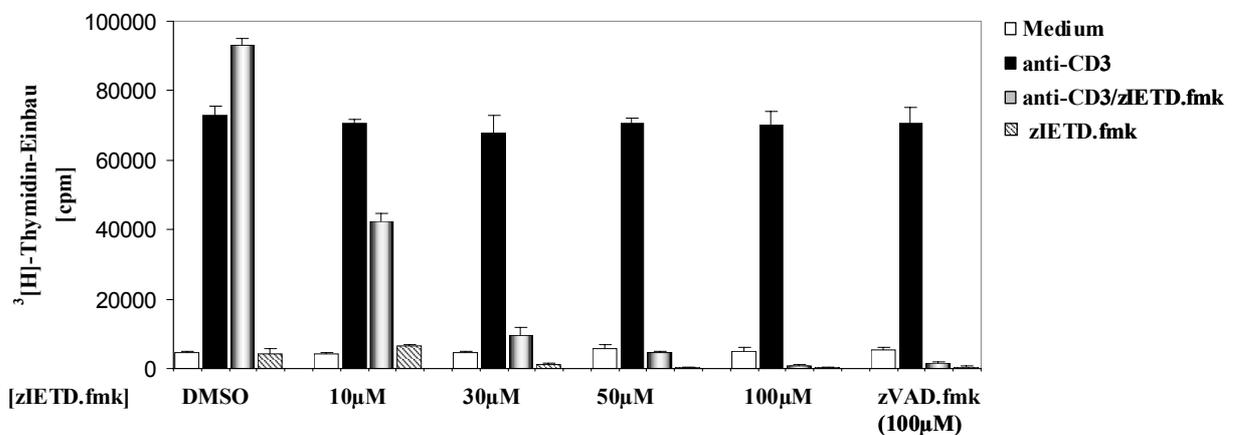


Abb. 6: zIETD.fmk inhibiert die anti-CD3 vermittelte Proliferation von PBMZ dosisabhängig. PBMZ wurden, wie in Abb. 4 beschrieben, für 4 Tage mit immobilisiertem anti-CD3 mAk stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen an zIETD.fmk kostimuliert. 18h nach Zugabe von 1 μ Ci ³[H]-Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Im Vergleich zu zVAD.fmk hatte zIETD.fmk bereits in einer Konzentration von lediglich 10 μ M einen deutlichen inhibitorischen Effekt.

Boissonnas et al. (2002) zeigten, dass die Aktivierung von Caspasen nur bei der Proliferation als Reaktion auf starke antigene Stimuli beschränkt war. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde eine anti-CD3-Titration durchgeführt. Die durch niedrige Konzentrationen an anti-CD3 mAk induzierte Proliferation sollte obiger Hypothese nach nicht durch zVAD.fmk inhibiert werden. Dies war jedoch nicht der Fall. Unabhängig von der anti-CD3 mAk-Konzentration, die von 10^{-5} -20 $\mu\text{g/ml}$ variierte, hatte Caspase-Inhibition einen deutlichen inhibitorischen Einfluss auf die $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Inkorporation (**Abb. 7**).

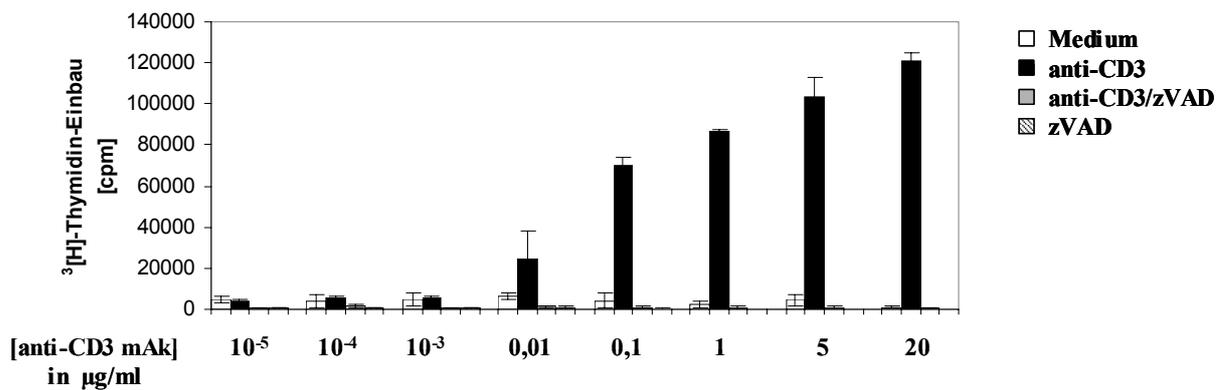


Abb. 7: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk geschieht unabhängig von der Konzentration an anti-CD3 mAk. PBMZ wurden, wie in Abb. 4 beschrieben, in Zellkulturplatten mit Medium oder immobilisiertem anti-CD3 Antikörper der angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit $100\mu\text{M}$ zVAD.fmk kostimuliert oder unbehandelt gelassen. 18h nach Zugabe von $1\mu\text{Ci}$ $^3\text{[H]}$ -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.2.4 Das Caspasesubstrat zVAD.amc hat keinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von T-Zellen

Das Molekül zVAD.amc ist ein fluorogenes Caspasesubstrat, das wie zVAD.fmk ein Peptid aus Valin, Alanin und Asparaginsäure darstellt. Ihm fehlt jedoch das Fluoratom, das zur irreversiblen Bindung an das aktive Zentrum der Caspasen verantwortlich ist. Es sollte zur Kontrolle untersucht werden, ob zVAD.amc eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen hatte. Frisch isolierte PBMZ wurden für 4 Tage mit Plastik-gebundenem anti-CD3 mAk inkubiert und zusätzlich, wie angegeben, mit zVAD.fmk bzw. zVAD.amc kostimuliert oder unbehandelt gelassen. Dabei hatte zVAD.fmk wie erwartet einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf den anti-CD3 induzierten Einbau von $^3\text{[H]}$ -Thymidin (**Abb. 8**).

zVAD.amc hatte dagegen weder einen negativen Einfluss auf die anti-CD3 mAk induzierte noch auf die Basisproliferation.

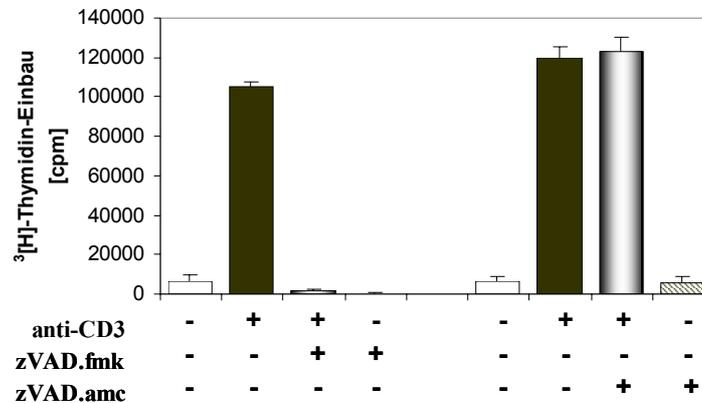


Abb. 8: zVAD.amc übt keinen inhibitorischen Effekt auf die T-Zellproliferation aus. PBMZ wurden, wie in Abb. 4 angegeben für 4 Tage in Medium gehalten oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit oder ohne 100 μM zVAD.fmk bzw. 100 μM zVAD.amc versetzt. 18 h nach Zugabe von 1 μCi $^3\text{[H]}$ -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.2.5 Caspase-Inhibition blockiert die Mitogen-induzierte Proliferation von PBMZ

Mitogene wie PMA/Ionomycin oder PHA sind ebenfalls potente Induktoren der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten. PMA aktiviert die Protein Kinase C θ (PKC θ) und simuliert damit die Wirkung von Diacylglycerol als Bestandteil von Glycolipid-angereicherte Mikrodomänen in der Plasmamembran. In Kombination mit Ionomycin, einem Calciumionophor, führt PMA zur Aktivierung der Zellen unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors. PHA, ein Lektin aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), bindet an glykosylierte Membranbestandteile und führt ebenfalls zur blastischen Transformation, zur Teilung und zum Wachstum von T-Lymphozyten.

Um zu untersuchen, ob die durch PMA/Ionomycin bzw. PHA hervorgerufene Proliferation ebenfalls durch Caspase-Inhibition blockiert wird, wurden frisch isolierte PBMZ mit den entsprechenden Mitogenen oder mit anti-CD3 mAk stimuliert. Dies geschah in An- oder Abwesenheit des Caspase-Inhibitors zVAD.fmk. Nach 4 Tagen wurde den Zellen 1 μCi $^3\text{[H]}$ -Thymidin zugegeben, dessen Einbau 18 h später im β -Zähler gemessen wurde. Sowohl PHA, als auch PMA/Ionomycin induzierten eine starke Proliferation, die im Fall von PHA etwas

schwächer ausfiel (**Abb. 9**). Kostimulation mit zVAD.fmk resultierte in jedem Fall in einer drastischen Inhibition.

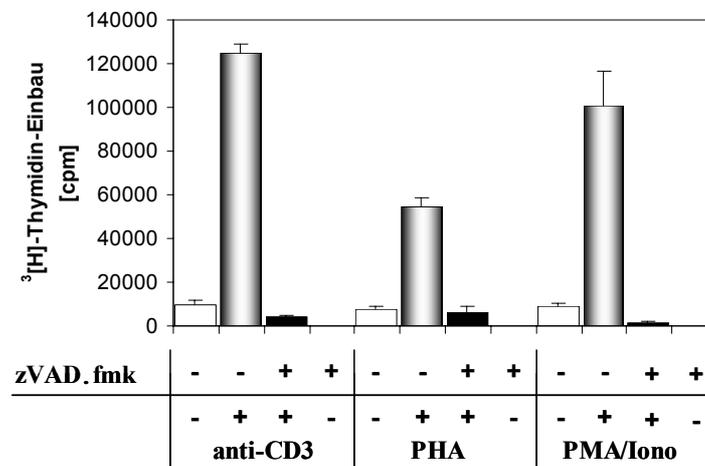


Abb. 9: zVAD.fmk inhibiert die Mitogen-vermittelte Proliferation. PBMZ wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Dreifachansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität für 4 Tage mit Medium, immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PHA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder PMA (10 ng/ml)/Ionomycin (500 ng/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit oder ohne 100 μM zVAD.fmk versetzt. 18h nach Zugabe von 1 μCi ^3H -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.2.6 Caspase-Inhibition blockiert die PPD-induzierte Proliferation von T-Zellen

Die bisher verwendeten Stimulantien (anti-CD3 mAk, PHA, PMA/Ionomycin) induzieren antigen-unabhängig polyklonale T-Zellaktivierung. Im Folgenden wurde ein physiologischerer und damit relevanterer Ansatz verfolgt. Hierzu wurde als Stimulus das Toxin PPD (purified protein derivative; Tuberkulin) aus *Mycobacterium tuberculosis* verwendet. PPD wurde PBMZ eines Spenders präsentiert, der eine positive Reaktion auf im Tuberkulin-Hauttest zeigte. Die durch PPD hervorgerufene Proliferation fiel im Vergleich zu den anderen Stimuli nach 4 Tagen schwächer aus, da nur in PPD-spezifischen Gedächtniszellen eine Antwort hervorgerufen wird. Doch auch in diesem Fall, der einer natürlichen Immunreaktion auf eine Antigenpräsentation näher kommt, bewirkte die Inhibition der Caspaseaktivität ein vollständiges Ausbleiben der T-Zell Proliferation (**Abb. 10**).

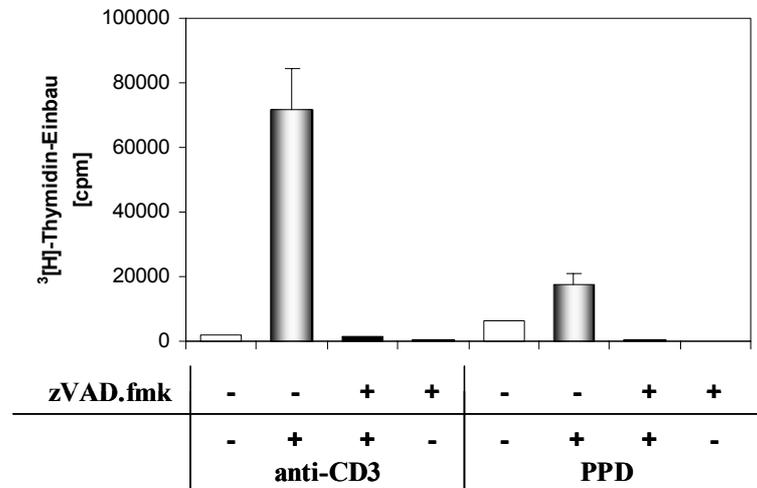


Abb. 10: zVAD.fmk inhibiert die PPD-vermittelte Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen. PBMZ wurden, wie in Abb. 4 beschrieben, in Zellkulturplatten ausgesät und für 4 Tage mit Medium, immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 µg/ml), oder mit PPD (10µg/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit oder ohne 100µM zVAD.fmk versetzt. 18h nach Zugabe von 1µCi ³[H]-Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β-Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.2.7 Caspase-Inhibition führt zu einem Arrest des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase

Die beobachteten Proliferationsdefekte nach Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk deutete auf eine mögliche Verbindung dieser Proteasen mit dem Zellzyklus hin. Durch eine Propidiumiodid-Färbung entsprechend stimulierter PBMZ wurden daher die Auswirkungen der Caspase-Inhibition auf den Verlauf des Zellzyklus untersucht. Nach 4-tägiger Stimulation mit anti-CD3 mAk wurden die Zellen gesammelt, mit Ethanol permeabilisiert und fixiert, sowie mit einer Propidiumiodidlösung gefärbt. Dabei zeigte sich nach durchflusszytometrischer Analyse die typische Verteilung proliferierender Zellen, mit 66,5 % der Zellen in der G₁/G₀ -, 21,7 % in der S- sowie 11,4 % in der G₂/M- Phase (**Abb. 11**). Aufgrund der durch zVAD.fmk-vermittelten Caspase-Inhibition wurden die PBMZ in der G₁/G₀ -Phase (98,8 % der Zellen) arretiert. Es waren praktisch keine Zellen in der S- oder G₂/M- Phase detektierbar. Darüberhinaus waren kaum hypodiploide, apoptotische Zellen nachweisbar (0,1 %). Dieser Befund sprach gegen eine allgemeine zytotoxische Wirkung von zVAD.fmk auf diese Zellen. Die nach Caspase-Inhibition beobachtete Phasenverteilung

ähnelte der von unstimulierten Zellen, mit 99,4 % in G₁/G₀ und kaum verbleibenden Zellen in den übrigen Zellzyklusstadien.

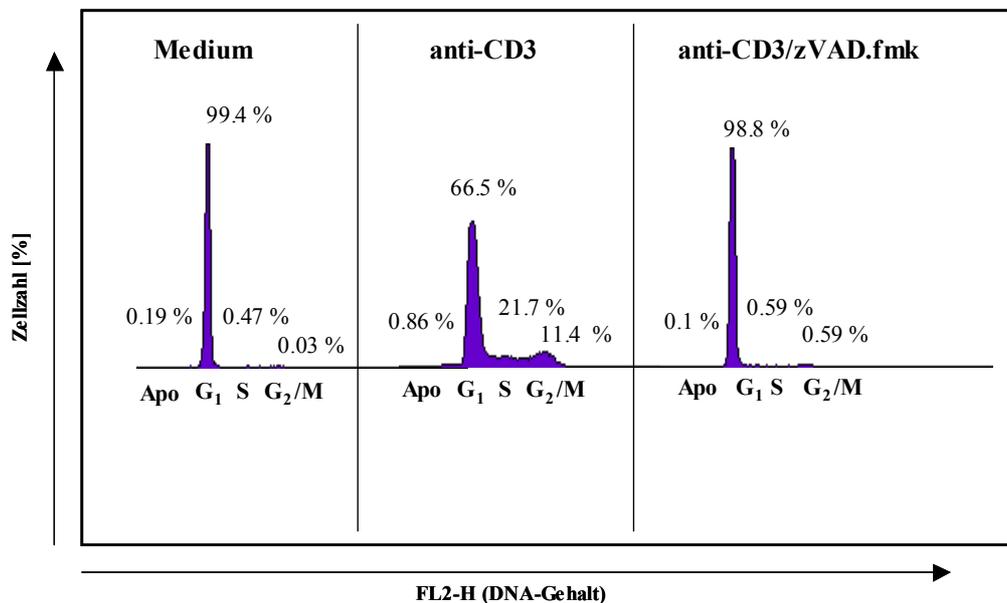


Abb. 11: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk führt zu einem Arrest der PBMZ in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus. PBMZ wurden in 10 mm Zellkulturschalen zu je 5×10^6 Zellen für 4 Tage mit Medium oder immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$) mit und ohne 100 μM zVAD.fmk stimuliert. Nach einer Färbung mit Propidiumiodid (PI) wurde die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Diese Resultate gaben Anlass zur genaueren Untersuchung Zellzyklus-regulierender Faktoren.

3.2.8 Caspase-Inhibition verhindert die adäquate Regulation verschiedener Zellzyklusproteine

Als nächstes wurde die Expression verschiedener Zellzyklus-assoziiierter Proteine in Western Blots untersucht. Erneut diente anti-CD3 mAk als Stimulus und zVAD.fmk als Caspase-Inhibitor. Nach 4 Tagen wurden die Zellen lysiert und gleiche Mengen an Protein elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Verwendung entsprechender Antikörper wurde die Expression verschiedener Zellzyklus-Proteine in Western Blots analysiert. Cdk1 lag nach anti-CD3 Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erwartungsgemäß hochreguliert vor (**Abb. 12**). Caspase-Inhibition verhinderte jegliche Cdk1 Expression. Auch

die Cdk2-Hochregulation wurde durch zVAD.fmk blockiert. Die Niveaus an Cdk4 und Cdk6 wurden, wenn überhaupt, durch zVAD.fmk nur schwach reduziert. Kostimulation mit zVAD.fmk wirkte sich deutlicher auf die Hochregulation der Cycline A, B₁, D₂ und D₃ aus. Das Retinoblastomprotein (RB-Protein) wird durch Phosphorylierung reguliert und kontrolliert den Phasenübergang von G₁ zu S. Sowohl das RB-Protein selbst, als auch sein Phosphorylierungsstatus an 3 verschiedenen Serinresten (780, 795, 807/811) lagen in proliferierenden Zellen erwartungsgemäß deutlich erhöht vor. Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk reduzierte diese Hochregulation signifikant, aber nicht bis auf das Basisniveau der unstimulierten Kontrolle. Der zelluläre Cdk-Inhibitor p27 übt eine inhibitorische Funktion auf den Zellzyklus aus. Folgerichtig lag p27 in proliferierenden Zellen niedriger exprimiert vor als in unstimulierten, ruhenden Zellen. zVAD.fmk verhinderte diese anti-CD3 induzierte Abnahme (**Abb. 12**).

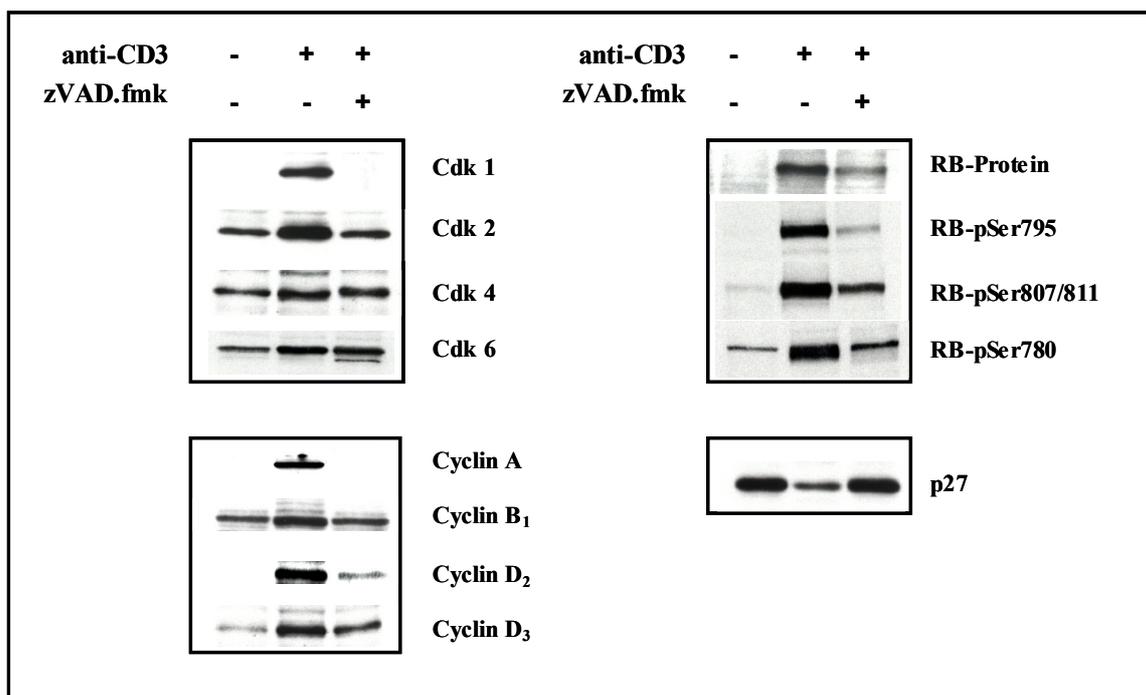


Abb. 12: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk führt zur Fehlregulation einer Vielzahl von Zellzyklusproteinen in PBMZ. Gereinigte PBMZ wurden in 100 mm Zellkulturschalen zu je 5×10^6 Zellen für 4 Tage mit Medium oder immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$) mit oder ohne 100 μM zVAD.fmk stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, und je 20 μg Protein wurden wie angegeben auf die Expression unterschiedlicher Zellzyklus-assoziiierter Proteine im Western Blot analysiert. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Um Verfälschungen der Ergebnisse durch potentielle Wechselwirkungen mit anderen Zellpopulationen in der PBMZ Mischkultur auszuschließen, wurden die Versuche auch in diesem Fall in gereinigten T-Zellen wiederholt. Auch hier zeigte sich durch Caspase-

Inhibition eine Fehlregulation von Cdk1,2,6 sowie Cyclin A, des RB-Proteins und p27 (**Abb. 13**). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk nach 4 Tagen zu einer Fehlregulation praktisch aller untersuchter Zellzyklusproteine führt.

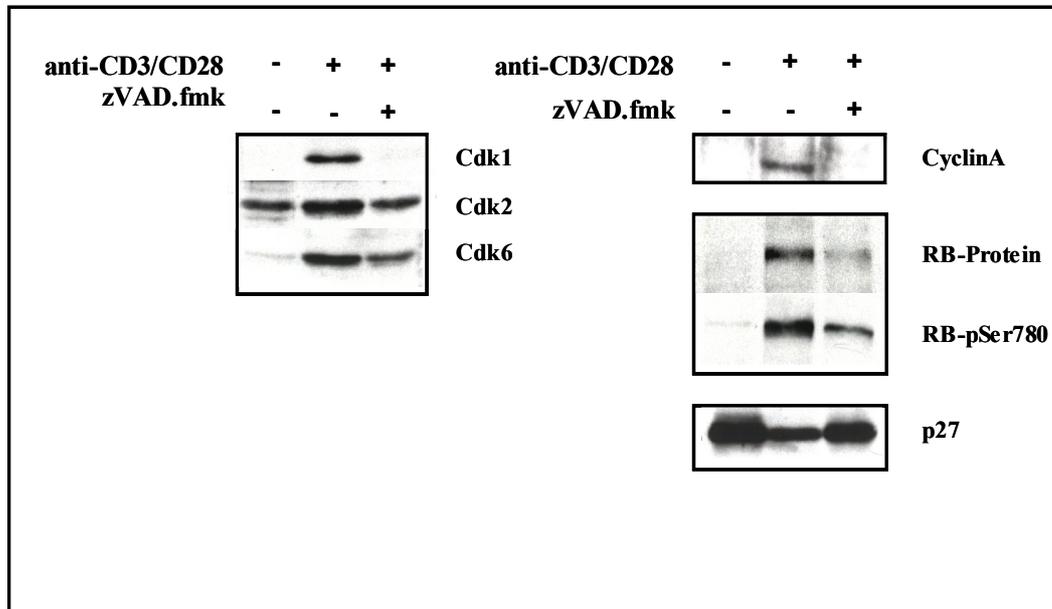


Abb. 13: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk führt zu einer Fehlregulation einer Vielzahl von Zellzyklusproteinen in T-Zellen. Aus PBMZ wurden per Negativ-Selektion T-Zellen angereichert. Diese wurden in 100 mm Zellkulturschalen zu je 5×10^6 Zellen für 4 Tage mit Medium oder immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$) und immobilisiertem anti-CD28 Antikörper (2 $\mu\text{g/ml}$) mit und ohne 100 μM zVAD.fmk stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und je 20 μg Protein wurden wie angegeben auf die Expression unterschiedlicher Zellzyklus-assoziiierter Proteine im Western Blot analysiert. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Zur näheren Untersuchung möglicher zeitlicher Zusammenhänge, wurde die Auswirkung der Caspase-Inhibition über einen Zeitraum von 1-4 Tagen untersucht (**Abb. 14**). Dabei zeigte sich, dass nach Tag 1 hinsichtlich der Expression kaum ein Unterschied bestand zwischen unstimulierten, anti-CD3-stimulierten und zVAD.fmk kostimulierten Zellen. Nach 2 Tagen erschien jedoch die Cdk1 Bande in proliferierenden PBMZ, zur selben Zeit begann die p27 Bande abzunehmen (**Abb. 14**). Beide Prozesse manifestierten sich nach 3-4 Tagen und wurden bei gleichzeitiger zVAD.fmk- Applikation verhindert. Ein analoger Zusammenhang ergab sich für die Expression von CyclinA, Cdk6 und das RB-Protein, deren aktivierungsinduzierte Hochregulation nach zwei Tagen begann und ebenfalls durch Caspase-Inhibition verhindert wurde. Diese Ergebnisse legten nahe, dass der funktionale Beitrag von Caspasen zur Zellproliferation relativ früh zu suchen ist, nämlich vor Tag 2 nach antigener Aktivierung.

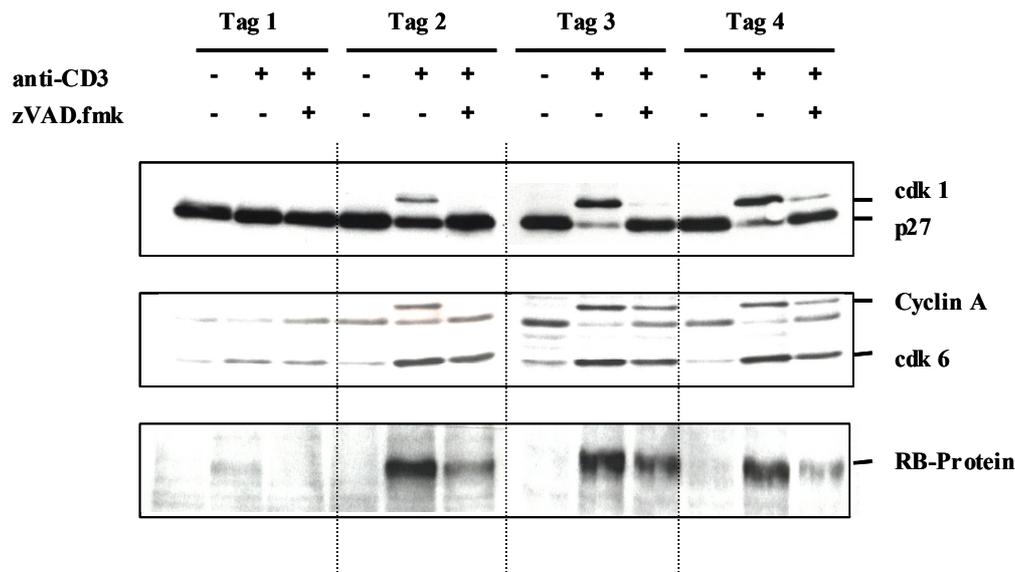


Abb. 14: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk verhindert die anti-CD3-induzierte Hochregulation von Zellzyklus-Proteinen, sowie die Herunterregulation des Cdk-Inhibitors p27 bereits nach zwei Tagen. PBMZ wurden in 100 mm Zellkulturschalen zu je 5×10^6 Zellen 1-4 Tage mit Medium oder immobilisiertem anti-CD3 Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$) mit und ohne 100 μM zVAD.fmk stimuliert. Nach Herstellung von TNE-Lysaten wurde die Expression verschiedener Zellzyklusproteine durch Western Blot-Analyse detektiert. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.2.9 Auswirkungen der Caspase-Inhibition auf die Tyrosin-Phosphorylierung

Nach Ligation des T-Zell-Rezeptorkomplexes wird eine schnelle und transiente Tyrosin-Phosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine induziert. Daran sind vor allem zytosolische Tyrosinkinasen der Src-Familie wie p56^{lck} und p59^{Fyn} beteiligt. Um zu untersuchen, ob Caspasen an diesen frühen Signalprozessen beteiligt sind, wurden PBMZ für kurze Zeitintervalle (30 sek. bis 30 min) mit löslichem anti-CD3 mAk stimuliert und, wenn angegeben, mit zVAD.fmk kostimuliert. Die Zellen wurden daraufhin lysiert und gleiche Mengen an Protein wurden nach Auftrennung im Proteingel mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper im Western Blot analysiert. Nach 3- minütiger Stimulation mit anti-CD3 mAk wurde die charakteristische Tyrosinphosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen sichtbar (**Abb. 15**).

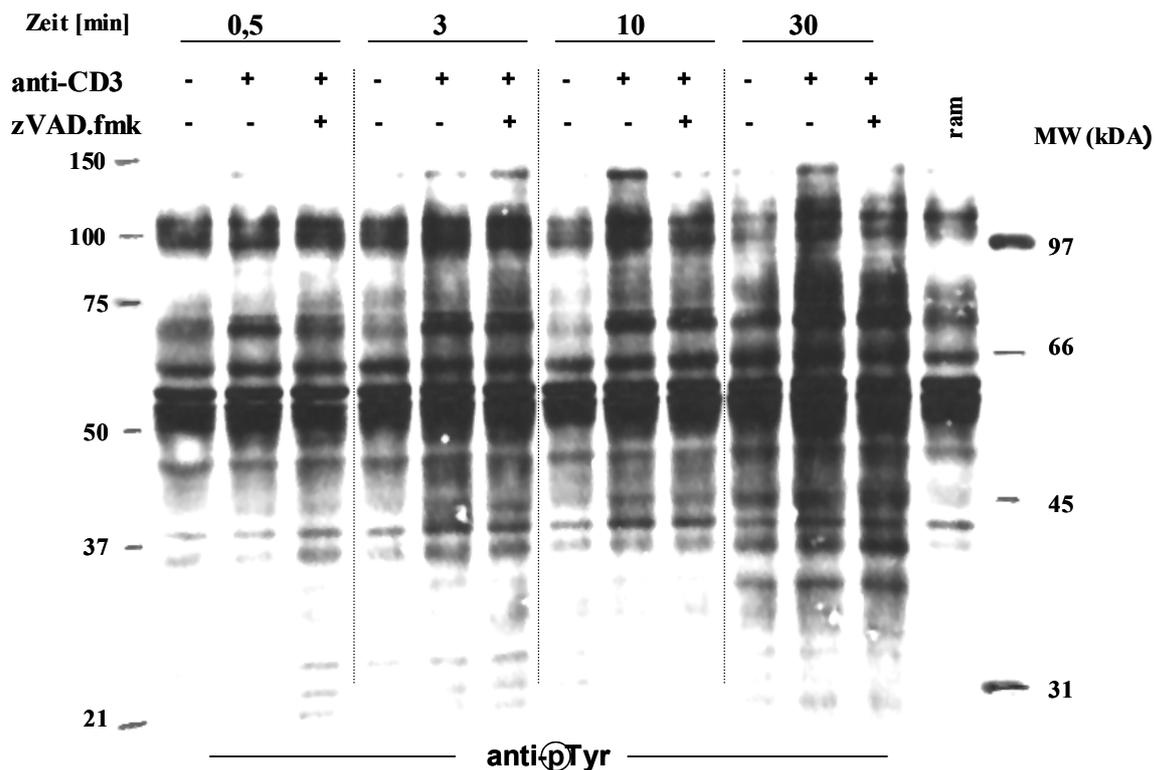


Abb. 15: zVAD.fmk- Kostimulation verhindert die Phosphorylierung einer ca. 150 kDa-Bande, aber nicht das allgemeine Muster der Tyrosin-Phosphorylierung. Gereinigte PBMZ wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen für 30 sek bis 30 min mit Medium oder löslichem anti-CD3 mAk (10 µg/ml) in Anwesenheit oder in Abwesenheit von 100µM zVAD.fmk inkubiert. Der lösliche anti-CD3 mAk wurde mit einem Kaninchen-anti-Maus Antiserum (ram) (1 µg/ml) kreuzvernetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen eines Ansatzes nur mit ram stimuliert. Die Totallysate wurden mit einem anti-Phospho-Tyrosin Antikörper auf entsprechend phosphorylierte Proteine analysiert. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Dieses Bandenmuster veränderte sich nicht grundsätzlich durch zusätzliche Stimulation mit zVAD.fmk. Eine Ausnahme bildete ein Protein von ca. 150 kDa. Nach 10- bzw. 30-minütiger Kostimulation mit zVAD.fmk war die Abnahme dieser Bande sichtbar. Mit Ausnahme des 150 kDa Proteins schienen die frühen Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen jedoch Caspase-unabhängig zu sein.

3.2.10 Caspase-Inhibition reduziert die Degradation von I κ B- α , aber nicht die Phosphorylierung von Akt oder Erk1/2

Die bisherigen Resultate sprechen für die Beteiligung einer oder mehrerer Caspasen an Signalen, die zur Proliferation führen. Diese Beteiligung scheint zeitlich zwischen 30 min und 2 Tagen eingrenzbar zu sein. Um diesen Aspekt genauer zu analysieren, wurden potentielle Auswirkungen der Caspase-Inhibition auf weitere frühe Signalwege untersucht, die zeitlich den Tyrosinphosphorylierungen folgen. Akt liegt im Signalweg unterhalb der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) und übt durch Phosphorylierung des Proteins Bad eine anti-apoptotische Funktion aus (Mitsiades et al., 2004). Darüberhinaus vermittelt Akt durch die Aktivierung des NF κ B-Signalweges das Überleben der Zelle (Lee et al., 2000) und ist über die Phosphoinositol-3 Kinase (PI-3 Kinase) an der Proliferation von T-Zellen beteiligt (Kane and Weiss, 2003). Die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 wird ebenfalls durch transiente Phosphorylierung an Threonin oder Tyrosinresten durch vorgeschaltete Kinasen reguliert. Aktive Erk-Dimere phosphorylieren nukleäre Transkriptionsfaktoren, die über Genexpression Proliferation auslösen. Während die Aktivierung und Translokation von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NFAT durch direkte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert wird, beruht der Mechanismus der NF κ B-Aktivierung auf der Phosphorylierung und der anschließenden Degradation eines Inhibitor Moleküls der I κ B-Familie. Als indirektes Maß für die NF κ B-Aktivität kann demnach die Menge des zellulären Inhibitors I κ B- α herangezogen werden.

Im folgenden Experiment sollte die Auswirkung der zVAD.fmk-Kostimulation auf diese Signalwege untersucht werden. Dazu wurden PBMZ wie zuvor mit kreuzvernetztem anti-CD3 mAk in An- oder Abwesenheit von zVAD.fmk für 30 bis 240 min stimuliert. Gleiche Konzentrationen an Proteinlysate wurden in Western Blots auf die Phosphorylierung von Akt, und Erk1/2 bzw. auf die Expression von I κ B- α untersucht. Nach 90-minütiger Stimulation mit anti-CD3 mAk zeigte sich eine maximale Akt-Phosphorylierung am Serinrest 473 (Ser473) (**Abb. 16**). zVad.fmk interferierte offensichtlich nicht mit der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt in den untersuchten Zeitintervallen von 30 bis 240 min. Bereits nach 30 min war eine deutliche aktivierungsinduzierte Erk-Phosphorylierung sichtbar, die durch zVAD.fmk nicht signifikant abnahm. Entsprechendes galt für die Zeiträume von 90-240 min, obwohl hier auch die anti-CD3 induzierte Phosphorylierung bereits abnahm. Nach 90 Minuten war eine moderate aber reproduzierbare anti-CD3-vermittelte Abnahme der I κ B- α -Proteinmenge detektierbar. Diese Abnahme war nach zVAD.fmk Kostimulation weniger deutlich ausgeprägt.

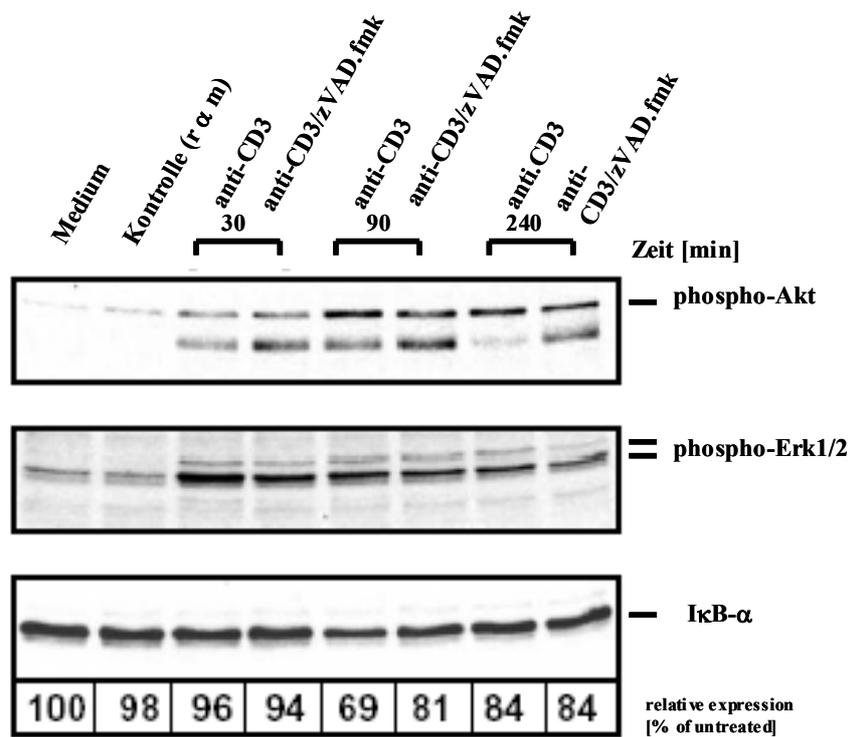


Abb. 16: Der Caspase-Inhibitor zVAD.fmk beeinflusst die anti-CD3-induzierte Degradation von IκB-α negativ, zeigt aber keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Erk1,2 oder Akt. Gereinigte PBMZ wurden mit kruzvernetztem anti-CD3 mAk (20 µg/ml) oder nur mit Kaninchen-anti-Maus Antiserum (1µg/ml) stimuliert (Kontrolle) und mit bzw. ohne 100µM zVAD.fmk kostimuliert. Die Lysate wurden in Western Blots auf die Menge an phosphoryliertem Akt, phosphorylierter Erk1/2 und IκB-α untersucht. Die Quantifizierung der IκB-α Expression wurde mittels 2D Laserscan Densitometrie durchgeführt. Die Zahlenwerte geben die relative prozentuale Expression von IκB-α in Bezug auf die Mediumkontrolle an. Einer von 4 unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

3.3 Nachweis aktiver Caspasen in nichtapoptotischen, proliferierenden T-Zellen

3.3.1 Nachweis aktiver Caspase-3 in proliferierenden T-Zellen

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich eine Blockierung der Caspaseaktivität negativ auf die Proliferation von PBMZ und T-Zellen auswirkte. Wenn Caspasen tatsächlich an Wachstumsprozessen beteiligt sein sollten, müssten diese in ihrer aktivierten Form in intakten, proliferierenden Zellen nachweisbar sein. Als intrazelluläre Nachweismethode diente zunächst ein fluorogenes, selektives Caspase-3 Substrat (PhiPhiLuxTM G₂D₂), welches nach Umsetzung Licht im roten Spektralbereich emittiert. PBMZ bzw. gereinigte T-Zellen wurden in einer definierten Zellzahl für 4 Tage mit unterschiedlichen Stimuli aktiviert (PHA, anti-CD3 mAk, anti-CD3 mAk/anti-CD28 mAk) und, wenn angegeben, mit zVAD.fmk kostimuliert. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mit PhiPhiLuxTMG₂D₂ inkubiert. Caspase-3 lag nach Stimulation durch sowohl PHA, als auch anti-CD3 mAk im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hochaktiv vor (**Abb. 17A**). Auch in mit anti-CD3/anti-CD28 mAk stimulierten T-Zellen war nach 4 Tagen eine signifikante Aktivierung der Effektor-Caspase zu beobachten. zVAD.fmk reduzierte diese Aktivität annähernd auf Kontrollniveau (**Abb. 17B**).

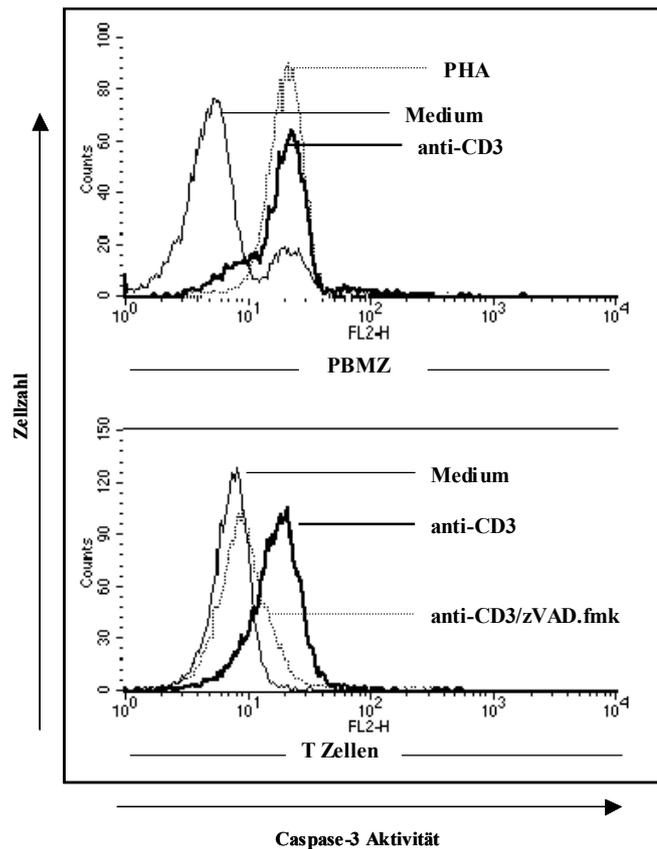


Abb. 17: Mitogene Stimulation von PBMZ oder T-Zellen führt zur Aktivierung von Caspase-3, zVAD.fmk verhindert diesen Prozess. (A) Gereinigte PBMZ wurden in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 µg/ml) stimuliert. Nach 4 Tagen wurde aktivierte Caspase-3 anhand der Umsetzung eines selektiven fluorogenen Substrats (PhiPhiLuxTM G₂D₂) durchflusszytometrisch im Lebend-Gate durch Vorwärts-Streulicht (FFC) /Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen. (B) Gereinigte T-Zellen wurden in Medium kultiviert oder mit immobilisierten anti-CD3 (20 µg/ml)/CD28 mAk (2 µg/ml) in An- oder Abwesenheit von 100 µM zVAD.fmk, stimuliert. Die Caspase-3 Aktivität wurde gemessen, wie in (A) beschrieben. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.3.2 Nachweis aktiver Caspasen-3 und -8 in proliferierenden T-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen

Die Beobachtung, dass Caspase-3 in proliferierenden Zellen aktiv vorliegt, sollte im Folgenden mit Hilfe einer weiteren Methodik verifiziert werden. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern durchgeführt, die spezifisch aktive Caspase-8, bzw. Caspase-3 binden. PBMZ bzw. T-Zellen wurden für 2-4 Tage stimuliert, und danach zur Färbung fixiert und permeabilisiert. Mit FITC- gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die aktiven Formen beider Caspasen im LSM visualisiert. Nach 2-tägiger antigener Stimulation war die aktive Form der Caspase-8 hauptsächlich in der Zellperipherie nachweisbar (**Abb. 18B**). Eine DAPI-Kofärbung verdeutlichte eine Lokalisation außerhalb des Zellkerns, im

schmalen zytoplasmatischen Saum (**Abb. 18E**). Nach 3-4 Tagen nahm die Intensität ab (**Abb. 18C,D**). In der unstimulierten Kontrolle ist praktisch keine aktive Caspase-8 erkennbar, mit Ausnahme weniger, vermutlich apoptotischer Zellen, in denen sie dann über die ganze Zelle verteilt vorlag (**Abb. 18A**). zVAD.fmk verhinderte die Caspase-8 -Aktivierung effektiv (**Abb. 18F**).

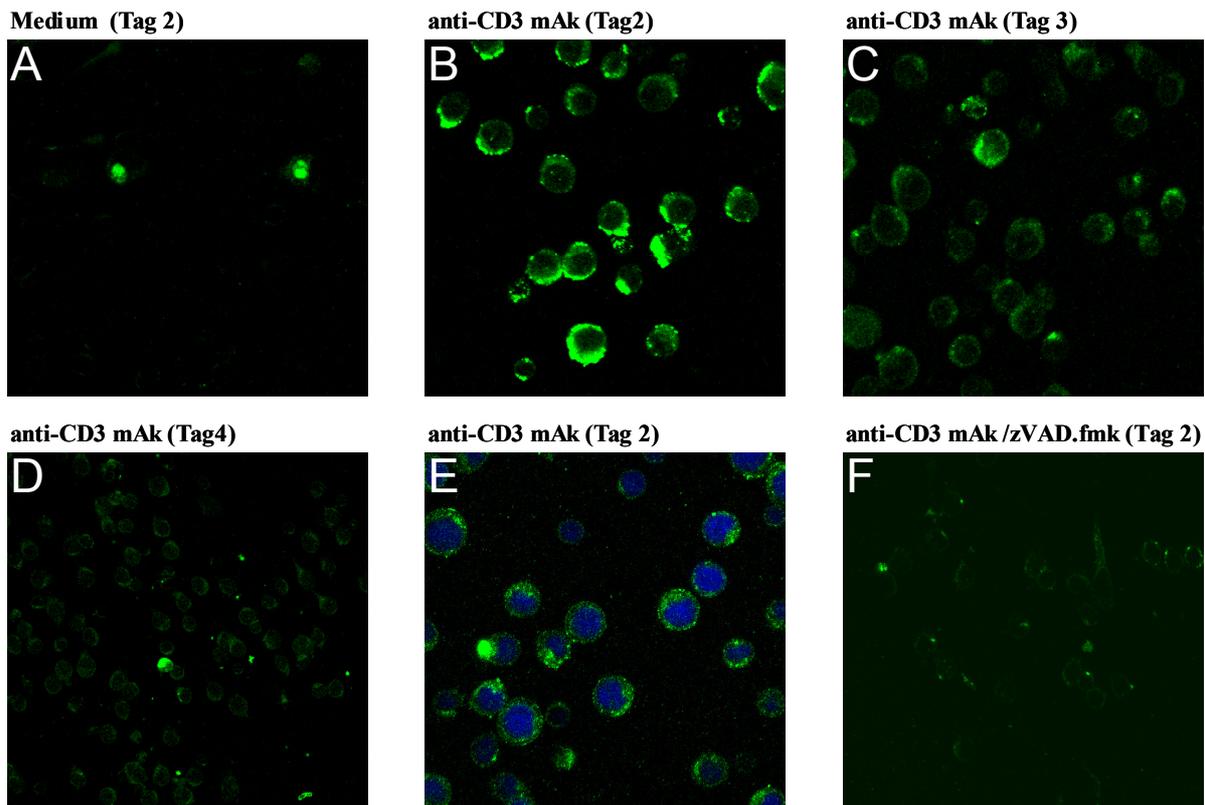


Abb. 18: anti-CD3 Stimulation von PBMZ führt zur Aktivierung von Caspase-8, die im Cytoplasma lokalisiert ist. zVAD.fmk verhindert diesen Prozess. (A-D,F) Gereinigte PBMZ wurden, wie angegeben, in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 µg/ml) für 3-4 Tage stimuliert und mit bzw. ohne 100µM zVAD.fmk kostimuliert. Aktive Caspase-8 wurde mit einem spezifischen unmarkierten Primärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper war Fluoreszenz-markiert (FITC). Die Abbildung zeigt die Detektion aktiver Caspase-8 im konfokalen Laserscan Mikroskop. Die Zellen in (E) wurden zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Die Beobachtung, dass in proliferierenden, nichtapoptotischen Zellen die Initiator Caspase-8 aktiv und in spezifischer Lokalisation vorliegt, führte zur Untersuchung der Lokalisation aktiver Effektor Caspase-3, die durch Caspase-8 prozessiert und aktiviert wird.

Ähnlich wie Caspase-8, war auch Caspase-3 in sich teilenden Zellen in aktivem Zustand in der Peripherie lokalisiert, vermutlich an der cytoplasmatischen Seite der Membran (**Abb. 19B**). Dies wird in einer Vergrößerung verdeutlicht (**Abb. 19D**). Weder in unstimulierten

noch in zVAD.fmk-kostimulierten T-Zellen war diese Aktivität zu beobachten (**Abb. 19E**). Nach 1-3 Tagen war keine signifikante Menge an aktiver Caspase-3 zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

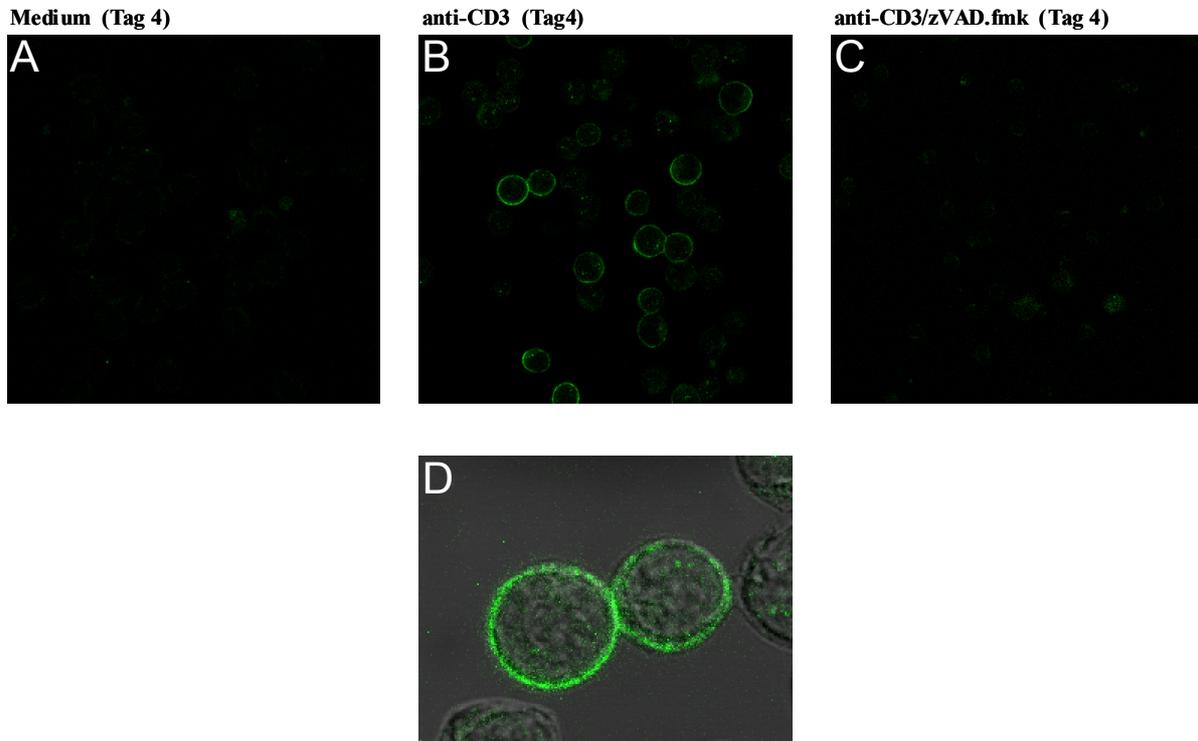


Abb. 19: anti-CD3 Stimulation von T-Zellen führt zur Aktivierung von Caspase-3, die im Cytoplasma lokalisiert ist, zVAD.fmk verhindert diesen Prozess. (A-D) Gereinigte PBMZ wurden, wie angegeben, in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 µg/ml)/anti-CD28 mAk (2 µg/ml) für 4 Tage stimuliert und mit bzw. ohne 100µM zVAD.fmk kostimuliert. Aktive Caspase-3 wurde mit einem spezifischen unmarkierten Primärantikörper und einem Fluoreszenz-markierten (FITC) Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Abbildung zeigt die Detektion aktiver Caspase-3 im konfokalen Laserscan Mikroskop. (D) stellt eine Vergrößerung der Zellen aus (B) dar. Die Abbildungen zeigen das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4 Untersuchungen zur Beteiligung von Caspasen an der Induktion des autokrinen IL-2/IL-2-Rezeptor Systems

3.4.1 Exogenes IL-2 hebt die zVAD.fmk vermittelte Proliferationsinhibition zum Teil auf

Die Proliferation von T-Lymphozyten wird durch eine autokrine Aktivierungsschleife vermittelt, die besonders in der früheren Aktivierungsphase nach 1-2 Tagen von Bedeutung ist. Dieses System beinhaltet zum einen die Sekretion des in T-Lymphozyten wichtigsten Wachstumsfaktors, des Interleukin-2 (IL-2), und zum anderen die Hochregulation der IL-2-Rezeptor alpha Kette (CD25). IL-2 bindet an seinen nun hochaffinen Rezeptor, wodurch Signalwege aktiviert werden, die zur Proliferation führen. Sollten Caspasen aktiv an diesem autokrinen System beteiligt sein, so müsste die Zugabe exogenen IL-2 den zVAD.fmk-vermittelten Proliferationsblock verhindern. Dieser potentielle Zusammenhang wurde im nächsten Experiment untersucht.

Caspase-1 ist essentiell für die Freisetzung der Cytokine IL-1 β und IL-18 von aktivierten Makrophagen (Earnshaw et al., 2000). Da diese Caspase ebenfalls durch zVAD.fmk inhibiert wird, und weil Makrophagen als Bestandteil der PBMZ Mischpopulation mögliche kostimulatorische Funktion auf T-Lymphozyten haben könnten, wurden auch diese Cytokine auf einen potentiellen, die Proliferationsinhibition aufhebenden Effekt untersucht.

PBMZ wurden für 4 Tage mit immobilisiertem anti-CD3 mAk stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. Wie angegeben, wurden die Zellen je nach Ansatz zusätzlich oder ausschließlich mit zVAD.fmk und bzw. oder den gewünschten Cytokinen (IL-1 β , IL-2, IL-18) stimuliert. 18 Stunden nach Zugabe von $^3\text{[H]}$ -Thymidin wurde die eingebaute Radioaktivität quantifiziert.

Wie zuvor führte eine Stimulation der PBMZ mit anti-CD3 mAk zu einer deutlich gesteigerten $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Inkorporation. Diese wurde durch die Zugabe exogenen IL-2 nicht weiter gesteigert (**Abb. 20**). Weder IL-1 β noch IL-18 übten einen deutlichen Einfluss auf die TCR-vermittelte Proliferation aus. Alleinige IL-2 Stimulation der Zellen führte zu einem lediglich schwachen Zellwachstum im Gegensatz zu IL-1 β und IL-18, die keinen Effekt auf ansonsten unstimulierte Zellen zeigten. zVAD.fmk bewirkte wie erwartet eine starke Reduktion des CD3-vermittelten $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Einbaus. Nur exogenes IL-2, aber nicht IL-1 β oder IL-18, war in der Lage den Proliferationsblock, zumindest teilweise, auszugleichen.

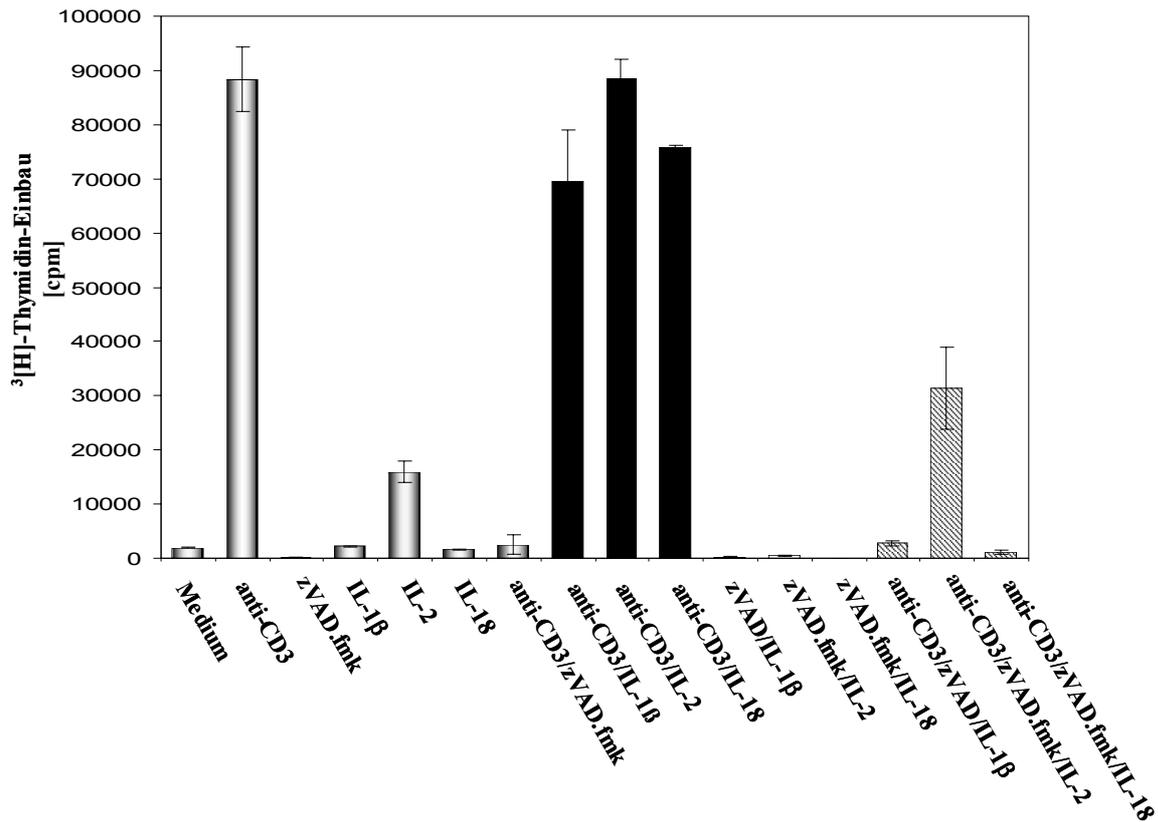


Abb. 20: Exogenes IL-2 hebt die zVAD.fmk vermittelte Proliferationsinhibition in PBMZ teilweise auf. Gereinigte PBMZ wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Dreifachansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität entweder mit den rekombinanten Cytokinen IL-1 β (10 ng/ml), IL-2 (30 units/ml) und IL-18 (10 ng/ml) allein, oder in Kombination mit anti-CD3 mAk (20 μ g/ml), 100 μ M zVAD.fmk oder anti-CD3+zVAD.fmk für 4 Tage stimuliert. 18 h nach Zugabe von 1 μ Ci ³[H]-Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Um potentielle kostimulatorische oder inhibitorische Einflüsse anderer Zellen auf das Proliferationsverhalten der T-Lymphozyten auszuschließen, wurde der Versuch in gereinigten T-Zellen wiederholt. Dabei stellte sich heraus, dass auch in hochreinen T-Zellen der zVAD.fmk vermittelte inhibitorische Effekt auf die Proliferation durch exogenes IL-2 zu einem gewissen Grad aufgehoben werden kann (**Abb. 21**).

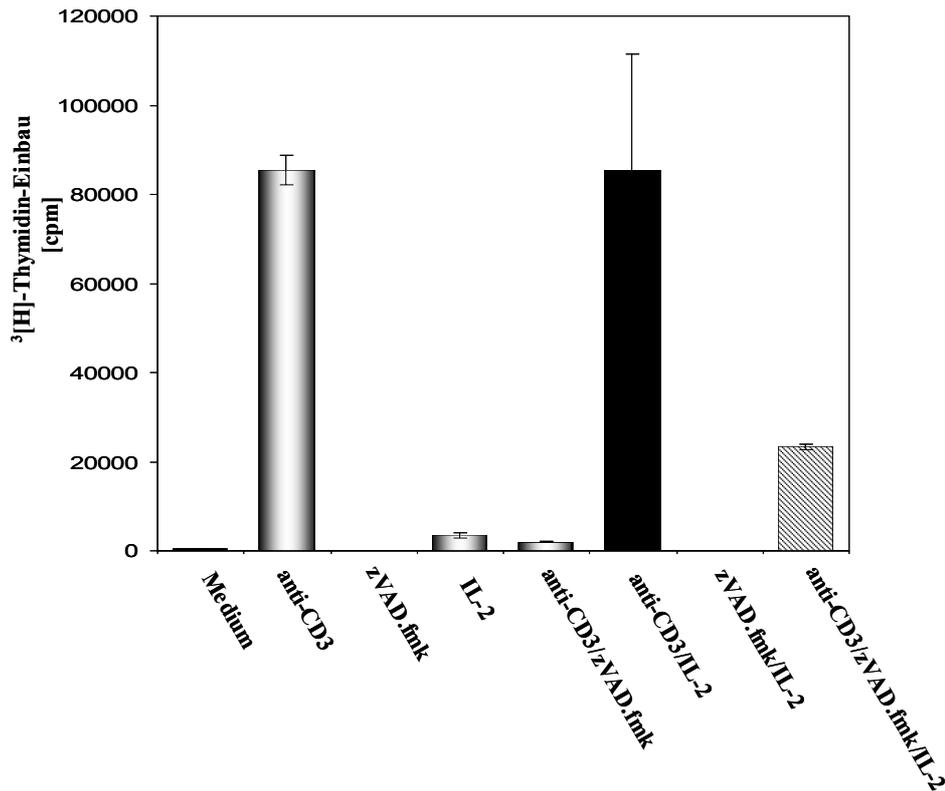


Abb. 21: Exogenes IL-2 hebt die zVAD.fmk vermittelte Proliferationsinhibition auch in gereinigten T-Zellen teilweise auf. Gereinigte T-Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Dreifachansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 $\mu\text{g/ml}$)/anti-CD28 mAk (2 $\mu\text{g/ml}$) für 4 Tage stimuliert und mit bzw. ohne 100 μM zVAD.fmk kostimuliert. Zusätzlich wurden die rekombinanten Cytokine IL-1 β (10 ng/ml), IL-2 (30 units/ml) und IL-18 (10 ng/ml) als Kostimulantien beigefügt (wie angegeben). 18h nach Zugabe von 1 μCi $^3\text{[H]}$ -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4.2 Exogenes IL-16 hebt die zVAD.fmk vermittelte Proliferationsinhibition nicht auf

Zusätzlich zu IL-1 β und IL-18 ist auch die Freisetzung des Cytokins IL-16 caspaseabhängig. Interleukin-16 ist ein proinflammatorisches Cytokin, das von CD8 $^+$ Lymphozyten produziert wird. Es übt einen chemotaktischen Effekt auf CD4 $^+$ T-Lymphozyten aus und induziert zudem Überlebenssignale (Cruikshank, 2000). Es wird als inaktive 80 kDa Proform gebildet. Es konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich des Promoleküls durch Caspase-3 geschnitten wird, was zur Freisetzung der bioaktiven Form des Cytokins führt (Zhang et al., 1998). Da zVAD.fmk Caspase-3 inhibiert, könnte eine fehlende IL-16 Aktivierung - zumindest teilweise - den beobachteten Proliferationsdefekt bedingen. Daher wurde

untersucht, ob die Zugabe von rekombinantem IL-16 diesen Effekt aufhebt. Während exogenes IL-2 wie erwartet eine gewisse Rekonstitution des $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbaus bewirkte, hatte IL-16 in den Konzentrationen von 2 bzw. 10 ng/ml keinen vergleichbaren Effekt (**Abb. 22**).

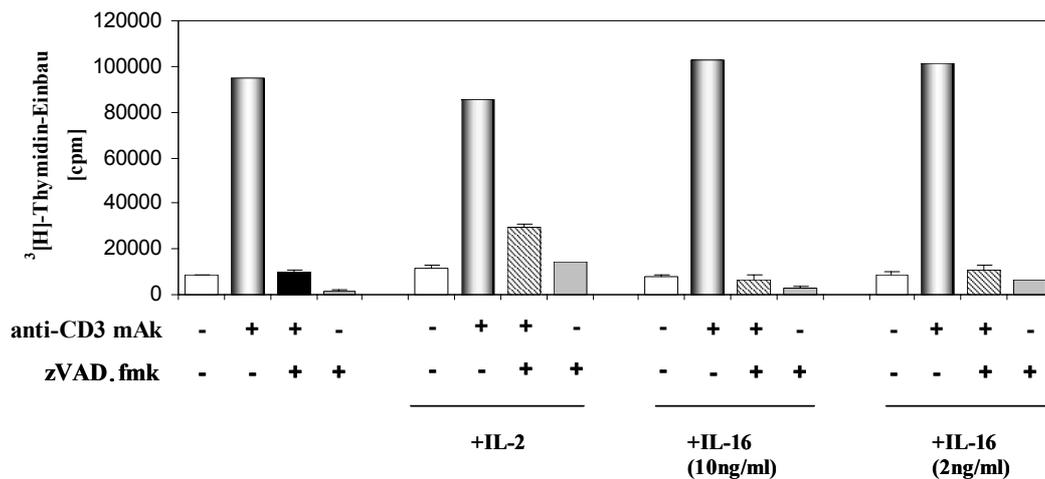


Abb. 22: Exogenes IL-16 kann die zVAD.fmk-vermittelte Proliferationsinhibition nicht aufheben. Aus PBMZ wurden durch gereinigte T-Zellen gewonnen. Je 1×10^5 Zellen pro Kavität wurden in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk ($20 \mu\text{g/ml}$) für 4 Tage stimuliert und mit bzw. ohne $100 \mu\text{M}$ zVAD.fmk kostimuliert. Zusätzlich wurde rekombinantes humanes IL-2 (30 U/ml) bzw. IL-16, in den angegebenen Konzentrationen (10 ng/ml bzw. 2 ng/ml) beigefügt. 18 h nach Zugabe von $1 \mu\text{Ci}$ $^3\text{[H]}$ -Thymidin pro Kavität wurde der Einbau im β -Zähler gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4.3 Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk führt zu einer starken Beeinträchtigung der Antigen-induzierten IL-2 Sekretion

Aufgrund der zentralen Rolle des IL-2 bei der Initialisierung des Proliferationssignals und der Beobachtung, dass der durch zVAD.fmk hervorgerufene inhibitorische Effekt durch exogenes IL-2 teilweise aufgehoben werden konnte, sollte die Induktion des IL-2/IL-2 Rezeptor Systems untersucht werden. Dazu wurden PBMZ wie zuvor mit immobilisiertem anti-CD3 mAk stimuliert, bzw. unbehandelt gelassen. Je nach Ansatz war dem Medium zVAD.fmk beigefügt oder nicht. Nach 1-4 Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen und mittels

ELISA auf die IL-2 Konzentration analysiert. Nach 2 Tagen war die anti-CD3-induzierte IL-2-Freisetzung maximal (**Abb. 23**, graue Balken). Kostimulation der Zellen mit zVAD.fmk resultierte in einer drastischen Inhibition dieser Freisetzung, teilweise unter die Werte der unstimulierten Kontrollen.

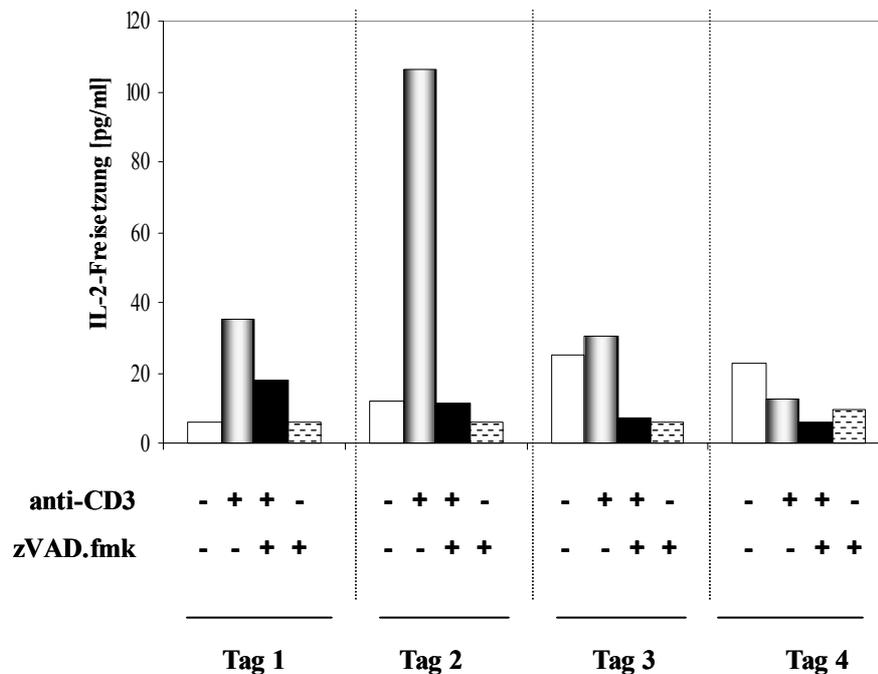


Abb. 23: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk verhindert die anti-CD3-induzierte Freisetzung von IL-2. Gereinigte PBMZ wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Dreifachansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk ($20 \mu\text{g/ml}$) stimuliert und mit bzw. ohne $100 \mu\text{M}$ zVAD.fmk kostimuliert. Nach 1-4 Tagen wurden die Kulturüberstände geerntet und im ELISA auf die IL-2 Konzentration untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4.4 Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk unterdrückt die PMA/Ionomycin-induzierte IL-2-Produktion

Zur Untermauerung des obigen Ergebnisses wurden PBMZ alternativ auch mit PMA/Ionomycin stimuliert. Diese Aktivierung unter Umgehung des TZR resultierte ebenfalls in einer deutlichen IL-2-Sekretion (**Abb. 24**). Auch in diesem Fall wurde ein Maximum nach zwei Tagen erreicht, und wieder resultierte die Caspase-Inhibition in fehlender IL-2 Produktion. Das Caspase-Substrat zVAD.amc hatte keinen negativen Einfluss auf die IL-2 Freisetzung (Daten nicht gezeigt).

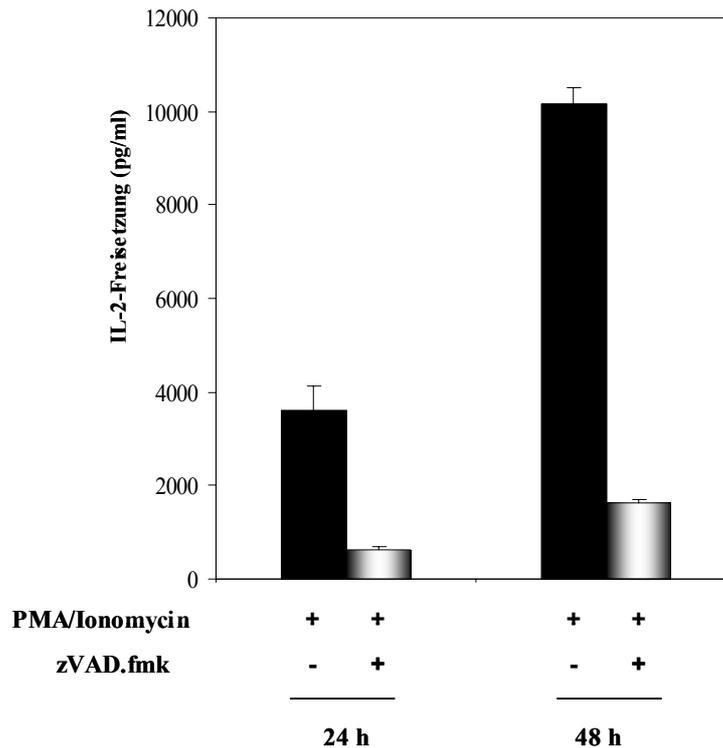


Abb. 24: Die TZR unabhängige IL-2 Freisetzung, induziert durch PMA/Ionomycin, wird durch zVAD.fmk inhibiert. Gereinigte PBMZ wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Dreifachansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität in Medium kultiviert, dem PMA (10 ng/ml)/Ionomycin (500 ng/ml) zugesetzt war. Die Zellen wurden wie angegeben mit oder ohne $100 \mu\text{M}$ zVAD.fmk kostimuliert. Nach 1-2 Tagen wurden die Kulturüberstände geerntet und im ELISA auf die IL-2 Konzentration untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4.5 Der beobachtete inhibitorische Effekt auf die IL-2 Produktion findet auf transkriptioneller Ebene statt

Diese Resultate allein lassen jedoch keinen Schluss zu, ob die beobachtete Herabsetzung der IL-2-Produktion auf Transkriptions-, oder sekretorischer Ebene geschieht. Um die Auswirkung von zVAD.fmk auf die Transkription des IL-2-Gens zu untersuchen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Nach 16-stündiger Stimulation wurde die Gesamt-RNA aus PBMZ isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die jeweilige Konzentration an IL-2-spezifischer mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR im LightCycler analysiert. Nach 16-stündiger Stimulation mit anti-CD3 mAk wurde ein starker Anstieg der IL-2 mRNA Konzentration induziert. Bei gleichzeitiger Caspase-Inhibition wurde die Transkription des IL-2 Gens auf einen mit der Kontrolle vergleichbaren Wert reduziert (**Abb. 25**). Dieses

Ergebnis deutet auf einen Zusammenhang von Caspaseaktivität und der IL-2 Transkriptionsregulation hin.

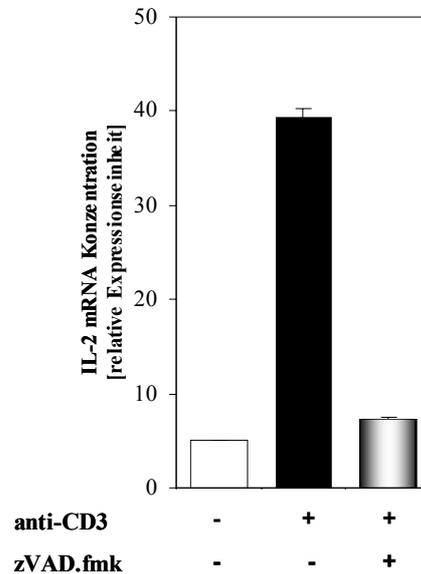


Abb. 25: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk blockiert die Transkription des IL-2 Gens. Gereinigte PBMZ wurden in 100 mm Zellkulturschalen mit Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 µg/ml) stimuliert und mit bzw. ohne 100µM zVAD.fmk kostimuliert. Nach 16 h wurden die Zellen geerntet. Die gesamte RNA wurde extrahiert, die mRNA wurde per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Menge an IL-2-kodierender cDNA wurde im LightCycler quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4.6 zVAD.fmk verhindert die vollständige Hochregulation bestimmter Aktivierungsmarker

Der IL-2-Rezeptor ruhender T-Zellen besteht aus zwei Untereinheiten, die mit IL-2R β und IL-2R γ bezeichnet werden. Wird die Zelle aktiviert, kommt es zur schnellen, transienten Expression der dritten IL-2R α Untereinheit (CD25). Dies führt zur Formation des hochaffinen IL-2 Rezeptors, der essentiell ist für die Weiterleitung des Aktivierungssignals. An der IL-2R α Expression ist unter anderem IL-2 selbst beteiligt (Lin and Leonard, 2000). Daher sollte untersucht werden, ob als Folge der reduzierten IL-2 Sekretion nach Caspase-Inhibition auch die CD25 Expression herabgesetzt war. Parallel dazu wurde die Expression weiterer Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche untersucht. So ist CD69 ein früher Marker, der auf antigene Stimulation sehr schnell hochreguliert wird. Ein weiterer Aktivierungsmarker, der

untersucht wurde, war HLA-DR (Human Leukocyte Antigen -DR), welches zur Klasse II der MHC-Moleküle gehört. CDw137 (4-1BB) wurde als ein Aktivierungsmarker auf T Zellen charakterisiert, dem darüber hinaus eine kostimulatorische Wirkung auf die Proliferation von T-Lymphozyten zugesprochen wurde (Alderson et al., 1994).

PBMZ wurden über Zeitintervalle von 1-4 Tagen wie angegeben stimuliert und mit Fluoreszenz markierten Antikörpern (CD3-FITC, CD69-PE, CD25-PE, HLA-DR-PE, CD137-PE) gefärbt. Die Balkendiagramme stellen die Auswertung der jeweiligen Dichtediagramme dar. Wie **Abb. 26A** zeigt, bewirkte die Stimulation mit anti-CD3 mAk eine deutliche Induktion der CD69-Expression auf der Oberfläche CD3-positiver T-Zellen. Diese Hochregulation wurde durch Caspase-Inhibition nicht wesentlich reduziert. Im klaren Gegensatz dazu standen Resultate bezüglich der anderen untersuchten Aktivierungsmarker. Antigene Stimulation äußerte sich in einer graduellen Zunahme der HLA-DR- Menge auf der Zelloberfläche über 1-4 Tage. Eine Blockierung der Caspaseaktivität manifestierte sich dagegen in einer deutlich reduzierten Expression des HLA-DR Moleküls und hatte zur Folge, dass das Niveau ab Tag 2 stagnierte (**Abb 26B**). Ähnliche Resultate zeigte eine Analyse der Expression von CD25. Diese regulatorische Untereinheit des IL-2 Rezeptors wurde ebenfalls zeitabhängig exprimiert (**Abb. 26C**). Während nach 1-tägiger Stimulation praktisch kein Unterschied hinsichtlich des Expressionsgrades nachweisbar war, akkumulierte CD25 beginnend mit Tag 2 auf der Zelloberfläche, bis nach 4 Tagen eine maximale Expression erreicht war. Kostimulation mit zVAD.fmk bewirkte eine deutliche Inhibition dieses Effektes (**Abb. 26C**). Auch die Hochregulation des zur TNF-Rezeptor-Familie gehörenden CDw137 erfolgte in einer eindeutig zeitabhängigen Weise. zVAD.fmk wirkte auch in diesem Fall inhibitorisch. So war nach 4-tägiger Stimulationsdauer die Expression deutlich herabgesetzt (**Abb. 26D**).

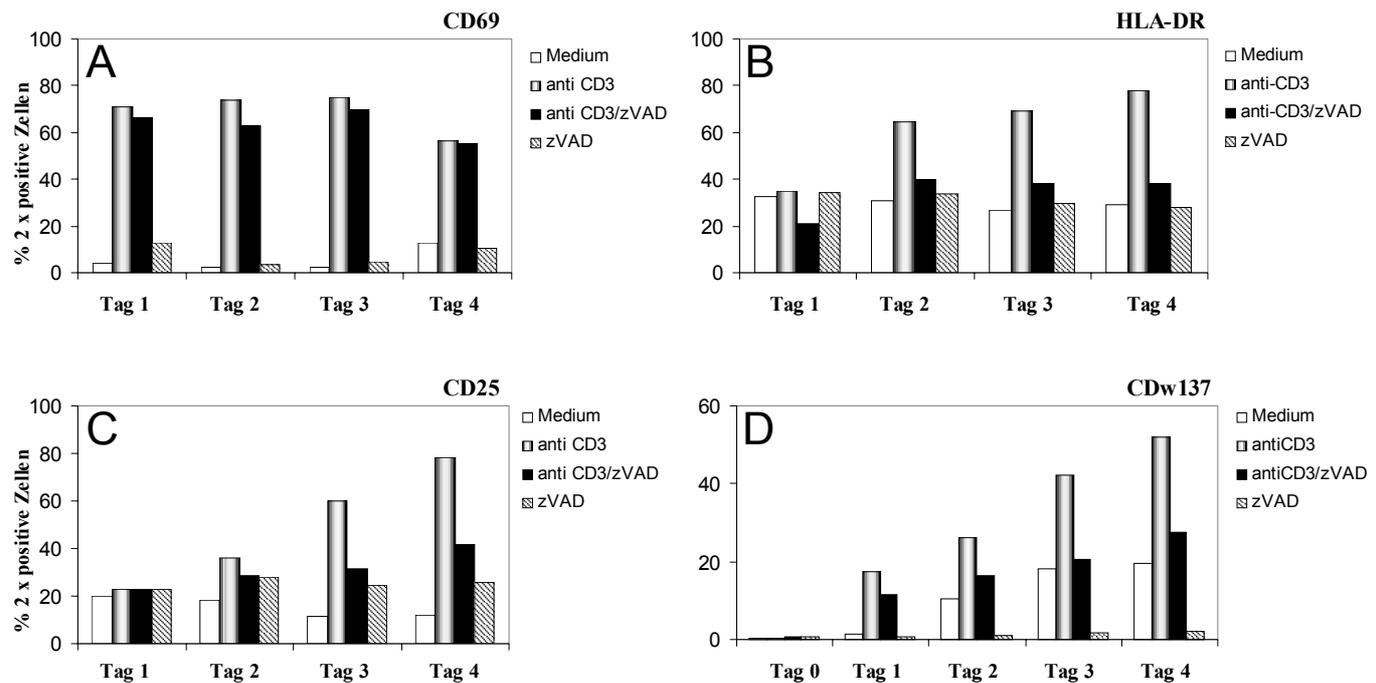


Abb. 26: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk vermindert die Aktivierungs-induzierte Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25, CD137, sowie HLA-DR, hat aber keinen Einfluss auf die Regulation von CD69. Gereinigte PBMZ wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Doppelansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk (20 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD3 mAk (20 $\mu\text{g/ml}$)/100 μM zVAD.fmk bzw. ausschließlich mit 100 μM zVAD.fmk stimuliert. Nach 1-4 tägiger Stimulationsdauer wurden die Doppelansätze vereinigt, und die Zellen wurden mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und auf die Expression von Oberflächen-CD3 in Kombination mit den Aktivierungsmarkern CD69 (A), HLA-DR (B), CD25 (C), CD137 (D) durchflusszytometrisch analysiert. Die abgebildeten Balkendiagramme geben die jeweiligen prozentualen Anteile der doppelgefärbten T-Zellpopulationen an. Die Abbildungen zeigen das repräsentative Ergebnis eines von mindestens 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Diese klar reproduzierbaren Ergebnisse sollten im Folgenden mit gereinigten T-Zellen wiederholt werden. Durch die Kofärbung mit Fluoreszenz-markierten anti-CD3 Antikörpern wurde zwar sichergestellt, dass ausschließlich T-Zellen der PBMZ-Mischkultur auf das Vorhandensein der Aktivierungsmarker untersucht wurden. Dennoch garantiert nur das Arbeiten mit einer hochreinen T-Zell-Population den Ausschluss potentieller kostimulatorischer Zellen und eine dadurch bedingte Verfremdung der Ergebnisse. Wie schon in vorangegangenen Versuchen stellte sich heraus, dass die in PBMZ erzielten Ergebnisse konsistent mit denen in isolierten T-Zellen sind. So war die Auswirkung der Caspase-Inhibition auf die Expression von CD69 im Zeitraum von 1-3 Tagen marginal und nach 4 Tagen nicht nachweisbar (Abb. 27A). Die Regulation von CD25 erwies sich Caspase-abhängig und wurde nach zVAD.fmk Kostimulation im untersuchten Zeitraum von 1-4 Tagen um annähernd 50 % reduziert (Abb. 27B). CD95 (Fas) ist ein weiterer Oberflächenmarker, auf aktivierten T-Zellen. Die Antigen-induzierte Expression von CD95 trägt dazu bei,

aktivierte T-Zellen für den Aktivierungs-induzierten Zelltod zu sensibilisieren, der die klonale Expansion nach Beendigung der Immunantwort terminiert. zVAD.fmk bewirkte eine moderate Reduktion der CD95-Expression (Abb. 27C).

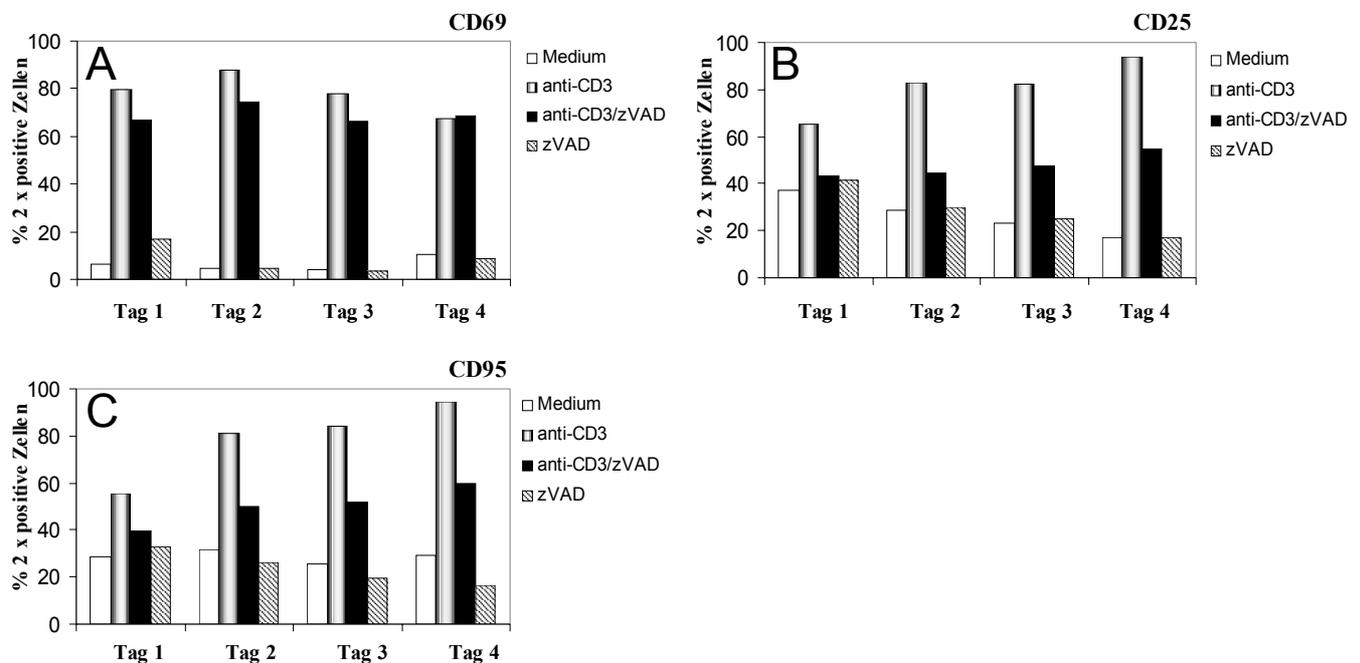


Abb. 27: Caspase-Inhibition durch zVAD.fmk vermindert die aktivierungsinduzierte Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25 und CD95, hat aber keinen Einfluss auf die Regulation von CD69. Aus gereinigten PBMZ wurden per Negativ-Isolierung hochreine T-Zellen gewonnen und in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten in Doppelansätzen zu je 1×10^5 Zellen pro Kavität in Medium kultiviert oder mit immobilisiertem anti-CD3 mAk ($20 \mu\text{g/ml}$), anti-CD3 mAk ($20 \mu\text{g/ml}$) / zVAD.fmk ($100\mu\text{M}$) bzw. ausschließlich mit $100\mu\text{M}$ zVAD.fmk stimuliert. Nach 1-4-tägiger Stimulationsdauer wurden die Doppelansätze vereinigt und die Zellen wurden mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt, und auf die Expression von Oberflächen-CD3 in Kombination mit den Aktivierungsmarkern CD69 (A), HLA-DR (B), CD25 (C), CD137 (D) durchflusszytometrisch analysiert. Die abgebildeten Balkendiagramme geben die jeweiligen prozentualen Anteile der doppelgefärbten T-Zellpopulationen an. Die Abbildungen zeigen das repräsentative Ergebnis eines von mindestens 4 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Eine Inhibition der Caspase-Aktivität führte zur Blockierung der Proliferation. Die Ursache ist vermutlich das Fehlen der Induktion des IL-2/IL-2R-Systems.

3.5 Untersuchungen zur Caspase-8-Defizienz in Jurkat T-Zellen

3.5.1 Das Fehlen funktionaler Caspase-8 führt zu einer deutlich reduzierten IL-2-Freisetzung in Jurkat T-Zellen

Die bisher beschriebenen Versuche wurden mit den pharmakologischen Inhibitoren zVAD.fmk bzw. zIETD.fmk durchgeführt. Obwohl diese Moleküle relativ spezifisch eine oder mehrere Caspasen inhibieren, können potentielle unspezifische Nebeneffekte nicht unbedingt ausgeschlossen werden. Für mehrere der folgenden Versuche wurde daher eine Jurkat T-Zelllinie verwendet, der aufgrund einer Deletion im Caspase-8 Gen das funktionelle Enzym fehlt (Jou et al., 1998). Von diesem genetischen Modell könnten somit physiologischere und biologisch relevantere Resultate abgeleitet werden. Zunächst wurde das Schlüsselexperiment, die Frage nach dem Einfluss der Caspase-8-Defizienz auf die mitogen-induzierte IL-2-Sekretion, in Jurkat T-Zellen wiederholt.

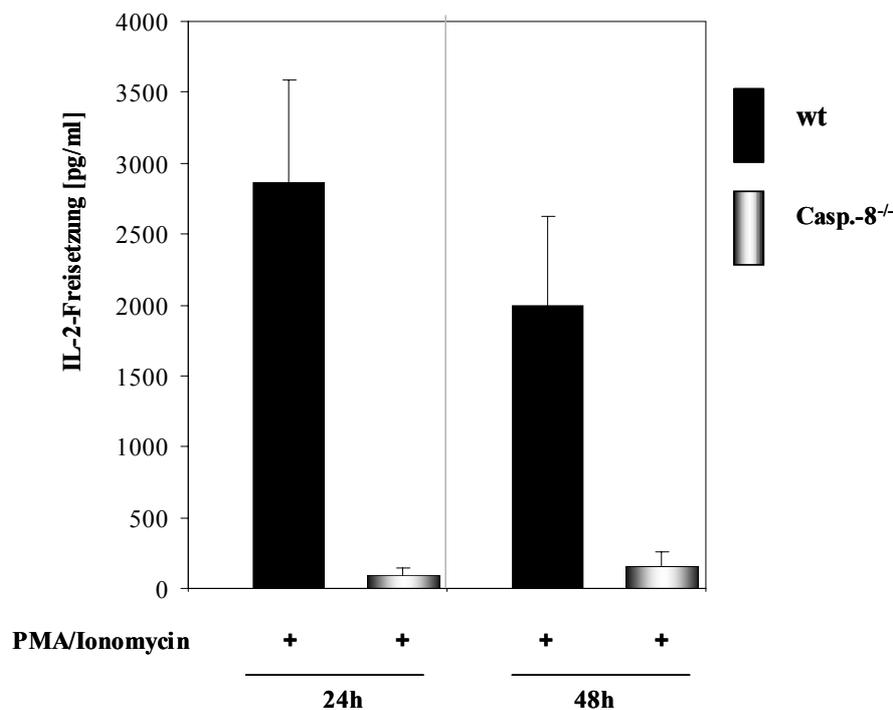


Abb. 28: Caspase-8-Defizienz in Jurkat T-Zellen äußert sich in einer Beeinträchtigung der IL-2 Produktion. Wildtyp und Caspase-8 defiziente Jurkat T-Zellen wurden für 24 bzw. 48 Stunden mit PMA (10 ng/ml)/Ionomycin (500 ng/ml) stimuliert. Die Überstände der Dreifachansätze wurden auf ihre IL-2 Konzentration im ELISA untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Wildtyp Jurkat-Zellen (WT) sowie der Caspase-8-defiziente Subklon wurden in einer definierten Zellzahl ausgesät und mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die IL-2 Konzentration in den Zellüberständen wurden nach 1-2 Tagen im ELISA analysiert. Sowohl nach 24 als auch

nach 48 Stunden wurde in Wildtyp-Zellen eine starke IL-2 Produktion ausgelöst (**Abb. 28**). Das Fehlen funktionaler Caspase-8 äußerte sich in einer nahezu vollständigen Inhibition der IL-2-Freisetzung.

3.5.2 Auswirkungen des Fehlens funktionaler Caspase-8 auf die Aktivität wichtiger Transkriptionsfaktoren

Die IL-2 Expression in T-Zellen unterliegt einer strikten Regulation. Dabei spielen Transkriptionsfaktoren wie NF κ B (*nuclear factor κ B*), NFAT (*nuclear factor in activated T cells*) und das aus Jun und Fos zusammengesetzte AP-1 eine wichtige Rolle. Ein weiterer bedeutender Regulator ist das der NF κ B Familie zugehörige cRel, welches zusammen mit AP-1 an den mit RE/AP bezeichneten Bereich des IL-2 Promotors bindet. Externe Aktivierungssignale münden letztendlich in der Kern-Translokation dieser Faktoren, die nun an spezifische Bereiche der IL-2 Promotorsequenz binden und somit die Transkription des IL-2 Gens initiieren. Die beobachtete Reduktion der IL-2 Transkription könnte seine Ursache in mangelnder Aktivierung eines oder mehrerer Transkriptionsfaktoren haben. Dafür spricht zum Beispiel die beobachtete fehlende Abnahme des I κ B- α -Levels nach Caspase-Inhibition, da NF κ B erst nach Degradation seines Inhibitors in den Kern translozieren kann.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden transiente Transfektionen mit verschiedenen dargestellten Luciferase-Reporter Konstrukten durchgeführt. Hierzu wurden erneut Wildtyp-Jurkat-Zellen mit dem Caspase-8 defizienten Subklon verglichen. Die Zellen wurden mit Plasmidkonstrukten transfiziert, die für das Luciferasegen kodieren. Dieses Reportergen war je nach Plasmid unter Kontrolle des IL-2 Promotors, der spezifischen DNA-Zielsequenzen für NFAT, NF κ B, oder für das kombinierte RE/AP-Element. Eine 24-stündige Stimulation mit PMA/Ionomycin induzierte eine starke IL-2- promotorabhängige Luciferaseaktivität in Wildtyp-Zellen. Im Caspase-8 defizienten Klon war diese Aktivität um ca. 60 % herabgesetzt (**Abb. 29A**). Der Transkriptionsfaktor NFAT wurde in beiden Zelltypen aktiviert, das Fehlen funktionaler Caspase-8 hatte keine negativen Folgen (**Abb. 29B**). Im Gegensatz dazu, zeigte die NF κ B-abhängige Luciferaseaktivität eine moderate Reduktion im Caspase-8 defizienten Subklon (**Abb. 29C**). Der deutlichste Effekt war jedoch für das RE/AP Element nachweisbar. Ein Fehlen funktionaler Caspase-8 führte zu einer Reduktion der RE/AP-abhängigen Luciferaseaktivität um ca. 80 % im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 29D**).

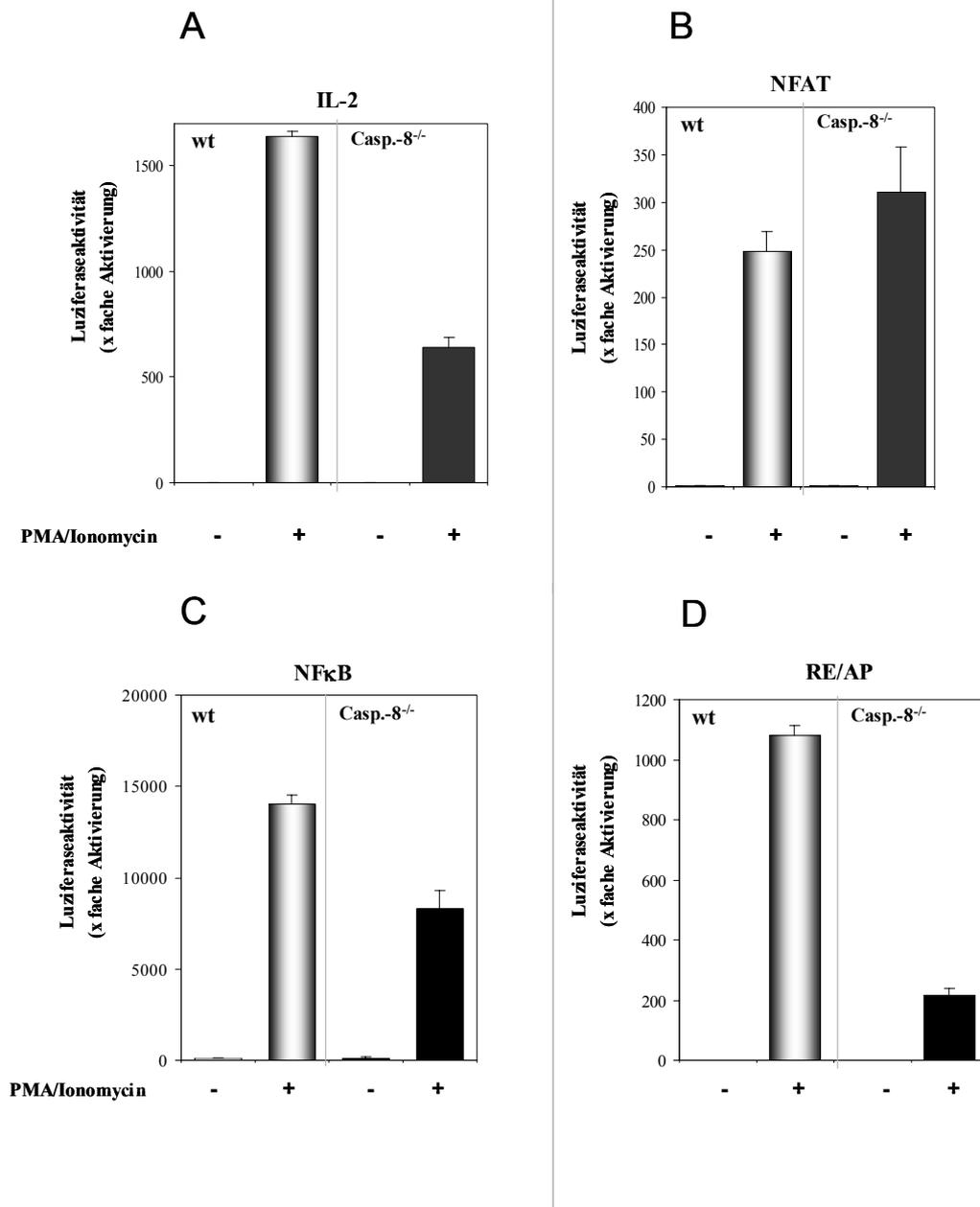


Abb. 29: Sowohl die Aktivierung des IL-2 Promotors, als auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB und des RE/AP-Elementes ist in Caspase-8 defizienten Zellen herabgesetzt. Jurkat-Wildtypzellen und der Caspase-8 defiziente Subklon wurden mit Reporterkonstrukten transfiziert, die das Luciferase-Gen kodieren. Das Reporter gen war unter der Kontrolle des IL-2 Promotors (A) oder der spezifischen Erkennungssequenzen für NFAT (B), NFκB (C) oder RE/AP (D). Nach 24 h wurden gleiche Aliquots transfizierter Zellen für 5 h unbehandelt gelassen oder mit PMA (10 µg/ml)/Ionomycin (500 ng/ml) stimuliert. Die Lysate wurden im Luminometer auf die Luciferase-Aktivität untersucht, die in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt ist. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelansätzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.5.3 Die Bindung von nukleärem cRel an seine entsprechende DNA-Zielsequenz ist im Caspase-8 defizienten Subklon herabgesetzt

Das NF κ B-Protein cRel wurde als entscheidender Faktor beschrieben, der an die RE/AP Sequenz bindet (Shapiro et. al., 1998). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die beobachtete Abnahme der RE/AP-spezifischen Luciferaseaktivität in einer reduzierten Bindung von cRel an seine spezifische Sequenz begründet ist. Dazu wurden Wildtyp- und Caspase-8- defiziente Jurkat-Zellen für 2 h mit PMA/Ionomycin stimuliert oder unbehandelt gelassen. In einem Gelretardationsexperiment wurde die Bindung von cRel in der nukleären Fraktion an seine spezifische Bindungsstelle untersucht. Diese Bindungsintensität wurde durch PMA/Ionomycin in Wildtypzellen stärker induziert als in dem Caspase-8 defizienten Subklon (**Abb. 30**). In Kernextrakten, die mit dem unmarkierten Wildtyp-Oligonukleotid (Oligo wt) vorinkubiert wurden, zeigte sich eine deutliche kompetitive Inhibition der cRel-Bindungsstärke. Diese Inhibition fiel signifikant schwächer aus, wenn anstelle des Wildtyp-Oligonukleotids eine mutierte Form verwendet wurde (Oligo mut.). Aufgrund der veränderten Zielsequenz konkurriert die mutierte Form nicht mehr mit der Bindung von cRel. Als Positivkontrolle fungierte vom Hersteller mitgelieferte Proteinextrakt PMA/Ionomycin stimulierter Jurkat-Zellen. Die beobachtete Abnahme der RE/AP-Aktivität könnte also in der Tat durch eine nicht vollständige Aktivierung des Transkriptionsfaktors cRel begründet sein.

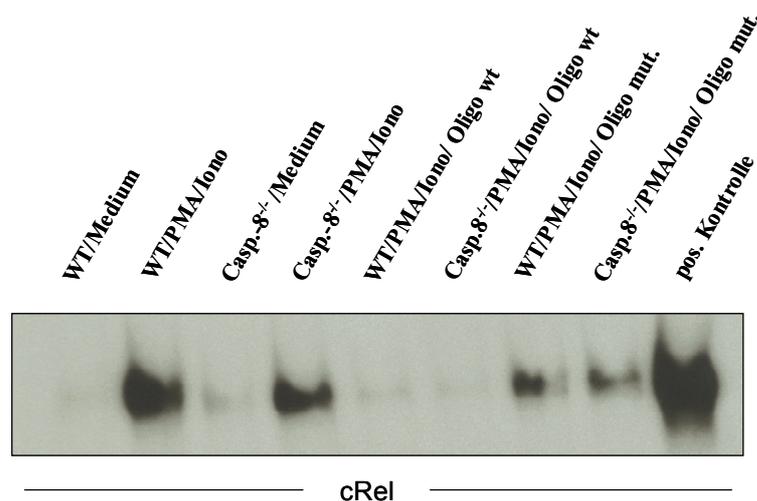


Abb. 30: Die aktivierungsinduzierte Bindung von cRel ist in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen herabgesetzt. Wildtyp Jurkat T-Zellen sowie der Caspase-8 defiziente Subklon wurden für 2 Stunden unbehandelt gelassen oder mit PMA (10 μ g/ml)/Ionomycin (500 ng/ml) stimuliert. Daraufhin wurden Kernextrakte hergestellt. Ein Gelretardationsexperiment, das die Bindung von cRel an ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid (RE/AP) erlaubt, wurde durchgeführt. Als Spezifitätskontrolle wurde das gleiche Oligonukleotid bzw. eine mutierte Form als Konkurrent eingesetzt. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.6 Der Einfluss von zVAD.fmk auf die Aktivierung humaner Monozyten

Im Falle humaner PBMZ inhibierte zVAD.fmk die T-Zellproliferation unter den Wert der unstimulierten Zellen, während der Effekt geringer betont war, wenn gereinigte T-Zellen analysiert wurden (**Abb. 4**). Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass zVAD.fmk zusätzliche Effekte auf Antigen-präsentierende Zellen ausübt. Dieser mögliche Zusammenhang wurde in Zusammenarbeit mit Norbert Reiling (Forschungszentrum Borstel) beispielhaft an humanen Monozyten untersucht. Dabei wurde die durch bakterielle Stimulation hervorgerufene TNF-Freisetzung als Maß für den Aktivierungszustand dieser Zellpopulation untersucht. Die Monozyten wurden aus PBMZ gesunder Spender mittels Elutriation isoliert und mit LPS stimuliert, einem bekannten Agonisten für den TLR-4 (*Toll like Receptor 4*), oder mit *Mycobacterium avium* Stamm SE01 infiziert, einem TLR-2 Agonisten. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen sensitiver auf zVAD.fmk reagieren als T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in den Versuchen mit einer zVAD.fmk Konzentration von 30µM gearbeitet. Nach 6-stündiger Stimulation wurden die Zellüberstände gesammelt und im ELISA auf die TNF-Konzentration untersucht. Sowohl die Stimulation mit *Mycobacterium avium* als auch mit LPS induzierte eine signifikante TNF-Freisetzung (**Abb. 31**). In beiden Fällen wurde die Sekretion von TNF durch 30 µM zVAD.fmk moderat reduziert. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass Caspasen möglicherweise an der Cytokinproduktion von Monozyten beteiligt sind.

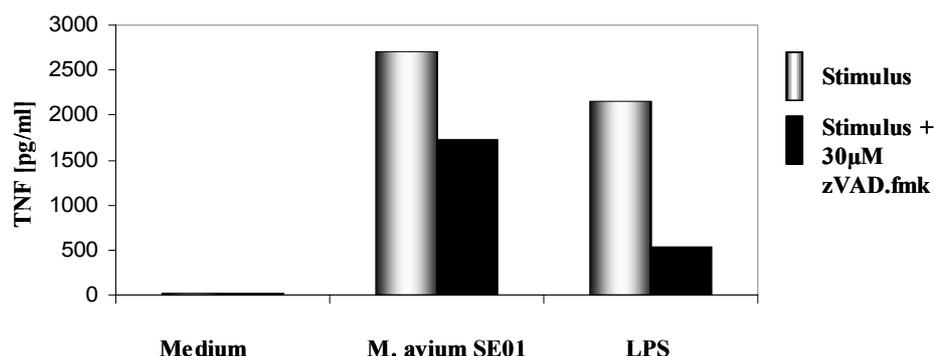


Abb. 31: Caspase-Inhibition reduziert die TNF-Freisetzung von Monozyten nach bakterieller Stimulation
ab. Hochreine humane Monozyten wurden mit *Mycobacterium avium* Stamm SE01 (5:1) infiziert oder mit LPS (10 ng/ml) stimuliert. Dies geschah entweder in Anwesenheit oder in Abwesenheit von 30µM zVAD.fmk. Nach 6 h wurde die TNF-Sekretion in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte von Dreifachansätzen dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Eines von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

4. DISKUSSION

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, eine mögliche Rolle des FADD/Caspase-8/Caspase-3 Signalweges bei der Induktion von Proliferation zu untersuchen. Die Bedeutung von Caspasen als zentrale Mediatoren des apoptotischen Zelltodes ist gut charakterisiert (Cohen, 1997; Alnemri, 1997). In den letzten Jahren verdichteten sich Hinweise darauf, dass Caspasen neben ihrer Rolle bei der Apoptose und der Reifung von Cytokinen auch bei der Proliferation insbesondere von T-Zellen involviert sind (Elkon, 1999; Los et al., 2001; Budd, 2002; Algericas-Schimmich et al., 2002). Diese Befunde überraschten und wurden zunächst kontrovers diskutiert, denn Zelltod und Zellteilung sind die wohl gegensätzlichsten Prozesse in einer Zelle. Als jedoch *in vivo* Daten aus humanen und murinen Modellen veröffentlicht wurden, fanden die *in vitro* Befunde Bestätigung. So wurden Patienten beschrieben, die an einem Autoimmun-lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) litten, einer Krankheit, die unter anderem durch eine Störung des Aktivierungs-induzierten Zelltodes charakterisiert ist. Lymphozyten dieser Patienten zeigten neben Apoptoseresistenz eine unvollständige Antwort auf antigene Stimulation. Als Ursache wurde eine Punktmutation im Caspase-8-Gen diagnostiziert (Chun et al., 2002). Knock-out-Mäuse mit Deletionen in FADD-, Caspase-8- oder Caspase-3-Genen zeigten schwere Entwicklungsstörungen und waren bereits im Embryonalstadium letal. Phänotypisch äußerten sich diese Deletionen unter anderem in einer gestörten Herzmuskelentwicklung, sowie einer verringerten Anzahl von Thymozyten. Die Knock-out-Mäuse waren kleiner und die Geburtenrate war reduziert (Los et al., 2001). Neuere Daten aus konditionellen Knock-out-Mäusen, in denen sich die Caspase-8-Defizienz auf die T-Zellreihe beschränkte, bestätigten die Beobachtungen vom Chun et al. (2002) im humanen System. Ein Fehlen der Caspase-8 resultierte in dem Unvermögen der T-Zellen, auf eine virale Infektion zu reagieren. Zudem zeigten diese Zellen *ex vivo* keine Reaktion auf antigene Stimulation (Salmena et al., 2003). Bis heute sind weitere Publikationen erschienen, die klar auf nicht-apoptotische Funktionen von Caspasen hindeuten (Los et al., 2001; Thome und Tschopp, 2001; Budd, 2002).

4.1 Bedeutung des FADD-Adaptermoleküls im Zellzyklus muriner Fibroblasten

Anhand verschiedener Klone der murinen Zelllinie NIH3T3 wurden zunächst potentielle Auswirkungen einer Unterbrechung des FADD/Caspase-8/Caspase-3 Signalweges auf das Wachstum und die Regulation Zellzyklus-assoziiierter Proteine untersucht. FADD ist ein Adapterprotein, das ursprünglich als Transduktor apoptotischer Signale isoliert wurde. FADD-defiziente Mäuse sind bereits im Embryonalstadium letal. T-Zellen, die von FADD^{-/-} Stammzellen generiert wurden oder eine dominant negativ wirkende Mutation von FADD exprimieren, fehlt das volle proliferative Potential auf antigene Stimulation (Zhang et al., 2001; Hueber et al., 2000). Zusammengenommen deutet dies auf eine Doppelrolle des FADD-Moleküls hin, also eine Beteiligung an sowohl apoptotischen, als auch proliferativen Prozessen. Zudem konnte gezeigt werden, dass FADD-defiziente, periphere T-Zellen eine normale Degradation des Cdk-Inhibitors p27 zeigten, aber eine erhöhte Menge an p21(Waf1/Cip1) sowie eine Reduktion von Cyclin D₂ aufwiesen (Zhang et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der FADD-DN-überexprimierende NIH3T3 Klon im Vergleich zu der mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle langsamer proliferiert (**Abb. 1**). Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen von Hueber et.al. (1999), die zeigten, dass eine dominant negativ wirkende FADD-Mutation die Proliferation sowie die Mobilisierung von Calcium auch in Fibroblasten inhibiert.

In der vorliegenden Arbeit ergab eine Analyse der Expression verschiedener Zellzyklusproteine, dass einige Proteine (Cycline A, B₁, D₁, p18) in FADD-DN-überexprimierenden Zellen nicht anders als in Kontrollzellen reguliert wurden (**Abb. 2**). Dagegen waren sowohl p21 als auch p27 und bedingt auch Cdk1 im NIH3T3 FADD-DN Klon hochreguliert. Da Cdk1 als Kinase an der Progression des Zellzyklus beteiligt ist, überraschte dieses Ergebnis zunächst. Allerdings muss eine erhöhte Cdk-Expression nicht zwangsläufig mit einer verstärkten Kinaseaktivität gekoppelt sein. Um diese eher unerwartete Beobachtung näher zu charakterisieren, könnte man durch einen Cdk1-Kinase-Assay untersuchen, ob das hohe Cdk1-Expressionsniveau mit einer erhöhten Kinase-Aktivität einhergeht. Die erhöhte Expression der Cdk-Inhibitoren p21 und p27 könnte Teil der Ursache für die beobachtete Wachstumsverzögerung sein. Chen et al. (2002) konnten nachweisen, dass p21-transduzierte NIH3T3 Zellen eine beta-Galaktosidase-Aktivität bei pH 6,0 zeigten, ein Merkmal für die Zellseneszenz. Medcalf et al. (1996) relativierten dieses Kriterium dahingehend, dass sie eine von p21 unabhängige Seneszenz in humanen Fibroblasten beschrieben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch p27 in seneszenten

Fibroblasten akkumuliert vorliegt (Wagner et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte durch eine X-Gal-Färbung keine vermehrte β -Galaktosidase-Aktivität bei pH 6,0 in FADD-DN-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Der Wachstumsdefekt und das frühe Sterben der Zellen wird damit vermutlich durch einen anderen Mechanismus verursacht.

4.2 Auswirkungen der Inhibition von Caspasen auf die Proliferation von T-Zellen

Die Beteiligung des FADD/Caspase-Signalweges an proliferativen Signalen wurde kontrovers diskutiert, bis zwei Veröffentlichungen *in vivo* Daten zeigten, dass ein Fehlen von Caspase-8 zu einer defekten T-Zellproliferation führte (Chun et al., 2002; Salmena et al., 2003). Daher wurde die Arbeit dahingehend erweitert, dass gereinigte PBMZ bzw. T-Zellen aus gesunden Spendern in die Untersuchungen miteinbezogen wurden. Zur Prüfung der Reinheit bzw. der prozentualen Zusammensetzung der jeweiligen Populationen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Diese ergab die typische prozentuale Zusammensetzung der PBMZ Mischkultur. Darüberhinaus wurde nach magnetischer Negativ-Selektion ein Reinheitsgrad der T-Zellen von 98 % ($CD3^+$) erzielt, was der vom Hersteller angegebenen Effizienz entspricht.

PBMZ bzw. hochreine T-Zellen wurden für die meisten Versuche mit agonistischen Antikörpern (anti-CD3 mAk bzw. anti-CD3/CD28 mAk) zum Wachstum angeregt. Somit wurden auch in Experimenten, die mit PBMZ durchgeführt wurden, lediglich CD3-positive T-Zellen aktiviert. Da in diesem Fall jedoch potentiell kostimulatorisch wirkende Zellen (Monozyten, B-Zellen) das anti-CD3-Signal verstärkten, wurde auf eine Kostimulation (anti-CD28 mAk) verzichtet. Unstimulierte PBMZ zeigten im Gegensatz zu hochreinen T-Zellen eine gewisse Basisproliferation, die vermutlich auf die genannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zurückzuführen ist. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Ergebnisreproduktion in gereinigten T-Zellen. Um die Auswirkungen aktiver Caspasen auf die Proliferation zu untersuchen, fand hauptsächlich der Breitband-Caspase-Inhibitor zVAD.fmk Verwendung. Dieser Inhibitor gilt als Caspase-spezifisch, obwohl eine inhibitorische Wirkung auch auf die Proteasen Cathepsin B und H beschrieben wurde (Schotte et al., 1999). Für Cathepsine wurde allerdings keine Beteiligung an proliferativen Prozessen beschrieben. Trotzdem wurden die Proliferationstests mit einem Caspase-8-spezifischen Inhibitor (zIETD.fmk) reproduziert, um potentielle unspezifische Nebenwirkungen zu minimieren. Letzterer bewirkte bei vergleichbarer Konzentration sogar eine deutlichere Inhibition (**Abb. 5, Abb. 6**). Diese

Beobachtung widerspricht der Möglichkeit, dass der inhibitorische Effekt durch eine Blockierung anderer Enzyme als Caspasen hervorgerufen wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Kennedy et al. (1999), die zeigen konnten, dass sowohl zVAD.fmk als auch zIETD.fmk die Antigen-induzierte Proliferation von T-Zellen inhibierte. Im Gegensatz dazu hatten YVAD.cmk und DEVD.fmk, ein Caspase-1- bzw. ein Caspase-3-Blocker, keinen Effekt. In dieser Arbeit wurde als Kontrolle das fluorogene Caspasesubstrat zVAD.amc eingesetzt, welches ebenfalls keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von T-Zellen zeigte.

Verschiedene Subpopulationen muriner T-Zellen, die FADD dominant negativ überexprimierten, zeigten deutlich unterschiedliche Antworten auf die TZR-Stimulation. Während die Proliferation von CD4⁺ Zellen nur schwach reduziert war, zeigten CD8⁺ Zellen einen starken Wachstumsdefekt (Beisner et al., 2003). Da in dieser Arbeit so gut wie keine proliferative Antwort in Anwesenheit des Caspase-Blockers nachgewiesen werden konnte, erscheint es unwahrscheinlich, dass der Inhibitor nur einen moderaten Effekt auf die CD4⁺ Population ausübte. Vermutlich wurden alle CD3⁺ Zellen inhibiert.

Eine Caspase-3-Prozessierung konnte nach Aktivierung in unterschiedlichen T-Zell-Subtypen (CD4⁺, CD8⁺) inklusive Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO⁺) nachgewiesen werden (Alam et al., 1999). In dieser Arbeit konnten ebenfalls aktive Caspasen in T-Zellen nachgewiesen werden. Humane dendritische Zellen, die mit LPS stimuliert wurden, zeigten eine caspaseähnliche Aktivität, die offensichtlich zum Überleben benötigt wird (Franchi, 2003). Aber auch in B-Zellen konnte eine Verbindung zwischen Caspasen und nicht-apoptotischen Signalen demonstriert werden. Caspase-Aktivität erwies sich als unerlässlich für den Eintritt von B-Lymphozyten in den Zellzyklus (Olsen et al., 2003). B-Zellen von Patienten mit einer Mutation im Caspase-8-Gen zeigten eine defekte Aktivierung.

Ein möglicher Nachteil von frisch isolierten Blutlymphozyten gegenüber Zelllinien könnte sein, dass aufgrund wechselnder Blutspender potentielle donorspezifische Schwankungen auftreten können. Diese fielen jedoch eher gering aus, wie ein vergleichender Proliferationstest mit PBMZ von 10 verschiedenen Spendern zeigte. Sowohl die Proliferationsintensität als auch die durch zVAD.fmk-vermittelte Proliferationshemmung erwies sich als relativ einheitlich. Diese Inhibition war nicht auf eine Stimulation mit anti-CD3 mAk beschränkt, sondern fand auch statt, wenn Zellen mit den Mitogenen PHA und PMA/Ionomycin oder dem Antigen PPD aktiviert wurden (**Abb. 8-10**). PMA/Ionomycin haben möglicherweise auch einen aktivierenden Einfluss auf andere Zelltypen der PBMZ.

Durch Stimulation mit Tuberkulin wurde sichergestellt, dass in erster Linie PPD-spezifische Gedächtnis-T-Zellen zur Expansion angeregt wurden.

Die Notwendigkeit aktiver Caspasen an proliferativen Prozessen könnte auf starke antigene Stimuli limitiert sein, während schwache TZR-Stimulation zur Proliferation ohne Beteiligung von Caspasen führt (Boissonnas et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass ein starker Stimulus, der eine massive T-Zellproliferation hervorruft, auch schnell und effektiv terminiert werden muss, um keine Autoreaktivität zu begünstigen. In dieser Arbeit wurde oben beschriebene Hypothese durch eine anti-CD3-Titration untersucht (**Abb. 7**). Dabei stellte sich heraus, dass zVAD.fmk unabhängig von der anti-CD3 mAk Konzentration die Proliferation inhibierte, was gegen obige These sprechen würde. Jedoch verwendeten Boissonnas et al. MHC-präsentierte genetische Variationen des Tauben-Cytochroms C (PCC 88-104) zur Stimulation, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

Das Wachstum von Jurkat-T-Zellen wurde durch zVAD.fmk nicht inhibiert, was gegen einen unspezifisch cytotoxischen Effekt von zVAD.fmk spricht (Alam et al., 1999). Allerdings zeigten neuere Daten, dass ein Caspase-ähnliches Enzym (KIPase) an der Proliferation von Jurkat-Zellen beteiligt ist, welches durch zVAD.fmk nicht inhibierbar ist (Medina-Palazon et al., 2004). So könnte das Vorhandensein dieses Enzyms erklären, warum zVAD.fmk in diesem Zelltyp nicht zur Proliferationsinhibition führte.

4.3 Auswirkungen der Inhibition von Caspasen auf die Induktion des autokrinen IL-2/IL-2R-Systems

Wenn man Daten, die vom murinen System abgeleitet wurden, mit denen im humanen Modell vergleicht, scheint der molekulare Mechanismus zu differieren, der das FADD/Caspase-Signal mit der Proliferation koppelt. So ist der Grund für die reduzierte Proliferation von murinen T-Zellen nach Caspase-Inhibition vermutlich ein verstärkter Zelltod. Dabei bleibt die IL-2-Produktion intakt (Salmena et al., 2003; Zhang et al., 1998; Beisner., 2003; Newton et al., 2001; Mack et al., 2001). In humanen T-Zellen hingegen scheint die Inhibition von Caspasen eine negative Auswirkung auf den Fortlauf des Zellzyklus durch Inhibition des IL-2/IL-2R-Systems zu haben (Kennedy et al., 1999; Chun et al., 2002). Diese Unterschiede wurden intensiv diskutiert (Tibbets et al., 2003). Der positive Zusammenhang zwischen Caspasen und der Regulation des IL-2/IL-2R-Systems konnte in dieser Arbeit durch mehrere Befunde

bestätigt werden. (1) Die Zugabe von exogenem IL-2 konnte den durch zVAD.fmk vermittelten inhibitorischen Effekt teilweise aufheben (**Abb. 20, 21**). Im Mausmodell konnte dagegen weder durch Kostimulation noch durch exogenes IL-2 die Proliferationsinhibition von zVAD.fmk aufgehoben werden (Mack und Häcker 2002). Die Zugabe anderer Cytokine, die zu ihrer Reifung Caspaseaktivität benötigen (IL-1 β , IL-16, IL-18), hatte keinen rekonstitutiven Effekt. (2) Durch ELISAs konnte eine erhebliche Hemmung der IL-2-Freisetzung durch zVAD.fmk nach verschiedenen Stimuli nachgewiesen werden (**Abb. 22,23**). Diese Inhibition erfolgte offensichtlich auf transkriptionsebene, worauf das Resultat einer quantitativen RT-PCR schließen ließ (**Abb. 25**). Auch in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen war die IL-2-Sekretion stark herabgesetzt (**Abb. 28**). (3) Die Expression der regulatorischen IL-2R α -Untereinheit (CD25) war nach Caspase-Inhibition deutlich inhibiert (**Abb. 26C**). Die Expression des IL-2-Gens wird hauptsächlich durch die transkriptionsebene Aktivität von NF-AT, NF κ B, AP-1 und RE/AP reguliert (Jain et al., 1995). Die Expression von CD25 wird unter anderem ebenfalls durch NF-AT und NF κ B induziert und ist zusätzlich an die Sekretion von IL-2 gekoppelt. Nach Assoziation von IL-2 an die konstitutiv exprimierten Rezeptoruntereinheiten IL-2R β und IL-2R γ wird über Jak3 (Janus Kinase 3) die Aktivierung von Stat5 induziert, was zur verstärkten Transkription von IL-2R α (CD25) führt. Dieser autokrine Mechanismus liefert eine mögliche Erklärung, warum eine reduzierte IL-2-Produktion zur unvollständigen Expression von CD25 führte. In Patienten mit einer Mutation im Caspase-8-Gen war die Expression von CD25 ebenfalls stark beeinträchtigt (Chun et al., 2002). Diese Ergebnisse sprechen gegen die Befunde von Alam et al. (1999), die *in vitro* eine weniger deutliche Beeinträchtigung der CD25-Expression zeigten.

4.4 Regulation von Aktivierungsmarkern

Die Transkriptionsregulation von CD95 ist komplex und wird unter anderem durch AP-1 und NFAT beeinflusst. Über Faktoren, die an der Regulation von CDw137 beteiligt sind, ist weniger bekannt. Die CD95-Expression war nach Caspase-Inhibition signifikant reduziert, genauso wie die von CDw137. CDw137 war in T-Zellen von Patienten mit einer Punktmutation im Caspase-8-Gen nicht inhibiert (Chun et al., 2002).

Dagegen unterliegt die CD69-Expression einer ähnlichen Kontrolle wie IL-2 durch die Transkriptionsfaktoren NF-AT, NF κ B, AP-1, wird aber nicht durch RE/AP aktiviert. Warum bleibt die Expression von CD69 im Vergleich zu IL-2 nach Caspase-Inhibition auf gleichem Niveau? Eine einfache aber spekulative Antwort wäre, dass in Jurkat Zellen der einzige

drastische Unterschied in der Aktivität von RE/AP lag, wohingegen NF κ B nur moderat und NF-AT gar nicht beeinträchtigt war (**Abb. 29**). Dies würde eine CD69-Transkription erlauben, die von IL-2 aber verhindern. Jedoch sind zumindest im Falle des IL-2 noch zusätzliche, an der Transkriptionsregulation beteiligte Aktivator- bzw. Repressor-Proteine bekannt, die darüber hinaus für die Inhibition der IL-2-Expression verantwortlich sein könnten. Der Hochregulation des späten Aktivierungsmarkers HLA-DR war nach Caspase-Inhibition reduziert, ein Ergebnis, das konsistent mit den Daten von Alam et al. (1999) ist.

4.5 Regulation von Transkriptionsfaktoren in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen

Im Einklang mit den Ergebnissen, die eine reduzierte IL-2-Freisetzung zeigten, war auch die IL-2-Promotorabhängige Luciferaseaktivität in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen herabgesetzt (**Abb. 29A**). Die NF κ B-Aktivität war moderat reduziert, was in Übereinstimmung mit einer gewissen Inhibition der I κ B- α -Degradation nach zVAD.fmk Kostimulation in PBMZ ist (**Abb. 16**). Der einzige untersuchte Transkriptionsfaktor, der trotz defekter Caspase-8 keine reduzierte Aktivität aufwies, war NF-AT. Die transgene Expression einer FADD-Mutante in T-Zellen hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Aktivierung von NF-AT (Chaneva et al., 2004). Der deutlichste Unterschied zeigte sich für die Aktivität des RE/AP Elementes. Das Fehlen aktiver Caspase-8 bewirkte eine drastische Reduktion (**Abb. 29D**). Das RE/AP-Element ist aus zwei proximalen Promotor-Bindestellen zusammengesetzt, nämlich aus dem CD28 Response Element (RE) und einer AP-1-Bindesequenz. Trotz der Tatsache, dass sowohl p50 als auch RelA an CD28RE binden können, ist cRel der Hauptfaktor, der im RE/AP-spezifischen Komplex zu finden ist (Shapiro et al., 1997; McGuire und Lacobelli, 1997). Zudem konnte ein Heterodimer aus Jun und Fos am RE/AP-Komplex nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit der reduzierten RE/AP-abhängigen Luciferaseaktivität in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen zeigte sich eine schwächere Affinität von nukleärem cRel an seine spezifische Zielsequenz (**Abb. 30**). Die herausragende Bedeutung von cRel wird anhand eines Mausmodells klar. T-Zellen von c-rel Knock-out-Mäusen zeigten keine Reaktion auf antigene Stimulation. Exogenes IL-2 konnte diesen inhibitorischen Effekt aufheben (Kontgen et al., 1995).

Worin besteht nun der exakte molekulare Beitrag der Caspasen bei proliferativen Prozessen? Eine einfache, aber plausible Möglichkeit könnte man aus Erkenntnissen im Drosophila-Modell ableiten. Hier wurde ein alternativer Mechanismus zur NF κ B-Aktivierung beschrieben. Im Gegensatz zum Säugermodell wird die Aktivierung von Relish (NF κ B-

Protein) nicht über die Proteasom-vermittelte Degradation der I κ B-Untereinheit vermittelt. Stattdessen wird Relish über eine schnelle, signalabhängige Endoproteolyse durch die Caspase Dredd in zwei stabile Fragmente prozessiert. REL-68, welches eine Rel-homologe Domäne besitzt, transloziert in den Nukleus, während REL-49 mit einer I κ B-Domäne im Zytoplasma verbleibt (Stöven et al., 2003). Dredd ist homolog zur humanen Caspase-8. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für die Aktivierung von cRel möglich. Allerdings ist beschrieben worden, dass cRel nach Caspase-vermittelter Spaltung inaktiviert wird (Barkett et al., 2001). Deshalb sollte ein Fehlen funktionaler Caspase-8 nicht zur beobachteten Abnahme, sondern zu einer Verstärkung der cRel-Bindung führen. Der Grund für diesen Widerspruch ist bislang ungeklärt.

4.6 Differentielle Substratspaltung

Die durchflusszytometrische Messung des Umsatzes eines Caspase-3 spezifischen Substrates (PhiPhiLuxG₂D₂) bestätigte die Caspase-3-Aktivität in proliferierenden T-Zellen. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurden in Westernblots nach bereits 4 Stunden die für eine Aktivierung typischen Spaltprodukte aktiver Caspase-8 demonstriert, Caspase-3 hingegen verblieb nach 4 Stunden als ungespaltenes Proenzym (Kennedy et al., 1999). Daten einer anderen Veröffentlichung zeigten eine Korrelation der T-Zellaktivierung mit den aktiven Effektorcaspasen 3,6,7. Dagegen verblieben Caspasen 1,2,4 und 9 in ihrer inaktiven Form (Alam et al., 1999).

Warum sollten Caspasen an der Progression des Zellzyklus beteiligt sein? Eine Hypothese geht davon aus, dass Caspasen dem Zellzyklus zusätzliche Kontrollpunkte verleihen, um sicherzustellen, dass nur gesunde Zellen die Teilung beenden (Los et al., 2001). Los et al. postulieren weiter, dass FADD zur Bildung eines Caspase-8 aktivierenden Signalkomplexes führen könnte. Demnach wären eine oder mehrere aktive Caspasen für die proteolytische Inaktivierung eines hypothetischen Proteins verantwortlich, das den Mitoseeintritt verhindert. Eine substantielle Spaltung von Zellzyklusproteinen auf Grundlage der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse scheint jedoch unwahrscheinlich, da ein derartiger Mechanismus die Lokalisation aktiver Caspase-8 im Zellkern voraussetzen würde. Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen konnte jedoch eine ausschließliche zytoplasmatische Lokalisation aktiver Caspasen-3 und -8 nachgewiesen werden (**Abb. 18**), ein Befund, der gegen die obige Hypothese spricht. Damit geht die Beobachtung einher, dass das p23 Spaltprodukt von p27^{KIP1} in apoptotischen Jurkat Zellen aber nicht in proliferativen T-Zellen

nachweisbar war (**Abb. 12** und Daten nicht gezeigt). Das Retinoblastom-Protein wird im Zuge der Apoptose durch Spaltung inaktiviert (Jänicke et al., 1996). In Lysaten proliferierender T-Zellen blieb das RB-Protein jedoch intakt (**Abb. 13**). Nach Caspase-Inhibition waren eine Vielzahl von Zellzyklusproteinen fehlreguliert, eine Tatsache, die auf eine allgemeinere Bedeutung von Caspasen bei der Proliferation hindeutet als lediglich die Spaltung eines Zellzyklusinhibitors. Konsistent mit den Ergebnissen zur Caspase-8-Lokalisation waren Befunde von O'Reilly et al. (2004), wonach FADD und Caspase-8 als Kappe an oder in der Nähe der Zytoplasmamembran von aktivierten T-Zellen detektierbar waren, was im Einklang mit der Rekrutierung an einen Rezeptorkomplex war. FADD unterging einer nicht näher charakterisierten posttranslationalen Modifikation nach mitogener, aber nicht Fas-Stimulation. Diese Unterschiede bezüglich der Modifikationen könnten bestimmen ob Proliferation oder Zelltod induziert wird.

Cau et al. (2004) konnten nachweisen, dass der E2F-1 Transkriptionsfaktor die Expression von Caspase-8 induziert, was zur Folge hat, dass T-Zellen in der S-Phase besonders empfänglich für den Aktivierungs-induzierten Zelltod sind. Diese Beobachtung verbindet Zellzyklus und Apoptose. Diese beiden Prozesse können also nicht strikt getrennt voneinander betrachtet werden. Ein weiterer Beleg für eine solche Verbindung lieferten Mendelson et al.(2002), die zeigen konnten, dass die Effektor-Caspase-2 durch Interaktion mit Cyclin D3 aktiviert wird.

Obwohl die Caspase-vermittelte Aktivierung der katalytischen Domäne der Phosphatase Calcineurin zur Aktivierung von NF-AT beitragen kann (Mukerjee et al., 2001), war die NF-AT-Aktivierung in Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen nicht herabgesetzt (**Abb. 29 B**).

Die bei der T-Zellaktivierung relevante Protein Kinase C theta (PKC θ) wird im Zuge der Apoptoseinduktion von Caspase-3 gespalten und dadurch aktiviert (Datta et al., 1997). Demnach könnte eine fehlende Aktivierung von PKC θ zu der in dieser Arbeit beobachteten Abnahme der NF κ B-Aktivität im Caspase-8-defizienten Jurkat Klon und zur fehlenden I κ B- α Degradation in PBMZ nach Caspase-Inhibition führen.

Der Nachweis aktiver Caspasen unter proliferativen Bedingungen wirft eine weitere Frage auf. Warum wird nach Aktivierung der Caspasen nicht das apoptotische Programm exekutiert, welches innerhalb weniger Stunden unwiderruflich zur Desintegration und zum Selbstmord der Zelle führen müsste? Diese Frage konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Eine Antwort könnte in der strikten Anordnung aktiver Caspasen in spezifischen subzellulären

Kompartimenten liegen. Dies würde dazu führen, dass in sich teilenden Zellen nur bestimmte Substrate zugänglich sind. In apoptotischen Zellen hingegen kommt es zu drastischen strukturellen Veränderungen, zur Auflösung der Organellen, der Kernmembran, und zur Depolymerisierung des Cytoskeletts. Mit abnehmender Integrität der Zelle können somit für die Apoptose relevante Substrate für Caspasen erreichbar sein. Die in dieser Arbeit gezeigte auffällige Caspase-3-Anordnung deutet möglicherweise auf eine Assoziation mit membrangebundenen Proteinen hin (**Abb. 19**). Caspase-8 scheint dagegen diffuser verteilt zu sein, jedoch ebenfalls klar außerhalb des Nukleus. Dies steht im Gegensatz zu z.B. apoptotischen PBMZ bzw. Jurkat Zellen, in denen Caspase-8 in der gesamten Zelle verteilt vorlag (**Abb. 18A**). Dies würde auch die Beobachtung erklären, dass Substrate wie DFF45 (DNA fragmentation factor) oder RFC140 (Replicationfactor C) in proliferativen T-Zellen trotz aktiver Caspasen nicht geschnitten werden, während sie in apoptotischen Zellen gespalten und damit aktiviert werden (Alam et. al., 1999). Eine Spaltung von DFF45 und RC140 würde zur Inhibition der DNA-Replikation und zur Fragmentierung genomischer DNA führen, zweier Prozesse, die definitiv nicht kompatibel mit der T-Zellproliferation sind. Zusammengefasst könnte eine selektive Substratprozessierung in nicht-apoptotischen Zellen erklären, warum T-Zellen trotz aktiver Caspasen überleben und proliferieren.

4.7 Caspase-Inhibition in Monozyten

In dieser Arbeit wurde ein blockierender Effekt der Caspase-Inhibition auf die TNF-Freisetzung gereinigter Monozyten festgestellt. Die Annahme, dass auch die Aktivierung der Monozyten bei den Experimenten mit der PBMZ-Mischpopulationen blockiert war, könnte die ausgeprägtere Proliferationsinhibition im Vergleich zu gereinigten T-Zellen erklären. Da zVAD.fmk als Breitspektrum-Caspase-Inhibitor auch Caspase-1 blockiert, könnte die fehlende IL-1 β Sekretion und der damit unterbrochene Signalweg über IL-1R zum beobachteten inhibitorischen Effekt von zVAD.fmk auf die TNF-Freisetzung führen. Die Cytokin-Freisetzung humaner Monozyten als Antwort auf anti-Fas oder LPS-Stimulation kann durch Caspaseblocker inhibiert werden. Jedoch hatte die spezifische Inhibition des IL-1 β -Signalwegs keine Konsequenzen für die Freisetzung von Zytokinen (Park et al., 2003). Nach 16-stündiger LPS-Stimulation war eine signifikante Anzahl toter Zellen detektierbar, wenn eine zVAD.fmk-Konzentration von 100 μ M eingesetzt wurde. Bei der hier verwendeten Konzentration von 30 μ M zVAD.fmk war jedoch kein signifikantes Sterben der Zellen zu erkennen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass Zelltod der Grund für die reduzierte Cytokin-Freisetzung war.

4.8 Ausblicke

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Caspasen bei der Antigen-vermittelten T-Zellproliferation untersucht. Die produzierten Daten unterstützen zum einen vorangegangene Studien, laut derer Caspasen essentiell an der Antigen-induzierten T-Zellproliferation beteiligt sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Caspase-Inhibition in Wildtyp-T-Zellen bzw. Caspase-8-Defizienz in einer Jurkat-T-Zelllinie zur Störung des autokrinen IL-2/IL-2R-Systems führt. Grund scheint eine abgeschwächte IL-2-Promotoraktivität zu sein. So war die Aktivität des Elementes RE/AP besonders stark herabgesetzt. In zukünftigen Arbeiten könnten nun die molekularen Mechanismen des Caspase-Beitrages an proliferativen Prozessen eingehender untersucht werden. So könnte versucht werden, die nukleäre Translokation von cRel nach Aktivierung in Gegenwart bzw. Abwesenheit von zVAD.fmk zu untersuchen. Dies könnte durch Immunfluoreszenz- oder Western Blot-Analyse der cRel-Menge nukleärer- und cytosolischer Fraktionen geschehen. Entsprechend würde eine genauere Lokalisationsanalyse aktiver Caspasen auf potentiell relevante Substrate unter Wachstumsbedingungen schließen lassen. Eine differentielle Genanalyse (Mikroarrays) könnte Unterschiede in der Genexpression proliferierender und durch zVAD.fmk inhibierter Zellen aufdecken. Besonders auffällig regulierte Gene könnten näher analysiert werden.

Darüberhinaus wäre es interessant, die Auswirkungen einer Caspase-Blockierung auf weitere hämatopoetische Zelltypen zu untersuchen. Denn offensichtlich ist ein Beitrag von Caspasen an nicht-apoptotischen Prozessen nicht auf T-Lymphozyten beschränkt. Daten dieser Arbeit in Bezug auf die Aktivierung von Monozyten sprechen ebenfalls für eine allgemeinere Bedeutung von Caspasen in verschiedenen Zelltypen.

Caspase-Aktivität ist essentiell für zwei offensichtlich entgegengesetzte Prozesse, nämlich Proliferation und Apoptose, in ein und demselben Zelltyp. Das genauere Verständnis der exakten molekularen Rolle von Caspasen bei nicht-apoptotischen Signalwegen in der Zelle wird Aufschluss geben über die Regulation von Zelltod und Apoptose nach TZR-Stimulation.

5. LITERATUR

Aggarwal B.B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 745-756.

Alderson M.R., Smith C.A., Tough T.W., Davis-Smith T., Armitage R.J., Falk B., Roux E., Baker E., Sutherland G.R., & Din W.S. (1994) Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur.J.Immunol.* **24**, 2219-2227.

Alderson M.R., Tough T.W., Davis-Smith T., Braddy S., Falk B., Schooley K.A., Goodwin R.G., Smith C.A., Ramsdell F., & Lynch D.H. (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **181**, 71-77.

Algeciras-Schimmich A., Barnhart B.C., & Peter M.E. (2002) Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr.Opin.Cell Biol.* **14**, 721-726.

Alnemri E.S. (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J.Cell Biochem.* **64**, 33-42.

Assoian R.K. & Zhu X. (1997) Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 93-98.

Barkett M., Dooher J.E., Lemonnier L., Simmons L., Scarpati J.N., Wang Y., & Gilmore T.D. (2001) Three mutations in v-Rel render it resistant to cleavage by cell-death protease caspase-3. *Biochim.Biophys.Acta* **1526**, 25-36.

Beisner D.R., Chu I.H., Arechiga A.F., Hedrick S.M., & Walsh C.M. (2003) The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T cell activation and survival. *J.Immunol.* **171**, 247-256.

Blangy A., Lane H.A., d'Herin P., Harper M., Kress M., & Nigg E.A. (1995) Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **83**, 1159-1169.

Boissonnas A., Bonduelle O., Lucas B., Debre P., Autran B., & Combadiere B. (2002) Differential requirement of caspases during naive T cell proliferation. *Eur.J.Immunol.* **32**, 3007-3015.

Boyce M., Degterev A., & Yuan J. (2004) Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ.* **11**, 29-37.

Budd R.C. (2002) Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J.Clin.Invest* **109**, 437-441.

Cao Q., Xia Y., Azadniv M., & Crispe I.N. (2004) The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J.Immunol.* **173**, 1111-1117.

Carnero A. & Hannon G.J. (1998) The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **227**, 43-55.

- Chaneva S., Schneider G., Siegmund D., Wajant H., Mages J., & Hacker G. (2004) Enhanced basal AP-1 activity and de-regulation of numerous genes in T cells transgenic for a dominant interfering mutant of FADD/MORT1. *Eur.J.Immunol.* **34**, 3006-3015.
- Chen X., Zhang W., Gao Y.F., Su X.Q., & Zhai Z.H. (2002) Senescence-like changes induced by expression of p21(waf1/Cip1) in NIH3T3 cell line. *Cell Res.* **12**, 229-233.
- Clayton L.K., Ghendler Y., Mizoguchi E., Patch R.J., Ocain T.D., Orth K., Bhan A.K., Dixit V.M., & Reinherz E.L. (1997) T-cell receptor ligation by peptide/MHC induces activation of a caspase in immature thymocytes: the molecular basis of negative selection. *EMBO J.* **16**, 2282-2293.
- Clem R.J., Fechheimer M., & Miller L.K. (1991) Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**, 1388-1390.
- Cohen G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* **326**, 1-16.
- Cruikshank W.W., Kornfeld H., & Center D.M. (2000) Interleukin-16. *J.Leukoc.Biol.* **67**, 757-766.
- Datta R., Kojima H., Yoshida K., & Kufe D. (1997) Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 20317-20320.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., & Reed J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.
- Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K.M., & Krammer P.H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438-441.
- Earnshaw W.C., Martins L.M., & Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 383-424.
- Ekert P.G., Silke J., & Vaux D.L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* **6**, 1081-1086.
- Elkon K.B. (1999) Caspases. Multifunctional proteases. *J.Exp.Med.* **190**, 1725-1728.
- Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D., & Hunt T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.
- Fischer U., Janicke R.U., & Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* **10**, 76-100.
- Franchi L., Condo I., Tomassini B., Nicolo C., & Testi R. (2003) A caspase-like activity is triggered by LPS and is required for survival of human dendritic cells. *Blood* **102**, 2910-2915.
- Gomyo Y., Ikeda M., Osaki M., Tatebe S., Tsujitani S., Ikeguchi M., Kaibara N., & Ito H. (1997) Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* **79**, 2067-2072.
- Green D.R., Droin N., & Pinkoski M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol.Rev.* **193**, 70-81.

- Greenberg A.H. (1996) Granzyme B-induced apoptosis. *Adv.Exp.Med.Biol.* **406**, 219-228.
- Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., & Harris C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* **54**, 4855-4878.
- Greenfield E.A., Nguyen K.A., & Kuchroo V.K. (1998) CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev.Immunol.* **18**, 389-418.
- Harper J.W., Elledge S.J., Keyomarsi K., Dynlacht B., Tsai L.H., Zhang P., Dobrowolski S., Bai C., Connell-Crowley L., Swindell E., & . (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol.Biol.Cell* **6**, 387-400.
- Herwig S. & Strauss M. (1997) The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur.J.Biochem.* **246**, 581-601.
- Hoffmann I., Clarke P.R., Marcote M.J., Karsenti E., & Draetta G. (1993) Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* **12**, 53-63.
- Hood L., Kronenberg M., & Hunkapiller T. (1985) T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* **40**, 225-229.
- Hueber A.O., Zornig M., Bernard A.M., Chautan M., & Evan G. (2000) A dominant negative Fas-associated death domain protein mutant inhibits proliferation and leads to impaired calcium mobilization in both T-cells and fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **275**, 10453-10462.
- Janicke R.U., Walker P.A., Lin X.Y., & Porter A.G. (1996) Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* **15**, 6969-6978.
- Jorgensen K.A., Koefoed-Nielsen P.B., & Karamperis N. (2003) Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand.J.Immunol.* **57**, 93-98.
- Juo P., Kuo C.J., Yuan J., & Blenis J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr.Biol.* **8**, 1001-1008.
- Kanduc D., Mittelman A., Serpico R., Sinigaglia E., Sinha A.A., Natale C., Santacroce R., Di Corcia M.G., Lucchese A., Dini L., Pani P., Santacroce S., Simone S., Bucci R., & Farber E. (2002) Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int.J.Oncol.* **21**, 165-170.
- Kane L.P. & Weiss A. (2003) The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3. *Immunol.Rev.* **192**, 7-20.
- Kang T.B., Ben Moshe T., Varfolomeev E.E., Pewzner-Jung Y., Yogevev N., Jurewicz A., Waisman A., Brenner O., Haffner R., Gustafsson E., Ramakrishnan P., Lapidot T., & Wallach D. (2004) Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J.Immunol.* **173**, 2976-2984.
- Karin M. & Delhase M. (2000) The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin.Immunol.* **12**, 85-98.

- Karin M., Liu Z., & Zandi E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 240-246.
- Karin M., Yamamoto Y., & Wang Q.M. (2004) The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat.Rev.Drug Discov.* **3**, 17-26.
- Kaufmann S.H. (1989) Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* **49**, 5870-5878.
- Kennedy N.J., Kataoka T., Tschopp J., & Budd R.C. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. *J.Exp.Med.* **190**, 1891-1896.
- Kim S.O., Ono K., Tobias P.S., & Han J. (2003) Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J.Exp.Med.* **197**, 1441-1452.
- Klas C., Debatin K.M., Jonker R.R., & Krammer P.H. (1993) Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int.Immunol.* **5**, 625-630.
- Kontgen F., Grumont R.J., Strasser A., Metcalf D., Li R., Tarlinton D., & Gerondakis S. (1995) Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* **9**, 1965-1977.
- Koretzky G.A. & Myung P.S. (2001) Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 95-107.
- Krammer P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamkanfi M., Declercq W., Kalai M., Saelens X., & Vandenabeele P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* **9**, 358-361.
- Lee J.C. & Adams J.L. (1995) Inhibitors of serine/threonine kinases. *Curr.Opin.Biotechnol.* **6**, 657-661.
- Leo A. & Schraven B. (2001) Adapters in lymphocyte signalling. *Curr.Opin.Immunol.* **13**, 307-316.
- Lin J. & Weiss A. (2001) T cell receptor signalling. *J.Cell Sci.* **114**, 243-244.
- Lin J.X. & Leonard W.J. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* **19**, 2566-2576.
- Los M., Stroh C., Janicke R.U., Engels I.H., & Schulze-Osthoff K. (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* **22**, 31-34.
- Luschen S., Ussat S., Scherer G., Kabelitz D., Adam-Klages S. (2002) Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of fas-associated death domain protein (FADD)/caspase signaling. Requirement of cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **275**, 24670-24678.

- Ma A., Boone D.L., & Lodolce J.P. (2000) The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J.Exp.Med.* **191**, 753-756.
- Mack A. & Hacker G. (2002) Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T cells. *Eur.J.Immunol.* **32**, 1986-1992.
- McGuire K.L. & Iacobelli M. (1997) Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells. *J.Immunol.* **159**, 1319-1327.
- McNulty S.E., del Rosario R., Cen D., Meyskens F.L., Jr., & Yang S. (2004) Comparative expression of NFkappaB proteins in melanocytes of normal skin vs. benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Res.* **17**, 173-180.
- Medcalf A.S., Klein-Szanto A.J., & Cristofalo V.J. (1996) Expression of p21 is not required for senescence of human fibroblasts. *Cancer Res.* **56**, 4582-4585.
- Medina-Palazon C., Bernard E., Frost V., Morley S., & Sinclair A.J. (2004) KIPase activity is a novel caspase-like activity associated with cell proliferation. *Eur.J.Biochem.* **271**, 2716-2723.
- Mendelsohn A.R., Hamer J.D., Wang Z.B., & Brent R. (2002) Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 6871-6876.
- Michel F. & Acuto O. (2002) CD28 costimulation: a source of Vav-1 for TCR signaling with the help of SLP-76? *Sci.STKE.* **2002**, E35.
- Miller C. & Koeffler H.P. (1993) P53 mutations in human cancer. *Leukemia* **7 Suppl 2**, S18-S21.
- Milon G., Marchal G., Seman M., & Truffa-Bachi P. (1981) A delayed-type hypersensitivity reaction initiated by a single T lymphocyte. *Agents Actions* **11**, 612-614.
- Mitsiades C.S., Mitsiades N., & Koutsilieris M. (2004) The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr.Cancer Drug Targets.* **4**, 235-256.
- Monks C.R., Kupfer H., Tamir I., Barlow A., & Kupfer A. (1997) Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* **385**, 83-86.
- Mukerjee N., McGinnis K.M., Gnegy M.E., & Wang K.K. (2001) Caspase-mediated calcineurin activation contributes to IL-2 release during T cell activation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **285**, 1192-1199.
- Newton K., Harris A.W., Bath M.L., Smith K.G., & Strasser A. (1998) A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* **17**, 706-718.
- O'Reilly L.A., Divisekera U., Newton K., Scalzo K., Kataoka T., Puthalakath H., Ito M., Huang D.C., & Strasser A. (2004) Modifications and intracellular trafficking of

FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ.* **11**, 724-736.

Okamoto K. & Beach D. (1994) Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J.* **13**, 4816-4822.

Olson N.E., Graves J.D., Shu G.L., Ryan E.J., & Clark E.A. (2003) Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. *J.Immunol.* **170**, 6065-6072.

Oren H., Ozkal S., Gulen H., Duman M., Ucar C., Atabay B., Yilmaz S., Kargi A., & Irken G. (2002) Autoimmune lymphoproliferative syndrome: report of two cases and review of the literature. *Ann.Hematol.* **81**, 651-653.

Paggi M.G., Baldi A., Bonetto F., & Giordano A. (1996) Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review. *J.Cell Biochem.* **62**, 418-430.

Park D.R., Thomsen A.R., Frevert C.W., Pham U., Skerrett S.J., Kiener P.A., & Liles W.C. (2003) Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J.Immunol.* **170**, 6209-6216.

Peng J., Marshall N.F., & Price D.H. (1998) Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J.Biol.Chem.* **273**, 13855-13860.

Pham C.T. & Ley T.J. (1997) The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Semin.Immunol.* **9**, 127-133.

Pines J. (1991) Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ.* **2**, 305-310.

Polyak K., Lee M.H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., & Massague J. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66.

Rao A., Luo C., & Hogan P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 707-747.

Ray C.A., Black R.A., Kronheim S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R., Salvesen G.S., & Pickup D.J. (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* **69**, 597-604.

Renno T., Hahne M., Tschopp J., & MacDonald H.R. (1996) Peripheral T cells undergoing superantigen-induced apoptosis in vivo express B220 and upregulate Fas and Fas ligand. *J.Exp.Med.* **183**, 431-437.

Reth M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-384.

Salmena L., Lemmers B., Hakem A., Matysiak-Zablocki E., Murakami K., Au P.Y., Berry D.M., Tambllyn L., Shehabeldin A., Migon E., Wakeham A., Bouchard D., Yeh W.C., McGlade J.C., Ohashi P.S., & Hakem R. (2003) Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev.* **17**, 883-895.

Schotte P., Declercq W., Van Huffel S., Vandenabeele P., & Beyaert R. (1999) Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett.* **442**, 117-121.

- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., & Peter M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur.J.Biochem.* **254**, 439-459.
- Sedwick C.E. & Altman A. (2004) Perspectives on PKC θ in T cell activation. *Mol.Immunol.* **41**, 675-686.
- Shapiro V.S., Truitt K.E., Imboden J.B., & Weiss A. (1997) CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites. *Mol.Cell Biol.* **17**, 4051-4058.
- Sherr C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551-555.
- Smith C.A., Farrah T., & Goodwin R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962.
- Stennicke H.R. & Salvesen G.S. (1999) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* **6**, 1054-1059.
- Stoven S., Silverman N., Junell A., Hedengren-Olcott M., Erturk D., Engstrom Y., Maniatis T., & Hultmark D. (2003) Caspase-mediated processing of the Drosophila NF-kappaB factor Relish. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 5991-5996.
- Thome M. & Tschopp J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 50-58.
- Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Timkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P., Chapman K.T., & Nicholson D.W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 17907-17911.
- Tibbetts M.D., Zheng L., & Lenardo M.J. (2003) The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat.Immunol.* **4**, 404-409.
- Trinchieri G., Rengaraju M., D'Andrea A., Valiante N.M., Kubin M., Aste M., & Chehimi J. (1993) Producer cells of interleukin-12. *Immunol.Today* **14**, 237-238.
- Uren A.G., O'Rourke K., Aravind L.A., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V., & Dixit V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol.Cell* **6**, 961-967.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., & Berneman Z.N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131-149.
- Wagner M., Hampel B., Hutter E., Pfister G., Krek W., Zwerschke W., & Jansen-Durr P. (2001) Metabolic stabilization of p27 in senescent fibroblasts correlates with reduced expression of the F-box protein Skp2. *Exp.Gerontol.* **37**, 41-55.
- Wang J. & Lenardo M.J. (2000) Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J.Cell Sci.* **113 (Pt 5)**, 753-757.

Wang S.L., Hawkins C.J., Yoo S.J., Muller H.A., & Hay B.A. (1999) The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* **98**, 453-463.

Yeh W.C., Pompa J.L., McCurrach M.E., Shu H.B., Elia A.J., Shahinian A., Ng M., Wakeham A., Khoo W., Mitchell K., El Deiry W.S., Lowe S.W., Goeddel D.V., & Mak T.W. (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954-1958.

Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H., & Winoto A. (1998a) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**, 296-300.

Zhang J., Kabra N.H., Cado D., Kang C., & Winoto A. (2001) FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery. *J.Biol.Chem.* **276**, 29815-29818.

Zhang Y., Center D.M., Wu D.M., Cruikshank W.W., Yuan J., Andrews D.W., & Kornfeld H. (1998b) Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J.Biol.Chem.* **273**, 1144-1149.

Zusammenfassung

Für die Familie der proapoptotischen Caspasen ist seit einiger Zeit eine zusätzliche Beteiligung an proliferativen Prozessen gezeigt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Bedeutung des FADD/Caspase-Signalweges beim Wachstum muriner Fibroblasten charakterisiert. Die Überexpression einer dominant-negativ wirkenden FADD-Mutante führte zu einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit muriner Fibroblasten. Die Analyse der Expression von Zellzyklusproteinen zeigte, dass die Cdk-Inhibitoren p21 und p27 im Vergleich zu Wildtypzellen hochreguliert vorlagen.

Zudem wurden Untersuchungen zum molekularen Beitrag von Caspasen bei der Mitogen-vermittelten Proliferation humaner T-Lymphocyten durchgeführt. Experimente mit humanen T-Zellen, die mit Mitogenen stimuliert wurden, zeigten eine stark reduzierte Proliferation, wenn gleichzeitig die Caspasen mit pharmakologischen Inhibitoren in ihrer Aktivität blockiert waren. Caspase-Inhibition bewirkte einen G₁-Zellzyklusarrest und eine Fehlregulation von Zellzyklusproteinen. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnten aktive Caspasen in proliferierenden, nicht-apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Proliferationstests legten einen positiven Beitrag von Caspasen am autokrinen IL-2/IL-2R System nahe. So konnte die Zugabe exogenen IL-2 die zVAD.fmk-vermittelte Proliferationsinhibition teilweise aufheben. In diesem Zusammenhang zeigte sich eine deutliche Reduktion der Aktivierungs-induzierten IL-2 Produktion von T-Zellen, in denen Caspasen inhibiert waren. Ebenso zeigten Jurkat T-Zellen, denen funktionale Caspase-8 fehlte, eine drastisch reduzierte IL-2 Sekretion. Diese Inhibition erfolgte auf transkriptioneller Ebene, was anhand einer quantitativen RT-PCR gezeigt werden konnte. Experimente in Jurkat T-Zellen, die mit Luciferase-Reporterkonstrukten transfiziert wurden, ergaben, dass die transkriptionelle Aktivität der Promotorelemente NFκB und RE/AP im Caspase-8 defizienten Subklon reduziert war. Konsistent mit dieser Beobachtung war, dass die Menge des an ein RE/AP Oligonukleotid gebundenen cRel in Caspase-8 defizienten Zellen geringer war als im Wildtyp. Zusammengefasst führte Caspase-Inhibition bzw. Caspase-8-Defizienz zu einer Fehlregulation der meisten Zellzyklusproteine und des IL-2/IL-2R Systems. Dadurch bedingt zeigten Zellen einen Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus und konnten *in vitro* nicht auf mitogene Stimulation reagieren.

Experimente mit humanen Monozyten zeigten, dass Caspase-Inhibition zu einer Reduktion der Aktivierungs-induzierten TNF-Freisetzung führte. Caspasen könnten demnach zur Zytokinproduktion in diesen Zellen beitragen.

Summary

Recently the proapoptotic caspase family has been described to be involved also in proliferative processes. Initially, in in this work, the relevance of the FADD/Caspase signaling pathway for cell growth was investigated using murine fibroblasts. Expression of a dominant-negative FADD mutant caused a reduced growth rate of these cells compared to the wildtype. Analysis of cell cycle proteins revealed an upregulation of Cdk-Inhibitors p21 and p27.

Subsequently the molecular contribution of caspases during mitogen-induced proliferation of human T lymphocytes was characterized. Experiments using human T cells showed an impaired proliferative response of mitogen-activated T cells, when caspase activity was blocked by pharmacological inhibitors. Moreover, caspase inhibition led to a G₁-cell cycle arrest of cells and caused inappropriate regulation of cell cycle-associated proteins. Active caspases could be detected in non-apoptotic proliferating cells by immunofluorescence staining. Proliferation assays implicated a positive contribution of caspases to the autocrine IL-2/IL-2R system, since exogenous IL-2 could partially revert the proliferative defects mediated by caspase inhibitors. Along those lines, caspase inhibition caused a strong reduction in the activation-induced IL-2 secretion of primary T cells. Jurkat T cells lacking functional caspase-8 also exhibited a disability to produce physiological amounts of IL-2. This inhibition occurred at the transcriptional level as shown by quantitative RT-PCR. Luciferase-reporter assays using the human T cell line Jurkat revealed an impaired transcriptional activity of NF κ B and the composite RE/AP element within the IL-2 promoter. Consistent with this observation, the nuclear binding of cRel to its specific recognition sequence was reduced in the subclone lacking functional caspase-8. Taken together, caspase inhibition or caspase-8 deficiency respectively caused a misregulation of the cell cycle and a disruption of the IL-2/IL-2 receptor system. Therefore cells were not capable of responding adequately to mitogenic stimuli.

Finally, caspases might be involved in activation-induced cytokine production of human monocytes, since caspase inhibition led to a reduced TNF secretion after stimulation with bacterial antigens.

DANKSAGUNG

Bei Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus möchte ich mich ausdrücklich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Bosch danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Meinen herzlichen Dank möchte ich an PD Dr. Sabine Adam richten, für ihre immerwährende Ansprechbarkeit, die gute Betreuung dieser Arbeit, die vielen fachlichen Gespräche sowie für ihren Anteil an der positiven Arbeitsatmosphäre.

Dem Direktor des Instituts für Immunologie, Herrn Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsraumes, sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Unterstützung.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich Sandra Ussat aussprechen, die meine Arbeit immer auf die freundlichste Weise unterstützt, und einen erheblichen Anteil an der positiven Laboratmosphäre hat. Ebenso danke ich herzlichst Gudrun Scherer für ihre nette Unterstützung. Ich danke meinen Kollegen Ulf, Silke und Maren für das freundschaftliche Verhältnis.

Mein Dank gilt weiterhin der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Adam.

Danke Heike, Lutz, Arne, Susan, Eva, Sabine und Dieter für die schöne, wenn auch arbeitsintensive Zeit.

Danke Marten für die Hilfe mit dem LSM!

Danke Jens und Marten für die fachlichen Gespräche und das freundschaftliche Verhältnis.

Bei PD Dr. Ottmar Janssen möchte ich mich sehr für die vielen Diskussionen bedanken und insbesondere für die unschätzbare Hilfe bei der Kontaktaufnahme nach Übersee!!

Ich danke meiner Familie für den starken Rückhalt.

Mein größter Dank gilt Dir, Annika, nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern vielmehr für die große Geduld und den Beistand in den schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit. Danke!

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Falk, M., Ussat, S., Reiling, N., Wesch, D., Kabelitz, D., Adam-Klages, S. (2004) Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J. Immunol.* **173**, 5077-5085.

Falk, M., Wesch, D., Adam-Klages, S. (2002) Caspase Inhibition Blocks T cell Proliferation by Repressing Appropriate Regulation of Cyclins, Cyclin-Dependent Kinases, and their Inhibitors. *Signal Transduction* **3-4**, 101-175 (abstract)

Lebenslauf

Name: Markus Falk
Anschrift: Teichstr. 16
24103 Kiel
Geburtsdatum: 26.03.74
Geburtsort: Niebüll
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung

Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium am Bildungszentrum Mettenhof	1993
Beginn des Studiums der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	10/1994
Studium an der Arizona State University, USA	8/1999 bis 5/2000
Abschluss des Studiums an der an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	12/2001
Beginn der Promotionsarbeit im Institut für Immunologie des Universitätsklinikums S-H, Campus Kiel	1/2002

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer - und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Markus Falk