

Regulation der Expression und Freisetzung des Fas-Liganden

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

vorgelegt von
Marcus Lettau

Kiel
2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1-19
1.1	Struktur des Fas-Liganden	2
1.2	Induktion der Apoptose durch den Fas-Liganden	3
1.3	Expression des Fas-Liganden	6
1.4	Funktionelle Rolle des Fas-Liganden im Immunsystem	7
1.4.1	Zytotoxizität von T- und NK-Zellen	7
1.4.2	Aktivierungs-induzierter Zelltod von T-Lymphozyten	8
1.4.3	Etablierung immun-privilegierter Gewebe und Tumor-Counter-Attack	9
1.4.4	Der Fas-Ligand als kostimulatorisches/akzessorisches Protein	10
1.4.5	Bedeutung des Fas-Liganden für bestimmte Krankheitsbilder	11
1.5	Regulation der Expression des Fas-Liganden	12
1.5.1	Regulation der Transkription des Fas-Liganden	12
1.5.2	Speicherung des Fas-Liganden in sekretorischen Lysosomen	13
1.5.3	Prozessierung des Fas-Liganden durch Metalloproteasen	15
1.5.4	Assoziation des Fas-Liganden mit Lipidmikrodomänen der Zellmembran	16
1.6	Interaktionspartner des Fas-Liganden	16
1.6.1	Nck	17
1.6.2	PCH-Proteine	17
2.	Fragestellung	20
3.	Material	21-40
3.1	Material für die Zellbiologie	21
3.1.1	Zellen	21
3.1.2	Medien und Puffer	21
3.1.2.1	Zellkultur	21
3.1.2.2	Zellseparation	22
3.1.2.3	Immunfluoreszenz: Durchflusszytometrie	22
3.1.2.4	Immunfluoreszenz: Konfokale Mikroskopie	23
3.1.2.5	Kalzium-Phosphat-Transfektion	24
3.1.3	Antikörper	24
3.1.4	Faktoren und weitere Reagenzien	27
3.1.5	Inhibitoren	27
3.1.6	Nukleofektions-Kits	27

3.2	Material für die Molekularbiologie	28
3.2.1	Primer	28
3.2.2	Vektoren	29
3.2.3	siRNA	29
3.2.4	Enzyme	30
3.2.5	Puffer und weitere Reagenzien	30
3.2.6	Kits für die Molekularbiologie	31
3.3	Material für die Biochemie	32
3.3.1	Puffer und Reagenzien	32
3.3.1.1	Antikörperaufreinigung	32
3.3.1.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	32
3.3.1.3	Proteinbestimmung	33
3.3.1.4	Lysieren von Zellen	33
3.3.1.5	Subzelluläre Fraktionierung	34
3.3.1.6	Immunpräzipitation	34
3.3.1.7	SDS-PAGE: Protean II-System (Bio-Rad)	34
3.3.1.8	SDS-PAGE: NuPAGE-System (Invitrogen)	35
3.3.1.9	Coomassie-Färbung	36
3.3.1.10	Western Blot	36
3.3.2	Antikörper	38
3.4	Weitere Materialien	38
3.5	Geräte	39
4.	Methoden	41-61
4.1	Zellbiologische Methoden	41
4.1.1	Kultivierung von Zellen	41
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	42
4.1.4	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	43
4.1.5	E-Rosettierung	43
4.1.6	Ansatz von Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten	44
4.1.7	Transfektion von Zellen	44
4.1.7.1	Kalzium-Phosphat-Präzipitation	44
4.1.7.2	Elektroporation	45
4.1.7.3	Nukleofektion	46
4.1.8	Immunfluoreszenzanalysen	47
4.1.8.1	Durchflusszytometrie	47
4.1.8.2	Konfokale Mikroskopie	48

4.1.9	Durchführung der Versuchsansätze mit T-Zellklonen und T-Zelllinien	50
4.1.9.1	Kinetik der FasL-Oberflächenexpression	50
4.1.9.2	Aktivierungs-induzierter Zelltod	51
4.1.9.3	Kokultur von T- und B-Zellen	51
4.2	Molekularbiologische Methoden	52
4.2.1	RNA-Isolierung	52
4.2.2	RT-PCR	52
4.2.3	Reguläre PCR	53
4.2.4	Transformation kompetenter Bakterien	53
4.2.5	Anlegen von Glycerol-Stocks	54
4.2.6	Aufreinigung von Plasmid-DNA	54
4.2.7	Restriktionsverdau	55
4.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	55
4.3	Biochemische Methoden	56
4.3.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	56
4.3.2	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	56
4.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	57
4.3.4	Herstellung von Zelllysaten	57
4.3.5	Subzelluläre Fraktionierung	57
4.3.6	Präzipitation mit Fusionsproteinen	58
4.3.7	(Ko-)Immunpräzipitation	59
4.3.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	59
4.3.9	Coomassie-Färbung	60
4.3.10	Western Blot	60
5.	Ergebnisse	62-112
5.1	Expression des FasL	62
5.2	FasL-interagierende Proteine	67
5.2.1	PCH-Proteine	68
5.2.1.1	PCH-Proteine interagieren mit dem Fas-Liganden in vitro	68
5.2.1.2	PCH-Proteine kolokalisieren mit dem Fas-Liganden in Transfektanten und beeinflussen dessen subzelluläre Verteilung	71
5.2.1.3	Monoklonale Antikörper gegen PCH-Proteine	76
5.2.1.4	Nachweis von PCH-Proteinen in T-Zellen	81
5.2.2	Nck	88
5.2.2.1	Charakterisierung des monoklonalen anti-Nck Antikörpers 280C10	89

5.2.2.2	FasL interagiert mit Nck	91
5.2.2.3	FasL und Nck assoziieren in 293T Transfektanten	92
5.2.2.4	Lysosomale Assoziation von endogenem FasL und Nck in primären humanen T-Zellen	94
5.2.2.5	FasL und Nck sind in lysosomalen Fraktionen angereichert	95
5.2.2.6	Kolokalisation von Nck, FasL und lysosomalen Markern an der zytotoxischen immunologischen Synapse	97
5.2.2.7	Aktin-Abhängigkeit der Rekrutierung des FasL zur immunologischen Synapse	99
5.2.2.8	Der Transport des FasL zur immunologischen Synapse ist von einer funktionellen Interaktion mit Nck abhängig	99
5.3	Prozessierung des FasL	106
5.3.1	Prozessierung des FasL in 293T-Zellen	106
5.3.2	Prozessierung des FasL in primären humanen T-Zellen	108
6.	Diskussion	113-134
6.1	Biphasische Expression des FasL in aktivierten T-Zellen und NK-Zellen	113
6.2	FasL-interagierende Proteine: PCH-Proteine	117
6.3	FasL-interagierende Proteine: Nck	125
6.4	Prozessierung des FasL	128
6.5	Regulation der Oberflächenexpression des Fas-Liganden	133
7.	Zusammenfassung	135-136
8.	Summary	137-138
9.	Literaturverzeichnis	139-155
10.	Anhang	156-161
10.1	Danksagung	156
10.2	Curriculum vitae	157
10.3	Erklärung	161

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AICD	activation-induced cell death (Aktivierungs-induzierter Zelltod)
ALPS	autoimmune lymphoproliferative disease (autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom)
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1 (Apoptotische Protease Aktivierungsfaktor 1)
APS	Ammoniumperoxydisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Arp2/3	actin related protein 2/3 (Aktin-verwandtes Protein 2/3)
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BAR	Bim/Amphiphysin/Rvs
B-CLL	B cell type chronic lymphocytic leukemia (chronisch-lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ)
BES	N, N'-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BFA	Brefeldin A
B-LCL	B lymphoblastoid cell line (Lymphoblastoide B-Zelllinie)
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CD	cluster of differentiation
CD2AP	CD2-associated protein (CD2-assoziiertes Protein)
CD2BP1	CD2-binding protein (CD2-bindendes Protein)
cdc15/42	cell division cycle protein 15/42 (Zellteilungszyklusprotein 15/42)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CHX	Cycloheximid
CIP4	cdc42-interacting protein 4 (cdc42-interagierendes Protein)
CK1	casein kinase 1 (Caseinkinase 1)
CMV	Cytomegalie-Virus
Da	Dalton
DAAM1	dishevelled-associated activator of morphogenesis (Dishevelled-assoziiertes Aktivator der Morphogenese)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DISC	death-inducing signaling complex (Todes-induzierender Signalkomplex)
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DRF	diaphanous-related formin (Diaphanous-verwandtes Formin)
DTT	Dithiothreitol
DZI	Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Proteine
DZO	Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenproteinen
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFC	extended Fes/CIP4 homology (Erweiterte Fes/CIP4-Homologie)
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EGTA	Bis-(Aminoethyl)glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne)
F-Aktin	filamentöses Aktin

Abkürzungsverzeichnis

FAM	Carboxy-Fluorescein
FAP1	Fas-associated phosphatase 1 (Fas-assoziierte Phosphatase 1)
FasL	Fas-Ligand
FBP17	formin-binding protein 17 (Formin-bindendes Protein 17)
FCH	Fes/CIP4 homology (Fes/CIP4-Homologie)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
(c-)FLIP	(cellular) FLICE-inhibitory protein ((zelluläres) Caspase-8 (FLICE)-inhibierendes Protein)
FSC	forward scatter
g	gravity (Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²)
Gads	Grb-2-related adapter protein (Grb-2-verwandtes Adapterprotein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein (Grünes fluoreszierendes Protein)
gld	generalized lymphoproliferative disease (allgemeine lymphoproliferative Erkrankung)
Grb-2	growth factor receptor-binding protein 2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor-bindendes Protein 2)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hrIL-2	humanes rekombinantes Interleukin-2
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IS	immunologische Synapse
LAMP	lysosome-associated membrane protein (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1)
LAT	linker for activation of T cells (Bindeglied der T-Zellaktivierung)
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1 (Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1)
lpr	lymphoproliferation
mAk	monoklonaler Antikörper
MCD	Methyl- β -Cyclodextrin
MEF	murine embryonic fibroblasts (murine embryonale Fibroblasten)
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
MTOC	microtubule organizing center (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum)
MW	Molekulargewicht
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet P40
PACSLN	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons (Proteinkinase C- und Caseinkinase-Substrat in Neuronen)
pAk	polyklonaler Antikörper
PBMNZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCH	pombe cdc15 homology
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PHA-Blasten	Phytohämagglutinin-aktivierte T-Zell-Blasten
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PRD	Prolin-reiche Domäne
PSTPIP1	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein (Prolin/Serin/Threonin-Phosphatase-interagierendes Protein)

Abkürzungsverzeichnis

PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
pTyr	Phosphotyrosin
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SE	Staphylokokken Enterotoxin
sFasL	soluble Fas ligand (löslicher Fas-Ligand)
SH	Src-Homologie
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SLP-76	SH2 domain-containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa (Leukozyten-spezifisches Phosphoprotein mit SH2-Domäne von 76 kDa)
SNX2	sorting nexin 2
SPPL2a	signal peptide peptidase like 2A
SRBC	sheep red blood cells (Schaferythrozyten)
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
THD	TNF-Homologie-Domäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein)
WB	Western Blot
WIP	WASP-interacting protein (WASP-interagierendes Protein)
WT	Wildtyp
WW-Domäne	Proteindomäne von 30-40 AS; Bezeichnung beruht auf zwei konservierten Tryptophanen
ZAP70	zeta-chain-associated protein kinase of 70 kDa (Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase von 70 kDa)

1. Einleitung

Der Fas-Ligand (FasL, CD95L, Apo-1L, CD178, TNFSF6) kann durch Interaktion mit seinem Rezeptor Fas Apoptose in Fas-exprimierenden Zellen induzieren und spielt so als Todesfaktor eine zentrale Rolle bei der Induktion des programmierten Zelltodes im Immunsystem. Der FasL ist an der Beendigung einer Immunantwort im Rahmen des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) und der negativen Selektion von T-Zellen im Thymus beteiligt und stellt ein Effektormolekül zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen dar. Darüber hinaus partizipiert er an der Etablierung immunprivilegierter Gewebe und kann durch Expression auf der Oberfläche von Tumoren diese vor Angriffen Tumor-infiltrierender Lymphozyten schützen. Da der Todesrezeptor Fas abundant in verschiedenen Geweben exprimiert wird, muss die Oberflächenexpression des FasL stringent reguliert werden. Fehlregulationen im Fas/FasL-System haben demzufolge schwere Folgen für die funktionelle Integrität und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase des Immunsystems. Bei der Regulation der Oberflächenexpression des FasL spielt eine im zytoplasmatischen Anteil des FasL lokalisierte Prolin-reiche Domäne (PRD) eine entscheidende Rolle. Diese Region erlaubt Interaktionen mit Proteinen, die ihrerseits über SH3- oder WW-Domänen verfügen. In den vergangenen Jahren wurden in unserer und in anderen Arbeitsgruppen verschiedene Proteine identifiziert, die mit der intrazellulären Prolin-reichen Region des FasL interagieren. Die detaillierte Analyse dieser Proteine und die funktionelle Charakterisierung der Interaktion mit dem FasL trägt dazu bei, nicht nur die komplexen Prozesse im Zusammenhang mit der Regulation der FasL-Oberflächenexpression besser zu verstehen, sondern auch die generelle Bedeutung des Fas/FasL-Systems für die Aufrechterhaltung der Immunzell-Homöostase. Darüber hinaus ermöglicht die Kenntnis der Regulation der FasL-Expression und der Prozessierung eine bessere Einschätzung der gerade in der Entwicklung befindlichen Fas/FasL-basierten Therapiekonzepte.

1.1 Struktur des Fas-Liganden

Strukturell ist der Fas-Ligand ein Typ-2-Transmembranprotein der TNF-Familie, das im Menschen aus 281 Aminosäuren (278 AS in der Maus) besteht (Abb. 1.1) (Suda et al., 1993). Die Primärstruktur des FasL ist innerhalb verschiedener Spezies stark konserviert.

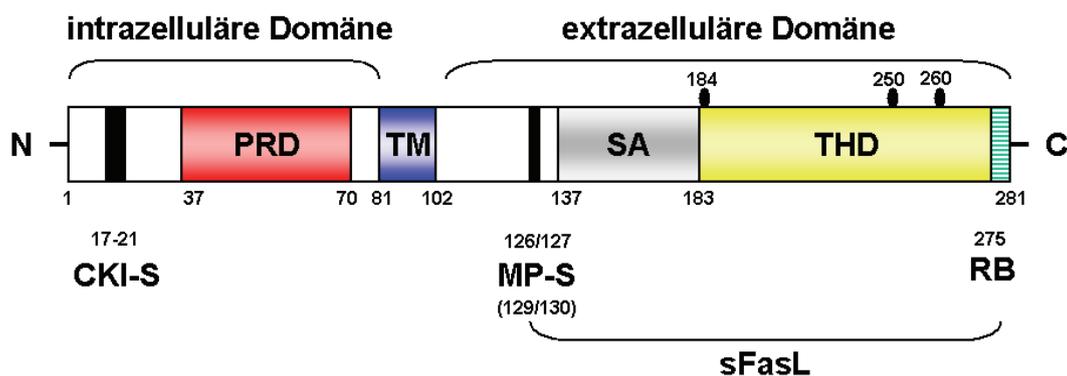


Abb. 1.1: Aufbau des Fas-Liganden. Der N-terminale zytoplasmatische Abschnitt (AS 1-81) enthält ein Casein-Kinase-1-Substrat-Motiv (CK1-S, AS 17-21) und eine Prolin-reiche Domäne (PRD, AS 37-70). Die Transmembranregion erstreckt sich über die Aminosäuren 81-102. Innerhalb des extrazellulären Abschnitts gibt es mehrere Bereiche, die Spaltstellen für Matrix-Metalloproteasen (MP-S) darstellen könnten. (AS 109-115 (ELAELR), S126/127L, K129/130Q). Diese Spaltstellen befinden sich C-terminal der für die Trimerisierung benötigten Region (SA, Selbstaggregation, self-assembly). Eine lösliche Form des FasL (sFasL) ist somit theoretisch zur Bildung funktioneller Trimere fähig. Die C-terminale TNF-Homologie-Domäne (THD) enthält einige putative N-Glykosylierungsstellen (AS 184, 250, 260). Die Rezeptorbindungsstelle (RB) befindet sich am C-Terminus. (Abb. nach (Janssen et al., 2003), verändert)

Entsprechend weisen humaner und muriner FasL eine Sequenzidentität von 76,9% auf und sind funktionell redundant (Nagata, 1997). Der N-terminale zytoplasmatische Anteil (AS 1-81) enthält ein Casein-Kinase 1-Substrat-Motiv (CK1-S) und eine Prolin-reiche Region (PRD, proline rich domain), welche ein Interaktionsmotiv für Proteine mit SH3- und WW-Domänen darstellt (Wenzel et al., 2001; Ghadimi et al., 2002; Janssen et al., 2003). Die Transmembranregion (TM) erstreckt sich über die Aminosäuren 81 bis 102. Innerhalb des extrazellulären Bereichs befinden sich mehrere potentielle Spaltstellen für Matrix-Metalloproteasen (MP-S, AS 109-115, S126/127L, K129/130Q). C-terminal davon liegt eine Region, die für die Selbstaggregation und Trimerisierung (SA) des Fas-Liganden essentiell ist. Weiterhin

enthält der extrazelluläre Teil eine TNF-Homologie-Domäne (THD). Die Rezeptorbindungsstelle (RB) bildet das C-terminale Ende des Moleküls.

1.2 Induktion der Apoptose durch den Fas-Liganden

Die Hauptfunktion des Fas-Liganden besteht in der Induktion von Apoptose durch Ligation seines Rezeptors Fas. Im Gegensatz zur Nekrose wird bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, das Auslösen einer Entzündungsreaktion dadurch vermieden, dass die sterbenden Zellen in kleine membranumschlossene Vesikel zerfallen. So werden zu keiner Zeit Zellinhaltsstoffe in die Umgebung entlassen. Diese apoptotischen Körperchen, die auch die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten, werden von benachbarten Zellen und Makrophagen durch Phagozytose internalisiert und beseitigt.

Der Apoptose liegt ein endogenes, aktivierbares Programm zugrunde. Sie stellt bei vielzelligen Organismen die physiologische Art des Zelltodes dar und spielt eine maßgebliche Rolle bei so verschiedenartigen Prozessen wie der embryonalen Morphogenese, der Rückbildung larvaler Organe während der Metamorphose von Amphibien, der Eliminierung von Virus-infizierten Zellen und Tumorzellen, der Beendigung von Immunantworten durch Aktivierungs-induzierten Zelltod und der klonalen Deletion autoreaktiver Thymozyten. Morphologisch zeichnet sich die Apoptose durch eine Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns aus. Die Morphologie der Organellen bleibt zunächst erhalten; sie verlieren erst spät ihre Integrität. Des Weiteren bilden sich Ausstülpungen der Plasmamembran, die sich als apoptotische Körperchen abschnüren können („blebbing“). Endonukleasen werden aktiviert, welche die genomische DNA zwischen den Nukleosomen schneiden und damit DNA-Fragmente mit Vielfachen von etwa 200 Basenpaaren erzeugen. Eine Fehlregulation der Apoptose ist mit der Pathogenese vieler Erkrankungen assoziiert. So kann eine verminderte oder fehlende Apoptose zu Autoimmun- oder Tumorerkrankungen führen.

Das Apoptose-Programm kann über intrinsische oder extrinsische Signalwege ausgeführt werden (Abb. 1.2) (Hengartner, 2000). Beim intrinsischen Signalweg wird in Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c induziert.

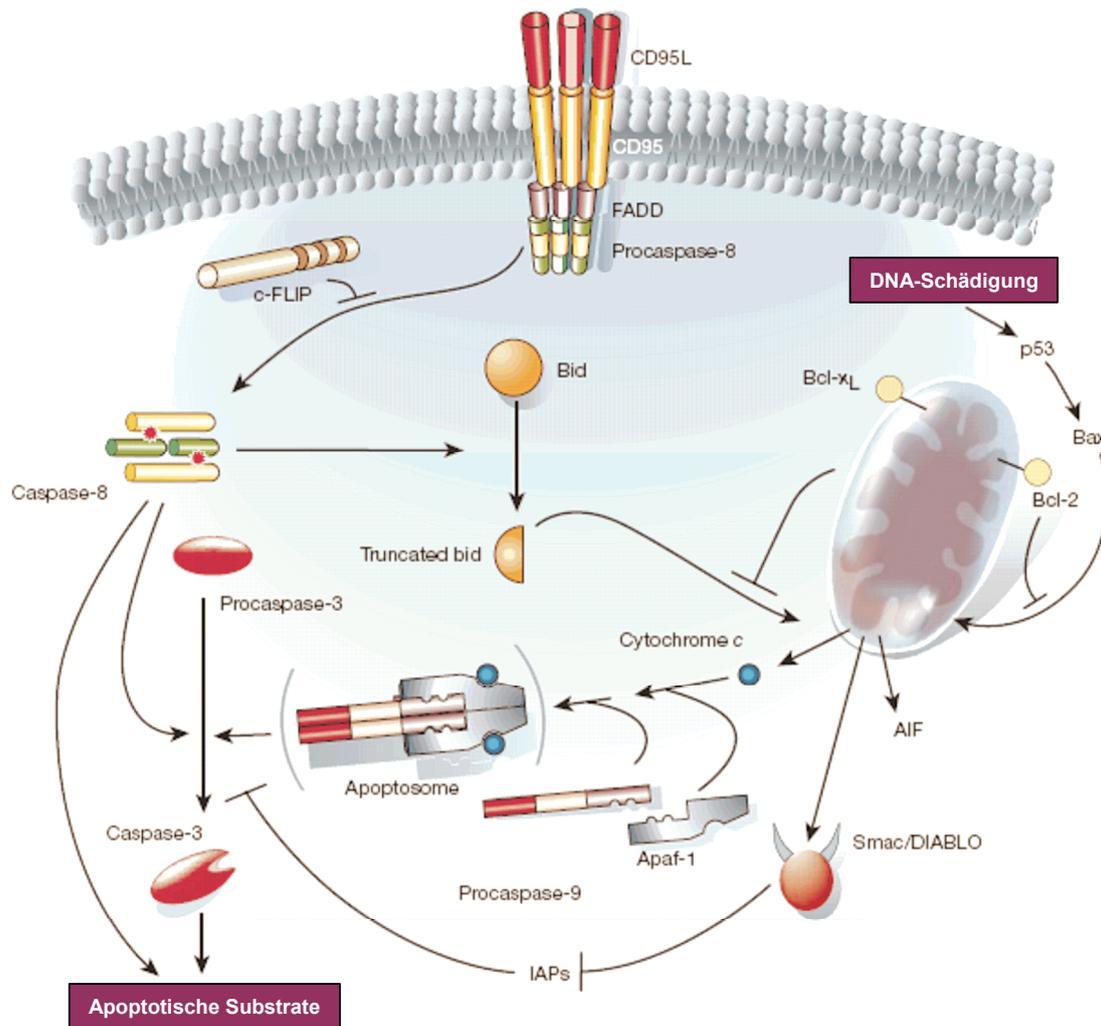


Abb. 1.2: Signaltransduktion der Apoptose über das Fas/FasL-System. Die Bindung des trimerisierten FasL (CD95L) an Fas (CD95) resultiert in der Ausbildung des Todes-induzierenden Signalkomplexes („death-inducing signaling complex“, DISC) und der Aktivierung der Procaspase-8. Das Protein c-FLIP kann die Aktivierung der Caspase-8 inhibieren. In „Typ-1-Zellen“ prozessiert und aktiviert Caspase-8 direkt Caspase-3, welche ihrerseits weitere zelluläre Substrate spaltet. In „Typ-2-Zellen“ spaltet die Caspase-8 Bid. Das Spaltprodukt tBid transloziert zu den Mitochondrien und induziert unter Beteiligung von Bax oder Bak die Freisetzung von Cytochrom c. Cytochrom c bildet mit Apaf-1 und der Procaspase-9 das „Apoptosom“, wodurch Caspase-9 aktiviert wird und die Procaspase-3 prozessieren und aktivieren kann. Aus Mitochondrien freigesetztes Smac/DIABLO kann anti-apoptotische IAPs („inhibitor of apoptosis proteins“) inhibieren. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L können die Freisetzung der mitochondrialen Faktoren hemmen. (Abb. nach (Hengartner, 2000), verändert)

Dies resultiert primär in der Bildung des Apoptosoms aus dem Adapterprotein Apaf-1, Cytochrom c und Caspase-9 (Li et al., 1997; Salvesen und Renatus, 2002). Dabei wird die Caspase-9 aktiviert, welche wiederum die Effektor-Caspase-3 aktivieren kann.

Diese terminale Caspase kann zahlreiche zelluläre Substrate spalten und vermittelt letztendlich die Apoptose (Li et al., 1997).

Auch andere mitochondriale Proteine werden nach einem Apoptose-induzierenden Stimulus von Mitochondrien freigesetzt. AIF (apoptosis-inducing factor) induziert nach Aktivierung die Kondensation und Spaltung nukleärer DNA (Susin et al., 1999). Smac/DIABLO hebt die Blockierung von Caspasen durch IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) auf und erlaubt so die Aktivierung von Effektor-Caspasen (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

Die mitochondrial vermittelte apoptotische Aktivität kann durch Expression von anti-apoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2-Familie inhibiert werden, vermutlich durch eine Blockierung der Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien (Green und Reed, 1998).

Der extrinsische Signalweg wird von Todesrezeptoren wie TNF-R1, TRAIL-Rezeptoren oder Fas initiiert (Peter et al., 1999). Die Stimulation des Rezeptors Fas führt zur Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain protein) an dessen zytoplasmatische Todes-Domäne (death domain, DD). FADD rekrutiert Caspase-8 und es entsteht der Todes-induzierende Signalkomplex (death-inducing signaling complex, DISC), in dem die Caspase-8 autokatalytisch aktiviert wird. Aktivierte Caspase-8 aktiviert ihrerseits direkt die terminale Effektor-Caspase-3, aber auch andere Caspasen, wie Caspase-6 und Caspase-7, welche in einer Signalverstärkenden Rückkopplung wiederum Caspase-8 aktivieren (Medema et al., 1997; Kischkel et al., 1995). Das Protein c-FLIP kann den programmierten Zelltod auf Ebene des DISC inhibieren, indem es durch die strukturelle Ähnlichkeit mit der Caspase-8 mit der Aktivierung dieser Initiator-Caspase interferiert (Scaffidi et al., 1999; Irmeler et al., 1997).

Unter bestimmten Voraussetzungen bedarf jedoch auch der extrinsische Signalweg der durch Beteiligung der Mitochondrien vermittelten Amplifikation des Todes-Signals. Entsprechend der Mitwirkung der Mitochondrien wird deshalb bei der Fas-vermittelten Apoptose zwischen „Typ-1-“ und „Typ-2-Zellen“ unterschieden (Scaffidi et al., 1998). In „Typ-1-Zellen“ ist die Induktion der Apoptose durch die Aktivierung großer Mengen Caspase-8 am DISC gekennzeichnet, die zu einer raschen Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 führt (Scaffidi et al., 1998). Da in diesen Zellen die Apoptose ohne mitochondriale Beteiligung verläuft, kann die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-x_L diese nicht verhindern, obgleich sie die

Freisetzung mitochondrialer Faktoren inhibieren. Im Gegensatz dazu generieren „Typ-2-Zellen“ nur geringe Mengen aktiver Caspase-8 am DISC und der fortschreitende Verlauf der Apoptose bedarf daher einer Amplifikation des CD95-Signals durch Beteiligung der Mitochondrien. Die Aktivierung der Mitochondrien wird durch das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid vermittelt (Li et al., 1998a; Luo et al., 1998). Bid ist ein Substrat der Caspase-8, wobei die geringe Menge an aktiver Caspase-8 in „Typ-2-Zellen“ zur Spaltung von Bid ausreicht, nicht aber für eine effektive Aktivierung der Caspase-3. Das verkürzte Spaltprodukt tBid (truncated Bid) transloziert zu den Mitochondrien und vermittelt dort unter Beteiligung anderer pro-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder wie Bax oder Bak die Freisetzung der mitochondrialen Effektoren und damit die Verstärkung des apoptotischen Signals (Zhai et al., 2000; Gross et al., 1999). Aufgrund der Beteiligung der Mitochondrien in „Typ-2-Zellen“ führt die Expression von Bcl-2/Bcl-X_L zu einer partiellen Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Scaffidi et al., 1998).

1.3 Expression des Fas-Liganden

Während Fas in verschiedenen Zelltypen und Geweben konstitutiv oder induzierbar exprimiert wird (Nagata und Golstein, 1995), ist die Expression seines Liganden auf wenige Zelltypen beschränkt. In verschiedenen T-Zell-Subpopulationen wird der Fas-Ligand unterschiedlich exprimiert. In CD4⁺ TH1-Zellen lässt sich die Oberflächenexpression des FasL durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit Antigen, anti-TCR/CD3-Antikörpern, mitogenen Lektinen, bakteriellen Superantigenen und anderen Stimuli wie Phorbolestern und Kalziumionophor induzieren. In CD8⁺ T-Zellen ist die derart initiierte Expression des FasL stärker (Janssen et al., 2000a; Suda et al., 1995). CD4⁺ TH2-Zellen zeigen nach entsprechender Stimulation des T-Zell-Rezeptors keine oder eine nur sehr schwache Expression des Fas-Liganden (Janssen et al., 2000b; Oberg et al., 1997a). Der Fas-Ligand wird auch in unstimulierten NK-Zellen exprimiert. Durch CD16-Stimulation oder Zytokine wie IL-2 oder IL-12 kann seine Expression in diesen Zellen erhöht werden (Bossi und Griffiths, 1999; Eischen et al., 1996; Medvedev et al., 1997). In zytotoxischen T- und NK-Zellen wird der FasL intrazellulär in sogenannten sekretorischen Lysosomen (s.u.) gespeichert (Bossi und Griffiths, 1999; Blott et al.,

2001). Auch in Monozyten ist der FasL intrazellulär nachweisbar. Aus diesen Zellen kann er durch Stimulation mit Immunkomplexen, PHA oder Superantigen freigesetzt werden (Kiener et al., 1997). In Zellen einiger immunprivilegierter Gewebe, wie dem Auge (Griffith et al., 1995) und den Testis (Green und Ferguson, 2001) aber auch in einigen Tumoren (Hahne et al., 1996) wird der FasL konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert. Die genauen molekularen Grundlagen dieser differentiellen Expression sind derzeit noch ungeklärt.

1.4 Funktionelle Rolle des Fas-Liganden im Immunsystem

Der FasL spielt als Todesfaktor eine zentrale Rolle bei der Induktion des programmierten Zelltodes im Immunsystem. Er trägt zur Zytotoxizität zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen bei, vermittelt den Aktivierungs-induzierten Zelltod von T-Lymphozyten und spielt eine wichtige Rolle bei dem Überleben von Tumorzellen und der Etablierung immunprivilegierter Gewebe.

1.4.1 Zytotoxizität von T- und NK-Zellen

Innerhalb des Immunsystems sind zytotoxische T- und NK-Zellen die wichtigsten Träger der zellvermittelten Zytotoxizität. Reife, immunkompetente T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren durch die peripheren lymphatischen Organe, wo sie das T-Zell-Repertoire der Peripherie bilden. Sobald ihnen dort von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in geeignetem MHC-Kontext das Antigen präsentiert wird, für das der Rezeptor der betreffenden T-Zelle spezifisch ist, wird die Zelle aktiviert, klonal expandiert und differenziert letztendlich zu T-Effektorzellen. Im Falle zytotoxischer T-Zellen geht diese Differenzierung einher mit der Synthese der erwähnten zytotoxischen Granula (sekretorische Lysosomen) und ihrer enthaltenen Proteine. In NK-Zellen werden diese Granula bereits während der Reifung der Zellen gebildet. Erkennt eine zytotoxische Zelle eine Zielzelle, werden die zytotoxischen Granula zum Ort des Zell-Zell-Kontakts transportiert, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren und ihre zytotoxischen Effektorproteine in die sich bildende immunologische Synapse entlassen. Das Zusammenwirken der Serin-Protease

Granzym B und des porenbildenden Proteins Perforin leitet selektiv die Eliminierung der Zielzelle durch Induktion von Apoptose ein (Russell und Ley, 2002).

Der Fas-Ligand stellt neben den klassischen Komponenten der zellvermittelten Zytotoxizität (Granzym B und Perforin) einen Teil der Effektormaschinerie von T- und NK-Zellen dar (Abb. 1.3)(Rouvier et al., 1993). Naive T-Zellen (CD45RA⁺) exprimieren nur geringe Mengen an FasL. Im Vergleich dazu ist die Expression in aktivierten T-Zellen (CD45RO⁺) deutlich erhöht (Barry und Bleackley, 2002). Der Granzym B/Perforin-vermittelte und der FasL-vermittelte Weg der Zielzellyse scheinen sich dabei funktionell zu ergänzen, wobei in Abhängigkeit vom jeweiligen physiologischen Kontext im Hinblick auf die Fas-Expression und die Sensitivität der Zielzelle gegenüber Fas/FasL-induzierter Apoptose jeweils der eine oder der andere Weg dominiert (Brunner et al., 2003). So exprimieren Hepatozyten den Fas-Rezeptor auf ihrer Oberfläche und sind sensitiv gegenüber Fas/FasL-vermittelter Apoptose (Ogasawara et al., 1993). Entsprechend wird die Schädigung dieser Zellen im Rahmen von Hepatitis C- oder Hepatitis B-Infektionen im Wesentlichen durch das Fas/FasL-System vermittelt, während Perforin eine nur untergeordnete Rolle spielt (Kondo et al., 1997). Auf der anderen Seite können Zellen gegenüber Fas-induzierter Apoptose resistent sein. Herzmuskelzellen oder Zellen der Skelettmuskulatur exprimieren im Gegensatz zu Zellen der Leber das anti-apoptotische Protein c-FLIP (Rasper et al., 1998). Darüber hinaus können Zielzellen nach Infektion mit bestimmten Viren das Virus-kodierte Protein v-FLIP exprimieren, welches ebenfalls zur Resistenz gegenüber Fas/FasL-vermittelter Apoptose beiträgt (Thome et al., 1997). Entsprechend werden verschiedene zytotoxische Effektormechanismen benötigt, um ein breites Spektrum unterschiedlicher Zielzellen in verschiedenen (patho)physiologischen Situationen eliminieren zu können.

1.4.2 Aktivierungs-induzierter Zelltod von T-Lymphozyten

Während die Aktivierung naiver T-Zellen zur klonalen Expansion und Differenzierung führt, wird in zuvor aktivierten T-Zellen durch erneute Stimulation Aktivierungs-induzierter Zelltod (activation-induced cell death, AICD) induziert (Shi et al., 1990; Dhein et al., 1995). Durch AICD werden vermutlich reaktive T-Zellen eliminiert und so die Immunantwort beendet. Die Auslösung der Apoptose erfolgt dabei erst einige Zeit

nach Beginn der primären Aktivierung; frisch isolierte T-Zellen sind gegenüber AICD und Fas/FasL-induzierter Apoptose resistent (Green et al., 1992). Die später auftretende Sensitivität gegenüber AICD korreliert mit der zunehmenden Expression von Fas und FasL sowie mit der Abnahme des anti-apoptischen Proteins c-FLIP innerhalb der ersten drei Tage nach antigener Stimulation (Janssen et al., 2000a; Refaeli et al., 1998). CD4⁺ TH2-Zellen zeigen keine oder eine eingeschränkte FasL-Expression, was zum Teil die *in vitro* beobachtete Resistenz entsprechender T-Zellklone gegenüber AICD erklärt (Oberg et al., 1997a; Janssen et al., 2000b; Ramsdell et al., 1994a). Aber auch weitere Mechanismen scheinen an der Insensitivität der TH2-Zellen gegenüber Fas/FasL-vermittelter Apoptose beteiligt zu sein, wie z.B. die PI-3-Kinase-vermittelte Modulation der Fas-assoziierten Caspase-Aktivität (Varadhachary et al., 1997; Varadhachary et al., 1999; Varadhachary et al., 2001) oder die mögliche Inhibition der Fas-Signaltransduktion durch die Fas-assoziierte Phosphatase 1 (Zhang et al., 1997). Die Sensitivität der T-Lymphozyten gegenüber Fas/FasL-induzierter Apoptose betreffend können drei Phasen unterschieden werden. Auf die klonale Expansions- und Effektor-Phase, in denen die IL-2-abhängige Proliferation und die Beseitigung des Pathogens stattfinden, folgt die Deletionsphase, welche sich durch eine Sensitivität der Zellen gegenüber AICD auszeichnet. Nur wenige Zellen bleiben dauerhaft resistent gegenüber dem AICD und differenzieren zu Gedächtniszellen.

Neben dieser peripheren Deletion reaktiver Lymphozyten wird auch eine mögliche Beteiligung des Fas-Liganden als Effektormolekül an der negativen Selektion von Fas-positiven Thymozyten während der T-Zell-Reifung diskutiert (Kishimoto et al., 1998).

1.4.3 Etablierung immun-privilegierter Gewebe und Tumor-Counter-Attack

Immunologisch privilegierte Regionen sind Körperbereiche, in denen allogene Gewebetransplantate keine Abstoßungsreaktion verursachen und immunologische Entzündungsreaktionen stark reduziert sind. Zu den immunprivilegierten Geweben gehören das Gehirn, das Auge, die Testis und der Uterus (Fetus). Die Etablierung des Immunprivilegs beruht zum einen auf physikalischen Barrieren, die der Wanderung von Zellen und Antigenen entgegenstehen, zum anderen auf dem

Vorhandensein löslicher und membranständiger Faktoren, die das Immungeschehen lokal beeinflussen können (Nieder Korn, 2006). Die konstitutive Expression des Fas-Liganden auf der Oberfläche von Zellen immunprivilegierter Gewebe kann so die lokale Immunantwort durch die Eliminierung infiltrierender Fas-positiver Lymphozyten minimieren. In Zellen des Auges wird der FasL konstitutiv auf der Zellmembran exprimiert. Die Fas/FasL-vermittelte Apoptose in einwandernden Lymphozyten trägt zur Etablierung des Immunprivilegs des Auges bei (Griffith et al., 1995). Auch für Zellen anderer immunprivilegierter Gewebe wie den Hoden, dem Uterus und der Plazenta ist eine konstitutive Oberflächenexpression des FasL beschrieben worden (Bellgrau et al., 1995; Hunt et al., 1997).

Einige Tumoren können sich eine eigene immunprivilegierte Mikroumgebung schaffen. Die konstitutive Expression des membranständigen FasL auf Tumorzellen oder die Sekretion von löslichem FasL oder membranständigem FasL als Komponente exozytierter Mikrovesikel durch Tumorzellen, kann diese vor Angriffen Fas-positiver Tumor-infiltrierender T-Lymphozyten schützen (O'Connell et al., 1996; Andreola et al., 2002).

1.4.4 Der Fas-Ligand als kostimulatorisches/akzessorisches Protein

Einige Mitglieder der TNF-Liganden-Familie sind in der Lage, ihrerseits Signale in die Liganden-exprimierende Zelle zu transduzieren. Beispielsweise induziert die Stimulation von membranständigem TNF- α mit anti-TNF- α -Antikörpern bzw. durch Inkubation mit TNF-R1 exprimierenden Zellen Ca^{2+} -Mobilisierung (Watts et al., 1999), eine vermehrte IL-2- und IFN- γ -Sekretion (Higuchi et al., 1997) und die Expression von E-Selectin (CD62E) auf aktivierten $CD4^+$ T-Lymphozyten (Harashima et al., 2001).

Unter Annahme einer derartigen reversen Signaltransduktion werden dem FasL auch akzessorische oder kostimulatorische Funktionen im Zusammenhang mit der T-Zellaktivierung zugesprochen. Nach zum Teil widersprüchlichen Befunden soll Ligation des FasL die Proliferation muriner $CD4^+$ T-Zellen hemmen (Desbarats et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass FasL-Bindung die Proliferation muriner $CD8^+$ T-Lymphozyten *in vitro* (Suzuki und Fink, 1998) und *in vivo* (Suzuki et al., 2000) positiv moduliert. Die kostimulatorische Wirkung des FasL wird dabei

offensichtlich von seiner Prolin-reichen Domäne vermittelt und beruht nach aktuellen Befunden auf einer erhöhten Phosphorylierung von Akt, Erk1/2, Jnk und dem FasL selbst, sowie einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und AP-1 (Sun et al., 2006). Im Kontext dieser möglichen reversen Signaltransduktion wird eine Beteiligung des FasL als akzessorisches Molekül bei der positiven Selektion von Thymozyten diskutiert (Boursalian und Fink, 2003).

1.4.5 Bedeutung des Fas-Liganden für bestimmte Krankheitsbilder

In Anbetracht der vielfältigen Funktionen des Fas/FasL-Systems innerhalb des Immunsystems äußern sich Defekte des Rezeptors Fas oder seines Liganden in schweren systemischen Störungen.

Die natürliche Maus-Mutante *gld* (generalized lymphoproliferative disease) weist eine einzelne Punktmutation im Gen des FasL auf, die einen Aminosäureaustausch im extrazellulären Bereich des FasL verursacht (Phe273/Leu273). Der mutierte Ligand ist deshalb nicht mehr in der Lage mit Fas zu interagieren und Apoptose zu induzieren (Takahashi et al., 1994; Nagata und Suda, 1995; Ramsdell et al., 1994b). Eine weitere natürliche Maus-Mutante weist einen Defekt im Fas-Rezeptor auf. Dieser Gendefekt in *lpr*- (lymphoproliferative disease) Mäusen beruht auf der Rekombination eines Retrotransposons in das Intron 2 des Fas-Gens, was zu einem veränderten Gentranskript mit verringerter Stabilität führt. Dies hat eine verminderte Expression des Fas-Rezeptors und damit auch eine verminderte Apoptose in T-Zellen dieser Mäuse zur Folge (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Nagata und Suda, 1995). Die Defekte im Fas/FasL-System in diesen Tieren resultieren phänotypisch in einer massiven Akkumulation von Lymphozyten, Splenomegalie, Lymphadenopathie und Autoimmunerkrankungen. Der Phänotyp der FasL-Knock-out-Maus entspricht dem der *gld*-Mäuse, ist aber in seiner Ausprägung deutlich stärker und weist damit auf weitere regulatorische Funktionen des FasL neben der Rezeptor-induzierten Apoptose hin (Nagata und Suda, 1995).

Im Menschen resultieren Defekte im Fas/FasL-System in speziellen Formen des Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS). Ähnlich dem Phänotyp von *gld/lpr*-Mäusen wird in ALPS-Patienten eine Vergrößerung der Milz und Lymphadenopathie, die Produktion von Autoantikörpern sowie eine Akkumulation

von CD4⁻ CD8⁻ doppelt negativen T-Lymphozyten beobachtet. Die Klassifizierung des ALPS beruht auf der Analyse der Sensitivität der Lymphozyten gegenüber Fas/FasL-induzierter Apoptose *in vitro*. So bezeichnet ALPS 0 einen Expressionsdefekt von Fas, während funktionelle Defekte des Fas-Rezeptors ALPS 1 definieren. Defekte von Proteinen, die an der Signaltransduktion des Fas-Rezeptors beteiligt sind verursachen ALPS 2. Mutationen im FasL definieren ALPS 1b (Rieux-Laucat et al., 2003). Ein ähnliches Krankheitsbild kennzeichnet SLE-Patienten (Systemischer lupus erythematosus). In einem von 75 SLE-Patienten wurde eine Deletion im Exon 4 des FasL-Gens gefunden (Wu et al., 1996). Verglichen mit Fas sind Mutationen im FasL-Gen extrem selten, ein weiterer Hinweis auf die kritische Bedeutung des FasL für die Aufrechterhaltung der organismischen Integrität. In Hashimoto-Thyroiditis-Patienten exprimieren die Thyrozyten neben funktionellem FasL auch Fas auf ihrer Oberfläche, was den apoptotischen Zelltod dieser Zellen zur Folge hat und damit zur Zerstörung der Schilddrüse führt (Giordano et al., 1997).

1.5 Regulation der Expression des Fas-Liganden

In Anbetracht seiner vielfältigen Funktionen innerhalb des Immunsystems muss die Expression des FasL stringent reguliert werden. Neben der Regulation der Transkription des FasL sind dabei unterschiedliche posttranskriptionelle Prozesse an der Modulation der FasL-Oberflächenexpression beteiligt.

1.5.1 Regulation der Transkription des Fas-Liganden

In T-Zellen induziert die Stimulation des TZR/CD3-Komplexes durch MHC/Antigen die Transkription und Expression des Fas-Liganden mit einer frühen Beteiligung von Src-Kinasen (Dhein et al., 1995). Entsprechend blockiert eine Inhibition der Src-Kinasen die FasL-Expression in AICD-sensitiven Zellen (Oberg et al., 1997a). Die T-Zell-Rezeptor-vermittelte FasL-Expression kann durch akzessorische oder kostimulatorische Signale moduliert werden. So interferiert in einigen T-Zellklonen die Ligation des CD4-Korezeptors mit der regulären Komposition des T-Zell-Rezeptor-assoziierten Signalkomplexes (Oberg et al., 1997b; Sanzenbacher et al.,

1999). Die Expression des FasL wird von vielen unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren beeinflusst. NF-AT (Latinis et al., 1997; Li-Weber et al., 1999), NF- κ B (Kasibhatla et al., 1999), c-myc (Brunner et al., 2000), IRF-1 (Chow et al., 2000) und Egr-3 (Rengarajan et al., 2000) sind an der Induktion der FasL-Expression nach T-Zellaktivierung z.B. im Rahmen des AICD beteiligt. In TH1- und TH2-Zellen zeigen Egr-Faktoren unterschiedliche Bindungsaktivitäten zu den entsprechenden Bindestellen innerhalb des FasL-Promotors, was zum Teil die unterschiedliche FasL-Expression und AICD-Sensitivität dieser Subtypen erklärt (Dzialo-Hatton et al., 2001). In CD4⁻CD8⁻ doppelt-negativen Thymozyten sind ebenfalls Egr-Faktoren maßgeblich an der Kontrolle der FasL-Genexpression beteiligt (Mittelstadt und Ashwell, 1999). Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie spielen eine Rolle bei der Induktion der FasL-Expression nach Entzug von Wachstumsfaktoren (Brunet et al., 1999), während der AP-1-Komplex an der Stress-induzierten FasL-Expression beteiligt ist (Faris et al., 1998). Die Expression ist also durch eine Vielzahl cis-agierender Promotorelemente kontrolliert, welche eine spezifisch auf den jeweiligen Stimulus abgestimmte Genaktivität ermöglichen.

1.5.2 Speicherung des Fas-Liganden in sekretorischen Lysosomen

In T- und NK-Zellen wird der Fas-Ligand in sogenannten sekretorischen Lysosomen gespeichert (Abb. 1.3) (Bossi und Griffiths, 1999). Sekretorische Lysosomen sind hochspezialisierte bifunktionelle Organellen, die sowohl als sekretorisches als auch als degradatives Kompartiment dienen. Sie entsprechen konventionellen Lysosomen insofern, als dass sie einen niedrigen pH-Wert aufweisen und über die lysosomale Maschinerie des Proteinabbaus verfügen. Darüber hinaus dienen diese Organellen der Speicherung sekretorischer Proteine und ermöglichen die regulierte Exozytose der in ihnen enthaltenen Mediatoren. Die meisten Zellen, die über sekretorische Lysosomen verfügen, sind hämatopoetischen Ursprungs, wobei Melanozyten eine wichtige Ausnahme darstellen (Blott und Griffiths, 2002). Die sekretorischen Lysosomen von T- und NK-Zellen sind von einer externen Membran umgeben und weisen interne membranassoziierte Vesikel sowie Bereiche dicht gepackter Proteine (dense cores) auf (Peters et al., 1991).

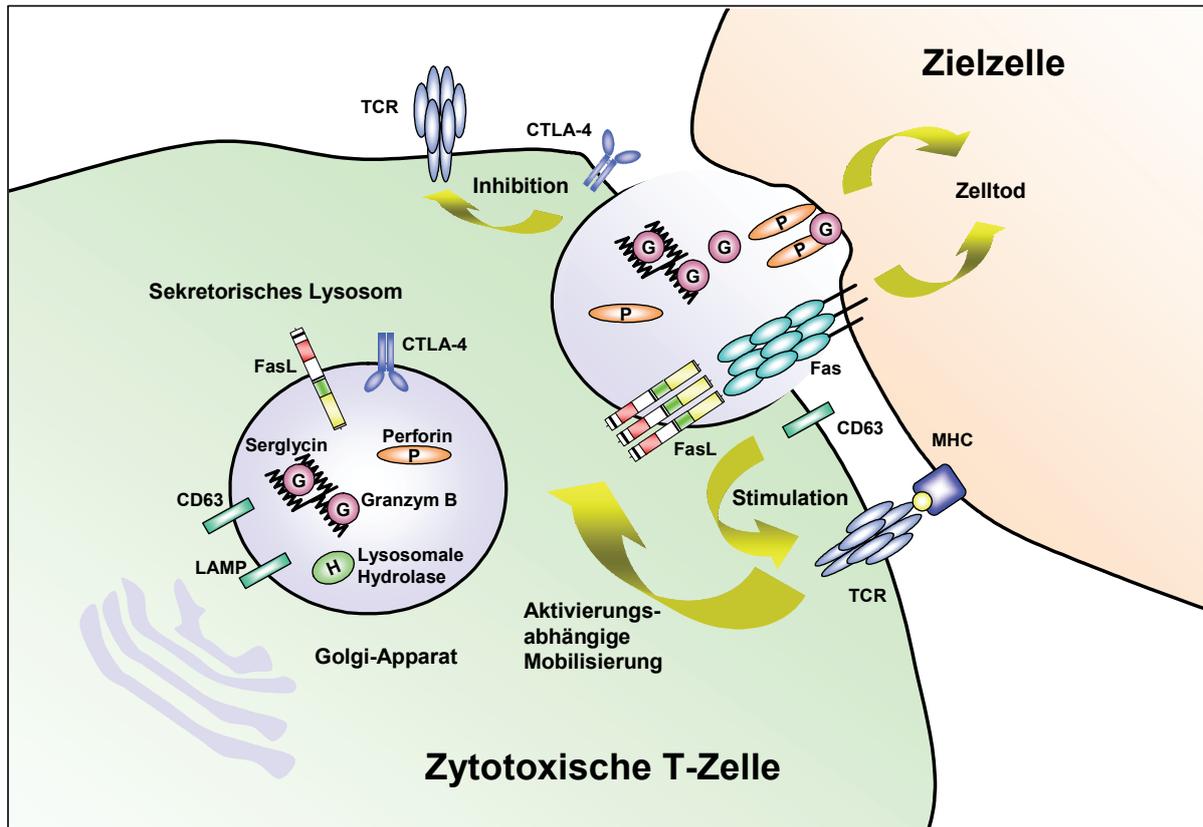


Abb. 1.3: Sekretorische Lysosomen zytotoxischer Lymphozyten. Nach Erkennen einer Zielzelle werden die sekretorischen Lysosomen zum Ort des Zell-Zell-Kontakts transportiert, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren. Die gemeinsame Speicherung und regulierte Freisetzung der verschiedenen exekutiven (Granzym B, Perforin, FasL), akzessorischen (Serglycin) und regulatorischen (CD63, CTLA-4) Komponenten der zellvermittelten Zytotoxizität erlaubt deren lokale, konzertierte Aktion (Abb. nach (Lettau et al., 2007)), verändert).

Neben Proteinen, die charakteristisch für konventionelle Lysosomen sind, wie lysosomalen Hydrolasen und lysosomalen Membranproteinen (LAMPs), enthalten die sekretorischen Lysosomen zytotoxischer Zellen Proteine, die an der Zielzellyse beteiligt sind wie Granzym B, Perforin und den FasL (Peters et al., 1991; Bossi und Griffiths, 1999). Weitere Faktoren wie das Proteoglykan Serglycin sind an der Speicherung der Granulakomponenten beteiligt, dienen aber auch als akzessorische Elemente bei der gerichteten Exozytose der Effektoren (Raja et al., 2005; Galvin et al., 1999). Die regulatorischen Proteine CTLA-4 und CD63 werden ebenfalls in sekretorischen Lysosomen gespeichert und können die Effektorfunktion zytotoxischer Zellen modulieren (van der Merwe et al., 1997; Iida et al., 2000; Metzelaar et al., 1991; Pfistershammer et al., 2004). Bei Erkennen einer Zielzelle werden die sekretorischen Lysosomen zum Ort des Zell-Zell-Kontakts transportiert, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren. Dabei werden die löslichen Effektoren in

die zytotoxische immunologische Synapse entlassen. Gleichzeitig werden Membranproteine sekretorischer Lysosomen lokal im Bereich der Synapse auf der Zelloberfläche exprimiert. Demzufolge ermöglichen diese Organellen die sichere Speicherung, die regulierte Exozytose und die lokal begrenzte Wirkung der verschiedenen exekutiven, akzessorischen und regulatorischen Komponenten der zellvermittelten Zytotoxizität (Lettau et al., 2007). In T- und NK-Zellen stellt der FasL eine Membrankomponente sekretorischer Lysosomen dar. Im Gegensatz zu anderen Proteinen, die aufgrund ihrer Di-Leucin- oder Tyrosin-basierten Motive zu lysosomalen Kompartimenten dirigiert werden (Letourneur und Klausner, 1992; Trowbridge et al., 1993), wird die Sortierung des FasL zu sekretorischen Lysosomen durch die Prolin-reiche Domäne vermittelt (Blott et al., 2001). Der FasL kann auch als Membrankomponente von Mikrovesikeln freigesetzt werden, welche einen Durchmesser von etwa 100-200 nm haben (Martinez-Lorenzo et al., 1999). Da die sekretorischen Lysosomen in T-Zellen Charakteristika multivesikulärer Körperchen haben, führen Degranulationsprozesse vermutlich auch zur Freisetzung solcher Exosomen.

1.5.3 Prozessierung des Fas-Liganden durch Metalloproteasen

In verschiedenen Zelltypen können Matrix-Metalloproteasen durch Spaltung des FasL an einer extrazellulären Spaltstelle die Freisetzung einer löslichen Form des FasL (sFasL) induzieren und gleichzeitig die Oberflächenexpression des membranständigen FasL reduzieren (Ethell et al., 2002; Kayagaki et al., 1995; Tanaka et al., 1998). Eine Spaltstelle für Metalloproteasen wurde im humanen FasL im Bereich Ser126/Leu127 beschrieben, während er im murinen System zwischen Lys129/Gln130 gespalten werden soll (Schneider et al., 1998). Die bei der Prozessierung entstehende lösliche Form des FasL vermittelt in Abhängigkeit vom lokalen Mikromilieu sowohl pro- als auch anti-apoptische Effekte (Chen et al., 1998; Schneider et al., 1998). Die Spaltung erfolgt dabei N-terminal der für die Trimerisierung des FasL verantwortlichen Region, so dass auch der lösliche FasL in der Lage ist, funktionelle Trimere zu bilden. Der Serumspiegel des sFasL scheint mit dem Verlauf diverser Erkrankungen zu korrelieren, wie z.B. der asymptomatischen

Phase der HIV-Infektion, rheumatoider Arthritis und einer Vielzahl maligner Erkrankungen (Linkermann et al., 2005).

1.5.4 Assoziation des Fas-Liganden mit Lipidmikrodomänen der Zellmembran

Lipidmikrodomänen (Lipid rafts) sind Membrankompartimente, die reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden und gesättigten Phospholipiden sind (Simons und Ikonen, 1997). Eine ihrer wichtigsten Eigenschaften ist die selektive Rekrutierung oder Ausgrenzung von Signalmolekülen, wodurch deren Aktivität reguliert und moduliert werden kann (Dykstra et al., 2003). Lipidmikrodomänen sind auch an der Regulation der Todesrezeptor-vermittelten Induktion der Apoptose beteiligt. (Legler et al., 2003; Doan et al., 2004). Der Fas-Rezeptor ist in Mikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert und diese Assoziation moduliert den Fas-vermittelten Zelltod in T-Zellen (Hueber et al., 2002; Muppidi und Siegel, 2004).

Auch für den FasL konnte eine Assoziation mit Lipidmikrodomänen sowohl in Transfektanten als auch in primären T-Zellen nachgewiesen werden (Nachbur et al., 2006; Cahuzac et al., 2006). Dabei wird die Rekrutierung des Fas-Liganden zu Lipidmikrodomänen von seiner Prolin-reichen Domäne vermittelt und die Fähigkeit zur Induktion von Apoptose positiv moduliert.

1.6 Interaktionspartner des Fas-Liganden

Eine derart komplex regulierte Expression muss von einer entsprechend umfassenden und zuverlässigen molekularen Maschinerie kontrolliert werden. Die Prolin-reiche Region im zytoplasmatischen Anteil des FasL erlaubt die Interaktion mit Proteinen, die ihrerseits über SH3- oder WW-Domänen verfügen (Kay et al., 2000). Vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass die Src-verwandte Kinase Fyn(T) selektiv mit ihrer SH3-Domäne mit Peptiden der Prolin-reichen Domäne des murinen FasL interagiert (Hane et al., 1995). In weiteren Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass der intrazelluläre Anteil des FasL mit seiner Prolin-reichen Domäne *in vitro* mit SH3-Domänen weiterer Src-verwandter Kinasen (Abl, Fgr, Hck, Lck, Lyn, Src) und Adapterproteine (Grb-2, Gads, Grap, Nck1, p47phox, p85 α -Untereinheit der

PI3-Kinase) interagiert. Darüber hinaus konnte eine Interaktion des FasL mit WW-Domänen der Adapterproteine Dystrophin, FBP11 und Fe65 beschrieben werden (Wenzel et al., 2001). In weiteren Untersuchungen wurden mit GST-Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne des FasL potentielle FasL-interagierende Proteine aus Lysaten von T-Zellen präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese separiert und die präzipitierten Proteine mittels Peptidmassenanalytik als Grb-2, β -Aktin, Tubulin, FBP17 und PACSIN2 identifiziert (Ghadimi et al., 2002).

1.6.1 Nck

Nck ist ein ubiquitär exprimiertes, zytosolisches Adapterprotein von 47 kDa, welches fast ausschließlich aus einer N-terminalen SH2-Domäne und drei SH3-Domänen besteht. Es gibt zwei Isoformen von Nck (Nck1/Nck2), die sich aber in nur wenigen Aminosäuren innerhalb der funktionell vermutlich irrelevanten Verknüpfungsregionen zwischen den SH2/SH3-Adapter-Domänen unterscheiden und die deshalb funktionell redundant sind. Entsprechend weisen weder Nck1- noch Nck2-Knock-out-Mäuse einen offensichtlichen Phänotyp auf, während Nck1/2-Doppel-Knock-out-Mäuse embryonal letal sind (Bladt et al., 2003). Eine wichtige Funktion von Nck besteht in der Verschaltung von Rezeptortyrosinkinasen mit der Maschinerie der Aktin-Reorganisation (Li et al., 2001). In diesem Zusammenhang stellt Nck ein zentrales Adapterprotein in der T-Zell-Rezeptorvermittelten Umgestaltung des Zytoskeletts dar (Zeng et al., 2003; Barda-Saad et al., 2005; Gil et al., 2002). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Nck mit zwei seiner SH3-Domänen mit der Prolin-reichen Domäne des FasL interagiert. Dies könnte bedeuten, dass Nck eine Rolle bei der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Mobilisierung des FasL zur sich ausbildenden immunologischen Synapse spielt.

1.6.2 PCH-Proteine

Mit PACSIN2 und FBP17 konnten in Vorarbeiten zwei strukturell verwandte Proteine identifiziert werden, die ebenfalls mit dem intrazellulären Anteil des FasL interagieren

(Ghadimi et al., 2002). Diese Proteine sind Mitglieder der sogenannten PCH (pombe *cdc15* homology)-Familie von Adapterproteinen. Diese Proteinfamilie umfasst im Menschen 21 Mitglieder, die funktionell und strukturell fünf Subfamilien konstituieren (Abb. 1.4). Die Funktion der PCH-Proteine besteht in der Verschaltung von Membrankrümmungsprozessen mit der Maschinerie der Aktin-Reorganisation (Aspenstrom et al., 2006a). So weisen alle PCH-Proteine eine EFC-Domäne (Extended Fer/CIP4-homology domain) auf, welche es PCH-Proteinen erlaubt, an Membranen zu binden und diese zu deformieren (Tsujiya et al., 2006).

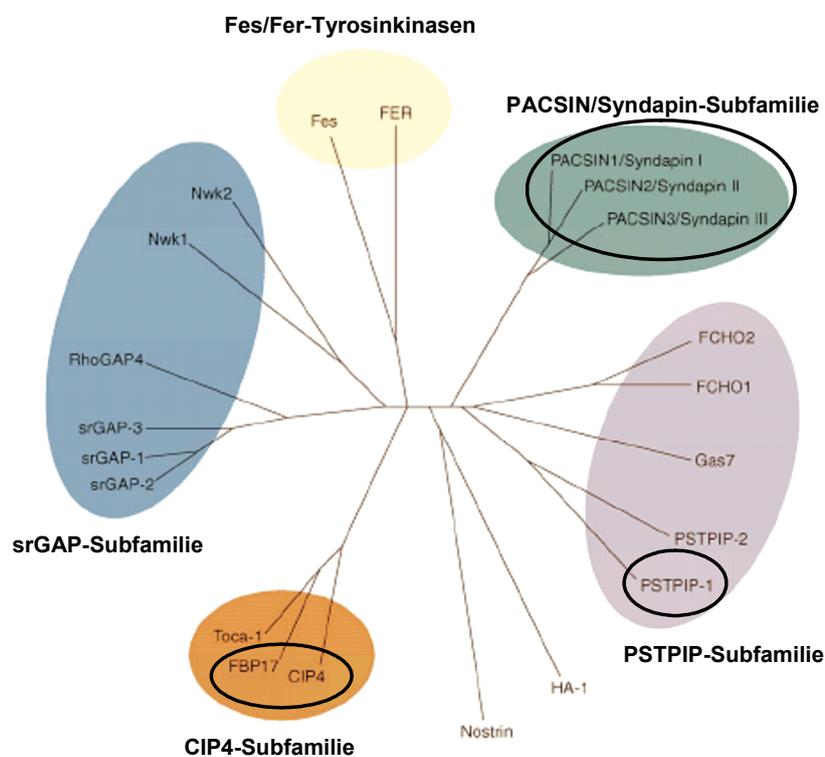


Abb. 1.4: Humane PCH-Proteine. Auf Grundlage der Homologie ihrer EFC-Domänen lassen sich PCH-Proteine fünf Subfamilien zuordnen, der srGAP-Subfamilie (blau), der Subfamilie der Fes- und Fer-Tyrosinkinasen (gelb), der PSTPIP (CD2BP)/Gas7/FCHO-Subfamilie und der CIP4-Subfamilie mit den Proteinen Toca-1, FBP17 und CIP4. Nostrin und HA-1 lassen sich keiner dieser Subfamilien eindeutig zuordnen. Innerhalb dieser 21 humanen PCH-Proteine konnten FBP17, CIP4, PSTPIP-1 (CD2BP1) und die PACSINe 1-3 als Interaktoren des FasL identifiziert werden (schwarz umrandet). (Abb. nach (Aspenstrom et al., 2006a), verändert)

Entsprechend weist die EFC-Domäne eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit der BAR-Domäne auf, die in endozytotischen Proteinen wie Endophilin und Amphiphysin die Krümmung zellulärer Membranen vermittelt (Peter et al., 2004). Weitere Adapter-Untereinheiten, wie die in vielen PCH-Proteinen vorhandenen SH3-Domänen ermöglichen die Interaktion mit Proteinen der Aktin-Reorganisationsmaschinerie. Viele PCH-Proteine sind Effektoren oder Modulatoren von Rho-GTPasen, die ihrerseits wichtige Regulatoren morphologischer Veränderungen oder der Migration von Zellen sind (Ho et al., 2004; Wong et al., 2001; Aspenstrom et al., 2006b; Carnahan und Gould, 2003). Darüber hinaus beeinflussen PCH-Proteine den WASP/Arp2/3-Komplex, welcher die Bildung verzweigter Netzwerke von Aktinfilamenten vermittelt. Einige PCH-Proteine interagieren mit DRFs (diaphanous-related formins), die ihrerseits die Elongation von Aktinfilamenten modulieren (Aspenstrom et al., 2006b; Badour et al., 2003b; Higgs, 2005). Von den 21 im humanen System bekannten PCH-Proteinen konnten in weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe neben PACSIN2 und FBP17 die PACSINe 1 und 3, CD2BP1 (PSTPIP1) und CIP4 als FasL-interagierende Proteine identifiziert werden, die alle eine C-terminale SH3-Domäne aufweisen.

Diese Proteine sind funktionell mit Prozessen wie dem Transport von Organellen, der Endo- und Exozytose und der Ausbildung der immunologischen Synapse assoziiert (Qualmann und Kelly, 2000; Badour et al., 2003a). Sie könnten so eine wichtige Rolle bei der Regulation der Oberflächenexpression des FasL spielen.

2. Fragestellung

- 1.) Basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und eigenen Vorbefunden sollte die Dynamik der induzierten Oberflächenexpression des FasL in T-Zellen und NK-Zellen mechanistisch untersucht und charakterisiert werden. Dabei sollte insbesondere die intrazelluläre Lokalisation des FasL in primären T-Zellen unter Etablierung geeigneter Färbeprotokolle fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.
- 2.) In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im Rahmen der Doktorarbeit von Jing Qian konnten FasL-interagierende PCH-Proteine in Transfektanten funktionell mit dem intrazellulären Transport des FasL assoziiert werden. Die Interaktion dieser Proteine mit dem FasL sollte zunächst verifiziert werden. Um endogene PCH-Proteine in primären T-Zellen untersuchen zu können, sollten in der Arbeitsgruppe hergestellte monoklonale Antikörper gegen diese Proteine charakterisiert werden. Unter Verwendung dieser Antikörper sollte dann die Expression dieser Proteine in primären humanen T-Zellen untersucht werden.
- 3.) Die Interaktion des FasL mit dem Adapterprotein Nck sollte verifiziert und funktionell in primären humanen T-Zellen charakterisiert werden.
- 4.) In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig (Biochemisches Institut, CAU, Kiel) sollte die für die Zelloberflächenprozessierung des FasL verantwortliche Protease identifiziert werden und die physiologische Relevanz dieser Prozessierung in primären humanen T-Zellen untersucht werden.

3. Material

3.1. Material für die Zellbiologie

3.1.1 Zellen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMNZ) wurden aus Buffy-Coat-Präparationen gesunder Spender isoliert, die vom Institut für Transfusionsmedizin, UK-SH, Campus Kiel bzw. Campus Lübeck bereitgestellt wurden. Der CD4⁺ T-Zellklon 12603, die CD8⁺ T-Zelllinien K CD8 und L CD8 und die $\gamma\delta$ T-Zelllinie EP3 wurden in der Arbeitsgruppe etabliert, ebenso die EBV-transformierten B-Zelllinien EBV-O und EBV-M. JFL ist eine stabil mit dem FasL transfizierte Jurkat-Variante, die ebenfalls in der Arbeitsgruppe hergestellt wurde (Jing Qian, Dissertation). Daneben wurde die Jurkat-Linie JM301 verwendet. KFL-9 sind stabile FasL-Transfektanten der Erythroleukämie-Linie K562, die von David Kaplan (Cleveland, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Weiterhin wurden die humane embryonale Nierenzelllinie 293T (ATCC: CRL-1573), die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa (ATCC: CCL-2) und die humane T-Zell-Lymphomlinie Hut78 (ATCC: TIB-161) verwendet.

3.1.2 Medien und Puffer

3.1.2.1 Zellkultur

Zellkulturmedien

RPMI1640-Zellkulturmedium mit 25 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure) und L-Glutamin	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco's minimum essential medium)	Gibco-Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg)	Biochrom AG, Berlin
FCS (Fetal calf serum) (Inaktiviert bei 56°C für 30 min, 0,22 µm steril filtriert)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG

III. Material

Vor Gebrauch in der Zellkultur wurden die Medien mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und mit 5-10% (v/v) FCS ergänzt. DMEM-Medium wurde zusätzlich mit 1% (v/v) L-Glutamin versetzt.

Einfriermedium

Zellkulturmedium mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) Merck, Darmstadt

PBS (Phosphate-buffered saline) Biochrom AG

Trypsin/EDTA (0,5%/0,2% (w/v)) Biochrom AG

Eosin-Lösung

Eosin	2 g	
NaN ₃	0,25 g	Merck

Lösen in 450 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 50 ml FCS, durch Faltenfilter filtrieren

Trypanblau-Lösung

0,1% Trypanblau in PBS Merck

3.1.2.2 Zellseparation

Ficoll (1,077 g/ml)	Biochrom AG
Schaferythrozyten (SRBC)	DEMIR, Wankendorf
Test-Neuraminidase	Dade Behring, Marburg

3.1.2.3 Immunfluoreszenz: Durchflusszytometrie

Waschpuffer

1% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin) in PBS mit 0,1% (w/v) NaN ₃	Carl Roth, Karlsruhe Merck
---	-------------------------------

Fixierungspuffer

1% (w/v) PFA (Paraformaldehyd) in PBS	Merck
---------------------------------------	-------

III. Material

Propidiumjodid-Lösung

Propidiumjodid (3 µg/ml) in PBS

Serva, Heidelberg

Cytofix/Cytoperm-Kit

Becton Dickinson,
Heidelberg

3.1.2.4 Immunfluoreszenz: Konfokale Mikroskopie

Poly-L-Lysin-Lösung

Poly-L-Lysin (100 µg/ml) in PBS

Sigma, München

PEM-Puffer (2x)

PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure))	200 mM	Merck
--	--------	-------

MgCl ₂	2 mM	Merck
-------------------	------	-------

EGTA (bis-(Aminoethyl)glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	2 mM	Merck
---	------	-------

Auf pH 6,95 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm)

Borat-Puffer (2x)

Natriumborat (Na ₂ B ₄ O ₇)	200 mM	Merck
---	--------	-------

MgCl ₂	2 mM	Merck
-------------------	------	-------

Auf pH 11 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm)

Fixierungspuffer

6% (w/v) PFA in PBS

Merck

Auf pH 7 einstellen, zur Herstellung der Fixierungspuffer mit gleichem Volumen PEM-Puffer (2x) bzw. Borat-Puffer (2x) mischen

Permeabilisierungspuffer

1% (v/v) Triton X-100 in PBS

Merck

Reduktionslösung

0,1% (w/v) NaBH₄ in PBS

Merck

Blockierungspuffer

0,2% (w/v) BSA/0,01% (v/v) Triton X-100 in
PBS

MoBiGLOW-Mounting Medium

MoBiTec, Göttingen

3.1.2.5 Kalzium-Phosphat-Transfektion

BES-Puffer (2X)

BES (N, N-bis (2-Hydroxyethyl)-2-Amino-ethansulfonsäure)	50 mM	Merck
NaCl	280 mM	Merck
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM	Merck

Auf pH 6,95 einstellen und steril filtrieren (0,22 µm)

Kalziumchlorid-Lösung

CaCl ₂	2,5 M	Merck
-------------------	-------	-------

Steril filtrieren (0,22 µm)

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.1, Teil A: In der Immunfluoreszenz verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper	Konzentration	Applikation			Bezugsquelle
		DZO	DZI	KM	
α-αβ-TCR-FITC (WT31)	50 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen, Heidelberg
α-γδ-TCR-PE (11F2)	25 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-CD2-FITC (S5.2)	12,5 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-CD3-PE (SK7)	12,5 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-CD4-FITC (SK3)	3 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-CD8-PE (SK1)	12,5 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-CD56-PE (NCAM16.2)	12,5 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-CD95-PE (DX2)	6,3 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
α-FasL-PE (NOK-1)	k.A.	unv.	-	-	Caltag, Hamburg

Abkürzungen: DZO: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen; DZI: Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Antigene; KM: Konfokale Mikroskopie; k.A.: Keine Angabe der Konzentration durch Hersteller; unv.: unverdünnt

III. Material

Tabelle 3.1, Teil B: In der Immunfluoreszenz verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper	Konzentration	Applikation			Bezugsquelle
		DZO	DZI	KM	
α -Cathepsin D, polyklonal	k.A.	-	-	1/75	Sigma
α -Nck, polyklonal	1 mg/ml	-	-	1/50	Lab Vision, CA, USA
α -myc (9B11)	k.A.	-	-	1/50	Cell Signaling, MA, USA
α -myc, polyklonal	k.A.	-	-	1/50	Cell Signaling
α -Phosphotyrosin (4G10)	1 mg/ml	-	-	1/50	Upstate, Hamburg
α -FasL (NOK-1)	0,5 mg/ml	-	-	1/50	BD Pharmingen
α -Perforin Alexa Fluor 488 (dG8)	k.A.	-	-	1/50	Biolegend, CA, USA
α -Perforin Alexa Fluor 647 (dG8)	k.A.	-	-	1/50	Biolegend
α -Granzym B Alexa Fluor 647 (GB11)	0,2 mg/ml	-	-	1/50	BD Pharmingen
α -LAMP1 (Clone 25)	0,25 mg/ml	-	-	1/50	BD Pharmingen
α -Nck (280C10)	1 mg/ml	-	-	1/50	Eigene Herstellung
α -FBP17 (144C6)	1 mg/ml	1/5	1/100	1/50	Eigene Herstellung
α -FBP17 (144B8)	1 mg/ml	1/5	1/100	1/50	Eigene Herstellung
α -PACSIN1 (13E5)	1 mg/ml	1/5	1/100	1/50	Eigene Herstellung
α -PACSIN3 (106C10)	1 mg/ml	1/5	1/100	1/50	Eigene Herstellung
α -CD2BP1 (129H10)	1 mg/ml	1/5	1/100	1/50	Eigene Herstellung
α -CIP4 (208A3)	1 mg/ml	1/5	1/100	1/50	Eigene Herstellung
α -FLAG (M2)	1 mg/ml	-	-	1/100	Sigma

Abkürzungen: DZO: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen; DZI: Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Antigene; KM: Konfokale Mikroskopie; k.A.: Keine Angabe der Konzentration durch Hersteller; unv.: unverdünnt

Tabelle 3.2, Teil A: In der Immunfluoreszenz verwendete Isotypkontrollen.

Isotypkontrolle	Konzentration	Applikation			Bezugsquelle
		DZO	DZI	KM	
α -IgG ₁ -PE (X40)	50 μ g/ml	unv.-1/5	-	-	BD Pharmingen
α -IgG ₁ -FITC (X40)	50 μ g/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
IgG _{2a} -PE (X39)	50 μ g/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
IgG _{2a} -FITC (X39)	50 μ g/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
IgG ₁ , unkonjugiert (X40)	50 μ g/ml	unv.-1/5	-	-	BD Pharmingen
IgG ₁ , unkonjugiert (MOPC-21)	0,5 mg/ml	-	1/50	1/25	Abcam, UK
IgG ₁ , unkonjugiert (11711)	0,5 mg/ml	-	1/50	1/25	R&D, MN, USA

Abkürzungen: DZO: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen; DZI: Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Antigene; KM: Konfokale Mikroskopie; k.A.: Keine Angabe der Konzentration durch Hersteller; unv.: unverdünnt

III. Material

Tabelle 3.2, Teil B: In der Immunfluoreszenz verwendete Isotypkontrollen.

Isotypkontrolle	Konzentration	Applikation			Bezugsquelle
		DZO	DZI	KM	
IgG _{2a} , unkonjugiert (X39)	50 µg/ml	1/5	-	-	BD Pharmingen
IgG _{2a} , unkonjugiert (MOPC-173)	0,5 mg/ml	-	1/50	1/25	Abcam, UK
IgG2b Alexa Fluor 488 (MPC-11)	k.A.	-	-	1/50	Biolegend
IgG2b Alexa Fluor 647 (MPC-11)	k.A.	-	-	1/50	Biolegend
IgG1 Alexa Fluor 647 (MOPC-21)	k.A.	-	-	1/50	BD Pharmingen

Abkürzungen: DZO: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen; DZI: Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Antigene; KM: Konfokale Mikroskopie; k.A.: Keine Angabe der Konzentration durch Hersteller; unv.: unverdünnt

Tabelle 3.3: In der Immunfluoreszenz verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Konzentration	Applikation			Bezugsquelle
		DZO	DZI	KM	
Ziege α-Maus-PE	0,2 mg/ml	1/60	1/600	-	Caltag
Esel α-Kaninchen Alexa Fluor 488	2 mg/ml	-	-	1/200	Invitrogen
Ziege α-Kaninchen Alexa Fluor 488	2 mg/ml	-	-	1/200	Invitrogen
Esel α-Maus Alexa Fluor 488	2 mg/ml	-	-	1/200	Invitrogen
Ziege α-Maus Alexa Fluor 488	2 mg/ml	-	-	1/200	Invitrogen
Ziege α-Kaninchen Alexa Fluor 546	2 mg/ml	-	-	1/400	Invitrogen
Ziege α-Maus Alexa Fluor 546	2 mg/ml	-	-	1/400	Invitrogen
Esel α-Kaninchen Alexa Fluor 555	2 mg/ml	-	-	1/400	Invitrogen
Ziege α-Kaninchen Alexa Fluor 647	2 mg/ml	-	-	1/400	Invitrogen
Ziege α-Maus Alexa Fluor 647	2 mg/ml	-	-	1/400	Invitrogen
Esel α-Kaninchen Rhodamin	0,4 mg/ml	-	-	1/75	Santa Cruz, CA, USA

Abkürzungen: DZO: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenantigenen; DZI: Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Antigene; KM: Konfokale Mikroskopie

3.1.4 Faktoren und weitere Reagenzien

(unter Angabe der Einsatzkonzentration)

Rekombinantes Interleukin-2	10 U/ml	Chiron, Marburg
Phytohämagglutinin (PHA)	0,5 µg/ml	Murex Biotech, England
Staphylokokken Enterotoxin A, B, C, D, E (SEA, B, C, D, E)	0,5 ng/ml	Toxin Technologies, FL, USA
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA)	10 ng/ml	Sigma
Ionomycin	500 ng/ml	Calbiochem, Darmstadt
Rhodamin-konjugiertes Phalloidin	1 U	MoBiTec
Tetramethylrhodamin-konjugiertes Weizenkeim-Agglutinin	2 µg/ml	Invitrogen
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	0,5 µg/ml	Merck

3.1.5 Inhibitoren

(unter Angabe der Einsatzkonzentration)

Cytochalasin D	5,1 µg/ml	Calbiochem
Latrunculin A	5 µM	Sigma
Brefeldin A	1 µg/ml	Sigma
Cycloheximid	2 µg/ml	Sigma
GM 6001 (Ilomastat, Galardin)	5 µg/ml	Calbiochem
TAPI (TNF- α protease inhibitor)	50 µM	Calbiochem
GW280264X	5 µM	Prof. Paul Saftig
GI254023X	5 µM	Prof. Paul Saftig

3.1.6 Nukleofektions-Kits

Kit für primäre humane T-Zellen

Kit für Zelllinien V

Die Nukleofektions-Kits wurden von Amaxa, Köln bezogen.

3.2 Material für die Molekularbiologie

3.2.1 Primer

Tabelle 3.4: Verwendete Primer

Name	Sequenz (5'-3')
GAPDH	s: 5' GAC CCC TTC ATT GAC CTC 3' as: 5' CCA AAG TTG TCA TGG ATG 3'
FBP17 (NM_015033)	s: 5' AAG CGA ACA TCC TCT CCT TT 3' as: 5' GAG GTT GTA GTG AGC CGA GA 3'
PACSIN1 (NM_020804)	s: 5' AAG CAG GAT GTG CAG AAG AC 3' as: 5' AGC TCA CGG TAC ACA TGG AT 3'
PACSIN2 (NM_007229)	s: 5' ATT TAC CAT GAC CTG GAG CA 3' as: 5' TTA CTC GGC AAA AAC TGG TC 3'
PACSIN3 (NM_016223)	s: 5' CCG AGA AGA CAA AAG CTC AG 3' as: 5' TTC TCA CTG CTG GAA AGG TC 3'
CIP4 (NM_004240)	s: 5' TCA CAG ATG CCC CAG ATA TT 3' as: 5' AAA CCT GAC TTG TGC AGC TC 3'
CD2BP1S/L (AF038603/AF038602)	s: 5' GAC ATC GAC AGT TTC ATC CA 3' as: 5' ACG AAG TGG TCT TGG GAC TT 3'
CD2BP1L (AF038603/AF038602)	s: 5' GGT GCC CTA CCA GAA CTA TT 3' as: 5' GGT CAG GGT CTC TGT GGA C 3'
Random Primer (für RT-PCR)	

Abkürzungen: s: sense; as: anti-sense

Alle verwendeten Primer (bis auf die Random Primer) wurden von TIB MOLBIOL, Berlin bezogen. Die in der RT-PCR verwendeten Random Primer stammen von Invitrogen, Karlsruhe.

3.2.2 Vektoren

Tabelle 3.5: Verwendete Konstrukte

Insert	Vektor	Bezugsquelle
-	pGEX2T	Pharmacia, Schweden
-	pEGFP C1	Invitrogen
-	pEGFP N1	Invitrogen
-	pcDNA3.1/myc His A	Invitrogen
PACSIN1	pGEX 3X	Dr. M. Plomann, Köln
PACSIN2	pGEX 2T	Dr. M. Plomann, Köln
PACSIN3	pGEX 3X	Dr. M. Plomann, Köln
FBP17	pcDNA3.1/V5-His-TOPO	Dr. U. Fuchs, Giessen
FBP17 Δ SH3	pcDNA3.1/V5-His-TOPO	Dr. U. Fuchs, Giessen
Nck1	pcDNA3.1/Myc His C	Dr. L. Larose, Montral, CA
Nck1, alle SH3-Domänen mutiert (W38R, W153R, W229R)	pcDNA3.1/Myc His C	Dr. L. Larose, Montral, CA
Nck1	pEGFP C1	Dr. L. Larose, Montral, CA
Nck1, alle SH3-Domänen mutiert (W38R, W153R, W229R)	pEGFP C1	Dr. L. Larose, Montral, CA
Nck1	CB6 GFP	Dr. M. Way, London, UK
CIP4	pGEX 2T	Dr. Jing Qian
CIP4	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
CIP4 Δ SH3	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
CD2BP1	pGEX 2T	Dr. Jing Qian
CD2BP1	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
PACSIN1	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
PACSIN2 (murin)	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
PACSIN2 P478L (murin)	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
PACSIN2	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
PACSIN3	pcDNA3.1/myc His A	Dr. Jing Qian
FasL (pI217s)	pcDNA3	M. Thome, Lausanne, Schweiz
FasL	pEGFP C1	Dr. Jing Qian
FasL	pEGFP N1	Dr. Jing Qian
FasL	pCR33	Dr. Martin Zörnig, Frankfurt
FasL Δ 40-80	pCR33	Dr. Martin Zörnig, Frankfurt

3.2.3 siRNA

Tabelle 3.6: Verwendete siRNAs

siRNA	ID	Bezugsquelle
Nck1 Silencer [®] Pre-designed siRNA	#144183	Ambion, CA, USA
Nck1 Silencer [®] Pre-designed siRNA	#144184	Ambion
Nck1 Silencer [®] Pre-designed siRNA	#144185	Ambion
Silencer [®] Negative Control siRNA	#1	Ambion
Silencer [®] FAM [™] labeled Negative Control siRNA	#1	Ambion

Sämtliche siRNAs wurden von Ambion, CA, USA bezogen.

3.2.4 Enzyme

Restriktionsenzyme

EcoRI	NEB, Frankfurt
BamHI	NEB
XhoI	Promega, Mannheim
XbaI	NEB
HindIII	NEB

HotStar Taq DNA-Polymerase

Qiagen, Hilden

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega

3.2.5 Puffer und weitere Reagenzien

Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE, 50x)

Tris (Tris (Hydroxymethyl)- Aminomethan)	242 g	Merck
Borsäure	55 g	
0.5 M EDTA (Ethyldiamin- tetraessigsäure)	40 ml	Serva
ddH ₂ O	Auf 1 l	Braun, Melsungen

1% Agarose-Gel

Agarose	1% (w/v)	Merck
1x TAE-Puffer	50-200 ml	s.o.
Ethidiumbromid	0,5 µg/ml	Merck

Agarose-Gel-Probenpuffer (10x)

Promega

Molekulargewichtsstandards

1 Kb DNA Ladder	Invitrogen
100 bp DNA Ladder	Invitrogen

III. Material

Kompetente Bakterien

One Shot[®] TOP10 Competent
E.coli
Invitrogen

Rekombinanter Ribonuklease-
Inhibitor RNasin[®] 40 U/ml Becton Dickinson

dNTP-Set, PCR Grade Invitrogen

LB-Medium

Pepton	10 g/l	Carl Roth
Hefe-Extrakt	5 g/l	Carl Roth
NaCl	10 g/l	Merck
Ampicillin oder Kanamycin (Zugabe erst nach dem Autoklavieren)	50 µg/ml	Merck

SOC-Medium

Pepton	10 g/l	Carl Roth
Hefe-Extrakt	2,5 g/l	Carl Roth
NaCl	0,25 g/l	Merck
KCl	1,25 g	Merck
Auf pH 7,0 einstellen, mit H ₂ O auf 485 ml auffüllen, autoklavieren		
Glucose 1M	10 ml	Merck
MgCl ₂ 1 M	5 ml	Merck

3.2.6 Kits für die Molekularbiologie

Nucleospin[®] RNA II-Kit
Nucleospin[®] Plasmid-Kit
NucleoBond[®] PC500-Kit

Die Kits wurden von Macherey-Nagel, Düren bezogen.

3.3 Material für die Biochemie

3.3.1 Puffer und Reagenzien

3.3.1.1 Antikörperaufreinigung

Säulenmaterial

Protein G-Sepharose™ 4B Zymed, München

Startpuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5)

1.) 1M NaH ₂ PO ₄ -Lösung		
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	68,995 g	Merck
ddH ₂ O	500 ml	Braun

Mit ddH₂O 1/20 verdünnen (20 mM) und NaCl zugeben (8,8 g auf 500 ml; 0,3 M)

2.) 1M Na ₂ HPO ₄ -Lösung		
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	88,995 g	Merck
ddH ₂ O	500 ml	Braun

Mit ddH₂O 1/20 verdünnen (20 mM) und NaCl zugeben (8,8 g auf 500 ml; 0,3 M)
Lösungen mischen und auf pH 6,5 einstellen, steril filtrieren und entgasen

Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl-Puffer, pH 2,7)

Glycin	3,275 g	Merck
--------	---------	-------

Auf pH 2,7 einstellen und mit ddH₂O auf 500 ml einstellen

Neutralisierungspuffer (1M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0)

Tris (Tris (Hydroxymethyl)- Aminomethan)	60,625 g	Merck
---	----------	-------

Auf pH 9,0 einstellen und mit ddH₂O auf 500 ml einstellen

3.3.1.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Beads

Glutathion-Sepharose™ 4B Amersham,
Freiburg

III. Material

Isopropyl-1-thio-Galactopyranosid (IPTG) Calbiochem

Lysepuffer

1% (v/v) Triton X-100 in PBS Merck

Elutionspuffer

Glutathion (reduziert)	10 mM	Sigma
Tris-Puffer pH 8,0	50 mM	Merck

Dialysepuffer

PBS Biochrom AG

3.3.1.3 Proteinbestimmung

Coomassie-Protein-Assay-Reagenz Pierce, IL, USA

3.3.1.4 Lysieren von Zellen

Lysepuffer

Nonidet [®] P 40 (NP40)	1% (v/v)	Fluka, Seelze
Tris-Puffer	20 mM	Merck
NaCl	0,15 M	Merck
EDTA	5 mM	Serva
Aprotinin	2 µg/ml	Sigma
Leupeptin	2 µg/ml	Sigma
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid	1 mM	Sigma
Natriumorthovanadat	1 mM	Merck
Natriumfluorid	10 mM	Fluka
Natriumpyrophosphat	1 mM	Sigma
Pepstatin A	2 µg/ml	Sigma

3.3.1.5 Subzelluläre Fraktionierung

Fraktionierungspuffer (Dichtegradienten-Zentrifugation)

Saccharose	340 mM	Merck
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure)	10 mM	Merck
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	0,3 mM	Serva
Auf pH 7,3 einstellen		

Fraktionierungspuffer (Differentielle Zentrifugation)

Saccharose	250 mM	Merck
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure)	10 mM	Merck
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	0,3 mM	Serva
Auf pH 7,3 einstellen		

Percoll-Lösung

Amersham

3.3.1.6 Immunpräzipitation

ImmunoPure[®] Protein L-Beads

Pierce

Protein A-Sepharose[™] CL-4B

GE Healthcare,
München

Protein G-Sepharose[™] 4B

Zymed

3.3.1.7 SDS-PAGE: Protean II-System (Bio-Rad)

Laufgel (30 ml pro Gel, 10%)

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	10 ml	Carl Roth
Tris-Puffer 1 M, pH 8,8	11,2 ml	Merck
SDS 10%	300 µl	Merck
ddH ₂ O	8,7 ml	Braun
APS 20%	100 µl	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetra-methylendiamin)	20 µl	Merck

III. Material

NuPAGE® MOPS SDS-Laufpuffer (20x)

Invitrogen

Vor Gebrauch 1/20 mit H₂O verdünnen

Reduktionslösung

1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) in _{dd}H₂O 0,85 M Merck

Protein-Molekulargewichts-Standards

SeeBlue® Plus2 Standard Invitrogen
MagicMark™ XP Standard Invitrogen

3.3.1.9 Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbe-Lösung

Methanol	410 ml	Sigma
Eisessig	70 ml	Merck
Coomassie-Brilliant-Blau G250	0,125 g	Merck
_{dd} H ₂ O	510 ml	Braun

Coomassie-Entfärbe-Lösung

Methanol	410 ml	Sigma
Eisessig	70 ml	Merck
_{dd} H ₂ O	510 ml	Braun

3.3.1.10 Western Blot

Transferpuffer

Tris (Tris (Hydroxymethyl)- Aminomethan)	25 mM	Merck
Glycin	192 mM	Merck
Methanol	20% (v/v)	Sigma
SDS	0,015% (v/v)	Merck

Protein-Färbe-Lösung

Ponceau S-Farbkonzentrat Sigma

III. Material

Waschpuffer (TBS)

Tris	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
Auf pH 7,5-8,0 einstellen		

Waschpuffer (TBST)

Tris (Tris (Hydroxymethyl)- Aminomethan)	10 mM	Merck
NaCl	150 mM	Merck
Tween 20	0,05%	Merck

Blockierungslösung

Tris pH 7,5	100 mM	Merck
NaCl	2,2% (w/v)	Merck
BSA	5% (w/v)	Carl Roth
NaN ₃	0,1% (w/v)	Merck
Steril filtrieren (0,22 µm)		

“Stripping”-Lösung

Tris pH 6,8	62,5 mM	Merck
β-Mercaptoethanol	2% (v/v)	Merck
SDS	6,9% (v/v)	Merck
ddH ₂ O		Braun

ECL-Detektionsreagenzien

GE Healthcare

3.3.2 Antikörper

Tabelle 3.7: Für Western Blot (WB) bzw. Immunpräzipitation (IP) verwendete Antikörper

Antikörper	Konzentration	Applikation		Bezugsquelle
		WB	IP	
α - β -Aktin (AC-15)	2,7 mg/ml	1/10000	-	Sigma
α -FasL (NOK-1)	0,5 mg/ml	-	1 μ g	BD Pharmingen
α -FasL (G247-4)	0,4 mg/ml	1/1500	-	BD Pharmingen
α -FasL, polyklonal (Ab-3)	0,1 mg/ml	1/100	-	Calbiochem
α -Nck, polyklonal	1 mg/ml	1/2500	-	Lab Vision
α -myc	1,2 mg/ml	1/5000	-	Invitrogen
α -myc (9B11)	k.A.	-	1 μ l	Cell Signaling
α -myc-HRP	1,42 mg/ml	1/5000	-	Invitrogen
α -LAMP-1 (Clone 25)	0,25 mg/ml	1/500	-	BD Pharmingen
α -FBP17 (144C6)	1 mg/ml	1/2500	0,1-10 μ g	Eigene Herstellung
α -FBP17 (144B8)	1 mg/ml	1/2500	0,1-10 μ g	Eigene Herstellung
α -PACSIN1 (13E5)	1 mg/ml	1/2500	0,1-10 μ g	Eigene Herstellung
α -PACSIN3 (106C10)	1 mg/ml	1/1500	0,1-10 μ g	Eigene Herstellung
α -CD2BP1 (129H10)	1 mg/ml	1/2500	0,1-10 μ g	Eigene Herstellung
α -CIP4 (208A3)	1 mg/ml	1/2500	0,1-10 μ g	Eigene Herstellung
Kaninchen α -Maus	1,7 mg/ml	-	2 μ g	Dianova, Hamburg
α -Maus-IgG-HRP	k.A.	1/7500	-	GE Healthcare
α -Kaninchen-IgG-HRP	k.A.	1/7500	-	GE Healthcare

Abkürzungen: WB: Western Blot; IP: Immunpräzipitation, HRP: Meerrettich-Peroxidase

3.4 Weitere Materialien

Nitrozellulose-Membran Hybond™ C Extra	Amersham
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, UK
Spritzenvorsatzfilter 0,2 μ m	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter 0,45 μ m	Sartorius
Sterilvakuumfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
	Nunc, DK
Zellkulturplatten	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Serologische Pipetten	Greiner
Microlance® Kanülen	Becton Dickinson
PCR-Röhrchen	Sarstedt
Objektträger	Carl Roth
Deckgläschen	Carl Roth
Gene-Pulser-Küvetten	Bio-Rad

Polycarbonat-Zentrifugen-Röhrchen (7 x 20 mm)	Beckman Coulter, Krefeld
Ultra-Clear™-Zentrifugen-Röhrchen (11 x 60 mm)	Beckman Coulter
Ultra-Clear™-Zentrifugen-Röhrchen (16 x 102 mm)	Beckman Coulter
Centricon®-30 Konzentrator 30000 MWCO	Amicon, MA, USA
Spektrometer-Küvetten	Sarstedt
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (10 Wells, 1.0 mm)	Invitrogen
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (15 Wells, 1.0 mm)	Invitrogen
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (10 Wells, 1.5 mm)	Invitrogen
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (15 Wells, 1.5 mm)	Invitrogen

3.5 Geräte

CO ₂ -Begasungsbrutschränke	Heraeus, Osterode
Dounce-Homogenisatoren	Braun
Ein- und Zwölfkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer Protean® II	Bio-Rad
Elektrophoresekammer X Cell SureLock™	Invitrogen
Elektrophoresekammer X Cell 6™	Invitrogen
Western Blot Transfer-Tank Trans-Blot®	Bio-Rad
Western Blot Transfer-Tank Mini Trans-Blot®	Bio-Rad
Elektrophoresekammer DNA Sub Cell™	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mini-Sub® Cell™	Bio-Rad
Entwicklungskassetten Hypercassette™	Amersham
Geltrockner	Bio-Rad
Filmentwicklungsmaschine Agfa Curix60	Agfa Deutschland, Köln
Spektrometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad
Ultraschallstab	Branson, USA
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Netzgeräte Power Pack 200/300	Bio-Rad
Netzgerät PS 250-2	Sigma Techware, München
Neubauer-Zählkammer	Fischer, Frankfurt/M
Feinwaage A120S	Sartorius
Gel Imager (Videokamera und Thermodrucker)	Intas, Göttingen
LAS3000 (Image capturing unit)	Fujifilm, Düsseldorf
Ultraschallbad RK 100	Bandelin, Berlin
pH-Meter wtw pH 315i	WTW, Weilheim
Ultra-Zentrifuge TL-100	Beckman Coulter
Ultra-Zentrifuge XL-80	Beckman Coulter
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
PCR-Maschine T Gradient	Biometra, Göttingen

III. Material

Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Sicherheits-Sterilbank	Heraeus
Tischzentrifugen 5415C	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge J2MC (Rotor JA-14, JA-20)	Beckman Coulter
Zentrifuge Typ J6HC (Rotor JS-42)	Beckman Coulter
Wipptisch Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Heizblöcke Thermostat DB-2 und DB-3	Techne, Wertheim
Nukleofektionsgerät Nucleofector™ II	Amaxa
Elektroporationsgerät GenePulser II mit RF-Modul	Bio-Rad

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂. Die Suspensionszelllinien Jurkat (JFL, JM 301), Hut78, EBV-M, EBV-O und KFL-9 wurden in RPMI-1640-Medium mit HEPES (10 mM), L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 5% FCS (v/v) kultiviert.

Zur Expansion der verwendeten T-Zellklone und -linien wurde dem Medium 10% FCS (v/v) und rekombinantes IL-2 (10 U/ml) zugesetzt. Direkt nach dem Auftauen der T-Zellklone oder -linien oder periodisch nach etwa 14-21 Tagen Kultur wurden diese mit einem sogenannten „Feeder-Cocktail“ restimuliert. Dieser „Feeder-Cocktail“ bestand aus 1×10^6 isolierten peripheren mononukleären Zellen (PBMNZ, 4000 rad bestrahlt) und $0,1 \times 10^6$ EBV-transformierten B-Zellen (B-LCL, 6000 rad bestrahlt) pro ml. Der Feedercocktail wurde zehnfach konzentriert angesetzt und in einem Volumen, das einem Zehntel des Volumens der zu „feedernden“ Zellen entspricht, eingesetzt. Um mögliche Radikale zu entfernen wurden die PBMNZ und B-LCLs nach dem Bestrahlen zweimal mit Kulturmedium gewaschen, dann vereinigt, abzentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen Kulturmedium mit 10% FCS (v/v) aufgenommen. Danach wurden IL-2 (100 U/ml) und PHA (5 µg/ml) hinzugegeben. Nach drei Tagen wurden die „gefeederten“ Klone über Ficoll gegeben, um lebende von toten Zellen zu trennen. Mit NK-Zellen wurde nach demselben Protokoll verfahren. Der Phänotyp der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch überprüft. Zur Generierung von T-Zell-Blasten wurden isolierte mononukleäre Zellen mit PHA (0,5 µg/ml) stimuliert. Nach drei Tagen wurden mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation die toten Zellen beseitigt und die lebenden PHA-Blasten nach intensivem Waschen unter Zusatz von rekombinantem IL-2 (10 U/ml) für weitere 7-21 Tage expandiert.

Die adhärennten Zelllinien HeLa und 293T wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS (v/v), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 1% L-Glutamin (v/v) kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen durch

Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-PBS-Lösung (0,05%/0,02% (w/v), 5-10 Minuten bei 37°C) abgelöst. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (1300 rpm, 7 min), im Verhältnis 1/3-1/5 geteilt und erneut in Kultur genommen.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden, um sie bei Bedarf wieder aufzutauen und erneut in Kultur zu nehmen. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert, maximal 20-30 x 10⁶ Zellen pro Aliquot in kaltem (4°C) Einfriermedium aufgenommen und auf Eis in 1 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit Folie zunächst bei -20°C eingefroren. Die Zugabe von DMSO, das in die Zellen diffundiert, soll die Kristallbildung beim Einfrieren und somit die Zerstörung der Zellmembranen verhindern. Nach der ersten Einfrierphase bei -20°C und -80°C folgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C). Zum Auftauen der Zellen wurde das Röhrchen im Wasserbad erwärmt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Unter ständigem Schütteln wurden zunächst tropfenweise 10 ml (kaltes) Kulturmedium hinzugegeben. Nach zweimaligen Waschen (1300 rpm, 7 min) mit Kulturmedium und dem Bestimmen der Zellzahl und der Zellvitalität konnten die Zellen weiter verarbeitet werden. Da DMSO bei Raumtemperatur für die Zellen toxisch ist, erfolgte der Vorgang möglichst rasch.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10-50 µl der Zellsuspension in 50-90 µl einer Eosin-Lösung oder Trypanblau-Lösung verdünnt. Die toten Zellen werden dabei aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit selektiv angefärbt, was eine Einschätzung der Zellvitalität ermöglicht. Die lebenden Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Kammervolumen ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich durch Multiplikation des Mittelwerts der in zwei bis vier Teilquadraten gezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor (2-10) und dem Kammerfaktor (10⁴).

4.1.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

„Buffy-Coats“ sind Leukozytenkonzentrate, die nach dem Abzentrifugieren von Vollblut abgepresst werden. Aus diesem Konzentrat lassen sich periphere mononukleäre Zellen (PBMNZ) durch eine Dichtegradientenzentrifugation isolieren. Dabei sammeln sich die Lymphozyten und Monozyten entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Plasma- und Thrombozyten-Überstand und der Ficoll-Lösung an. Das Zellsediment setzt sich aus Erythrozyten und Granulozyten (und gegebenenfalls toten MNZ) zusammen, welche eine höhere Dichte aufweisen als 1,077 g/ml. Es wurden in einer mittleren Zellkulturflasche 100 ml PBS vorgelegt und der „Buffy-Coat“ (meist ca. 25-30 ml) darin verdünnt. In 50 ml Röhrchen wurden jeweils 15 ml Ficoll ($d=1,077$ g/ml) vorgelegt und 25 ml des verdünnten Buffy-Coats vorsichtig überschichtet. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse) wurde der Überstand bis zum Interphasering abgesaugt. Der Lymphozytenring wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, zweimal mit PBS, einmal mit Kulturmedium gewaschen (1300 rpm, 7 min) und schließlich in RPMI-Medium mit 5% FCS aufgenommen. Die Waschschriffe dienen der Entfernung von Thrombozyten, Serum und Ficollrückständen.

4.1.5 E-Rosettierung

T-Zellen weisen in der Regel ein charakteristisches Oberflächenmolekül (CD2) auf, das ein Glykoprotein (T11TS) auf Schaferythrozyten (sheep red blood cells, SRBC) bindet. Bei der Inkubation beider Zelltypen bilden sich SRBC-Rosetten um einzelne T-Zellen. Diese Rosetten lassen sich aufgrund ihrer insgesamt höheren Dichte effektiv über einen Ficoll-Gradienten von (nicht rosettierenden) B-Zellen oder Monozyten ("E⁻ Zellen") trennen. SRBC lassen sich anschließend mit einer 1 M NH₄Cl-Lösung lysieren. Die zu behandelnden Zellen wurden auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und 20 ml dieser Zellsuspension mit 5 ml Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten vermenget. Dieses Gemisch wurde auf 15 ml Ficoll geschichtet und anschließend abzentrifugiert (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse). Der Interphasering enthält die E⁻ Zellen, die E⁺ Zellen finden sich im Zellsediment. Zur Isolierung dieser CD2⁺ Zellen wurde das sedimentierte Material in 1-2 ml NH₄Cl-

Lösung resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen.

4.1.6 Ansatz von Neuraminidase-behandelten Schafserythrozyten

20 ml Schafblut wurden dreimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, ohne Bremse). Dabei wurde jeweils die sich ablagernde Schicht von Schaflymphozyten auf den Erythrozyten abgesaugt. Das Erythrozytensediment wurde dann in 20 ml RPMI-Medium mit 10% FCS aufgenommen. Nach Zugabe von 500 µl Neuraminidase und 30minütiger Inkubation bei 37° wurden die Erythrozyten noch zweimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, ohne Bremse). Ausgehend vom erhaltenen Pellet wurde eine 10%ige SRBC-Suspension in RPMI-Medium mit 10% FCS hergestellt. Zur Überprüfung der Reinheit wurden 500 µl Erythrozyten in NH₄Cl-Lösung lysiert und die Anzahl der Leukozyten in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die SRBCs wurden nur für Rosettierungen verwendet, wenn die Auszählung weniger als sieben Leukozyten pro Quadrant ergab.

4.1.7 Transfektion von Zellen

4.1.7.1 Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Die Transfektion von 293T-Zellen wurde nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitatemethode durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen gemäß den Angaben in Tabelle 4.1 ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Der Transfektionsansatz besteht aus einem gleichen Volumen an BES (2x) und einer 250 mM Kalziumchloridlösung, welche die zu transfizierende DNA enthält. Zunächst wurde die DNA zur CaCl₂-Lösung gegeben und das Volumen mit Wasser gemäß Tabelle 4.1 dem Volumen der einzusetzenden BES-Lösung angeglichen. Nachfolgend wurde die BES-Lösung tropfenweise unter leichtem Schütteln (800 rpm) zur Kalziumchlorid-Lösung mit der entsprechenden DNA gegeben. Der Reaktionsansatz verblieb zehn Minuten bei Raumtemperatur und wurde dann tropfenweise dem Kulturmedium beigefügt. Die Zellen wurden für weitere 18-24

Stunden kultiviert und nachfolgend für die entsprechenden Analysen verwendet. In Abhängigkeit von der verwendeten Zellkulturschale wurde die Zellzahl, die DNA-Menge und die Menge der eingesetzten Reagenzien gemäß Tabelle 4.1 variiert.

Tabelle 4.1: Zellzahl, Menge an DNA und Volumen der eingesetzten Puffer bei Verwendung unterschiedlicher Zellkulturschalen

Zellkulturschale	Anzahl der Zellen/ Volumen Medium	DNA-Menge (Vektor 1: Vektor 2)	Puffervolumen (2xBES/2.5 M CaCl ₂)
10 cm-Zellkulturschale	5-6 x 10 ⁵ /10 ml	5 µg : 1 µg	500 µl/50 µl
20 cm-Zellkulturschale	3-4 x 10 ⁶ /40 ml	20 µg : 6 µg	2 ml/200 µl
6-Well-Platte	1,2-1,5 x 10 ⁵ /2 ml	1 µg : 0.2 µg	100 µl/10 µl
12-Well-Platte	1,2 x 10 ⁵ /2 ml	1 µg : 0.2 µg	100 µl/10 µl

4.1.7.2 Elektroporation

Die adhärenzte Zelllinie HeLa wurde bei 80% Konfluenz durch Zugabe von 10 ml Trypsin/EDTA geerntet, dreimal mit PBS gewaschen und in RPMI-Medium ohne weitere Zusätze auf eine Dichte von 10×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Suspensionszellen Hut78 wurden am Vortag der Elektroporation in frisches Kulturmedium überführt. Zur Elektroporation wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und in RPMI-Medium ohne weitere Zusätze auf eine Dichte von 20×10^6 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µg Vektor oder zusätzlich mit 6 µg eines zweiten Vektors in einer „Gene Pulser“-Küvette gemischt und im Gene Pulser II (RF model) elektroporiert. Die Parameter wurden entsprechend des zu elektroporierenden Zelltyps variiert (Tabelle 4.2). Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 6 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und sorgfältig resuspendiert. Die Zellen wurden für weitere 18-24 Stunden in 12-Well-Platten kultiviert und für entsprechende Analysen verwendet.

Tabelle 4.2: Elektroporationseinstellungen für HeLa-Zellen und Hut78-Zellen

Zelltyp	Volt (V)	Frequenz (kHz)	Modifikation (%)	Anzahl der Pulse	Pulsdauer (msec)
HeLa	240	40	50	5	5
Hut78	370	40	100	5	7

4.1.7.3 Nukleofektion

Jurkat-Zellen und PHA-Blasten wurden mit dem Nukleofektionssystem von AMAXA transfiziert. Je Transfektionsansatz wurden 5×10^6 Zellen in 100 μ l der entsprechenden Nukleofektionslösung (Tab. 4.3) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 2 μ g der zu transfizierenden DNA bzw. 150 pmol siRNA in Nukleofektionsküvetten überführt und im Nukleofektor unter Verwendung eines geeigneten Programms (Tab. 4.3) elektroporiert. Nachfolgend wurden rasch 500 μ l vorgewärmtes Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann sorgfältig resuspendiert und in 12-Well-Zellkulturplatten mit jeweils 1,5 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Nach etwa 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geteilt. Jurkat-Zellen wurden 24 Stunden kultiviert und dann für nachfolgende Analysen verwendet. Nach Transfektion mit siRNA wurden PHA-Blasten 72 Stunden inkubiert, bevor sie für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

Tabelle 4.3: Verwendete Lösungen und Programme zur Nukleofektion von PHA-Blasten und Jurkat-Zellen

Zelltyp	Nukleofektorlösung	Programm
Jurkat	V	G-010, S-018
PHA-Blasten	For primary cells	X-001

4.1.8 Immunfluoreszenzanalysen

4.1.8.1 Durchflusszytometrie

Die Immunfluoreszenz ermöglicht sowohl den Nachweis zellulärer Oberflächenantigene als auch intrazellulärer Antigene. Mit Hilfe des Durchflusszytometers können Zellen, welche mit Fluorochrom-gebundenen Antikörpern markiert sind, hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität analysiert werden.

Nachweis von Zelloberflächenantigenen

Jeweils $1-2 \times 10^5$ Zellen wurden in einer 96-Well Spitzboden-Mikrotiterplatte abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min, 4°C) und einmal mit 100 µl kaltem Waschpuffer (PBS mit 1% BSA und 0,1% NaN_3) gewaschen. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen mit Antikörpern bzw. einer geeigneten Isotypkontrolle gleicher Konzentration in einem Volumen von 5-10 µl resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Je nach Art des Primärantikörpers erfolgten weitere Färbeschritte. Bei direkt konjugierten Antikörpern wurden die Zellen nach zwei weiteren Waschschritten direkt in einer 1%igen PFA-Lösung aufgenommen. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurden die Zellen nach zwei weiteren Waschschritten mit einem geeigneten Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Bei Gebrauch biotinylierter Antikörper erfolgte ein weiterer Färbeschritt mit Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin.

Nachweis intrazellulärer Antigene

Zur Detektion intrazellulärer Antigene wurde das Cytofix/Cytoperm-Kit von Becton Dickinson verwendet. Jeweils $1-2 \times 10^5$ Zellen wurden in einer 96-Well-Spitzboden-Mikrotiterplatte abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min, 4°C) und einmal mit 100 µl kaltem Waschpuffer (PBS mit 1% BSA und 0,1% NaN_3) gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden diese in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung

resuspendiert und 15 Minuten auf Eis belassen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 100 µl Perm/Wash-Lösung wurden die pelletierten Zellen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration (1-5 µg) bzw. einer entsprechenden Isotypkontrolle gleicher Konzentration in einem Volumen von 100 µl Perm/Wash-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Wie auch bei dem Nachweis von Zelloberflächenantigenen erfolgten je nach Art des Primärantikörpers weitere Färbeschritte. Bei direkt konjugierten Antikörpern wurden die Zellen nach zwei weiteren Waschschritten mit Perm/Wash-Lösung direkt in einer 1%igen PFA-Lösung aufgenommen. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurden die Zellen nach zwei weiteren Waschschritten mit einem geeigneten Fluorochrom-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert.

Bestimmung des Anteils toter Zellen mittels Propidiumjodid

Der Anteil toter Zellen lässt sich durchflusszytometrisch anhand der Aufnahme von Propidiumjodid messen. Propidiumjodid wird hierbei aufgrund der Membrandisfunktion selektiv von toten Zellen aufgenommen und interkaliert in die DNA. Interkaliertes Propidiumjodid fluoresziert wesentlich stärker als lösliches und lässt sich somit im FACScan (FL2 oder FL3) nachweisen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann in 100 µl Propidiumjodid-Lösung (2,5 µg/ml Propidiumjodid in PBS) aufgenommen. Die Messung erfolgte nach 10 bis 20 Minuten im FACScan.

4.1.8.2 Konfokale Mikroskopie

Reinigung der Deckgläser

Zur Vorbereitung der Deckgläser für den Gebrauch in der Zellkultur wurden diese für 15 Minuten in konzentrierter Salzsäure geschwenkt. Anschließend wurden sie zweimal mit Wasser und einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurden sie zu Sterilisationszwecken über Nacht bei 180°C getrocknet.

Vorbehandlung der Deckgläser

Um die Adhärenz der Zellen auf den Glas-Deckgläsern zu gewährleisten, wurden diese in 12-Well-Platten überführt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Es wurde dann Poly-L-Lysin (50 µg/ml in PBS) hinzugegeben und die Deckgläser 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Deckgläser wiederum dreimal mit PBS gewaschen.

Vorbereitung der Zellen

Adhärenz Zellen wurden in einer Dichte von $1,2-1,5 \times 10^5$ Zellen für 24 Stunden auf Deckgläsern in 12-Well-Platten kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen entweder direkt für mikroskopische Analysen verwendet oder im Falle von 293T-Zellen bei Bedarf mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation transfiziert, für weitere 18-24 Stunden kultiviert und dann mikroskopisch analysiert. HeLa-Zellen wurden nach Elektroporation auf Deckgläsern in 12-Well-Platten ausgesät und für 18-24 Stunden kultiviert, bevor sie mikroskopisch analysiert wurden. Suspensionszellen wurden direkt auf vorgekühlte Deckgläser in einer 12-Well-Platte überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Adhärenz der Zellen wurde lichtmikroskopisch untersucht. Nicht-adhärenz Zellen wurden durch Abnehmen des Kulturmediums vorsichtig entfernt.

Fixierung der Zellen

Vor der Fixierung der auf den Deckgläsern adhärenz Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation mit 3% PFA in PEM-Puffer, gefolgt von einer zehnminütigen Inkubation mit 3% PFA in Borat-Puffer. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese nachfolgend 15 Minuten mit 1% Triton X-100 in PBS behandelt. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit PBS gewaschen. Bei Färbung der Plasmamembran mit Fluorochrom-konjugierten Weizenkeim-Agglutininen wurde auf eine Permeabilisierung der Zellen verzichtet. Zur Reduktion reaktiver

Aldehydgruppen, welche zur Hintergrundfluoreszenz des Präparats beitragen könnten, wurden die Zellen zweimal zehn Minuten mit Natriumborhydrid (1 mg/ml in PBS) behandelt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurde die Zellen gefärbt.

Färbung der Zellen

Zunächst wurden die Präparate für eine Stunde mit 0,2% BSA in PBS blockiert. Zur Färbung wurden die Zellen mit Antikörpern in geeigneter Konzentration inkubiert. Dazu wurden die Antikörper in einem Volumen von 50-100 µl in Blockierungspuffer verdünnt und auf Parafilm aufgebracht. Die Deckgläser wurden dann bei Raumtemperatur eine Stunde mit den entsprechenden auf dem Parafilm vorgelegten Antikörpern inkubiert. Je nach Art des Primäantikörpers erfolgten weitere Färbeschritte. Bei direkt konjugierten Antikörpern wurden die Deckgläser nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS und einem mit destilliertem Wasser direkt auf die Objektträger aufgebracht. Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurden die Zellen nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS mit einem geeigneten Fluorochrom-konjugiertem Sekundäantikörper inkubiert (45-60 min, RT). Rhodamin-konjugiertes Phalloidin wurde zur Färbung von Aktinfilamenten verwendet (30 min, RT). Die Plasmamembran wurde mit Fluorochrom-konjugierten Weizenkeim-Agglutininen gefärbt (20-30 min, RT). Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen für 15 Minuten mit DAPI inkubiert. Die Deckgläser wurden mit 12 µl MoBiGLOW-Mounting-Medium auf dem Objektträger fixiert.

4.1.9 Durchführung der Versuchsansätze mit T-Zellklonen und T-Zelllinien

4.1.9.1 Kinetik der FasL-Oberflächenexpression

Für die Versuche wurden Zellen verwendet, die sich in der Proliferationsphase (9-21 Tage nach Restimulation mit „Feeder-Cocktail“) befanden. Die Zellen wurden auf eine Zelldichte von 1×10^6 /ml eingestellt, aliquotiert und jeweils mit den Inhibitoren in geeigneter Konzentration für 30 min bei 37° C vorinkubiert. Dann wurden 90 µl der

Zellsuspension in eine 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte überführt und zur Stimulation mit 10 µl einer Verdünnung von TPA und Ionomycin (Endkonzentration: 10 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin) in Kulturmedium versetzt. Die Zugabe von TPA/Ionomycin erfolgte sukzessiv, d.h. die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume stimuliert, aber gleichzeitig gefärbt. Zum Abbruch der Stimulation wurden die Zellen in eine 96-Well Spitzboden-Mikrotiterplatte überführt und abzentrifugiert (1000 rpm, 4°C, 4 min) und zur durchflusszytometrischen Untersuchung der FasL-Oberflächenexpression gemäß des Standardprotokolls gegen den Fas-Liganden und mit einer geeigneten Isotypkontrolle gefärbt.

4.1.9.2 Aktivierungs-induzierter Zelltod

Zur Analyse des Aktivierungs-induzierten Zelltodes wurden Zellen des CD4⁺ T-Zellklons 12603 (TH1) auf eine Zellzahl von 2×10^6 /ml in Kulturmedium eingestellt, aliquotiert und jeweils mit den Inhibitoren in geeigneter Konzentration für 30 min bei 37° C vorinkubiert. 400 µl der entsprechend vorbehandelten Zellsuspension wurden in eine 24-Well Zellkulturplatte überführt und für 18 Stunden mit Staphylokokken-Enterotoxin A (0.5 ng/ml) oder zur Kontrolle ohne weitere Zusätze inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellviabilität mittels Propidiumjodid-Färbung ermittelt. Die FasL-Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch gemäß Standardprotokoll untersucht.

4.1.9.3 Kokultur von T-und B-Zellen

Zur mikroskopischen Analyse der zytotoxischen immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und B-Zellen wurden 2×10^6 PHA-Blasten oder Zellen des Klons 12603 bzw. 1×10^6 Jurkat-Zellen mit 1×10^6 EBV-transformierten B-Zellen (EBV-M) in 1 ml Kulturmedium für 10-30 Minuten in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 37°C inkubiert. Im Falle der Kokultur mit PHA-Blasten wurden die EBV-transformierten B-Zellen 30 Minuten mit einer Mischung der bakteriellen Superantigene A, B, C, D und E (jeweils 20 ng/ml) inkubiert und dreimal intensiv mit Medium ohne weitere Zusätze gewaschen. Für die Kokultur mit Jurkat-Zellen wurde mit bakteriellem Superantigen

E analog verfahren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellkonjugate vorsichtig auf vorgekühlte Deckgläser überführt und nach dem Standardprotokoll fixiert und gefärbt. Bei Verwendung von Inhibitoren wurden die Effektorzellen 30 Minuten bei 37°C mit den entsprechenden Substanzen vorinkubiert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolierung

1-2 x 10⁶ Zellen wurden mit PBS gewaschen und die RNA unter Verwendung des Nucleospin[®] RNA II-Kits isoliert. Dazu wurden 5 x 10⁶ T-Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in 350 µl Lysepuffer (RA1) mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Nach kurzer Inkubation wurde die Lysate auf eine Filtersäule gegeben und zentrifugiert (11000 x g, 1 min). Der Durchlauf wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt und zur Bindung der RNA auf eine weitere Säule gegeben und zentrifugiert (11000 x g, 30 sec). Zum Entsalzen der Probe wurde die Säule nach Zugabe von 350 µl Entsalzungspuffer (MDB) ein weiteres Mal zentrifugiert (11000 x g, 1 min). Um enthaltene DNA zu entfernen wurde die Silikamembran für 15 Minuten mit DNase behandelt. Nachfolgend wurde die Membran dreimal gewaschen, davon einmal mit 200 µl Waschpuffer RA2 (11000 x g, 30 sec), und zweimal mit einem weiteren Waschpuffer RA3 (600 µl, 11000 g, 30 sec und 250 µl, 11000 g, 2 min). Schließlich wurde die RNA mit 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

4.2.2 RT-PCR

Zur Generierung von cDNA wurden 1 µg der isolierten RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl eingestellt. Es wurde dann 1 µl Primer (Random Primer) hinzugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 72°C im PCR-Gerät inkubiert, um die Bindung der Primer zu gewährleisten. Es wurden nachfolgend 4 µl PCR-Puffer, 1 µl dNTPs, 0,5 µl RNase-Inhibitor (RNasin) und 1 µl Reverse

Transkriptase beigefügt. Die Proben wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C im PCR-Gerät inkubiert.

4.2.3 Reguläre PCR

Zur Amplifikation individueller cDNAs wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl 2 µl der aus der RT-PCR erhaltenen DNA (s. 4.2.2) mit jeweils 3 µl der entsprechenden Primer (10 pmol/µl) und 2,5 µl PCR-Puffer (10x), 0,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 0,25 µl Hot-Start-Taq-Polymerase sowie 12,75 µl Wasser versetzt. Als Kontrollen dienten jeweils eine Probe ohne Primer und Template (N1) und eine ohne Template (N2). Nach der Aktivierung der Polymerase für 15 Minuten bei 95°C erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen. Nach einer initialen Denaturierungsphase bei 95°C für 30 Sekunden fand die Bindung der Primer bei geeigneter Temperatur für 40 Sekunden statt. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 30 Sekunden. Die PCR wurde durch eine zehnmünütige Synthesephase abgeschlossen.

4.2.4 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation kompetenter Bakterien (TOP10) mit Plasmid-DNA wurden 50 µl der Bakteriensuspension mit 2 µl DNA versetzt. Der Transformationsansatz wurde 30 Minuten auf Eis belassen und anschließend für 30 Sekunden bei 42°C inkubiert. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden 950 µl vorgewärmtes SOC-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und dieser nachfolgend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. 50 µl des Ansatzes wurden entnommen und auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Der verbleibende Transformationsansatz wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die sedimentierten Bakterien in 50 µl SOC-Medium aufgenommen und ebenfalls auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C für 24 Stunden wurde die Agarplatte auf das Wachstum definierter Kolonien untersucht.

4.2.5 Anlegen von Glycerol-Stocks

Zur Aufbewahrung transformierter Bakterien wurden 3-5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit den gewählten Kolonien angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min), die sedimentierten Bakterien in 500 µl LB-Medium aufgenommen und weiterhin mit 500 µl Glycerol versetzt. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

4.2.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in kleinem Maßstab mittels des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey Nagel), in großem Maßstab unter Verwendung des NucleoBond PC500 Kits (Macherey Nagel) aufgereinigt. Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden am Vortag 3-5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit Bakterien angeimpft (aus Glycerolstock oder ausgewählten Kolonien) und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und das Pellet in 250 µl RNase-haltigem Puffer (A1) aufgenommen. Der Ansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 250 µl Lysepuffer (A2) versetzt und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µl Neutralisierungspuffer (A3) zugefügt und der Ansatz abermals durch vorsichtiges Schwenken durchmischt. Nach Zentrifugation (11000 rpm, 10 min) wurde der Überstand auf eine Säule gegeben und durch Zentrifugation (11000 rpm, 1 min) mit 600 µl Waschpuffer (A4) gereinigt. Zur Trocknung wurde die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert (11000 rpm, 2 min). Die DNA wurde mit destilliertem Wasser durch Zentrifugation bei 11000 rpm für zwei Minuten eluiert.

Zur Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurden 350 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit Bakterien angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min). Die sedimentierten Bakterien wurden in 12 ml RNase-haltigem Puffer resuspendiert (S1), mit weiteren 12 ml Lysepuffer (S2) versetzt und nach vorsichtigem Schwenken fünf Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nachfolgend wurden 12 ml Neutralisierungspuffer (S3) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das erhaltene Lysat wurde zentrifugiert (13000 rpm, 40 min), filtriert und auf eine mit

Equilibrierungspuffer (N2) equilibrierte Säule geladen. Die an die Säule gebundene DNA wurde gewaschen (32 ml Waschpuffer N3) und mit 15 ml Elutionspuffer (N5) eluiert. Das erhaltene Eluat wurde mit 11 ml Isopropanol versetzt, leicht geschwenkt und bei 13000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 5 min), getrocknet und in 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

4.2.7 Restriktionsverdau

In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 1 µg der zu testenden DNA mit jeweils 0,5 µl der entsprechenden Restriktionsenzyme, 1 µl des geeigneten Reaktionspuffers (10x) und einem entsprechenden Volumen von destilliertem Wasser versetzt. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37° C inkubiert und dann mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung restriktionsverdauter Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Aufgrund des linear zur Länge der DNA negativ geladenen Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats findet ein Ladungstransport statt, wobei die Nukleinsäuren ihrem Molekulargewicht entsprechend zur Anode wandern. Die Elektrophorese wurde in der Regel bei 100 V in 0,8-2%igen Gelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt, die mit TAE-Puffer umspült wurden. Die Laufzeit betrug unter den Bedingungen ca. 30 Minuten. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht an einem Gelscanner mit angeschlossenem PC.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Der Kulturüberstand der entsprechenden Hybridomzellen wurde gesammelt, filtriert und der pH-Wert auf 6.5 eingestellt. Der Überstand wurde dann über eine Protein G Sepharose-Säule gegeben, die zuvor mit Bindungspuffer equilibriert und intensiv gewaschen worden war. Das gebundene Protein wurde mit Elutionspuffer von der Säule in Sammelröhrchen eines Fraktionssammlers eluiert und neutralisiert. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht in Dialysierschläuchen gegen PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und die erhaltene Antikörperlösung gegebenenfalls mit einem Centricon-30-Konzentrator ankonzentriert. Die Antikörper wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine wurden transformierte Bakterien über Nacht in 100 ml sterilem LB-Medium mit $50\ \mu\text{g/ml}$ Ampicillin bei 37°C auf einem Schüttler angezogen. Diese Vorkultur wurde dann in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und für weitere ein bis zwei Stunden expandiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von IPTG ($1\ \text{mM}$) induziert. Nach weiteren vier bis fünf Stunden wurden die Bakterien abzentrifugiert ($10\ \text{min}$, $5000\ \text{rpm}$, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in $27\ \text{ml}$ PBS resuspendiert und anschließend lysiert. Dazu wurden die Bakterien zunächst dreimal für jeweils drei Sekunden mit Ultraschall behandelt und nach Zugabe von in $3\ \text{ml}$ 10% igem Triton X-100 Lysepuffer weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das erhaltene Lysat wurde abzentrifugiert ($30\ \text{min}$, $13000\ \text{rpm}$, 4°C), wobei die Fusionsproteine in der Regel im Überstand verblieben. Zur Präzipitation der GST-Fusionsproteine wurde der Überstand mit $3\ \text{ml}$ Glutathion-Sepharose-4B-Beads (50% (v/v) in PBS) versetzt und bei 4°C für zwei Stunden rotiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Proteinbeladung der Beads photometrisch bestimmt. Entweder wurden die mit Fusionsprotein beladenen Beads aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder die Fusionsproteine mit Glutathion-Elutionspuffer eluiert. Dabei wurde das Beads-

Elutionspuffergemisch für 20-30 Minuten bei 4°C rotiert. Die Elution wurde dreimal durchgeführt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, filtriert und die Konzentration des Fusionsproteins photometrisch bestimmt. Danach wurden die Eluate über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert und der Proteingehalt nach der Dialyse erneut bestimmt. Die erhaltenen Fusionsproteine wurden gegebenenfalls ankonzentriert. Die Reinheit der eluierten Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung überprüft. Die eluierten und dialysierten Fusionsproteine wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit einem modifizierten Bradford-Test (Pierce) nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt.

4.3.4 Herstellung von Zelllysaten

Eine definierte Anzahl von Zellen (abhängig von Zelltyp und Applikation) wurde einmal mit PBS gewaschen und in 1% NP40-Lysepuffer resuspendiert. Zur Vermeidung weiterer Degradierung von Proteinen wurden dem Lysepuffer die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid, Pepstatin A, Natrium-Orthovanadat, EDTA, Natriumfluorid und Natriumpyrophosphat beigelegt. In einigen Fällen wurde das Lysat unter Verwendung eines Homogenisators weiter homogenisiert. Nach 15-25 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 14000 rpm für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die erhaltenen Lysate wurden entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.3.5 Subzelluläre Fraktionierung

Zur subzellulären Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden PHA-Blasten (200×10^6) bzw. JFL-Zellen (100×10^6) mit PBS gewaschen und in 1 ml Fraktionierungspuffer aufgenommen. Zum schonenden Aufschluss der Zellen

wurden diese jeweils zweimal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Zur Entfernung verbliebener intakter Zellen und der Zellkerne wurde das erhaltene Zellhomogenisat abzentrifugiert (4000 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde über einen Percoll-Dichtegradienten separiert. Dazu wurden zunächst 1,7 ml Percoll-Lösung (d=1,05 g/ml, eingestellt mit Fraktionierungspuffer) mit 1,7 ml Percoll-Lösung anderer Dichte (d=1,12 g/ml) unterschichtet. Auf den Percoll-Dichtegradienten wurde dann 1 ml des Zellhomogenisats gegeben und der Fraktionierungsansatz in einer Ultra-Zentrifuge zentrifugiert (100000 x g, 150 min, 4°C, ohne Bremse). Danach wurde der Boden des Zentrifugen-Röhrchens mit einer Kanüle perforiert und Fraktionen von 4 Tropfen (jeweils ca. 100 µl) gesammelt.

Zur subzellulären Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation wurden 200×10^6 Zellen analog aufgeschlossen, wobei jedoch ein modifizierter Fraktionierungspuffer verwendet wurde (s. 3.3.1.6). Das erhaltene Zellhomogenisat wurde ebenfalls zunächst für zehn Minuten bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert, um verbliebene intakte Zellen und Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde dann zur Entfernung von Membranfragmenten bei 8000 x g und 4°C für zwei Minuten zentrifugiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 100000 x g für zwei Minuten, bei der die Organellen sedimentieren, wurde der Überstand zwölf Minuten bei 400000 x g zentrifugiert, um Mikrosomen vom Zytosol zu trennen.

4.3.6 Präzipitation mit Fusionsproteinen

Zur Präzipitation von Proteinen mit GST-Fusionsproteinen wurden die Lysate von $10-20 \times 10^6$ Zellen zwei Stunden bei 4°C mit 20-50 µg des entsprechenden Fusionsprotein und 50 µl Glutathion-Sepharose-Beads (50% (v/v) in PBS) rotiert. Die Beads wurden abzentrifugiert, dreimal mit kaltem PBS gewaschen und in Probenpuffer aufgekocht (5 min, 95°C). Die Proben wurden dann über SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels Western Blot analysiert.

4.3.7 (Ko-)Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurden Lysate zwei Stunden mit 1-5 µg eines Antikörpers und in Abhängigkeit vom Isotyp des verwendeten Antikörpers mit 50-60 µl Protein A-, Protein G- oder Protein L-Sepharose-Beads (50% (v/v) in PBS) zwei Stunden rotiert. Die Beads wurden dann abzentrifugiert, dreimal mit kaltem PBS oder Lysepuffer gewaschen und in Probenpuffer gekocht (5 min, 95°C). Die Proben wurden schließlich über SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels Western Blot analysiert. Zur Ko-Immunpräzipitation wurden etwa 4×10^6 293T-Zellen 24 Stunden nach Transfektion geerntet und lysiert. Die erhaltenen Lysate wurden geteilt und jeweils für 2 Stunden mit 2-5 µg des entsprechenden Antikörpers und 50-60 µl Protein A-Sepharose-Beads (50% (v/v) in PBS) rotiert. Die Beads wurden analog der einfachen Immunpräzipitation weiter verarbeitet.

4.3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit β -Mercaptoethanol reduziert. Durch die Bindung von SDS an hydrophobe Regionen der Proteine werden negative Ladungen eingeführt, welche die Eigenladung des Proteins überdecken. Dadurch hängt die Mobilität der Proteine im Acrylamidgel nicht mehr von ihrem isoelektrischen Punkt, sondern nur noch von ihrer Größe ab.

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese standen das Protean II-System der Firma Bio-Rad und das NuPAGE-System von Invitrogen zur Verfügung. Beim Protean II-System wurde die Acrylamidkonzentration des Trenngels entsprechend des Molekulargewichts des zu untersuchenden Proteins variiert. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit 96%igem Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Alkohol abgegossen und verbliebenes Ethanol durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Der Gesamtproteingehalt der zu analysierenden Proben betrug 20-50 µg. Die Proben wurden mit Probenpuffer (3x) versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Nachfolgend wurden die Proben zentrifugiert und in die mit Laufpuffer gefüllten Geltaschen

überführt. Präzipitate auf Protein A/G/L- bzw. Glutathion-Beads wurden nach dem Aufkochen in die trockenen Geltaschen geladen und erst anschließend mit Laufpuffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgte bei 55-70 V über Nacht.

Bei dem NuPAGE-System von Invitrogen wurden in der Regel 4-12% Bis-Tris-Fertiggele verwendet. 1-5 µg der Probe wurden mit 2,5 µl NuPAGE-Probenpuffer (4x) und 1 µl DTT (0,85 M) versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Anschließend wurden die Proben zehn Minuten bei 70°C inkubiert, zentrifugiert und in die Geltaschen überführt. Die Auftrennung erfolgte für ca. eine Stunde bei 200 V.

4.3.9 Coomassie-Färbung

Proteine in Polyacrylamidgelen können mit Coomassie Brilliant Blue dargestellt werden. Die Gele wurden für 1-5 Stunden in einer Färbelösung inkubiert, danach entfärbt und schließlich getrocknet.

4.3.10 Western Blot

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die separierten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Komponenten der Transfer-Kammer wurden zunächst in Western Blot-Transferpuffer equilibriert. Die Transferkammer wurde von der Kathode zur Anode wie folgt zusammengesetzt: Schwamm, zwei Whatman-Papiere, Gel, Nitrozellulose-Membran, zwei Whatman-Papiere, Schwamm. Die Transfer-Kassette wurde in die Pufferkammer gesetzt und der Transfer wurde bei 4°C und 0,8 Ampere für zwei Stunden oder bei 0,15 A über Nacht durchgeführt. Der Transfer von NuPAGE-Gelen auf Nitrozellulose erfolgte analog unter Verwendung kleiner Gelkassetten bei 100 V für eine Stunde unter Eiskühlung. Die Effizienz des Transfers wurde durch Färbung mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde die Membran kurz mit Wasser gespült, fünf Minuten mit Ponceau S gefärbt und abermals mit Wasser gespült. Zur Immunodetektion von Proteinen wurde die Membran mit TBS entfärbt und mit Blockierungslösung für eine Stunde blockiert. Nachfolgend wurde die Membran eine Stunde mit Primärantikörper (verdünnt in TBST) und 45 Minuten mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Zwischen jedem Schritt wurde die

Membran dreimal für 7-10 Minuten mit TBST gewaschen. Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran eine Minute mit ECL-Detektionsreagenz inkubiert und die Chemilumineszenz durch Belichtung von Hyperfilm ECL Filmen dokumentiert.

5. Ergebnisse

5.1 Expression des FasL

Der Fas-Ligand wird als Todesfaktor im Verlauf des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) auf CD4⁺ T-Zellen und als zytotoxisches Effektormolekül auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Im Rahmen des AICD wird der FasL in der Regel in Abhängigkeit von der vorangegangenen Stimulation nach etwa 2-3 Stunden exprimiert (Oberg et al., 1997a). Im Falle der zytotoxischen Effektorzellen ist eine schnelle Expression des FasL in der immunologischen Synapse zur Unterstützung der Zielzellyse erforderlich (Bossi und Griffiths, 1999).

In eigenen Vorarbeiten im Rahmen der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Phorbol ester und Kalziumionophor induzierte Oberflächenexpression des FasL in kultivierten T- und NK-Zellen einer biphasischen Kinetik folgt. Unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren der Proteinbiosynthese, des Proteintransports, der Aktinpolymerisation und von Metalloproteasen konnte diese Expressionskinetik näher charakterisiert werden. Da diese Ergebnisse die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellen und im Rahmen der Doktorarbeit verifiziert wurden, sollen sie einleitend kurz dargestellt werden.

T-Zellklone und T-Zelllinien unterschiedlichen Phänotyps sowie NK-Zellen wurden unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors mit Phorbol ester (TPA) und Kalziumionophor (Ionomycin) stimuliert (Abb. 5.1.1). Anschließend wurde die Oberflächenexpression des Fas-Liganden durchflusszytometrisch bestimmt. Aus zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommenen individuellen Histogrammen wurden die Verläufe der Expression über einen Zeitraum von drei Stunden erstellt. Dabei tritt ein erstes Maximum nach einer Stimulationsdauer von nur zehn Minuten auf. Die Oberflächenexpression nimmt bei andauernder Stimulation wieder ab und erreicht ein Minimum nach etwa 40 Minuten. Im weiteren Stimulationsverlauf ist ein Wiederanstieg zu beobachten, welcher in einem zweiten Maximum nach etwa 120 Minuten resultiert. Unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren der Proteinbiosynthese, des Proteintransports, der Aktinpolymerisation und von Metalloproteasen konnte diese Expressionskinetik näher charakterisiert werden (Abb. 5.1.2 exemplarisch für CD8⁺ T-Zellen der Linie K CD8).

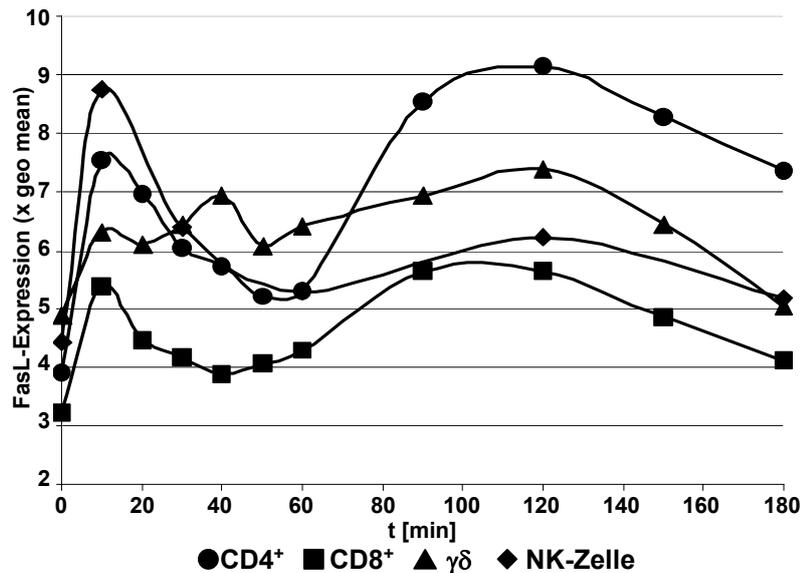


Abb. 5.1.1: Kinetik der TPA/Ionomycin-stimulierten FasL-Oberflächenexpression in T- und NK-Zellen. Zusammenstellung repräsentativer Experimente mit T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps sowie NK-Zellen.

Sowohl die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid (Abb. 5.1.2 A) als auch die Inhibition des Proteintransports vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat durch Brefeldin A (Abb. 5.1.2 B) zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das erste Maximum der FasL-Oberflächenexpression. Im weiteren Stimulationsverlauf nimmt die Menge des FasL auf der Zelloberfläche jedoch kontinuierlich ab und es lässt sich kein zweites Maximum beobachten. Unter Verwendung von Inhibitoren der Aktinpolymerisation (Cytochalasin D und Latrunculin A) wurde untersucht, inwieweit die induzierte Oberflächenexpression einen Aktin-abhängigen Prozess darstellt (Abb. 5.1.2 C). Sowohl Cytochalasin D als auch Latrunculin A inhibieren beide Phasen der FasL-Oberflächenexpression. Um den Einfluss von Matrix-Metalloproteasen auf den beobachteten biphasischen Verlauf der TPA/Ionomycin-stimulierten Oberflächen-Expression des Fas-Liganden zu untersuchen, wurde GM6001 (Ilomastat, Galardin) verwendet (Abb. 5.1.2 C). Diese Substanz inhibiert Matrix-Metalloproteasen durch Komplexbildung des katalytischen Metall-Ions und stellt somit einen Breitband-MMP-Inhibitor dar.

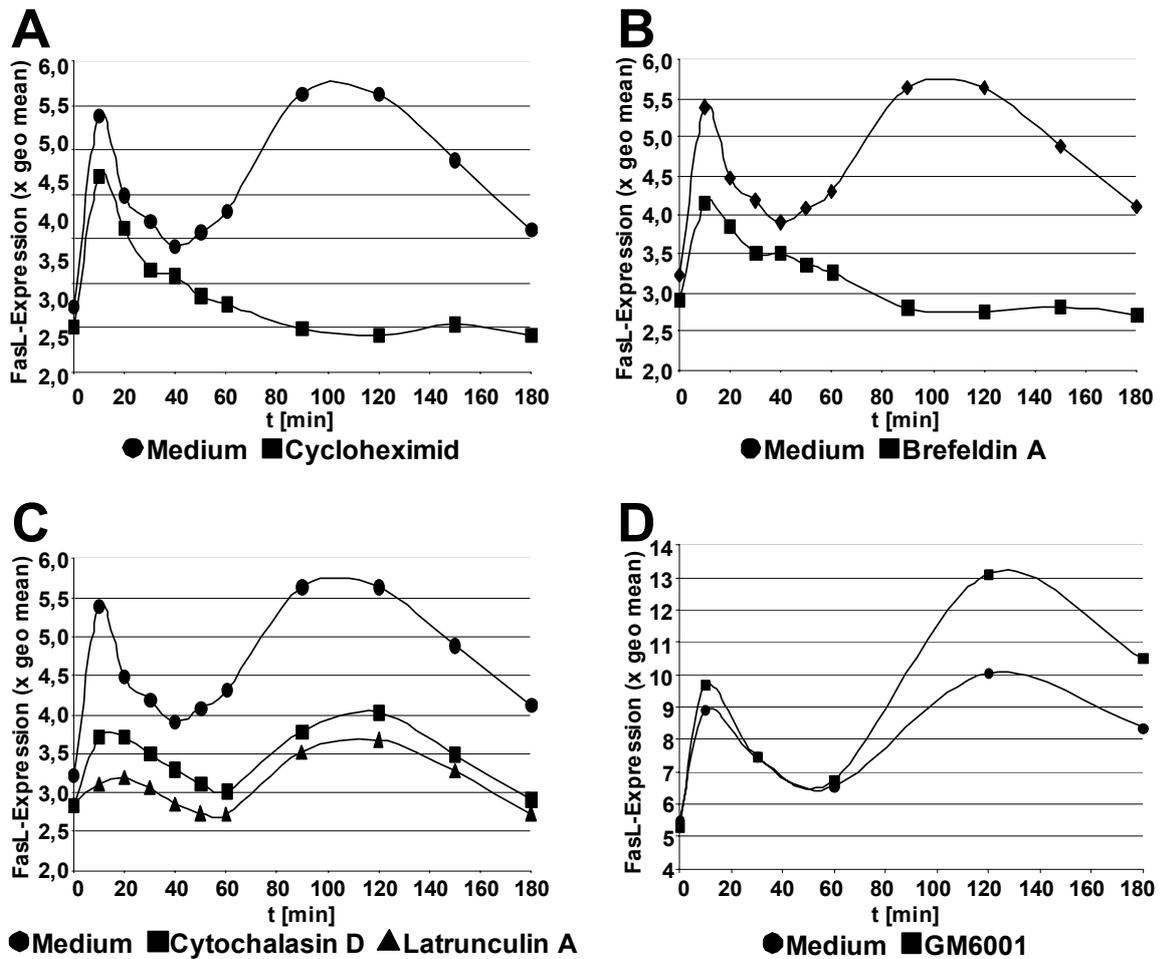


Abb. 5.1.2: Charakterisierung der induzierten FasL-Oberflächenexpression. Kinetik der TPA/Ionomycin-induzierten FasL-Oberflächenexpression in CD8⁺ T-Zellen der Linie K CD8 unter Einfluss von Inhibitoren der Proteinbiosynthese (Cycloheximid, A), des Proteintransports (Brefeldin A, B), der Aktinpolymerisation (Cytochalasin D und Latrunculin A, C) sowie von Matrix-Metalloproteasen (GM6001, D).

Bei GM6001-behandelten Zellen zeigt sich das erste Maximum in seiner Ausprägung geringfügig verstärkt. Wie in Kontrollzellen nimmt die Expression ab und erreicht ein Minimum nach etwa 50 Minuten, so dass sich ein klarer biphasischer Verlauf ergibt. Im weiteren Stimulationsverlauf nimmt die Expression jedoch stetig zu. Das zweite Maximum ist in seiner Intensität deutlich verstärkt.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass der FasL in kultivierten T- und NK-Zellen in sekretorischen Lysosomen gespeichert und nach Stimulation mit Phorbol ester und Kalziumionophor in einem Aktin-abhängigen Degranulationsprozess auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dies resultiert in dem beobachteten ersten Expressionsmaximum nach zehnminütiger Stimulation. Gleichzeitig induziert diese

Stimulation die Biosynthese des Proteins. Neusynthetisierter FasL wird ebenfalls zur Zelloberfläche transportiert und bedingt das beobachtete zweite Expressionsmaximum. Auf der Oberfläche der Zelle können Metalloproteasen die Expression des FasL beeinflussen. Interessanterweise konnten in diesem System keine Unterschiede zwischen einzelnen T-Zellsubpopulationen beobachtet werden.

Da die Speicherung des FasL in sekretorischen Lysosomen eine Voraussetzung für die beobachtete schnelle Aktivierungs-induzierte Mobilisierung und Oberflächenexpression des Todesfaktors darstellt, sollte die intrazelluläre Lokalisation des FasL in T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps fluoreszenzmikroskopisch näher untersucht werden. Dazu wurden $CD4^+$ T-Zellen des Klons 12603 und $CD8^+$ T-Zellen der Linie L $CD8^+$ fixiert, permeabilisiert und gegen die lysosomale Protease Cathepsin D sowie die gut charakterisierten zytotoxischen Effektorproteine Perforin und Granzym B, für die ebenfalls eine Speicherung in sekretorischen Lysosomen beschrieben ist, gefärbt. Sowohl in $CD4^+$ (Abb. 5.1.3 A) als auch in $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 5.1.3 B) findet sich der FasL in distinkten intrazellulären Granula. In diesen granulären Strukturen kolokalisiert der Todesfaktor mit Cathepsin D, Perforin und Granzym B. FasL wird in diesen Zellen somit gemeinsam mit Komponenten der zytotoxischen Effektormaschinerie intrazellulär in einem lysosomalen, sekretorischen Kompartiment gespeichert. Zur verbesserten Darstellung der Verteilung dieser intrazellulären Granula innerhalb der Zelle wurden Zellen der Linie L $CD8^+$ fixiert, permeabilisiert und gegen den FasL gefärbt. Die Zellen wurden dann durch Aufnahme von Z-Stapeln von xy-Scans dreidimensional visualisiert. Anhand der erhaltenen Aufnahmen (Abb. 5.1.4) lässt sich erkennen, dass die intrazellulären Granula, in denen der FasL lokalisiert ist, relativ gleichmäßig im Zytosol der Zelle verteilt sind.

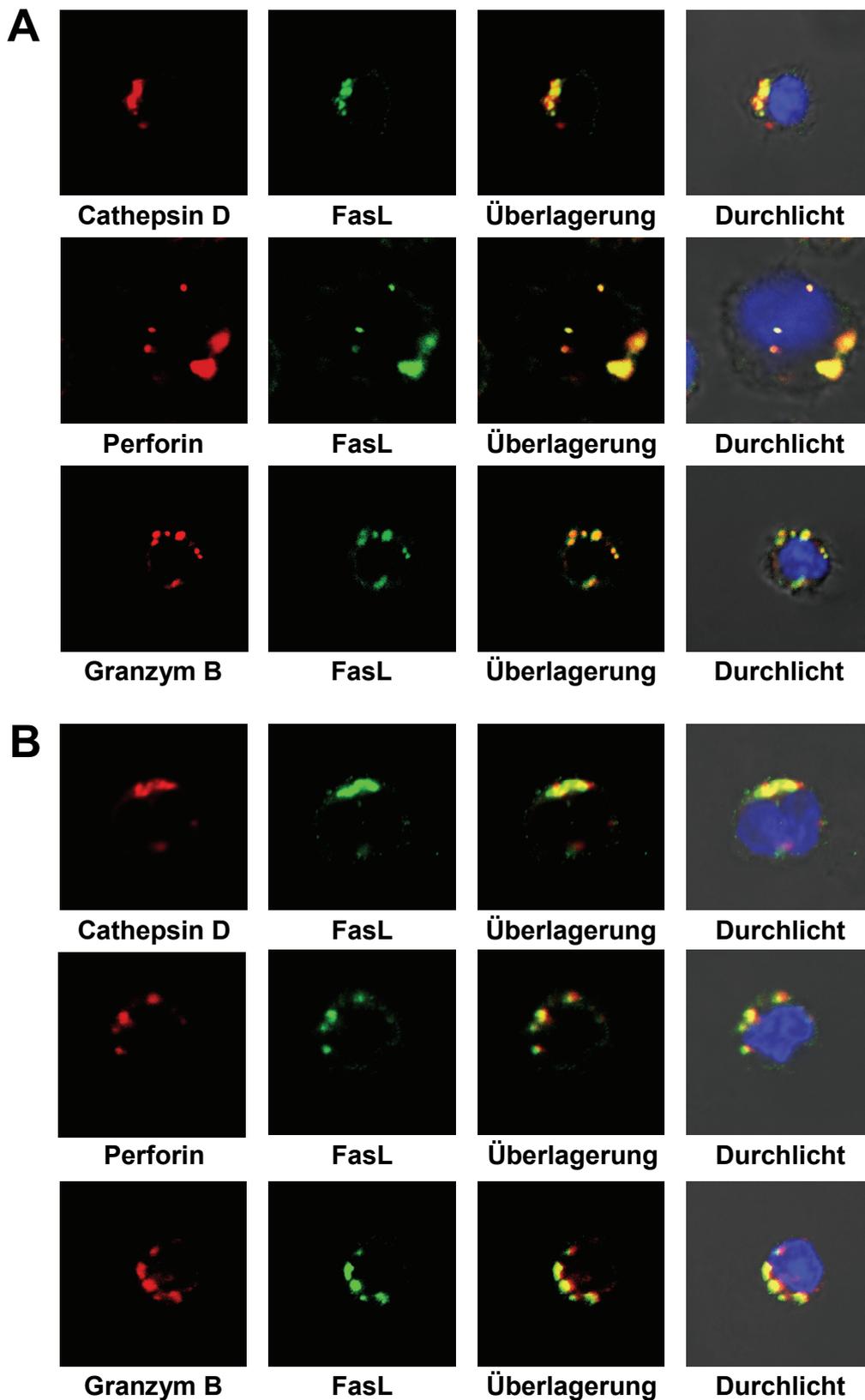


Abb. 5.1.3: Intrazelluläre Lokalisation des FasL. CD4⁺ T-Zellen des Klon 12603 (A) und CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8⁺ (B) wurden fixiert, permeabilisiert und gegen FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG, gegen Cathepsin D mit anti-Cathepsin D pAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG gefärbt. Nach intensivem Waschen wurden Granzym B und Perforin mit Alexa Fluor 647-konjugiertem anti-Perforin mAk bzw. Anti-Granzym B mAk gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

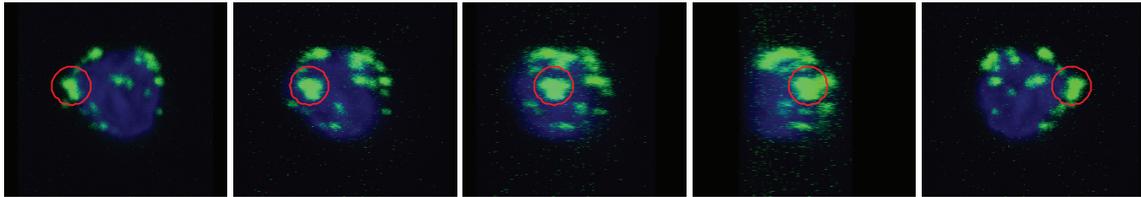


Abb. 5.1.4: Intrazelluläre Lokalisation des FasL. CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8⁺ wurden fixiert, permeabilisiert und gefärbt gegen FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Dargestellt sind Einzelansichten eines dreidimensionalen Bildes, welches aus Z-Stapeln von xy-Scans (0,2 µm Unterschied in z-Richtung) konstruiert wurde. Die Bilder stellen eine Rotation um die z-Achse um jeweils ca. 45° dar. Zur Verdeutlichung der Darstellung wurde eine individuelle Akkumulation von Granula rot markiert.

5.2 FasL-interagierende Proteine

Die posttranskriptionelle Regulation der Oberflächenexpression des Fas-Liganden beinhaltet die Speicherung des Todesfaktors in sekretorischen Lysosomen und die Aktivierungs-abhängige Degranulation dieser Speicherorganellen, was zur lokalen Oberflächenexpression des Fas-Liganden führt. Neben der induzierten Mobilisierung gespeicherter FasL-Moleküle führt die Aktivierung von T- und NK-Zellen zur Induktion der FasL-Biosynthese und der Expression auch der neusynthetisierten Proteine auf der Zelloberfläche. Dort kann die Aktivität des Fas-Liganden durch die Assoziation mit Lipidmikrodomänen der Zellmembran moduliert werden (Cahuzac et al., 2006; Nachbur et al., 2006). Darüber hinaus können Matrix-Metalloproteasen (MMPs) durch Spaltung des FasL an einer extrazellulären Spaltstelle die Freisetzung einer löslichen Form des FasL induzieren und gleichzeitig die Oberflächenexpression des membranständigen FasL reduzieren.

In Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde die Prolin-reiche Domäne des FasL funktionell mit der Regulation des Transports und der Oberflächenexpression assoziiert (Blott et al., 2001). Wir haben uns daher im folgenden mit Proteinen beschäftigt, die über SH3-Domänen mit der FasL-PRD interagieren. Der Fokus wurde dabei auf Proteine der PCH-Familie und das Adapterprotein Nck gelegt, die zuvor in unserer Arbeitsgruppe als FasL-Interaktoren identifiziert wurden.

5.2.1 PCH-Proteine

Mit GST-Fusionsproteinen der intrazellulären Domäne des FasL wurden in Vorarbeiten potentielle FasL-interagierende Proteine aus Lysaten von T-Zellen präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese separiert und die präzipitierten Proteine mittels Peptidmassenanalytik identifiziert. Mit PACSIN2 und FBP17 konnten zwei strukturell verwandte Proteine identifiziert werden (Ghadimi et al., 2002). Diese Proteine sind Mitglieder der sogenannten PCH (pombe cdc15 homology)-Familie. Wie in der Einleitung erläutert, konnten von den im humanen System 21 bekannten PCH-Proteinen neben PACSIN2 und FBP17 die PACSINe 1 und 3, CD2BP1 und CIP4 als FasL-interagierende Proteine identifiziert werden. Alle PCH-Proteine weisen eine C-terminale FCH bzw. EFC-Domäne auf. Die als FasL-Interaktoren identifizierten Proteine verfügen darüber hinaus über eine N-terminale SH3-Domäne. Funktionell sind Mitglieder der PCH-Familie an Prozessen wie der Endo- bzw. Exozytose, der Reorganisation des Zytoskeletts sowie dem Transport von Organellen und Proteinen beteiligt. Entsprechend konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass PCH-Proteine bei Überexpression die subzelluläre Lokalisation des FasL in Transfektanten beeinflussen und eine Rolle bei der lysosomalen Assoziation des FasL spielen könnten (Doktorarbeit, Jing Qian, (Aspenstrom et al., 2006a)).

5.2.1.1 PCH-Proteine interagieren mit dem Fas-Liganden in vitro

Zunächst wurde die Interaktion der PCH-Proteine mit dem Fas-Liganden verifiziert und näher charakterisiert. Der FasL ist mit GST-Fusionsproteinen der PCH-Proteine effizient aus Lysaten stabil FasL-transfizierter Jurkat T-Zellen (JFL) oder K562-Zellen (KFL-9) zu präzipitieren (Abb. 5.2.1).

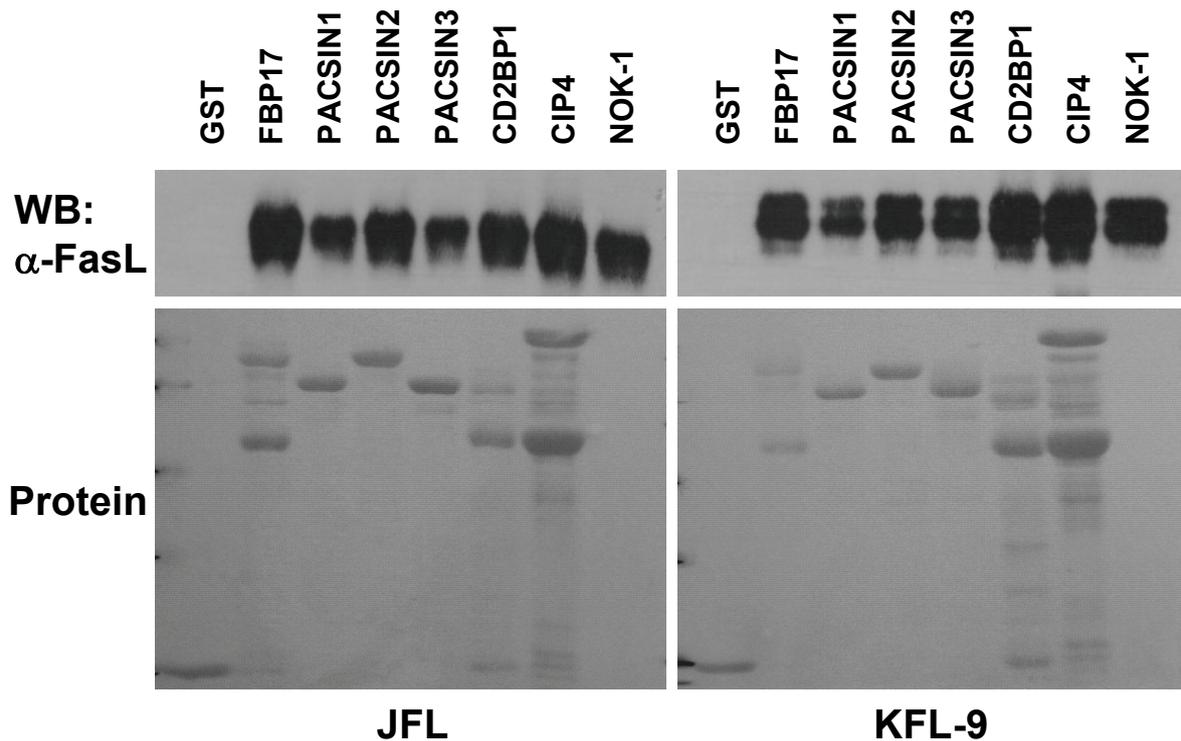


Abb. 5.2.1: PCH-Proteine interagieren mit dem FasL in vitro. GST-Fusionsproteine von FBP17, PACSIN 1-3, CD2BP1 und CIP4 wurden verwendet, um den FasL aus Lysaten der FasL-exprimierenden Zellen KFL-9 und JFL zu präzipitieren. Der anti-FasL mAk NOK-1 diente als Positiv-Kontrolle, GST als Negativ-Kontrolle. Präzipitierter FasL wurde mit dem mAk G247-4 nachgewiesen. Die verwendeten Fusionsproteine sind in der Ponceau S-Färbung dargestellt.

Die Interaktionen ließen sich mittels Ko-Immunopräzipitationen aus Transfektanten verifizieren (Abb. 5.2.2). Dazu wurden myc-konjugierte PCH-Proteine zusammen mit FasL transient in 293T-Zellen überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate geteilt und jeweils eine Immunpräzipitation mit dem anti-FasL mAk NOK-1 bzw. einem anti-myc mAk durchgeführt. Die kopräzipitierten Proteine wurden anschließend mittels Western Blot detektiert. FBP17 und die PACSINe 1-3 präzipitieren kotransfizierten FasL und FasL umgekehrt die PCH-Proteine. Auch CIP4 präzipitiert effizient FasL. Die nur sehr schwach ausgeprägte Bande von präzipitierten CIP4 erklärt sich durch die geringe Expression des Proteins in den untersuchten Zellen. Die Deletion der SH3-Domänen im Falle von FBP17 und CIP4 oder eine Punktmutation innerhalb der SH3-Domäne von PACSIN2 führen zu einem kompletten Verlust der Interaktion.

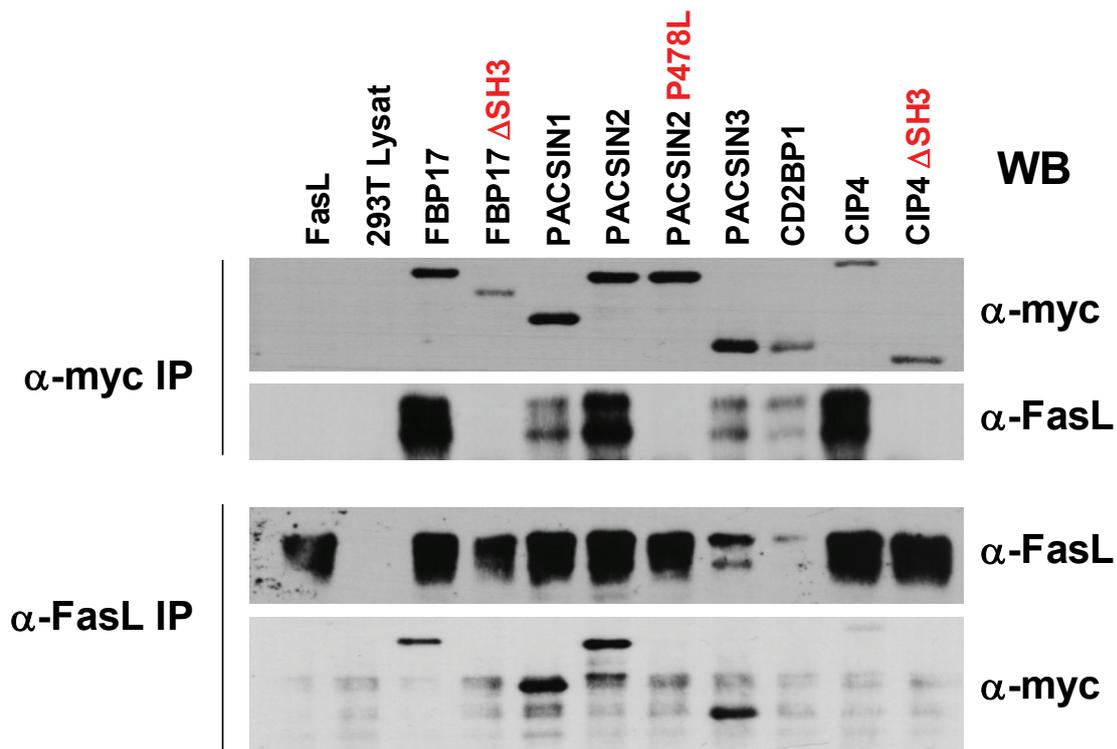


Abb. 5.2.2: Der FasL kopräzipitiert mit PCH-Proteinen. Myc-konjugierte Wildtyp oder mutierte PCH-Proteine wurden zusammen mit dem FasL transient in 293T-Zellen überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate geteilt und jeweils eine IP mit anti-FasL mAk NOK-1 bzw. mit anti-myc mAk 9B11 durchgeführt. Die Western Blots wurden mit einem anti-myc mAk und anti-FasL mAk G247-4 entwickelt.

Zwar ließ sich mit CD2BP1 FasL präzipitieren, nicht jedoch CD2BP1 mit FasL, wofür womöglich die geringe Menge an exprimiertem FasL im entsprechenden Präzipitationsansatz ursächlich war. Eine Wiederholung der Ko-Immunopräzipitation mit verschiedenen Mengen an transfiziertem FasL und CD2BP1 ergab eine effiziente Präzipitation von CD2BP1 durch FasL und umgekehrt von FasL durch CD2BP1 (Abb. 5.2.3). Die in den dargestellten Experimenten (Abb. 5.2.1/5.2.2) verwendeten PACSIN2-Konstrukte sind murinen Ursprungs, doch weisen murines und humanes PACSIN2 eine Homologie von 87% auf. Die SH3-Domänen der orthologen Proteine sind annähernd identisch. Entsprechend lässt sich der humane FasL auch mit humanem PACSIN2 präzipitieren. Umgekehrt präzipitiert FasL auch humanes PACSIN2 (Abb. 5.2.3).

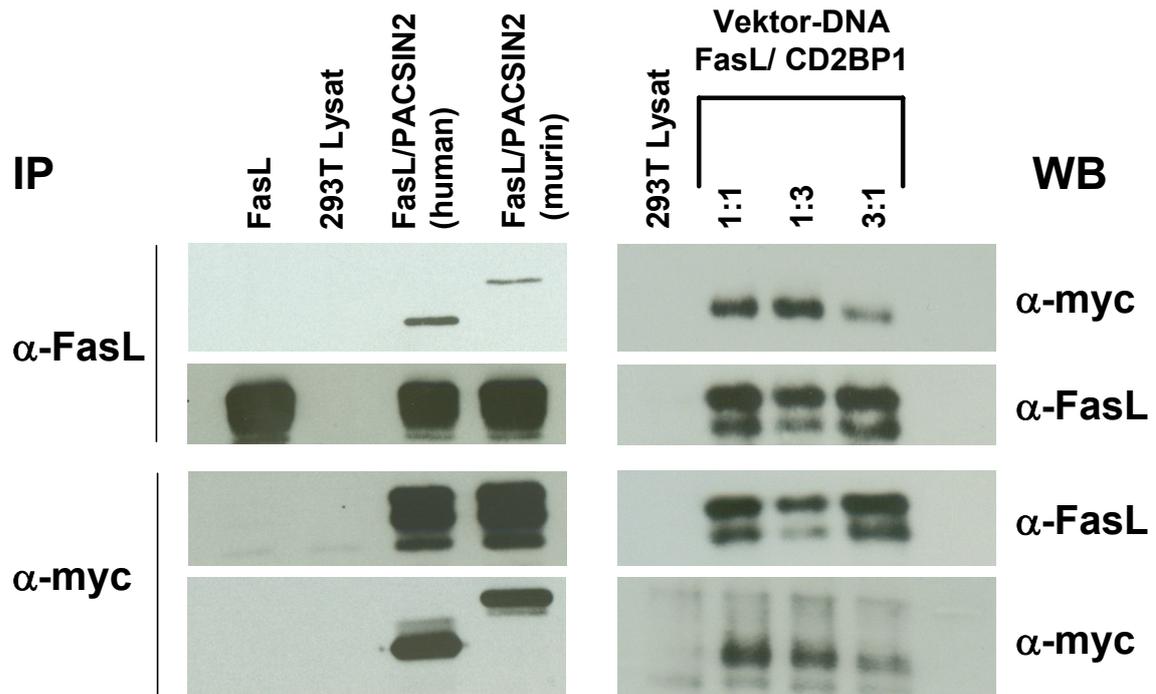


Abb. 5.2.3: FasL kopräzipitiert mit murinem und humanem PACSIN2 und mit CD2BP1. Humanes und murines PACSIN2 und unterschiedliche Mengen von myc-gekoppeltem CD2BP1 und FasL wurden transient in 293T-Zellen überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate geteilt und jeweils eine IP mit anti-FasL mAk NOK-1 bzw. mit anti-myc mAk 9B11 durchgeführt. Die Western Blots wurden mit einem anti-myc mAk und anti-FasL mAk G247-4 entwickelt.

5.2.1.2 PCH-Proteine kolokalisieren mit dem Fas-Liganden in Transfektanten und beeinflussen dessen subzelluläre Verteilung

Die Speicherung des Fas-Liganden in sekretorischen Lysosomen stellt einen bedeutenden Aspekt der posttranskriptionellen Regulation der Expression dar und ist ausschließlich für Zellen hämatopoetischen Ursprungs beschrieben (Bossi und Griffiths, 1999). Diese lysosomale Assoziation wird von der Prolin-reichen Domäne des Fas-Liganden vermittelt, welche im zytoplasmatischen Teil lokalisiert ist. Interessanterweise ist für Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs eine Zelloberflächenexpression des FasL beschrieben (Blott et al., 2001). Um die subzelluläre Lokalisation des FasL in Zellen unterschiedlichen Ursprungs zu untersuchen, wurden nicht-hämatopoetische Zellen wie die humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie HeLa und die embryonale Nierenzelllinie 293T sowie die hämatopoetische T-Zell-Lymphomlinie Hut78 mit EGFP-konjugiertem FasL transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, die

Plasmamembran der Zellen gefärbt und die subzelluläre Lokalisation des FasL fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zur Färbung der Plasmamembran wurde Tetramethylrhodamin-konjugiertes Weizenkeim-Agglutinin verwendet (Abb. 5.2.4). In HeLa- und 293T-Zellen führt die Überexpression von EGFP-gekoppeltem FasL zu einer deutlichen Oberflächenexpression des Todesfaktors (Abb. 5.2.4). Aufgrund der Überexpression ist der FasL auch intrazellulär nachweisbar. Er wird in diesen Zellen jedoch deutlich membranassoziiert exprimiert und kolokalisiert mit der Färbung der Plasmamembran. Bei Überexpression in hämatopoetischen Zellen wie der T-Zell-Lymphomlinie Hut78 findet sich FasL wie auch in primären humanen T-Zellen beobachtet vor allem intrazellulär in distinkten granulären Strukturen (Abb. 5.2.4).

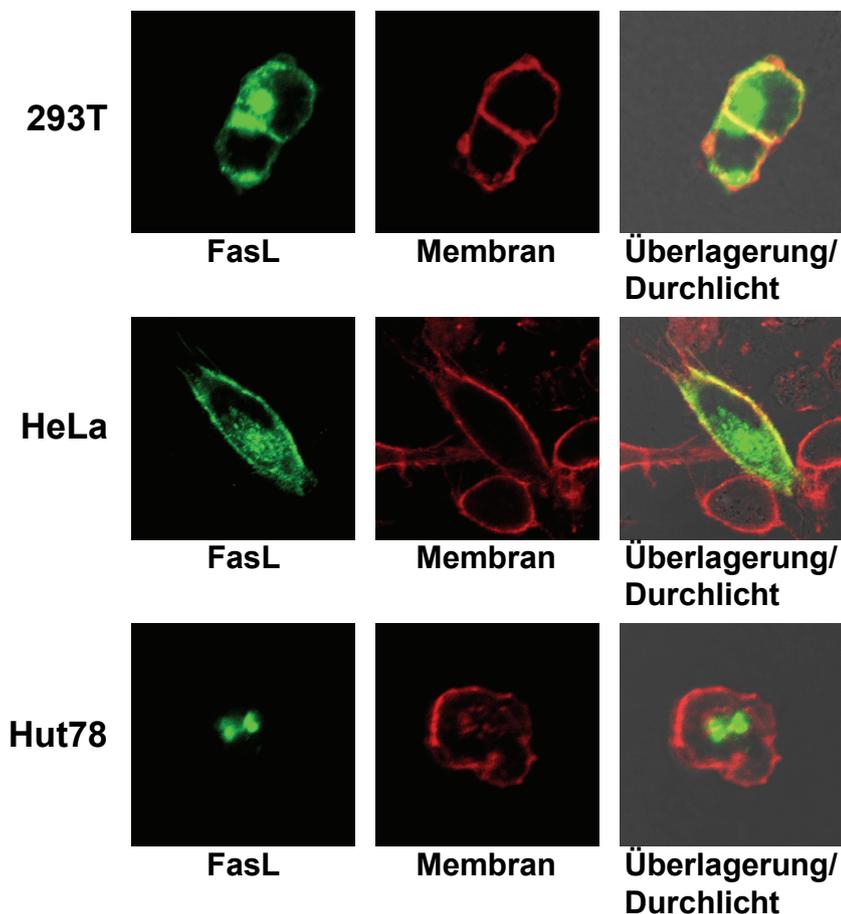


Abb. 5.2.4: Expression des FasL in verschiedenen Zelltypen. FasL-EGFP wurde transient in den nicht-hämatopoetischen Zelllinien 293T und HeLa und in der hämatopoetischen Zelllinie Hut78 überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Plasmamembran mittels Tetramethylrhodamin-konjugiertem Weizenkeim-Agglutinin gefärbt. Die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Um Hinweise auf eine funktionelle Rolle der Interaktion der PCH-Proteine mit dem FasL zu erhalten, wurde zunächst untersucht, ob sich die PCH-Proteine und FasL bei gemeinsamer Überexpression in diesen nicht-hämatopoetischen Zellen gegenseitig in ihrer subzellulären Verteilung beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde das EGFP-FasL-Konstrukt alleine oder zusammen mit myc-konjugiertem CD2BP1 in HeLa-Zellen überexprimiert und die subzelluläre Lokalisation der Proteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.2.5). Wie zuvor erwähnt, erscheint FasL bei alleiniger Überexpression deutlich membranassoziiert (Abb. 5.2.5 A). Die Kotransfektion von CD2BP1 führt zu einer Retention im Zellinneren und einer deutlichen Assoziation mit granulären Strukturen, in denen der FasL mit CD2BP1 kolokalisiert (Abb. 5.2.5 B).

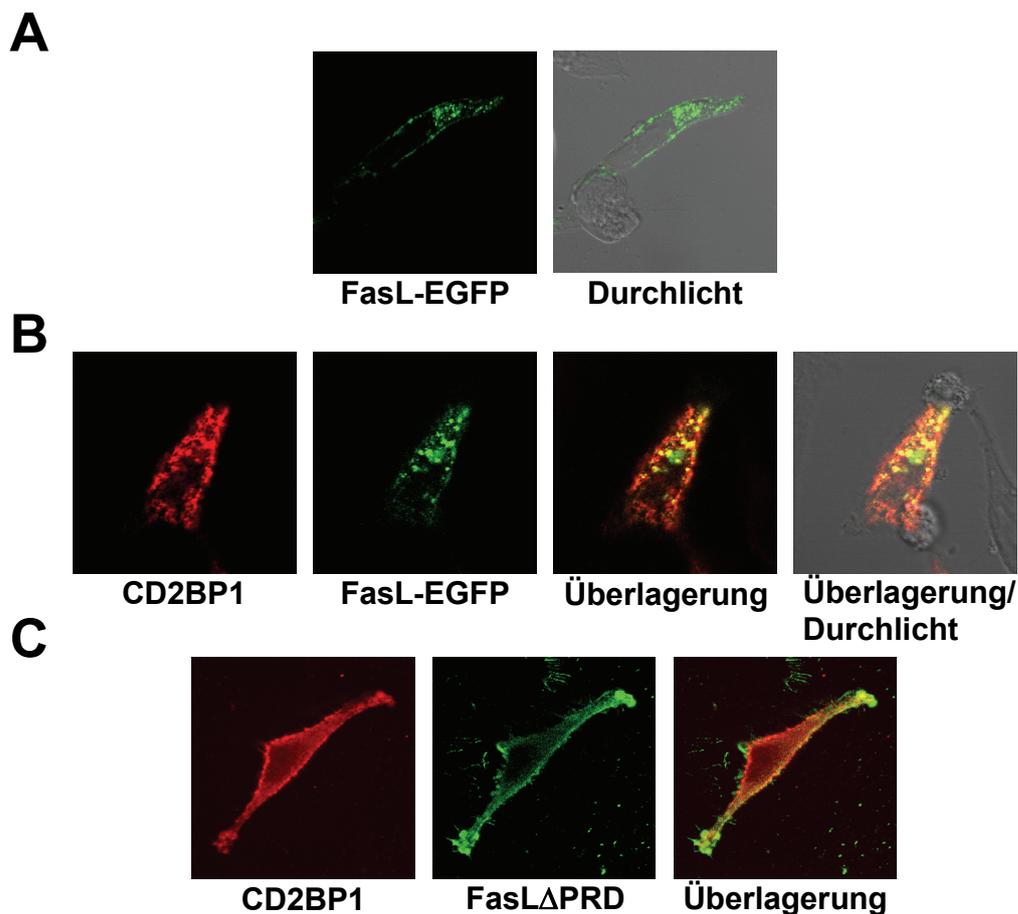


Abb. 5.2.5: Kolokalisation von CD2BP1 mit FasL in HeLa-Transfektanten. Myc-gekoppeltes CD2BP1 und/oder EGFP-gekoppelter FasL oder FLAG-gekoppelter FasL ohne Prolin-reiche Domäne (FasL Δ PRD) wurden in 293T Zellen exprimiert bzw. koexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-myc mAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG bzw. anti-Flag mAk und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt.

Bei Überexpression einer FasL-Deletionsmutante ohne Prolin-reiche Domäne (FasL Δ PRD) und CD2BP1 assoziiert FasL verstärkt mit der Plasmamembran und es kann keine deutliche Kolokalisation mit CD2BP1 beobachtet werden (Abb. 5.2.5 C). Dieser Retentionseffekt kann auch bei Kotransfektion der anderen Mitglieder der PCH-Familie in weiteren Zelllinien beobachtet werden. Das EGFP-FasL-Konstrukt wurde alleine oder zusammen mit myc-konjugierten PCH-Proteinen beispielsweise in 293T-Zellen überexprimiert und die subzelluläre Verteilung der Proteine mikroskopisch untersucht (Abb. 5.2.6). Auch in diesem Zellsystem erscheint FasL bei Einzeltransfektion im Bereich der Plasmamembran (Abb. 5.2.4/5.2.5/5.2.6). Kotransfektion der PCH-Proteine führt in allen Fällen zu einer eher intrazellulären Expression des FasL. Neben dieser intrazellulären Retention ist vor allem bei Kotransfektion von FBP17 und PACSIN3 eine deutliche Assoziation des FasL mit granulären Strukturen erkennbar. Bei Kotransfektion von CIP4 findet sich der FasL ebenfalls in distinkten Granula, welche im Gegensatz zu den bei Kotransfektion von FBP17 und PACSIN3 beobachteten Strukturen jedoch größer erscheinen. Bei Kotransfektion von PACSIN1, PACSIN2 und CD2BP1 ist im vorliegenden Experiment die Assoziation mit granulären Strukturen weniger ausgeprägt, doch lässt sich sowohl die intrazelluläre Retention des FasL als auch die damit einhergehende verminderte Oberflächenexpression beobachten. Die in allen Fällen deutliche Kolokalisation bestätigt die zuvor biochemisch definierten Protein-Protein-Interaktionen. Die PCH-Proteine scheinen somit bei Überexpression die subzelluläre Verteilung des FasL zu beeinflussen, was auf eine funktionelle Rolle dieser Proteine bei FasL-Transportprozessen schließen lässt.

In weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten die intrazellulären Granula, in denen der FasL bei Kotransfektion von PCH-Proteinen lokalisiert ist, als lysosomales Kompartiment identifiziert werden. Weiterhin konnte die verminderte Oberflächenexpression des FasL für einige PCH-Proteine durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Dabei geht die durch PCH-Proteine verminderte Oberflächenexpression mit einer geringeren Zytotoxizität der FasL-exprimierenden Zellen einher (Qian et al., 2006; Baum et al., 2005).

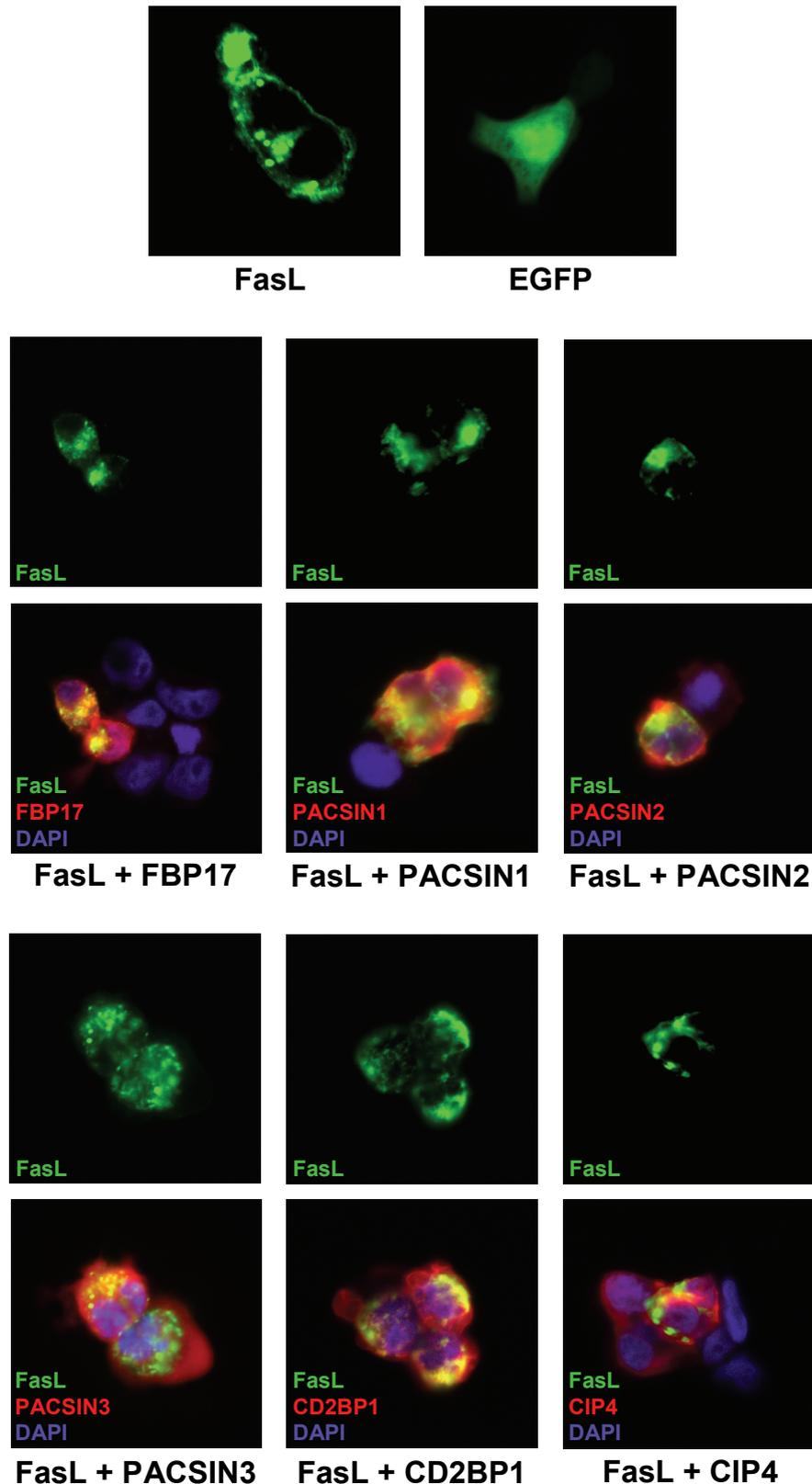


Abb. 5.2.6: Kolokalisation von PCH-Proteinen mit FasL in 293T Transfektanten. Myc-gekoppelte PCH-Proteine und/oder EGFP-gekoppelter FasL wurden in 293T Zellen exprimiert bzw. koexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-myc mAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt.

5.2.1.3 Monoklonale Antikörper gegen PCH-Proteine

Um die Funktion der PCH-Proteine insbesondere für die Biologie des FasL in primären humanen Zellen untersuchen zu können, wurden monoklonale Antikörper gegen verschiedene Mitglieder dieser Proteinfamilie hergestellt und auf ihre Funktionalität im Hinblick auf Western Blot, Immunpräzitation und konfokale Mikroskopie untersucht.

Eignung der Antikörper für Western Blot/Immunpräzitation

Zunächst wurde getestet, ob die hergestellten Antikörper ihr jeweiliges Antigen im Immunoblot erkennen. Dazu wurden 293T-Zellen transient mit myc-konjugierten PCH-Konstrukten transfiziert, lysiert, die Lysate über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert (Abb. 5.2.7).

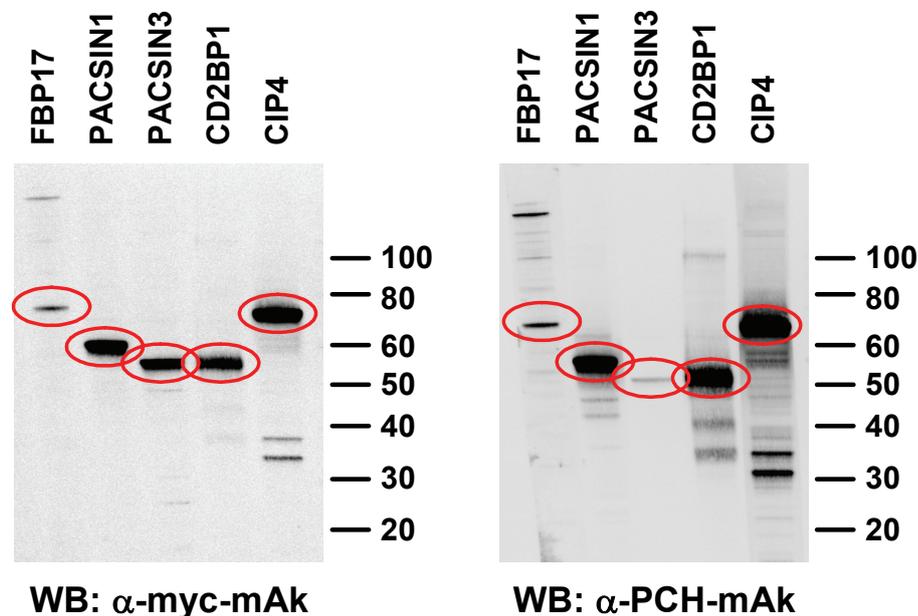


Abb. 5.2.7: Detektion von PCH-Proteinen mit den generierten Antikörpern im Western Blot. 293T-Zellen wurden transient mit myc-gekoppelten PCH-Proteinen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, über SDS-Gelelektrophorese separiert, auf Nitrozellulose transferiert und die PCH-Proteine sequentiell mit einem anti-myc mAk und den entsprechenden generierten mAk (FBP17: 144C6, PACSIN1: 13E5, PACSIN3: 106C10, CD2BP1: 129H10, CIP4: 208A3) nachgewiesen.

Die Blots wurden nachfolgend mit den entsprechenden anti-PCH-Antikörpern und einem anti-myc-Antikörper behandelt. Mit dem anti-myc-Antikörper lassen sich alle Fusionsproteine nachweisen. FBP17 migriert bei ca. 75 kDa, PACSIN1 bei ca. 60 kDa, PACSIN3 und CD2BP1 bei ca. 55 kDa und CIP4 bei ungefähr 75 kDa. Die auf Grundlage der Primärstruktur berechneten Molekulargewichte betragen für FBP17 71 kDa, für PACSIN1 51 kDa, für PACSIN3 49 kDa, für CD2BP1 48 kDa und für CIP4 68 kDa. Die Färbung mit den monoklonalen Antikörpern nach dem Strippen des Blots ergibt ein entsprechendes Bild. Die Antikörper eignen sich somit zur Detektion der denaturierten Proteine im Western Blot.

Dann wurde überprüft, ob sich die Antikörper zur Präzipitation der korrespondierenden Proteine eignen. Dazu wurden 293T-Zellen transient mit myc-konjugierten PCH-Proteinen transfiziert und lysiert. Die Lysate wurden mit den jeweiligen anti-PCH-Antikörpern und Protein A-Beads bzw. im Falle des anti-PACSIN3-Antikörpers mit Protein L-Beads inkubiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die jeweiligen Proteine parallel unter Verwendung des anti-myc-Antikörpers 9B11 präzipitiert. Die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot auf Nitrozellulose transferiert und dort mit einem anti-myc-Antikörper nachgewiesen (Abb. 5.2.8). Von den hergestellten Antikörpern werden PACSIN1, CD2BP1 und CIP4 effizient präzipitiert. PACSIN3 und FBP17 ließen sich mit den Antikörpern 106C10 und 144C6 im Vergleich zur Präzipitation mit einem anti-myc-Antikörper nur unzureichend präzipitieren. Aus diesem Grund wurde versucht, die Präzipitationseffizienz durch modifizierte Protokolle zu erhöhen. Da es sich bei dem anti-FBP17-Antikörper um einen IgG₁-Antikörper handelt, wurden zur Präzipitation Protein G-Beads verwendet (Abb. 5.2.9). In der Tat führte die Verwendung von Protein G-Beads zu einer deutlich effizienteren Immunpräzipitation. Um die Präzipitation mit dem anti-PACSIN3-Antikörper 106C10 zu optimieren, wurden die Lysate transient PACSIN3-transfizierter 293T-Zellen mit dem anti-PACSIN3-Antikörper inkubiert. Erst dann wurden die Immunkomplexe mit einem anti-IgG/IgM-Antikörper (Kaninchen anti-Maus) in Kombination mit Protein A-Beads präzipitiert (Abb. 5.2.9).

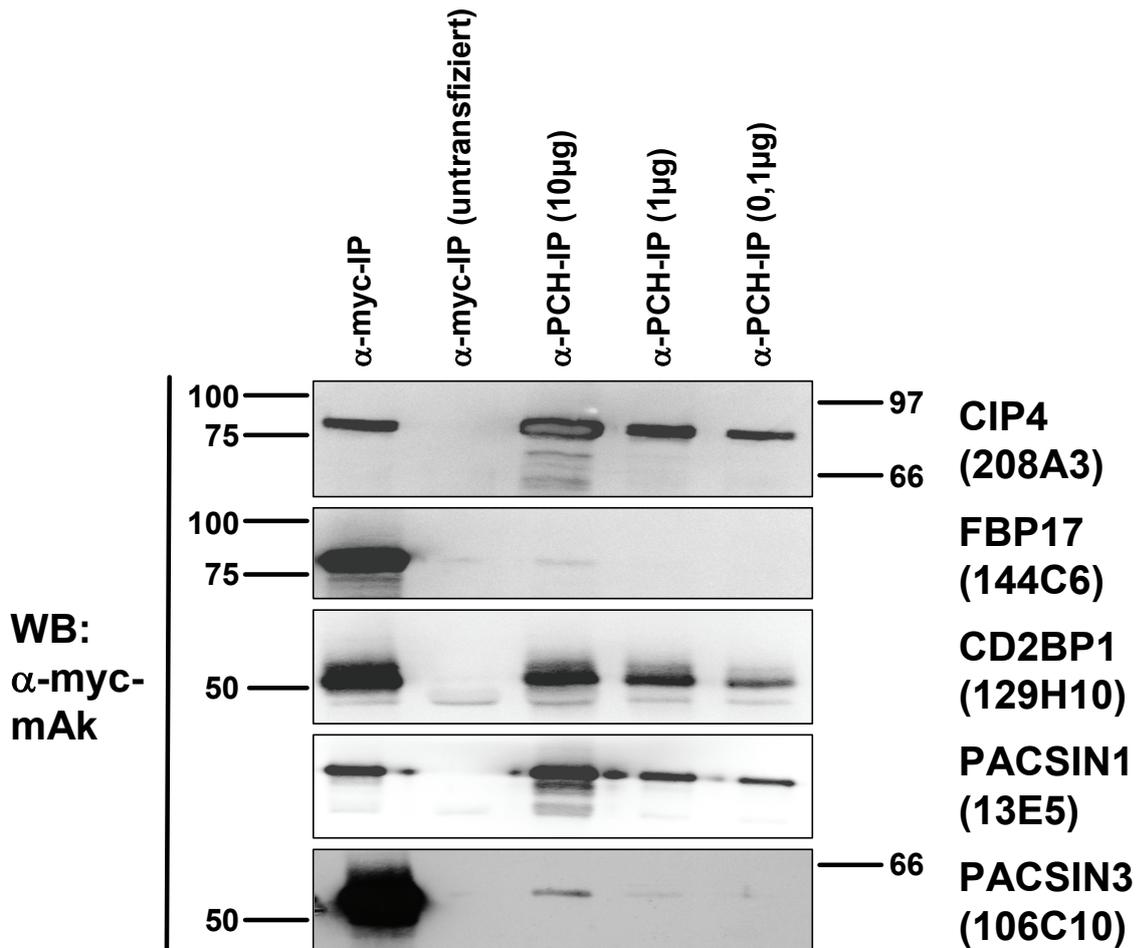


Abb. 5.2.8: Immunpräzipitation transfizierter PCH-Proteine unter Verwendung der generierten Antikörper. 293T-Zellen wurden transient mit myc-gekoppelten PCH-Proteinen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die PCH-Proteine mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg, 1 µg, 0,1 µg) der entsprechenden AK (FBP17: 144C6, PACSIN1: 13E5, PACSIN3: 106C10, CD2BP1: 129H10, CIP4: 208A3) und Protein A- oder Protein L-Beads präzipitiert (Spuren 3-5). Als Positivkontrolle diente die Präzipitation mittels des anti-myc mAk 9B11 (Spur 1), die Präzipitation aus Lysaten untransfizierter 293T Zellen mit den entsprechenden hergestellten mAk diente als Negativkontrolle (Spur 2).

Auch in diesem Fall ließ sich die Präzipitationseffizienz deutlich verbessern. Dennoch ist in beiden Fällen die Präzipitation mit den hergestellten Antikörpern deutlich ineffizienter als die entsprechende Präzipitation der Fusionsproteine mit dem anti-myc Antikörper 9B11.

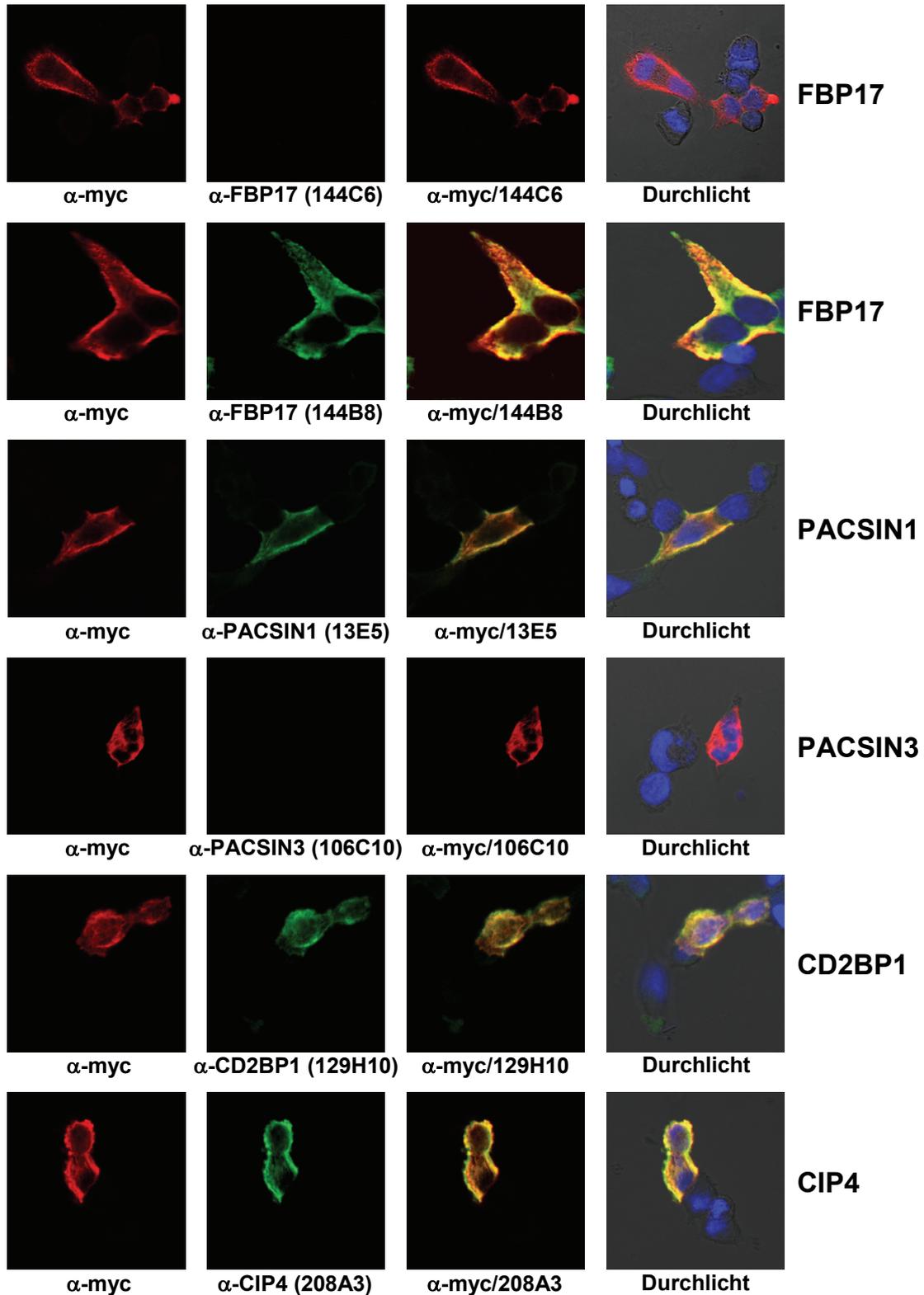


Abb. 5.2.10: Immunfluoreszenzfärbung transfizierter PCH-Proteine unter Verwendung der generierten Antikörper. 293T-Zellen wurden transient mit myc-konjugierten PCH-Proteinen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti-myc pAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG sowie den entsprechenden anti-PCH mAk (FBP17: 144C6 bzw. 144B8, PACSIN1: 13E5, PACSIN3: 106C10, CD2BP1: 129H10, CIP4: 208A3) und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

In allen Fällen konnte das transfizierte Protein unter Verwendung des anti-myc-Antikörpers nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sowohl die Transfektion als auch die nachfolgende Färbung für jedes untersuchte Protein funktioniert haben. Mit den hergestellten Antikörpern konnten PACSIN1, CD2BP1 und CIP4 nachgewiesen werden. FBP17 wurde bei Verwendung des mAk 144B8 nachgewiesen, nicht aber bei Färbung mit dem mAk 144C6. PACSIN3 ließ sich nicht detektieren. Da die Einstellungen entsprechend der Fluoreszenzintensität nicht-transfizierter Zellen kalibriert wurden, lassen sich eventuell vorhandene endogene Proteine nicht nachweisen.

5.2.1.4 Nachweis von PCH-Proteinen in T-Zellen

Eine Voraussetzung für die Einflussnahme von PCH-Proteinen auf die Biologie des Fas-Liganden ist deren Expression in den zu untersuchenden FasL-exprimierenden Zellen. Zunächst wurde untersucht, inwieweit PCH-Proteine in T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps und Ursprungs exprimiert werden und ob sich die hergestellten Antikörper auch für die Analyse endogener Proteine eignen. Zunächst wurden die mRNA-Expressionslevel der einzelnen PCH-Proteine in verschiedenen T-Zellen analysiert (Abb. 5.2.11). Verwendet wurden die T-Zell-Lymphomlinie Hut78 (da in diesen Zellen initial PACSIN2 und FBP17 als FasL-interagierende Proteine identifiziert wurden), PHA-Blasten, CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 und CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8. Da die Möglichkeit bestand, dass die Gene für PCH-Proteine erst nach Stimulation der Zelle transkribiert werden, wurden die Zellen jeweils für zwei Stunden mit einer Kombination aus Phorbolster und Kalziumionophor (TPA/Ionomycin) inkubiert. Da für CD2BP1 zwei unterschiedliche Isoformen beschrieben sind, wurden die Primer so konstruiert, dass ein Primerpaar (CD2BP1S/L) beide Isoformen erfassen kann, während das zweite Primerpaar (CD2BP1L) selektiv nur die mRNA der putativen langen Isoform amplifiziert (Abb. 5.2.11). Die Transkripte für FBP17, PACSIN2, PACSIN3 und CIP4 ließen sich in allen analysierten T-Zellen nachweisen. PACSIN1 war unter den gewählten Bedingungen lediglich in Zellen der T-Zell-Lymphomlinie Hut78 und äußerst schwach in PHA-Blasten detektierbar. Für CD2BP1 konnte die putative lange Isoform nachgewiesen werden (CD2BP1L).

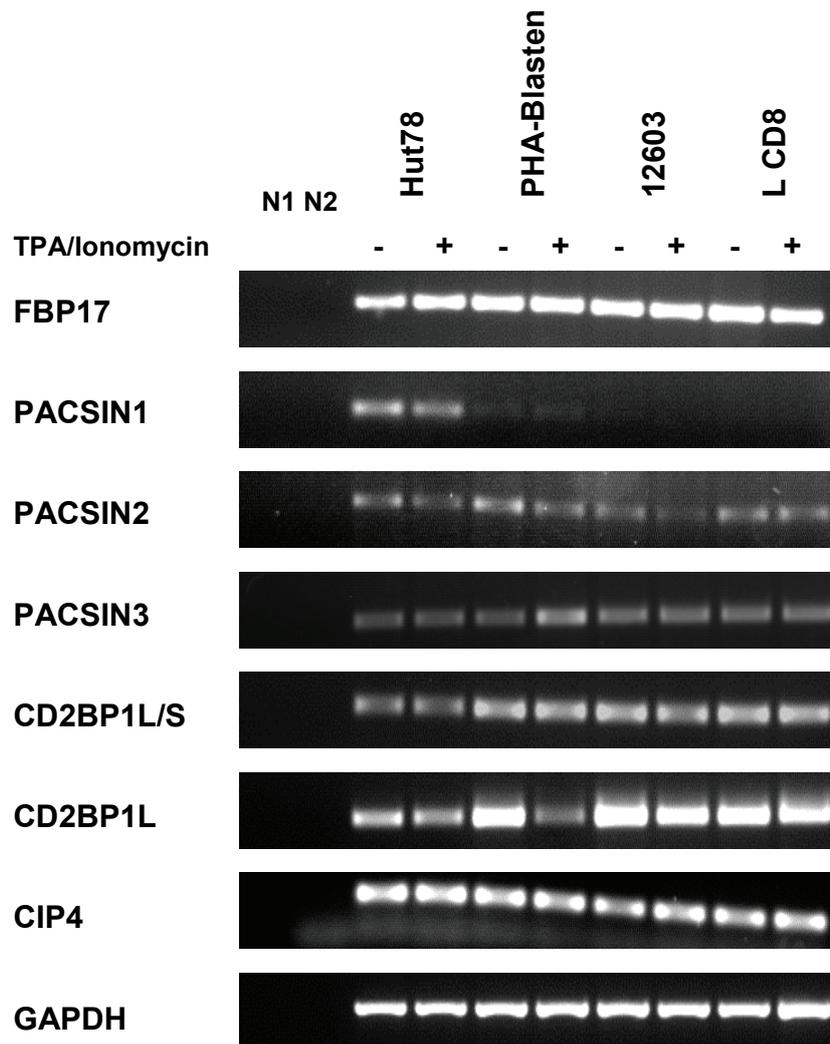


Abb. 5.2.11: Nachweis der mRNA für PCH-Proteine in T-Zellen. Hut78-Zellen, PHA-Blasten, CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 und CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8 wurden für zwei Stunden mit Medium (-) oder TPA/Ionomycin (+) behandelt. Nachfolgend wurde RNA aus diesen Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und über PCR selektiv amplifiziert. Als Kontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne cDNA (N1/N2) und/oder Primer (N1). Als Haushaltsgen diente GAPDH.

Bei Verwendung des anderen Primerpaares zeigt sich nur eine Bande, die auf Höhe des erwarteten Fragments für die putative lange Isoform migriert.

Als nächster Schritt folgte der Proteinnachweis unter Verwendung der hergestellten Antikörper. Initial wurde die Expression von CIP4, CD2BP1 und PACSIN1 untersucht, da sich insbesondere die Antikörper gegen CIP4 (208A3), CD2BP1 (129H10) und PACSIN1 (13E5) für verschiedene biochemische und zellbiologische Applikationen eignen. Ferner stellen diese Proteine jeweils prototypische Mitglieder

dreier unterschiedlicher PCH-Subfamilien dar (Abb. 1.4). Lysate von transient mit dem nachzuweisenden Protein transfizierten (Positivkontrolle) und untransfizierten 293T-Zellen, von Hut78, von PHA-stimulierten (10 Tage und 21 Tage) T-Zellen zweier Spender, einem CD4⁺ T-Zellklon (12603) und einer CD8⁺ T-Zelllinie (L CD8) wurden mittels Western Blot auf die Präsenz der entsprechenden Proteine untersucht (Abb. 5.2.12).

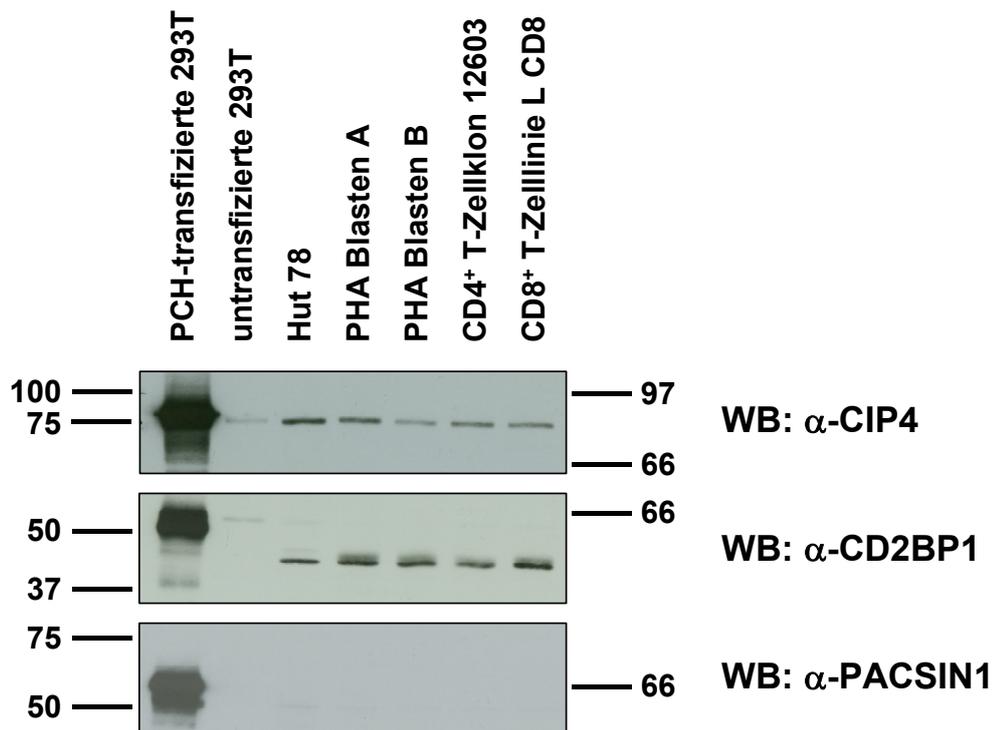


Abb. 5.2.12: Expression von CIP4, CD2BP1 und PACSIN1 in T-Zellen. Die Lysate von Hut78, von PHA-Blasten zweier Spender, von CD4⁺ T-Zellen des Klon 12603 und CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8 wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle dienen die Lysate transient transfizierter 293T-Zellen, Lysate untransfizierter 293T Zellen als mögliche Negativkontrolle.

CIP4 konnte in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden und migriert auf Höhe des überexprimierten Proteins bei ungefähr 80 kDa. Interessanterweise lässt sich endogenes CIP4 auch schwach in untransfizierten 293T-Zellen detektieren. CD2BP1 scheint ebenfalls in allen analysierten T-Zellen exprimiert zu sein. In den untersuchten T-Zellen migriert das Protein bei ca. 45 kDa und läuft damit deutlich niedriger als das überexprimierte Protein (ca. 55 kDa).

In beiden Fällen lassen sich die Expressionslevel betreffend bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede feststellen. Endogenes PACSIN1 ließ sich in keiner der untersuchten T-Zellpopulationen nachweisen.

Zur weiteren Verifikation wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Lysate von transient transfizierten (Positivkontrolle) und untransfizierten 293T-Zellen, von Hut78-Zellen, von isolierten für unterschiedliche Zeiträumen mit PHA stimulierten (10 Tage und 21 Tage) T-Zellen zweier Spender und einer CD4⁺ T-Zelllinie (12603) wurden dazu mittels Immunpräzipitation auf die Präsenz der entsprechenden Proteine untersucht (Abb. 5.2.13). Entsprechend der Vorbefunde konnten sowohl CIP4 als auch CD2BP1 in allen untersuchten T-Zellen nachgewiesen werden. Die untersuchten Zellen weisen in erster Näherung ähnliche Proteinexpressionslevel auf. CIP4, nicht aber CD2BP1, konnte endogen in untransfizierten 293T-Zellen nachgewiesen werden. Auch im vorliegenden Experiment migriert transfiziertes CD2BP1 bei ca. 55 kDa, während endogenes CD2BP1 dagegen bei ca. 45 kDa nachgewiesen wird. PACSIN1 konnte auch bei längerer Expositionszeit der Blots in keiner der analysierten T-Zelllinien detektiert werden. In einigen Fällen (besonders deutlich in Hut78-Zellen) wurde jedoch eine deutliche Bande bei ca. 55 kDa beobachtet.

Zur weiteren Untersuchung der endogenen Proteine CIP4, CD2BP1 und PACSIN1 in T-Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen angeschlossen. Der anti-FBP17-Antikörper 144B8 eignete sich in Vorversuchen für Immunfluoreszenzanalysen. Aus diesem Grund wurde 144B8 ebenfalls in FACS-Analysen getestet. CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603, CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8 und PHA-Blasten wurden mit und ohne vorangegangene Permeabilisierung mit den monoklonalen Antikörpern gegen CIP4 (208A3; Abb. 5.2.14 A), FBP17 (144B8; 5.2.14 B), CD2BP1 (129H10; Abb. 5.2.14 C) und PACSIN1 (13E5; 5.2.14 D) bzw. einer Isotypkontrolle und PE-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt und die intra- und extrazelluläre Expression der Proteine durchflusszytometrisch analysiert. In keiner der untersuchten Zellen waren CIP4, FBP17, CD2BP1 oder PACSIN1 auf der Zelloberfläche nachweisbar. CIP4, FBP17 und CD2BP1 lassen sich jedoch intrazellulär detektieren.

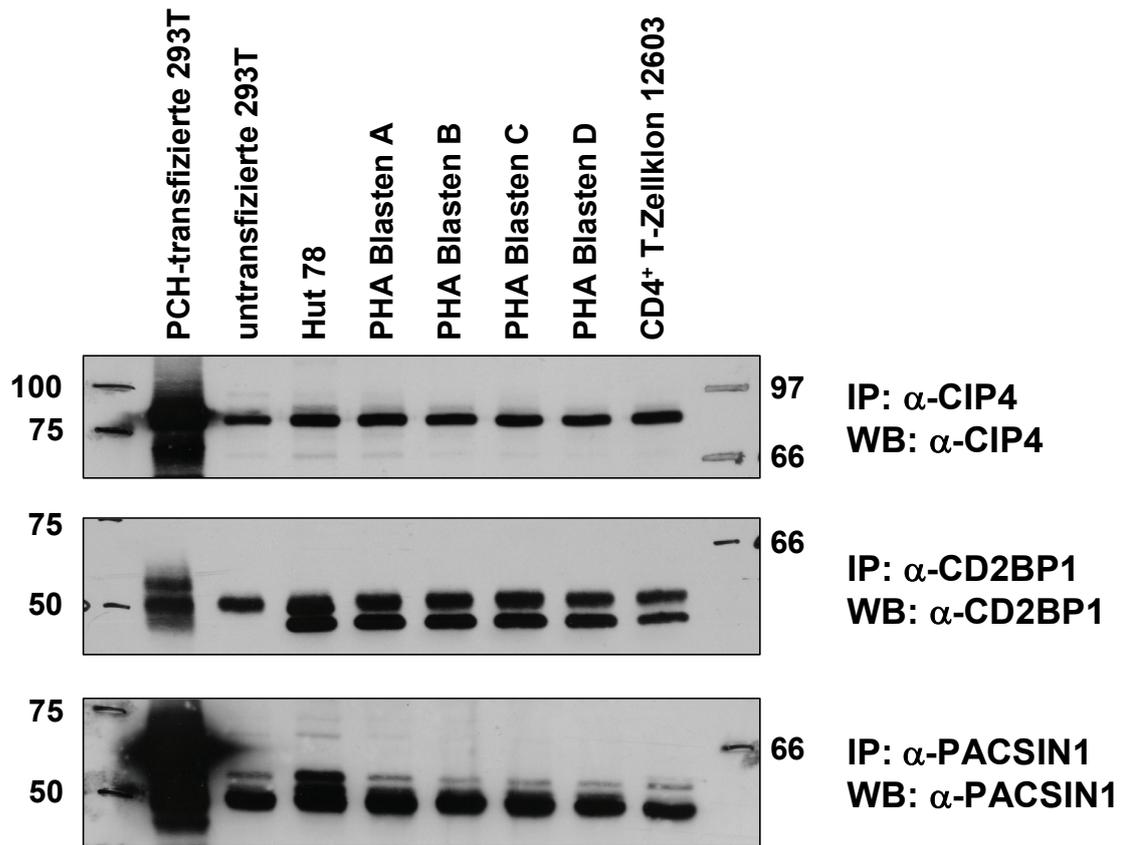


Abb. 5.2.13: Präzipitation von CIP4, CD2BP1 und PACSIN1 aus T-Zellen. Lysate von Hut78-Zellen, von PHA-Blasten unterschiedlicher Spender (A, B von Spender 1 und C, D von Spender 2), welche für unterschiedliche Zeiträume stimuliert wurden (A, C für 10 Tage und B, D für 21 Tage) sowie von CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 wurden mit anti-CIP4 mAk 208A3 (1 µg), CD2BP1 mit anti-CD2BP1 mAk 129H10 (2 µg) oder PACSIN1 mAk 13E5 (2 µg) und Protein G-Beads inkubiert, die Präzipitate über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle diente die Präzipitation mittels des anti-myc mAk 9B11 (Spur 1), die Präzipitation aus Lysaten untransfizierter 293T Zellen mit den entsprechenden hergestellten mAk diente als Negativkontrolle (Spur 2).

In Bezug auf den Phänotyp der untersuchten T-Zellen lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CIP4, FBP17 und CD2BP1 erkennen. Darüber hinaus demonstriert das vorliegende Experiment die Eignung der monoklonalen Antikörper gegen CIP4 (208A3), FBP17 (144B8) und CD2BP1 (129H10) für die Detektion endogener intrazellulärer Proteine mittels Durchflusszytometrie.

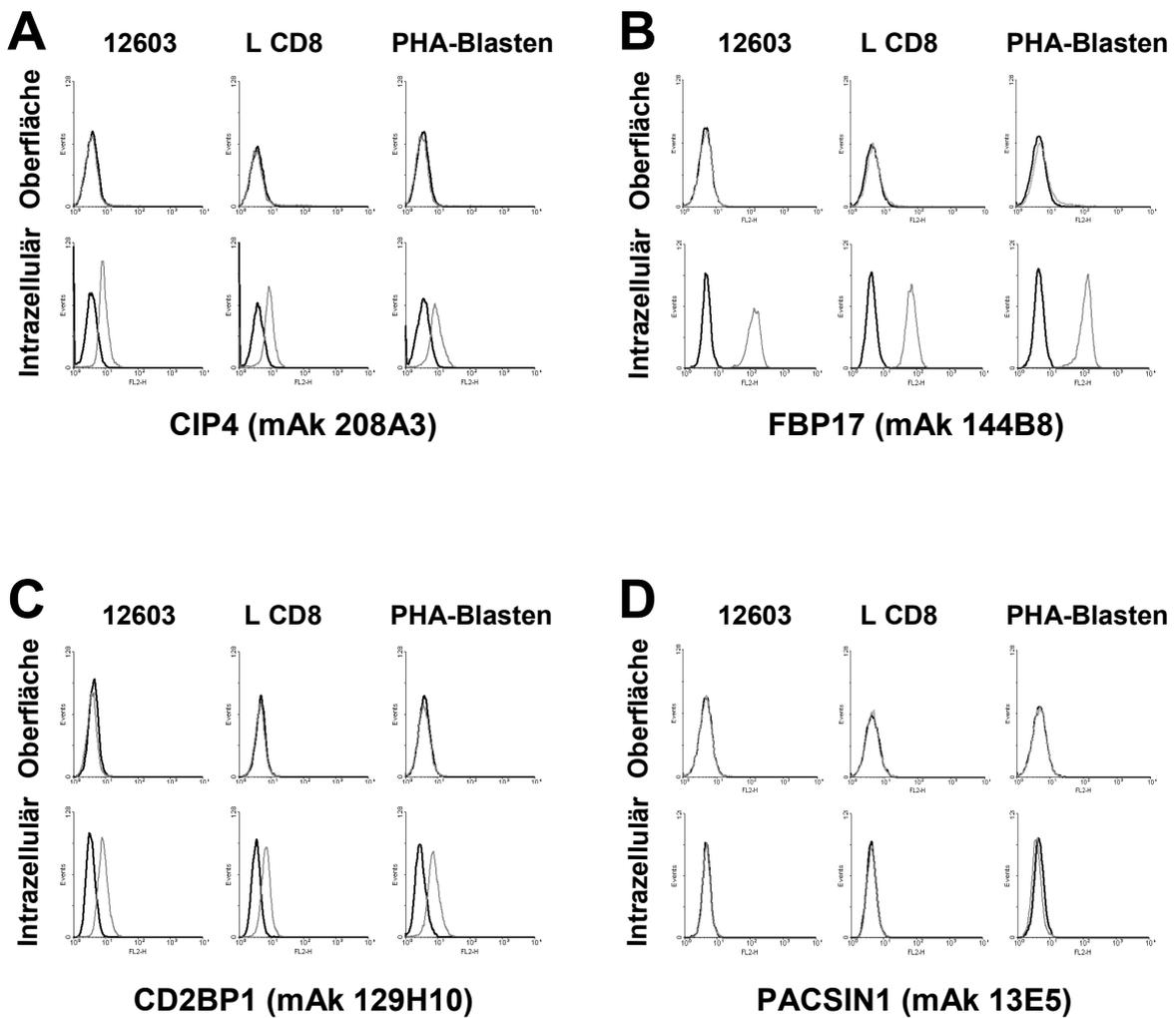


Abb. 5.2.14: Expression von CIP4 (A), FBP17 (B), CD2BP1 (C) und PACSIN1 (D) in CD4⁺ T-Zellen (12603), CD8⁺ T-Zellen (L CD8) und PHA-Blasten. Zur Analyse der Oberflächenexpression der Proteine wurden die Zellen mit dem anti-CIP4 mAk 208A3, dem anti-FBP17 mAk 144B8, dem anti-CD2BP1 mAk 129H10 oder dem anti-PACSIN1 mAk 13E5 (jeweils graue Linie) oder den entsprechenden Isotypkontrollen und PE-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt (obere Histogramme). Die intrazelluläre Expression wurde nach Permeabilisierung der Zellen unter Einsatz einer entsprechenden Isotypkontrolle analog bestimmt (untere Histogramme).

Um die subzelluläre Lokalisation von endogenem CIP4, CD2BP1 und FBP17 in primären humanen T-Zellen zu untersuchen, wurden PHA-Blasten permeabilisiert, mit dem anti-CIP4 mAk 208A3, dem anti-CD2BP1 mAk 129H10 und dem anti-FBP17 mAk 144B8 bzw. einer geeigneten Isotypkontrolle und Alexa-Fluor 488-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt und die subzelluläre Lokalisation der entsprechend gefärbten Proteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.2.15).

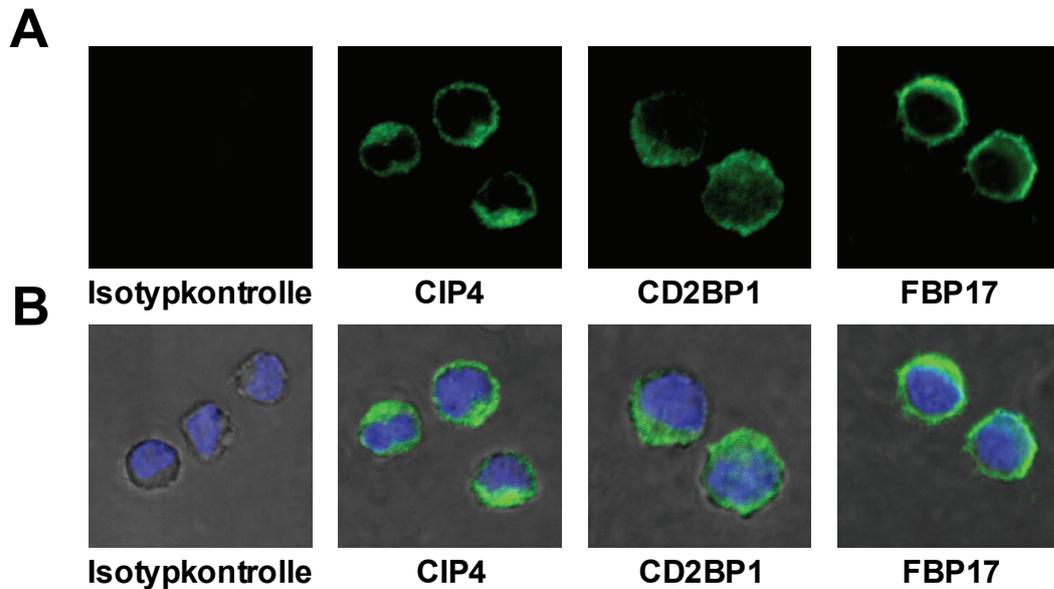


Abb. 5.2.15: Subzelluläre Lokalisation von CIP4, CD2BP1 und FBP17 in PHA-Blasten. PHA-Blasten wurden fixiert, permeabilisiert, mit dem anti-CIP4 mAk 208A3 und dem anti-CD2BP1 mAk 129H10 bzw. einer geeigneten Isotypkontrolle und Alexa-Fluor 488-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Die positive Färbung der Proteine im Vergleich zur Isotypkontrolle bestätigt die beobachtete Expression von CIP4, CD2BP1 und FBP17 in primären humanen T-Zellen. Die untersuchten Proteine zeigen in diesen Zellen eine vorwiegend zytosolische Lokalisation.

Nachfolgend wurde untersucht, ob CIP4 und CD2BP1 in aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen differentiell exprimiert sind. Zu diesem Zweck wurde die Expression von CIP4 und CD2BP1 in Lysaten von PHA-Blasten und von frisch isolierten E⁺ T-Zellen mittels Western Blot analysiert (Abb. 5.2.16). Dabei scheinen sowohl CIP4 als auch CD2BP1 in PHA-Blasten deutlich stärker exprimiert zu sein als in den analysierten nicht-aktivierten T-Zellen. Darüber hinaus migriert CD2BP1 nur in E⁺ T-Zellen als Doppelbande.

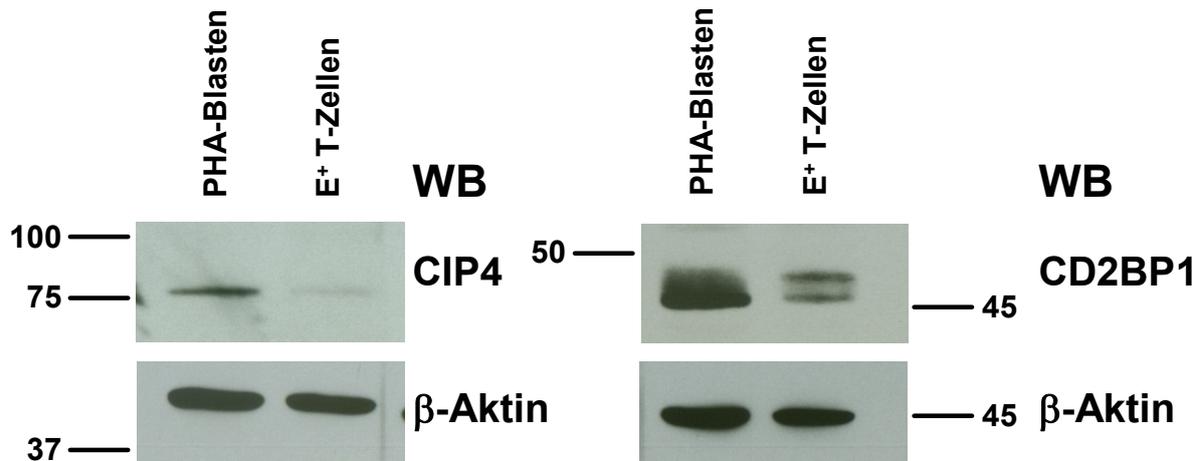


Abb. 5.2.16: Expression von CIP4 und CD2BP1 in aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen. Lysate von PHA-Blasten und frisch isolierten E⁺ T-Zellen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Expression von CIP4 und CD2BP1 mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper 208A3 (CIP4) und 129H10 (CD2BP1) analysiert.

5.2.2 Nck

FasL wird in kultivierten T-Zellen und NK-Zellen in sekretorischen Lysosomen gespeichert und nach Stimulation in einem Aktin-abhängigen Degranulationsprozess auf der Zelloberfläche exprimiert. Nck ist ein moduläres Adapterprotein von 47 kDa, welches im Wesentlichen aus einer C-terminalen SH2-Domäne und drei SH3-Domänen besteht. Seine Hauptfunktion besteht in der Regulation Aktivierungs-abhängiger Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Es interagiert sowohl mit phosphoryliertem SLP-76, einem wichtigen Adapterprotein im Rahmen der Signaltransduktion des T-Zellrezeptors, als auch mit WASP, einem Aktivator des Arp2/3-Komplexes und damit der Aktinpolymerisation. Nck kann so die Aktinmaschinerie zum Ort der T-Zellaktivierung rekrutieren. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Nck mit zwei seiner SH3-Domänen auch mit dem FasL interagiert, sollte untersucht werden, inwieweit dieses Adapterprotein bei der Aktin-abhängigen Rekrutierung des Fas-Liganden zur immunologischen Synapse eine Rolle spielt.

5.2.2.1 Charakterisierung des monoklonalen anti-Nck Antikörpers 280C10

Im Rahmen der Herstellung der Antikörper gegen Proteine der PCH-Familie wurde auch ein monoklonaler Antikörper gegen Nck hergestellt und charakterisiert. Das etablierte Hybridom produziert einen IgG_{2a}-Antikörper. Wie auch bei den Antikörpern gegen die PCH-Proteine wurde zunächst untersucht, ob sich der aufgereinigte Antikörper 280C10 zur Präzipitation von Nck eignet. Dazu wurden 293T-Zellen transient mit myc-konjugiertem Nck transfiziert und lysiert. Das Lysat wurde mit Protein A-Beads und dem Antikörper 28C10 inkubiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde Nck auch mittels eines anti-myc-Antikörpers aus dem Lysat präzipitiert. Die an die Beads gebundenen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot auf Nitrozellulose transferiert und dort mit einem anti-myc-Antikörper nachgewiesen (Abb. 5.2.17).

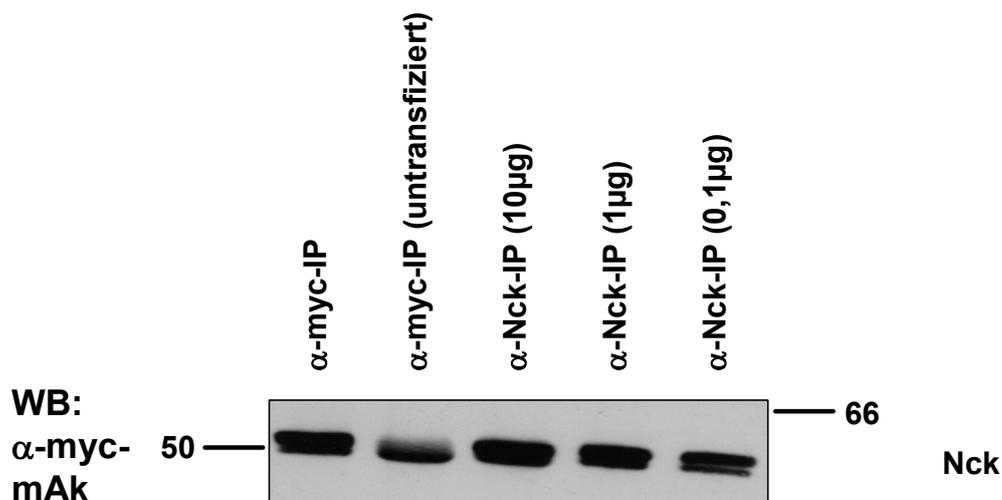


Abb. 5.2.17: Präzipitation von transfiziertem Nck mit dem anti-Nck-Antikörper 280C10. 293T-Zellen wurden transient mit myc-konjugiertem Nck transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und Nck mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg, 1 µg, 0,1 µg) des anti-Nck mAk 280C10 und Protein A-Beads präzipitiert (Spuren 3-5). Als Positivkontrolle diente die Präzipitation mittels des anti-myc mAk 9B11 (Spur 1), die Präzipitation aus Lysaten untransfizierter 293T Zellen mit den entsprechenden generierten Ak diente als Negativkontrolle (Spur 2).

Das präzipitierte Protein Nck migriert im gezeigten Experiment bei ungefähr 52 kDa knapp oberhalb der Bande der schweren Kette des Antikörpers. Selbst bei Einsatz geringer Antikörperkonzentrationen lässt sich das Protein effizient präzipitieren.

Um zu untersuchen, inwieweit sich der Antikörper 280C10 für die konfokale Mikroskopie eignet, wurden 293T-Zellen transient mit myc-gekoppeltem Nck transfiziert, fixiert und permeabilisiert. Das transfizierte Protein wurde mit einem polyklonalen anti-myc-Antikörper in Kombination mit einem Alexa Fluor 546-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper visualisiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem anti-Nck-Antikörper 280C10 behandelt und dieser mit einem Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-Maus-Antikörper nachgewiesen (Abb. 5.2.18). Anhand der Färbung der Zellen mit dem polyklonalen anti-myc-Antikörper ließen sich die Transfektanten nachweisen. Nur die transfizierten Zellen wurden auch mit dem anti-Nck-Antikörper angefärbt. Da die Einstellungen entsprechend der Fluoreszenzintensität nicht-transfizierter Zellen kalibriert wurden, ließ sich eventuell vorhandenes endogenes Nck nicht nachweisen. Der hergestellte Antikörper erkennt somit selektiv Nck und eignet sich für die Anwendung in der konfokalen Mikroskopie.

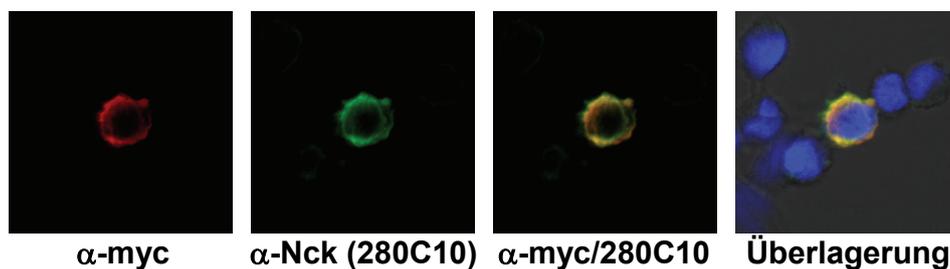


Abb. 5.2.18: Immunfluoreszenzfärbung von transfiziertem Nck unter Verwendung des monoklonalen anti-Nck-Antikörpers 280C10. 293T-Zellen wurden transient mit myc-gekoppeltem Nck transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-myc pAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG sowie dem anti-Nck mAk 280C10 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Um zu analysieren inwieweit der generierte Antikörper endogenes Nck erkennt und inwieweit Nck in unterschiedlichen Zellen exprimiert wird, wurden Lysate der myeloiden Leukämiezelllinie KFL-9, der T-Zell-Lymphomlinie Hut78, von PHA-Blasten zweier Spender (A, B), des CD4⁺ T-Zellklons 12603 und der CD8⁺ T-Zelllinie L CD8 elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot auf Nitrozellulose transferiert und Nck mit dem Antikörper 280C10 detektiert (Abb. 5.2.19).

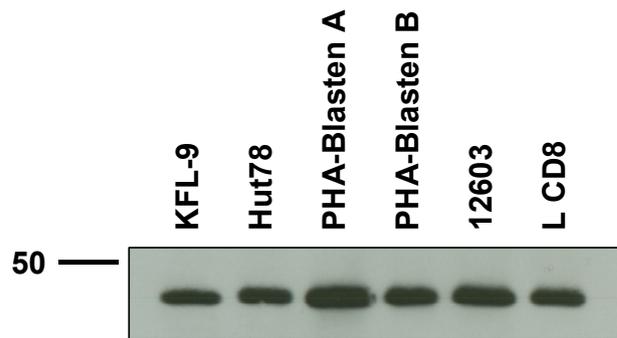


Abb. 5.2.19: Expression von Nck in T-Zellen. Die Lysate von KFL9-Zellen, von Hut78-Zellen, von PHA-Blasten zweier Spender, von CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 und CD8⁺ T-Zellen der Linie L CD8 wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 280C10 analysiert.

In allen untersuchten Zellen lässt sich Nck als spezifische Einzelbande bei ca. 47 kDa nachweisen. Hinsichtlich der Ausprägung dieser Expression lassen sich in den analysierten Zellen keine signifikanten Unterschiede feststellen.

5.2.2.2 FasL interagiert mit Nck

Die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschriebene Interaktion des FasL mit Nck wurde mittels Ko-Immunopräzipitationen aus Transfektanten verifiziert (Abb. 5.2.20). Dazu wurden myc-konjugiertes Wildtyp-Nck oder eine mutierte Nck-Variante mit Punktmutationen in allen SH3-Domänen zusammen mit dem FasL transient in 293T-Zellen überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate geteilt und jeweils eine Immunpräzipitation mit dem anti-FasL mAk NOK-1 bzw. einem anti-myc mAk durchgeführt. Es wurden dann die kopräzipitierten Proteine mittels Western Blot überprüft. Da überexprimiertes myc-konjugiertes Nck bei 52 kDa und damit knapp oberhalb der schweren Kette der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper migriert, wurde Nck im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Nck-Antikörper aus dem Kaninchen detektiert (Abb. 5.2.20).

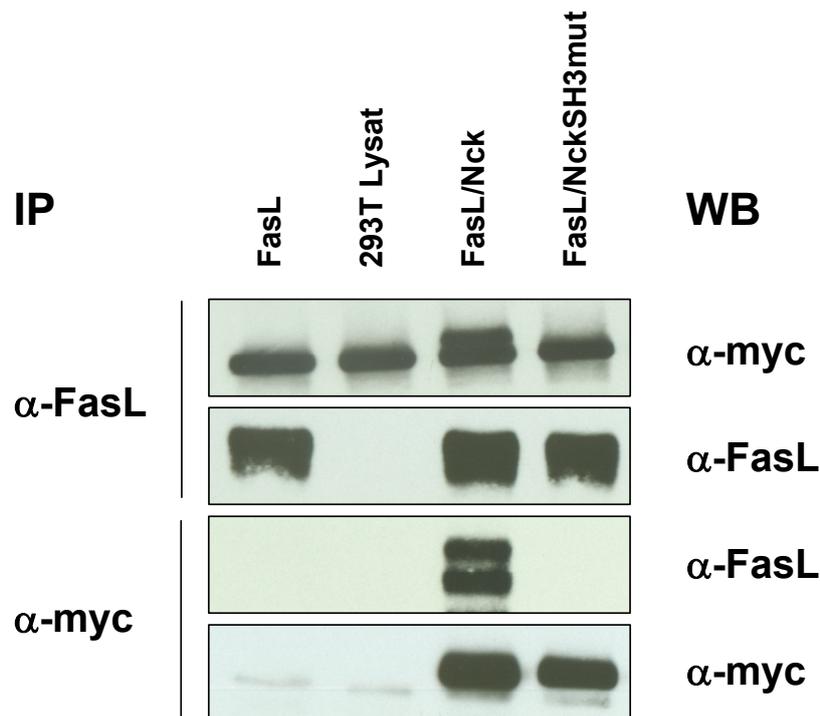


Abb. 5.2.20: Der FasL kopräzipitiert mit Nck in Transfektanten. Myc-konjugiertes Wildtyp- oder mutiertes Nck wurde zusammen mit dem FasL transient in 293T-Zellen überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die Lysate geteilt und jeweils eine IP mit anti-FasL mAk NOK-1 bzw. mit anti-myc mAk 9B11 durchgeführt. Die Western Blots wurden mit einem anti-myc mAk und anti-FasL mAk G247-4 entwickelt.

Bei der Präzipitation des Fas-Liganden wird Nck kopräzipitiert. Umgekehrt kopräzipitiert Nck den FasL. Diese Interaktion wird durch Mutation der SH3-Domänen vollständig inhibiert. Der FasL lässt sich mit dem mutierten Nck-Konstrukt nicht kopräzipitieren. Umgekehrt kopräzipitiert der FasL Nck nicht, wenn die SH3-Domänen mutiert sind, obwohl jeweils beide Proteine exprimiert und effizient präzipitiert werden.

5.2.2.3 FasL und Nck assoziieren in 293T Transfektanten

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Proteine bei gemeinsamer Überexpression in 293T-Zellen gegenseitig in ihrer subzellulären Verteilung beeinflussen, um so erste Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der Interaktion von Nck mit FasL zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurde ein EGFP-Nck-Konstrukt in 293T-Zellen allein oder zusammen mit dem Fas-Liganden überexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die subzelluläre Verteilung der Proteine fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.2.21).

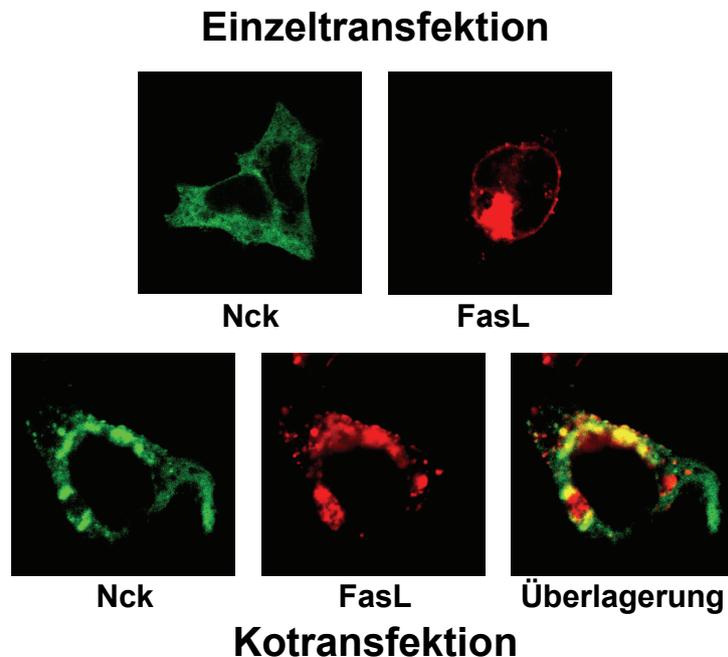


Abb. 5.2.21: Kolokalisation von Nck mit FasL in 293T Transfektanten. EGFP-gekoppeltes Nck und/oder FasL wurden in 293T Zellen exprimiert bzw. koexprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Die Koexpression von Nck führt zu einer intrazellulären Retention des FasL in granulären Strukturen.

In den Einzeltransfektanten zeigte der FasL neben der aufgrund der Überexpression zu erwartenden intrazellulären Akkumulation im Golgi-Apparat vor allem eine membranassoziierte Expression. Nck ist in den einzeltransfizierten Zellen gleichmäßig im Zytosol verteilt. Bei Anwesenheit von Nck ist der FasL deutlich mit intrazellulären granulären Strukturen assoziiert. Auch Nck findet sich im Bereich dieser Granula, wo es mit dem Fas-Liganden partiell kolokalisiert. Interessanterweise scheinen die beiden Proteine sich in diesem Überexpressionssystem in ihrer subzellulären Verteilung zu beeinflussen. Dies deutet ebenfalls auf eine mögliche funktionelle Rolle von Nck bei FasL-Transportprozessen hin.

5.2.2.4 Lysosomale Assoziation von endogenem FasL und Nck in primären humanen T-Zellen

Im Folgenden wurde die subzelluläre Verteilung der endogenen Proteine in einem primären humanen CD4⁺ T-Zellklon (12603) untersucht. Dazu wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, gegen die lysosomale Protease Cathepsin D, FasL und Nck gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 5.2.22). Wie bereits erläutert, findet sich FasL in distinkten intrazellulären Granula, wo er mit der lysosomalen Protease Cathepsin D kolokalisiert.

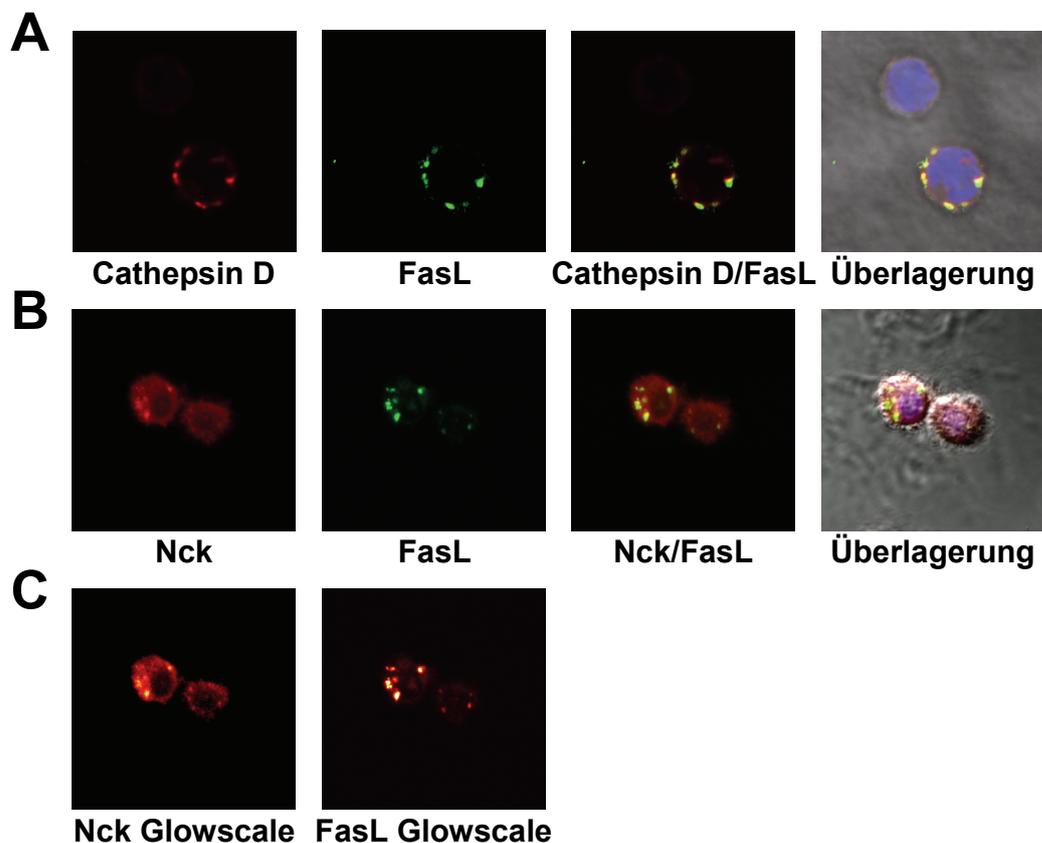


Abb. 5.2.22: Subzelluläre Verteilung von FasL und Nck in humanen CD4⁺ T-Zellklonen. (A) Kolokalisation von Cathepsin D und FasL. (B) Kolokalisation von Nck und FasL. (C) Glowscale-Darstellung der Nck-Färbung und der FasL-Färbung aus B. CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 wurden fixiert, permeabilisiert und gefärbt mit anti-Cathepsin D pAk (A) oder anti-Nck pAk (B, C) und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG und mit dem anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG (A, B, C). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Nck zeigt eine gleichmäßigere Verteilung, ist aber im Bereich der FasL-enthaltenden Granula deutlich angereichert. Die Assoziation mit granulären Strukturen lässt sich anhand der dargestellten Glow-Scale-Aufnahmen verdeutlichen.

5.2.2.5 FasL und Nck sind in lysosomalen Fraktionen angereichert

Anhand subzellulärer Fraktionierungen von T-Zelllysaten wurde die fluoreszenzmikroskopisch untersuchte subzelluläre Verteilung des FasL biochemisch verifiziert. Dazu wurden Lysate von stabil FasL-transfizierten Jurkat T-Zellen (JFL) oder PHA-Blasten über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert und die Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf das Vorhandensein des lysosomalen Membranproteins LAMP-1 sowie des FasL und Nck hin analysiert (Abb. 5.2.23). Der FasL findet sich ausschließlich in den LAMP-1-positiven, lysosomalen Fraktionen 1 und 2. Wie auch fluoreszenzmikroskopisch beobachtet weist Nck eine diffusere Verteilung auf, ist aber vor allem bei dem mit PHA-Blasten durchgeführten Experiment deutlich in der lysosomalen Fraktion angereichert. Diese Anreicherung von Nck in den lysosomalen Fraktionen lässt sich tendenziell auch in den stabil mit dem FasL transfizierten Jurkat-Zellen (JFL) nachweisen. Dieser Unterschied könnte auf der unterschiedlichen FasL-Expression in den verwendeten Zellen beruhen. In JFL-Zellen ist FasL intrazellulär gespeichert, dennoch weisen diese Zellen auch ohne Stimulation eine starke FasL-Oberflächenexpression auf (Doktorarbeit, Jing Qian). In primären T-Zellen findet sich der FasL ausschließlich intrazellulär und ist erst nach Stimulation auf der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 5.1.3).

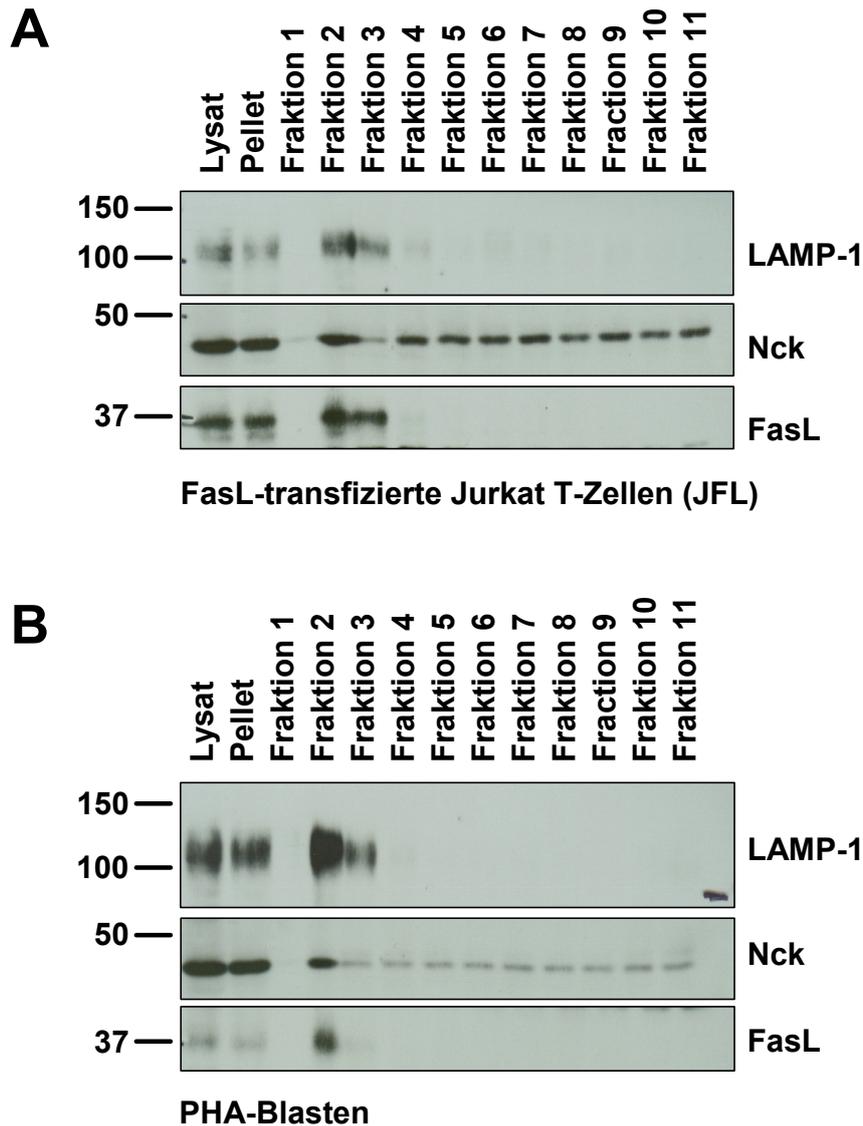


Abb. 5.2.23: Anreicherung von FasL und Nck in lysosomalen Fraktionen. Lysate unstimulierter JFL-Zellen (A) oder PHA-Blasten (B) wurden über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Gleiche Proteinmengen der jeweiligen Fraktion wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot bezüglich der Expression des FasL, Nck und dem lysosomalen Membranprotein LAMP-1 analysiert.

Entsprechende Ergebnisse wurden bei der Fraktionierung von Lysaten des CD4⁺ T-Zellklons 12603 mittels differentieller Zentrifugation erhalten (Abb. 5.2.24). Der FasL findet sich ausschließlich in der LAMP-1-positiven Organellenfraktion. Nck hingegen zeigt eine deutlich gleichmäßigere Verteilung, ist aber auch in der Organellenfraktion nachweisbar.

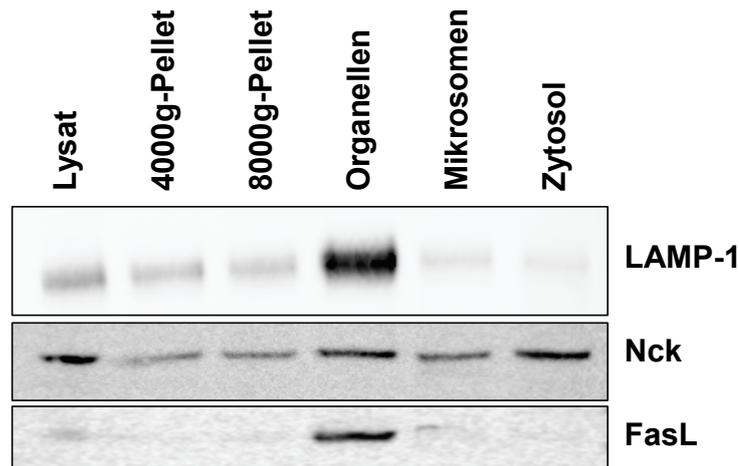


Abb. 5.2.24: Anreicherung von FasL und Nck in lysosomalen Fraktionen. Das Lysat des CD4⁺ T-Zellklons 12603 wurde über differentielle Zentrifugation fraktioniert. Gleiche Proteinmengen der jeweiligen Fraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot bezüglich LAMP-1, Nck und FasL analysiert.

5.2.2.6 Kolokalisation von Nck, FasL und lysosomalen Markern an der zytotoxischen immunologischen Synapse

Um nähere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Adapterproteins Nck am Transport des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse zu erhalten, wurde die subzelluläre Verteilung beider Proteine in einer T-Zell/Zielzell-Kontaktsituation untersucht. Dazu wurde der CD4⁺ T-Zellklon 12603 mit EBV-transformierten B-Zellen für 30 Minuten kokultiviert, die Zellen fixiert, permeabilisiert und gegen Phosphotyrosin, F-Aktin, die lysosomale Serinprotease Cathepsin D, die zytotoxische Effektorprotease Granzym B, den FasL und gegen Nck gefärbt (Abb. 5.2.25). Am Ort des Zell-Zell-Kontakts kommt es zu einer massiven Zellaktivierung, wie anhand der Phosphotyrosin-Färbung zu erkennen ist. Darüber hinaus akkumuliert F-Aktin im Bereich der sich ausbildenden Synapse (A). Cathepsin D kolokalisiert mit Granzym B und dem FasL an der Kontaktzone. Dies deutet darauf hin, dass lysosomale, zytotoxische Granula zum Ort der Zellaktivierung transportiert werden (B, C). Nck ist im Bereich des Zell-Zell-Kontakts deutlich angereichert. Wie schon vorher beobachtet, zeigt es dort zwar eine etwas diffusere Verteilung, akkumuliert aber deutlich in der Umgebung der Granula, wo es mit FasL kolokalisiert.

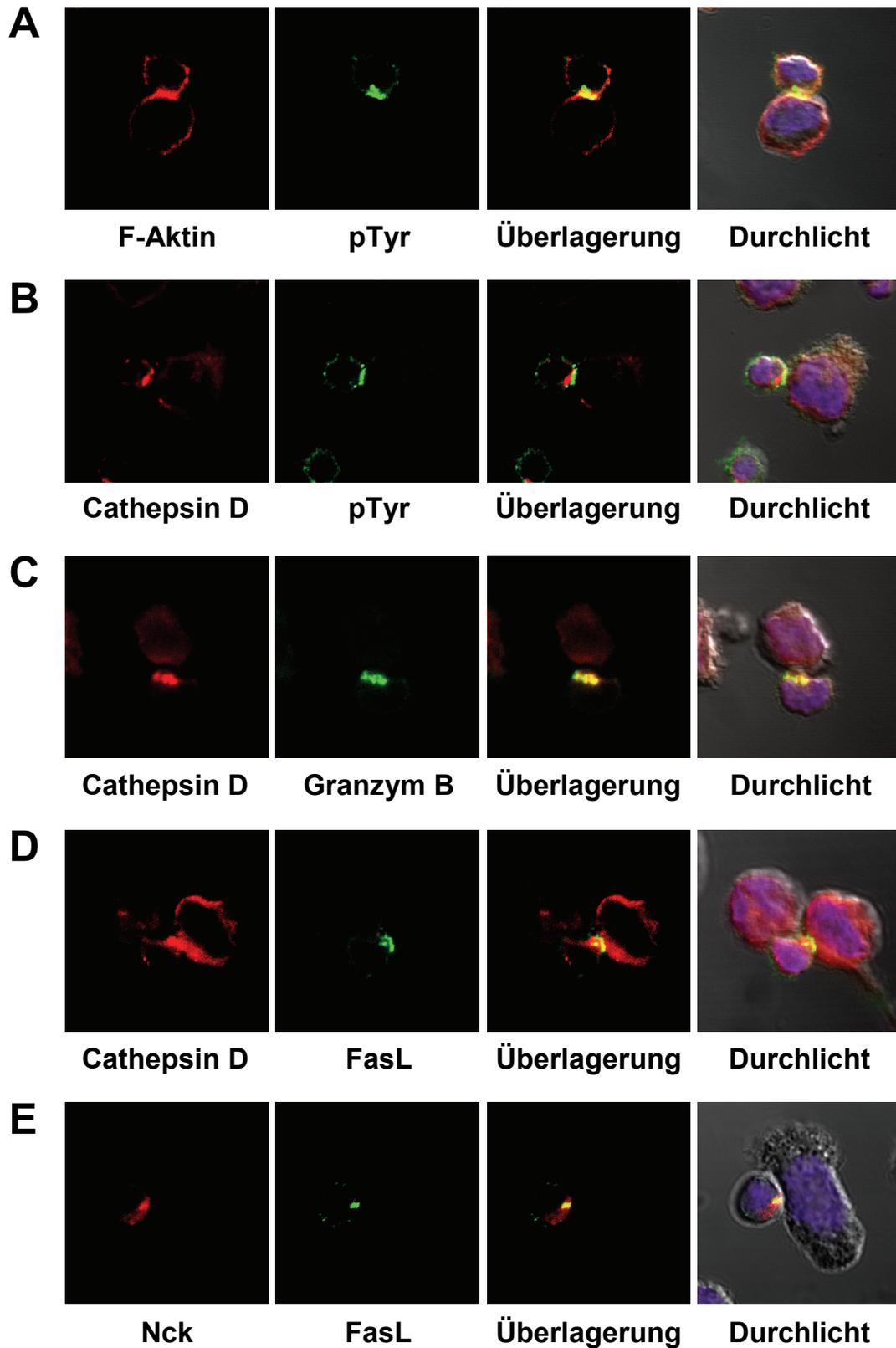


Abb. 5.2.25: Kolokalisation von FasL und Nck in Konjugaten klonaler T-Zellen und EBV-transformierter B-Zellen (B-LCL). Die T-Zellen wurden mit den B-LCL für 30 min inkubiert, fixiert, permeabilisiert und gefärbt mit anti-Cathepsin D pAk, anti-Nck pAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG, mit einem anti-Granzym B mAk, einem anti-Phosphotyrosin mAk, anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG und Rhodamin-konjugiertem Phalloidin. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

5.2.2.7 Aktin-Abhängigkeit der Rekrutierung des FasL zur immunologischen Synapse

Eine der Hauptfunktionen des Adapterproteins Nck besteht in der Rekrutierung der Aktinpolymerisations-Maschinerie zum Ort der T-Zellaktivierung. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss eine Inhibition der Aktinpolymerisation auf den Transport des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse hat, um so zumindest indirekte Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von Nck bei diesem Prozess zu erhalten. Dazu wurden T-Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren der Aktinpolymerisation Latrunculin A und Cytochalasin D mit EBV-transformierten B-Zellen inkubiert und der Transport des FasL zur Synapse fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.2.26). Bei Kokultivierung der T-Zellen mit Zielzellen akkumulieren F-Aktin und FasL im Bereich der Kontaktzone. In Anwesenheit von Inhibitoren der Aktinpolymerisation findet sich im Bereich des Zell-Zell-Kontakts weder F-Aktin noch lässt sich ein Transport des FasL dorthin beobachten. Die Inhibitoren beeinflussen gleichzeitig die intrazelluläre Speicherung des FasL nicht. Interessanterweise scheint aber im Vergleich zu den Zellen, welche nicht mit Zielzellen inkubiert wurden, bei Kontakt mit Zielzellen die Menge an nachweisbarem FasL in den mit Inhibitoren behandelten Zellen abzunehmen. Das deutet darauf hin, dass auch in diesen Zellen womöglich noch induzierte Degranulationsprozesse mit anschließendem Shedding stattfinden, diese aber aufgrund der Beeinträchtigung der Aktinpolymerisation ungerichtet sind, so dass es zu keiner lokalen und stabilen Expression des FasL auf der Zelloberfläche kommt.

5.2.2.8 Der Transport des FasL zur immunologischen Synapse ist von einer funktionellen Interaktion mit Nck abhängig

FasL interagiert mit seiner zytoplasmatischen Domäne mit SH3-Domänen von Nck. Uns hat deshalb die Frage interessiert, welchen Einfluss die Überexpression einer nicht-bindenden Nck-Mutante (s. Abb. 5.2.20) auf den Transport des FasL zur Synapse hat.

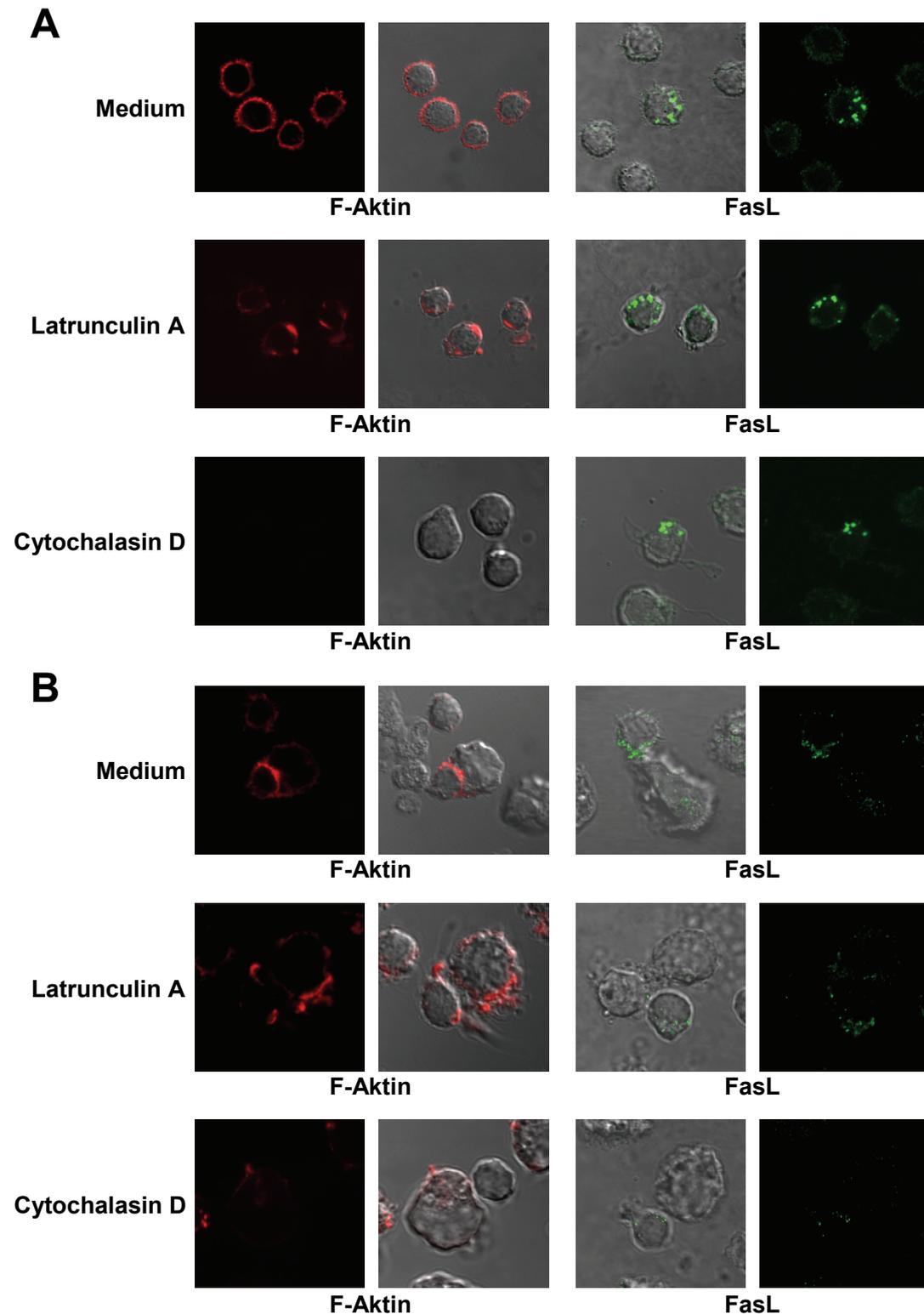


Abb. 5.2.26: Aktin-Abhängigkeit der Rekrutierung des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse. (A) Subzelluläre Verteilung des FasL in unstimulierten CD4⁺ T-Zellklonen. Die Zellen wurden für 30 min in Medium oder in Anwesenheit von Latrunculin A oder Cytochalasin D inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Aktinfilamente wurden mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin und FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 gefolgt von Alexa Fluor 488-konjugiertem Esel anti-Maus Sekundärantikörpern gefärbt. (B) Subzelluläre Verteilung des FasL in Konjugaten von CD4⁺ T-Zellklonen mit EBV-transformierten B-Zellen. Die T-Zellen wurden mit den B-Zellen im Verhältnis 2:1 für 20 min kokultiviert, fixiert, permeabilisiert und wie beschrieben (s.o.) gefärbt. Die Zellformen wurden durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Um zu überprüfen, ob sich Jurkat-Zellen für diese Fragestellung eignen und bei Kontakt mit Zielzellen ebenfalls die Charakteristika der zytotoxischen immunologischen Synapse aufweisen, wurden diese mit EGFP-konjugiertem FasL transfiziert, mit Superantigen E-beladenen EBV-transformierten B-Zellen kokultiviert, fixiert, permeabilisiert und gegen Nck und Cathepsin D gefärbt (Abb. 5.2.27). Wie zuvor beim T-Zellklon 12603 beobachtet (s. Abb. 5.2.25), akkumulieren sowohl Cathepsin D als auch FasL am Ort des Zell-Zell-Kontakts, wo sie in granulären Strukturen kolokalisieren.

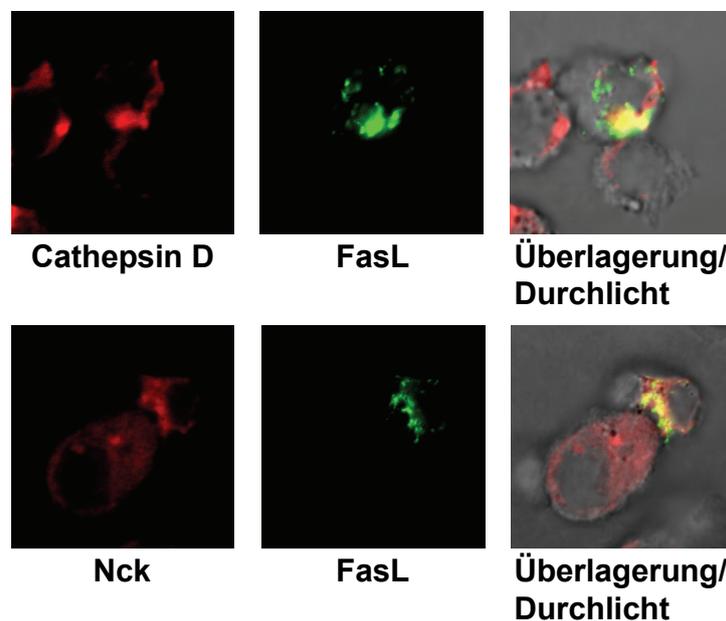


Abb. 5.2.27: Subzelluläre Verteilung des FasL in Konjugaten transient FasL-transfizierter Jurkat Zellen mit EBV-transformierten B-Zellen. Jurkat Zellen wurden transient mit FasL transfiziert, mit Superantigen E-beladenen EBV-transformierten B-Zellen kokultiviert, fixiert, permeabilisiert und gegen FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG sowie gegen Cathepsin D und Nck mit anti-Cathepsin D pAk bzw. anti-Nck pAk und Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG gefärbt. Die Zellformen wurden durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Auch Nck ist im Bereich der Kontaktzone angereichert und kolokalisiert mit FasL. In weiteren Experimenten wurden stabil FasL-transfizierte Jurkat-Zellen (JFL) mit EGFP-konjugiertem Wildtyp- oder SH3-mutiertem Nck transfiziert und ebenfalls mit Superantigen E-beladenen EBV-transformierten B-Zellen kokultiviert, fixiert und gegen FasL und F-Aktin gefärbt (Abb. 5.2.28).

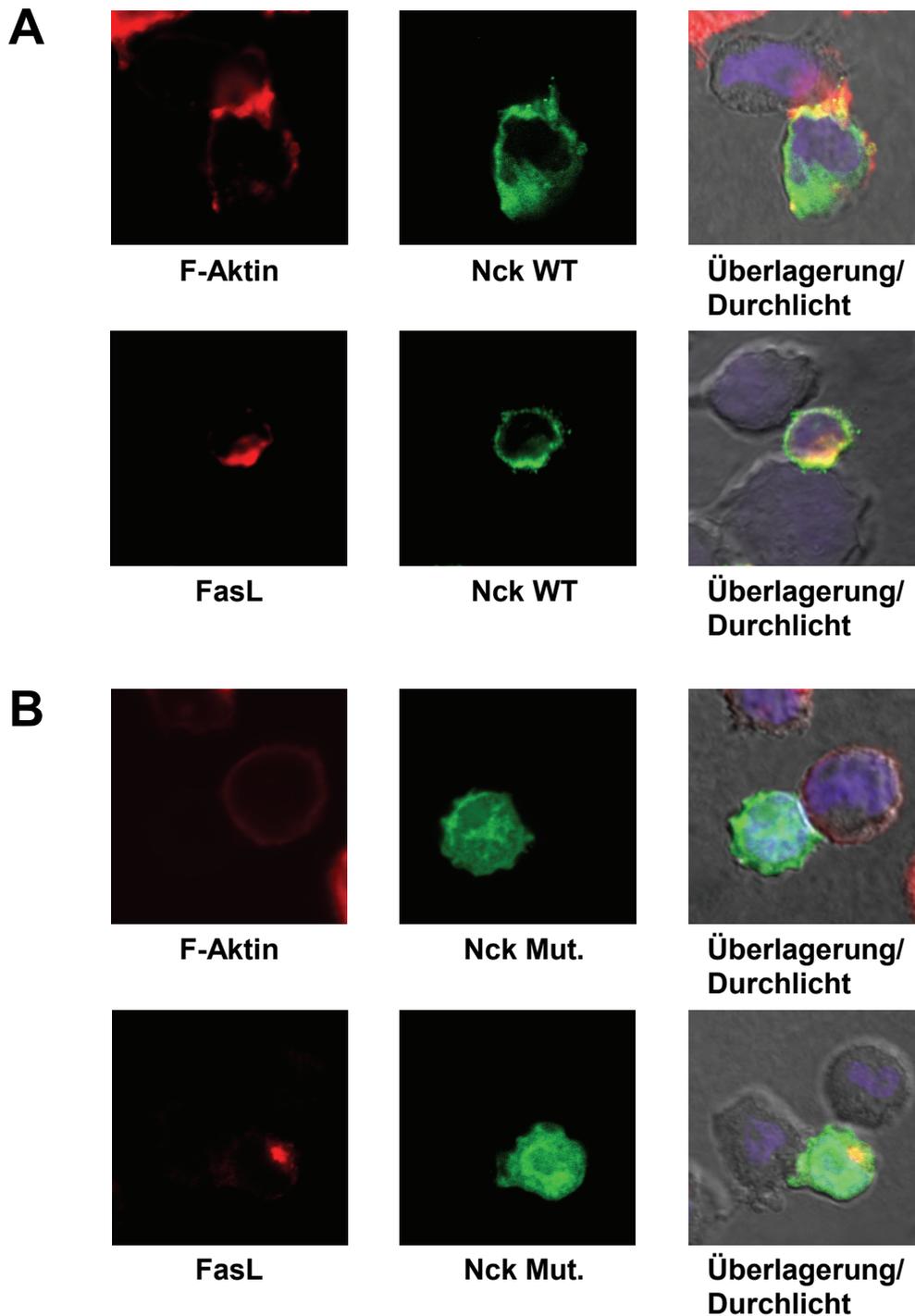


Abb. 5.2.28: Kolokalisation von FasL und Nck in Konjugaten von stabil FasL-transfizierten Jurkat Zellen (JFL) und EBV-transformierten B-Zellen (B-LCL). JFL Zellen wurden transient mit EGFP-gekoppelten Nck-Konstrukten transfiziert, mit Superantigen E-beladenen B-LCL für 10-30 min kokultiviert, fixiert, permeabilisiert und gegen den FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG und gegen F-Aktin mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Überexprimiertes Wildtyp-Nck zeigt eine Anreicherung im Bereich des Zell-Zell-Kontakts, obgleich diese Akkumulation nicht so ausgeprägt erscheint wie in anderen Zellsystemen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich um überexprimiertes Protein handelt. Im Bereich der Synapse kolokalisiert Nck mit F-Aktin und mit FasL. Bei Überexpression von mutiertem Nck beobachtet man an der Kontaktstelle weder eine Akkumulation von FasL, noch von F-Aktin oder Nck. Das bedeutet, dass eine funktionelle Interaktion mit SH3-Domänen des Adapterproteins Nck für den Transport des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse eine wichtige Rolle spielt. In diesem Zellsystem überexprimierter FasL wird somit in sekretorischen Lysosomen gespeichert und bei Kontakt mit Zielzellen zur immunologischen Synapse transportiert. Nck erscheint im Bereich des Zell-Zell-Kontakts ebenfalls angereichert.

Als nächstes wurde die Expression von Nck in PHA-stimulierten T-Zellblasten durch RNA-Interferenz vermindert, um die funktionelle Relevanz des Adapterproteins Nck für den Transport FasL-beladener Vesikel in primären humanen T-Zellen zu demonstrieren. Wie auch die untersuchten T-Zellklone und Jurkat-Zellen bilden diese Zellen bei Kontakt mit Zielzellen eine zytotoxische Synapse aus, an der F-Aktin und Nck akkumulieren und der FasL lokal auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Abb. 5.2.29).

Unbehandelte, siRNA-transfizierte und mit Kontroll-RNA transfizierte T-Zellen wurden jeweils mit Superantigen-beladenen EBV-transformierten B-Zellen kokultiviert, fixiert, permeabilisiert und gegen FasL gefärbt. Die subzelluläre Verteilung des FasL wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.2.30). Durch Transfektion dieser Zellen mit Nck-siRNA ließ sich eine Herunterregulation des Nck-Proteins um ca. 50-60% erreichen (Abb. 5.2.30 B). Die Zellpopulation konnte jedoch in ihrer Gesamtheit transfiziert werden, wie anhand der durchflusszytometrischen Analyse nach Transfektion mit FAM-markierter siRNA deutlich wird (Abb. 5.2.30 A).

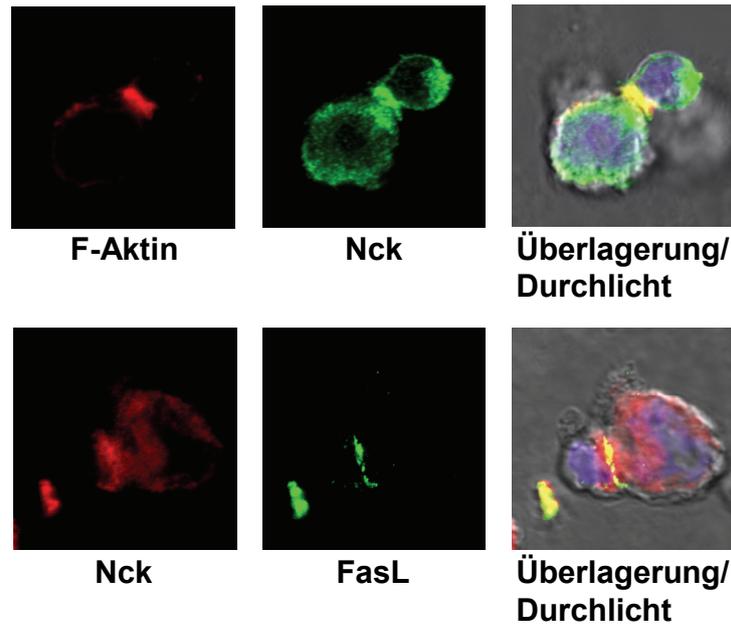


Abb. 5.2.29: Kolokalisation von FasL und Nck in Konjugaten von PHA-Blasten und EBV-transformierten B-Zellen (B-LCL). PHA-Blasten wurden mit Superantigen-beladenen B-LCL für 10-30 min kokultiviert, fixiert, permeabilisiert und gegen den FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG, gegen Nck mit anti-Nck pAk und Alexa Fluor 488-konjugiertem Esel anti-Kaninchen IgG bzw. Alexa Fluor 546-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG und F-Aktin mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Zellform wurde durchlichtmikroskopisch visualisiert.

Das bedeutet, dass die Menge an Nck in der Population gleichmäßig herunterreguliert ist. Die erreichte Reduktion reicht aus, den Transport des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse massiv zu beeinflussen. In untransfizierten oder mit Kontroll-RNA transfizierten Zellen ist im Gegensatz zu den mit siRNA transfizierten Zellen innerhalb des analysierten Zeitraums von 30 Minuten in fast allen Zellkonjugaten eine lokale Expression des FasL im Bereich der immunologischen Synapse zu beobachten (rote Kreise). In mit siRNA behandelten Zellen ist diese lokale Expression geringer oder der FasL ist innerhalb der Zelle lokalisiert, obwohl sich morphologisch deutliche Zellkonjugate ausbilden konnten (weiße Kreise). Bei Auszählung von jeweils 100 immunologischen Synapsen konnte in 78,9% der unbehandelten Zellen und in 78,2% der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen eine effiziente Mobilisierung des FasL zum Ort des Zell-Zell-Kontakts beobachtet werden. Demgegenüber war in nur 54,5% der mit siRNA-transfizierten Zellen eine stabile Expression des FasL in der IS nachweisbar.

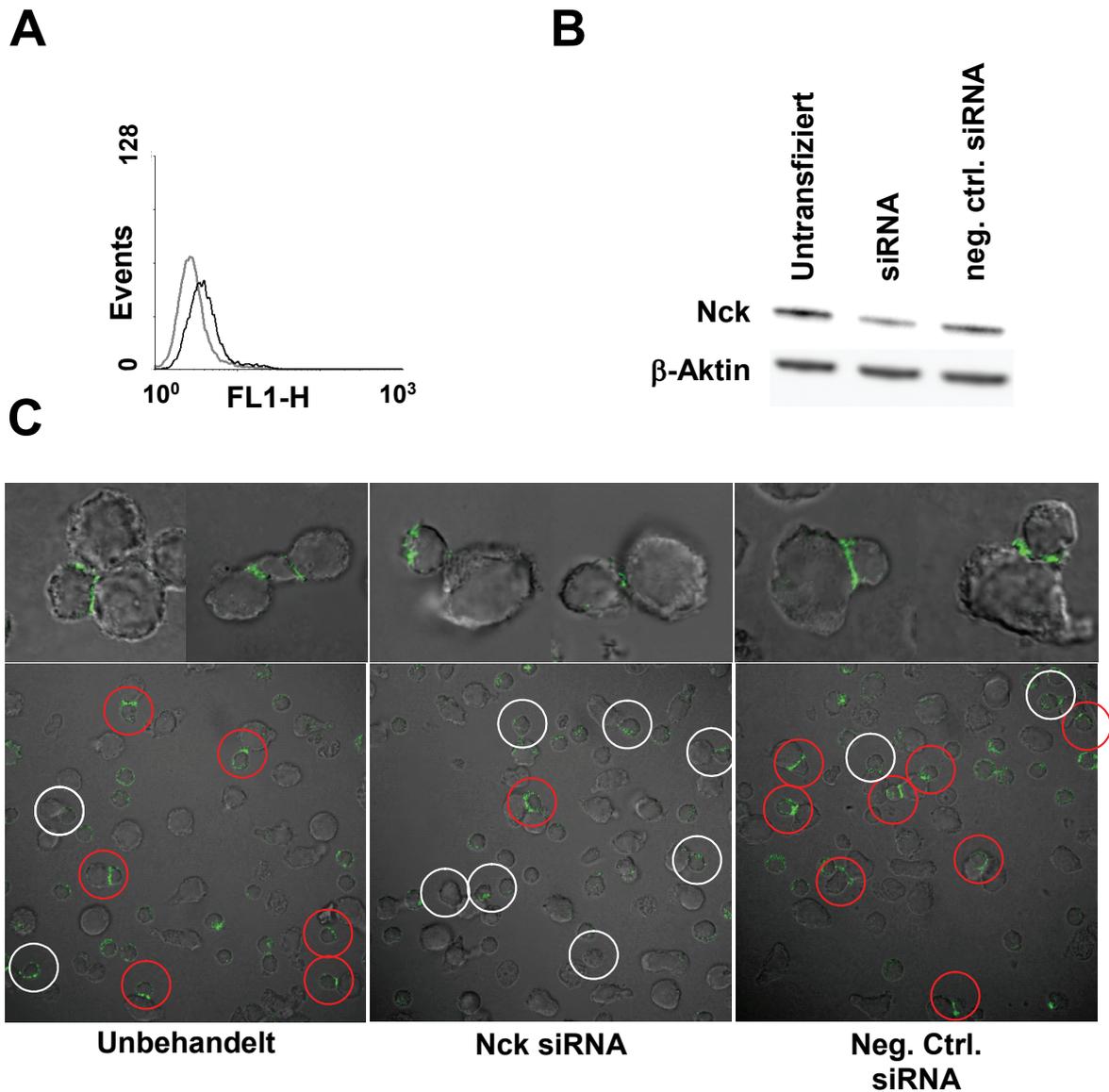


Abb. 5.2.30: Partieller „Knock-down“ von Nck vermindert den Transport des FasL zur sich ausbildenden zytotoxischen immunologischen Synapse. (A) Transfektionskontrolle: PHA-Blasten wurden nicht behandelt (graue Linie) oder mit FAM-konjugierter siRNA transfiziert (schwarze Linie) und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Western Blot-Analyse: PHA-Blasten wurden nicht transfiziert oder transfiziert mit siRNA gegen Nck bzw. einer Kontroll-siRNA. Nach 72 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Menge an Nck ist um ca. 50-60% reduziert. (C) Die entsprechend transfizierten PHA-Blasten wurden mit Superantigen-beladenen B-LCL für 30 Minuten inkubiert, fixiert, permeabilisiert und gegen den FasL mit anti-FasL mAk NOK-1 und Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Zellkonjugate wurden durchlichtmikroskopisch visualisiert. In den Übersichtsaufnahmen sind die Synapsen mit effizient transportiertem FasL (rot) und jene mit unzureichend transportiertem FasL (weiß) markiert.

5.3 Prozessierung des FasL

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind in verschiedenen Zellsystemen an der Prozessierung des FasL beteiligt. Entsprechend stabilisiert der Breitband-MMP-Inhibitor GM6001 (Galardin, ein synthetisches Hydroxamsäurederivat) die biphasische TPA/Ionomycin-induzierte FasL-Oberflächenexpression sowohl in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch in NK-Zellen, ohne jedoch den biphasischen Verlauf qualitativ zu beeinflussen. Dementsprechend könnten MMPs auch in T-Zellen oder NK-Zellen die Oberflächenexpression des Fas-Liganden durch Shedding-Prozesse beeinflussen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig (Biochemisches Institut der CAU) sollte die verantwortliche Protease identifiziert und die funktionelle Relevanz des FasL-Sheddings untersucht werden.

5.3.1 Prozessierung des FasL in 293T-Zellen

Proteolytische Spaltung von Transmembranproteinen resultiert neben der Generierung einer löslichen Form in der Bildung eines verkürzten transmembranen Spaltprodukts. Um erste Hinweise auf einen solchen Mechanismus im Zusammenhang mit der Spaltung des FasL zu erhalten, wurden 293T-Zellen mit FasL sowie zwei FasL-EGFP-Konstrukten transfiziert, wobei das grüne Fluoreszenzprotein in einem Fall am extrazellulären C-Terminus, im anderen Fall am intrazellulären N-Terminus des FasL gekoppelt war. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert, die Lysate gelelektrophoretisch separiert und mittels Western Blot analysiert. Zum Nachweis möglicher N-terminaler Spaltprodukte wurde dabei ein gegen den intrazellulären Anteil des FasL gerichteter polyklonaler Antikörper (Ab-3) verwendet (Abb. 5.3.1).

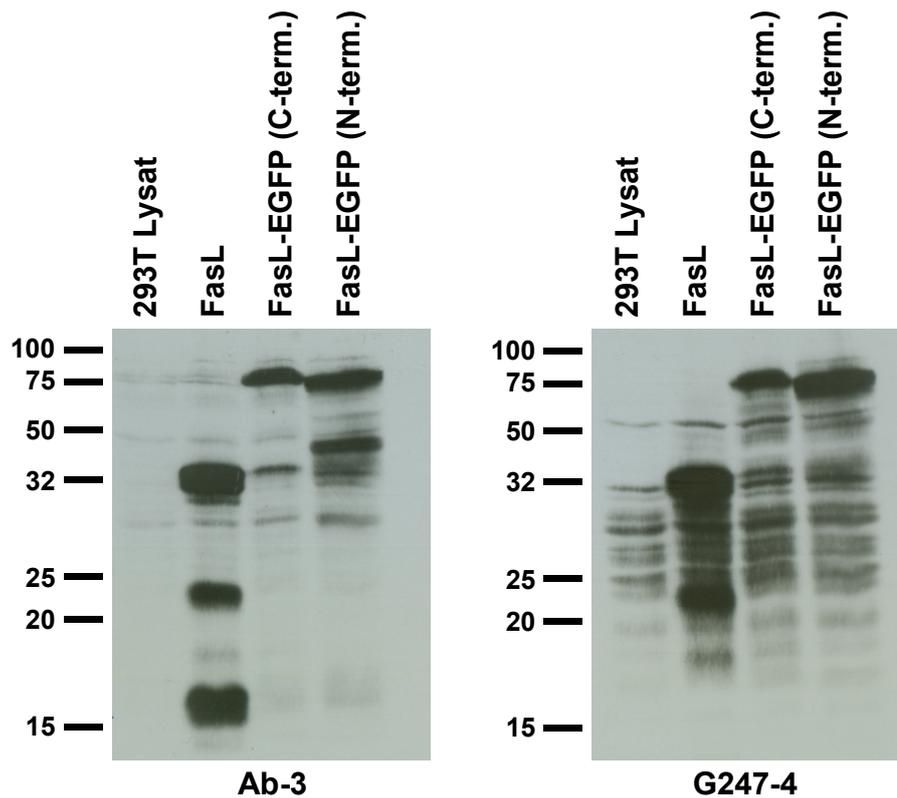


Abb. 5.3.1: Prozessierung von transfiziertem FasL in 293T-Zellen. 293T-Zellen wurden mit FasL oder N- bzw. C-terminal EGFP-gekoppeltem FasL transfiziert oder unbehandelt belassen. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-Gelelektrophorese (15% Gel) separiert.

Im Falle der Transfektion mit unkonjugiertem FasL migriert das Volle-Länge-Protein bei ca. 32 kDa. Interessanterweise beobachtet man auch eine ausgeprägte Bande bei ca. 15 kDa. Da diese Bande bei Verwendung eines Antikörpers gegen den extrazellulären Anteil des FasL (G247-4) nicht vorhanden ist, könnte es sich hierbei um ein N-terminales Spaltfragment des FasL handeln. Entsprechend des Molekulargewichts des EGFP von ca. 30 kDa migrieren die FasL-EGFP-Konstrukte deutlich höher (ca. 75 kDa). Bei Verwendung des Antikörpers Ab-3 lässt sich nur im Falle des FasL-Konstrukts mit N-terminal konjugiertem EGFP eine ausgeprägte Bande bei ca. 45 kDa nachweisen. Diese ist bei Verwendung des Antikörpers G247-4 nicht zu erkennen. Somit könnte es sich dabei ebenfalls um ein N-terminales Spaltfragment handeln, welches aufgrund des EGFP ca. 30 kDa höher migriert.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig konnte die Metalloprotease ADAM10 als die für die Prozessierung des FasL in 293T-Zellen und auch Maus-Fibroblasten verantwortliche Protease identifiziert werden. Um zu ermitteln, inwieweit

diese Beobachtung eine physiologische Relevanz hat, sollte die Prozessierung von endogenem FasL in primären humanen T-Zellen untersucht werden.

5.3.2 Prozessierung des FasL in primären humanen T-Zellen

In kultivierten T-Zellen folgt die TPA/Ionomycin-induzierte Oberflächenexpression der beschriebenen Kinetik. Da diese Expression durch Breitband-Inhibitoren von MMPs stabilisiert werden konnte, sollte untersucht werden, welchen Einfluss „spezifischere“ Inhibitoren von ADAM-Proteasen auf die TPA/Ionomycin-induzierte FasL-Oberflächenexpression haben. Das Hydroxamsäurederivat GW280264X inhibiert spezifisch sowohl ADAM10 als auch ADAM17. Die Substanz GI254023X stellt einen hochspezifischen ADAM10-Inhibitor dar und beeinflusst ADAM17 mit hundertfach reduziertem Potenzial (Ludwig et al., 2005).

Zunächst wurden unbehandelte oder mit GI254023X vorbehandelte CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 für einen Zeitraum von drei Stunden mit Phorbol ester und Kalziumionophor stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Oberflächenexpression des FasL durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 5.3.2 A). In unbehandelten Zellen zeigt sich bereits nach zehn Minuten eine deutliche Zunahme der FasL-Oberflächenexpression. Bei länger andauernder Stimulation nimmt die Fluoreszenzintensität zunächst wieder ab und erreicht ein Minimum nach etwa 40 Minuten. Im weiteren Stimulationsverlauf ist ein Wiederanstieg zu beobachten mit einer maximalen Fluoreszenzintensität nach etwa 100 Minuten. Diese Expression ist ebenfalls transient. Bei GI254023X-behandelten Zellen zeigt sich das erste Maximum in seiner Ausprägung geringfügig verstärkt. Wie auch in Kontrollzellen nimmt die Expression ab und erreicht ein Minimum nach etwa 40 Minuten, so dass sich ein klarer biphasischer Verlauf ergibt. Im weiteren Verlauf nimmt die FasL-Expression in Anwesenheit von GI254023X jedoch stetig zu. Das zweite Maximum ist in seiner Intensität deutlich verstärkt und es ist im Gegensatz zu unbehandelten Zellen bei fortschreitender Stimulation keine weitere Abnahme der Oberflächenexpression des FasL zu beobachten.

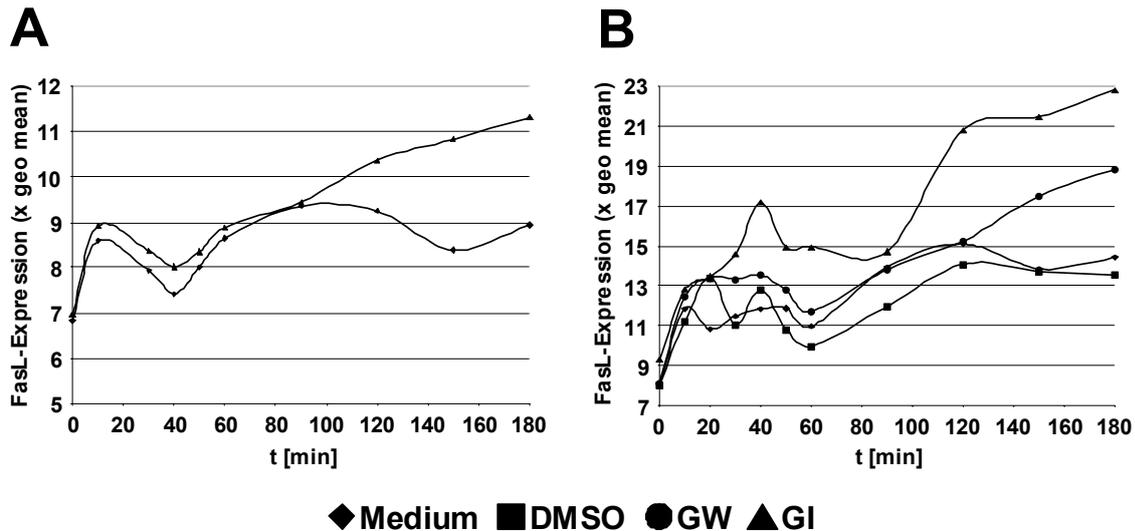


Abb. 5.3.2: Einfluss von Inhibitoren von Matrix-Metalloproteasen auf die Kinetik der TPA/Ionomycin-induzierten FasL-Oberflächenexpression in CD4⁺ T-Zellen (Klon 12603). (A) Einfluss des ADAM10-spezifischen Inhibitors GI254023X im Vergleich mit unbehandelten Zellen. (B) Einfluss von DMSO, dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW280264X und dem ADAM10-Inhibitor GI254023X im Vergleich mit unbehandelten Zellen.

Ein weiteres Experiment unter Einbeziehung des ADAM10/ADAM17-Inhibitors GW280264X und DMSO als Lösungsmittelkontrolle ergab ähnliche Befunde (Abb. 5.3.2 B). Bei Verwendung von GW280264X zeigen sich sowohl das erste als auch das zweite Maximum in ihrer Intensität verstärkt und es kann in der späten Phase der Expression keine weitere Abnahme beobachtet werden. Der Effekt von GI254023X ist im vorliegenden Experiment besonders ausgeprägt. Die FasL-Oberflächenexpression ist in der Degranulationsphase (20-40 min) und in der Phase der *de novo* Synthese stark verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass ADAM10 auch an der Oberflächenprozessierung von endogenem FasL maßgeblich beteiligt ist.

Stimulation aktivierter T-Zellen über den TZR/CD3-Komplex resultiert in einer gesteigerten Expression des FasL und seines Rezeptors Fas. Bindet FasL daraufhin auf der Oberfläche derselben oder benachbarter Zellen exprimiertes Fas, so induziert dies den Tod der Zelle (Suizid/Fratrizid). Auf diese Weise ist der FasL im Rahmen dieses Aktivierungs-induzierten Zelltodes maßgeblich an der Beendigung der T-Zellvermittelten Immunantwort und damit an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems beteiligt. Daher wurde untersucht, ob die beobachtete Modulation der FasL-Oberflächenexpression durch ADAM10 einen Einfluss auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod humaner T-Zellen hat.

CD4⁺ T-Zellen des Klons 12603 wurden zur Induktion von AICD in Anwesenheit von DMSO oder GI254023X oder ohne weitere Zusätze für 18 Stunden mit Superantigen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulation wurde die Zellviabilität über die Aufnahme von Propidiumjodid bestimmt und die Oberflächenexpression des FasL durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 5.3.3).

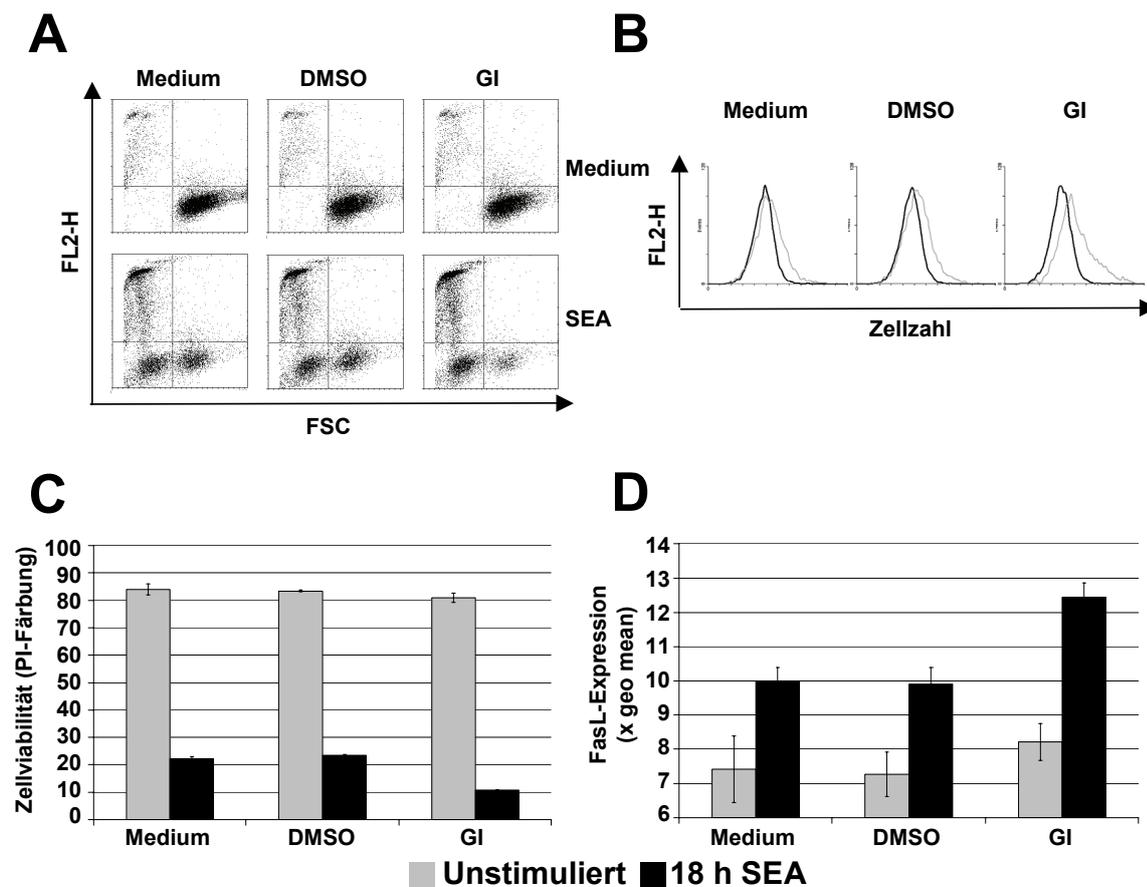


Abb. 5.3.3: Einfluss des ADAM10-Inhibitors GI254023X auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod. Die Zellen wurden in Anwesenheit von GI254023X, DMSO oder ohne weitere Zusätze für 18 Stunden mit Medium oder Superantigen inkubiert. (A) Die Zellviabilität wurde mittels PI-Färbung bestimmt. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente sind in C dargestellt (B) Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen gegen den FasL gefärbt und dessen Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Expression nach Stimulation mit Medium (schwarze Linie) und nach Stimulation mit Superantigen (graue Linie, skaliert). Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente sind in D dargestellt. (C, D) Graphische Darstellung der Zellviabilität (C) bzw. der FasL-Oberflächenexpression aus drei unabhängigen Experimenten, die am siebten Tag nach zweiter Restimulation der Zellen durchgeführt wurden.

Werden unbehandelte Zellen für 18 Stunden mit Superantigen inkubiert, so induziert dies massiven Zelltod. Der Anteil der lebendigen Zellen sinkt im Verlauf der Stimulation von 84% auf 22%. Dies entspricht einer relativen Apoptoseinduktion von etwa 74%. Bei Anwesenheit des ADAM10-Inhibitors GI254023X im Stimulationsansatz nimmt die Zellviabilität während der Stimulation von 81% auf 11% ab. Im Vergleich mit unbehandelten Zellen sind nach Ablauf der Stimulationszeit nur noch halb so viele Zellen lebendig. Dies entspricht einer relativen Apoptoseinduktion von 86%. DMSO hat unter diesen Bedingungen keinen Effekt auf die Zellviabilität (Abb. 5.3.3 A/C). Die Behandlung der Zellen mit Protease-Inhibitoren führt zu einer starken Zunahme der FasL-Oberflächenexpression. In Gegenwart des ADAM10-Inhibitors GI254023X ist die Menge an FasL auf der Zelloberfläche im Vergleich zu Kontrollzellen (Medium, DMSO) deutlich erhöht. Da selektiv die FasL-Oberflächenexpression der lebendigen Zellen bestimmt wurde, diese Population im Verlauf der Stimulation aber stark zurückgeht, wurde zur Verbesserung der Darstellung das entsprechende Histogramm (graue Linie) mittels WinMDI-Analysesoftware aufskaliert. Eine Inhibition von ADAM10 führt in diesem System sowohl zu einer Stabilisierung der Oberflächenexpression des FasL als auch zu gesteigertem Zelltod in den behandelten Zellen (Abb. 5.3.3. B/D).

In weiteren Experimenten unter zusätzlicher Verwendung des ADAM10/ADAM17-Inhibitors GW280264X konnte der beobachtete Effekt von GI254023X bestätigt werden (Abb. 5.3.4). Zwar ist in beiden gezeigten Experimenten die Zelltodinduktion und die FasL-Expression vergleichsweise geringer, doch zeigt GI254023X einen signifikanten Einfluss auf beide Parameter. GW280264X hat einen noch stärkeren Einfluss auf die Zellviabilität, während die FasL-Oberflächenexpression betreffend die Effekte von GI254023X und GW280264X annähernd gleich sind.

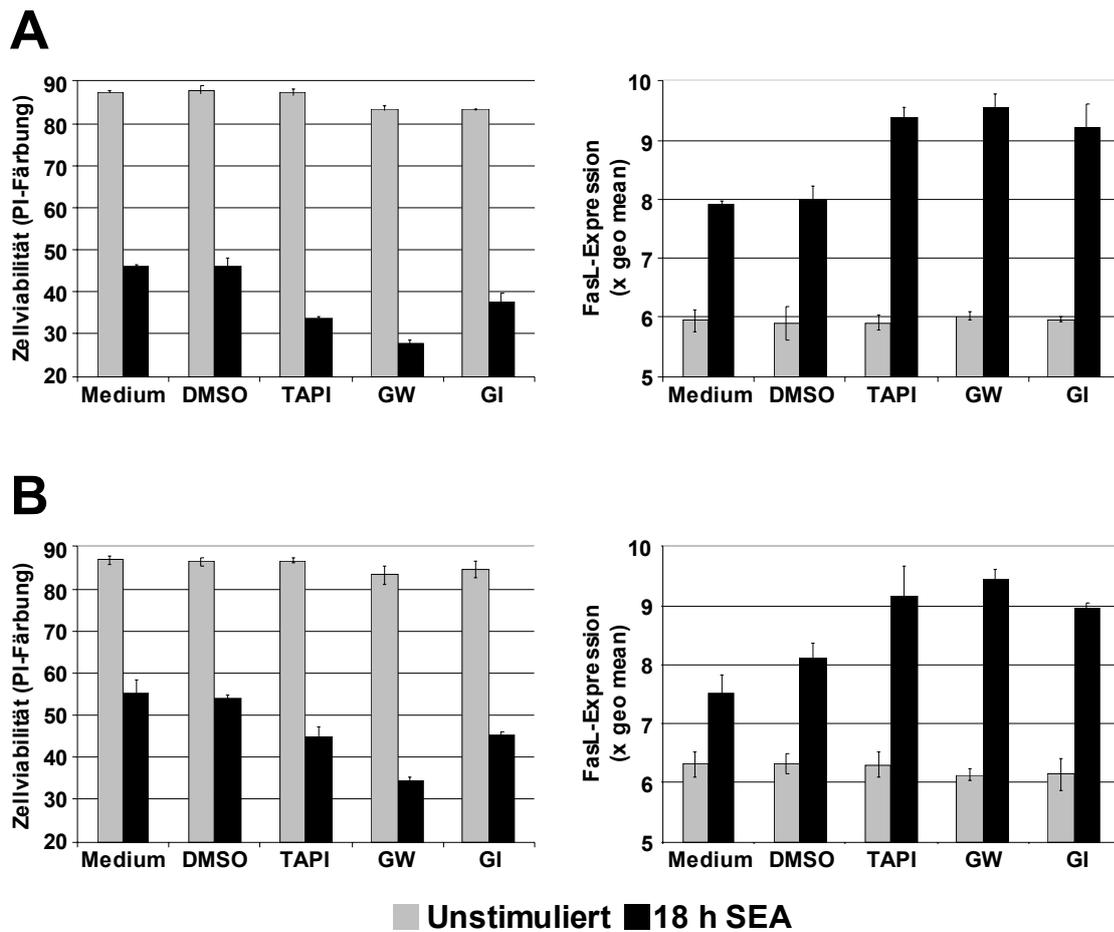


Abb. 5.3.4: Einfluss des MMP-Breitbandinhibitors TAPI, des ADAM10/ADAM17-Inhibitors GW280264X und des ADAM10-Inhibitors GI254023X auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod. Die Zellen wurden in Anwesenheit von DMSO, TAPI, GW280264X, GI254023X oder ohne weitere Zusätze für 18 Stunden mit Medium oder Superantigen inkubiert. (A) Graphische Darstellung der Zellviabilität (links) bzw. der FasL-Oberflächenexpression (rechts) aus drei unabhängigen Experimenten, die acht Tage nach Restimulation der Zellen durchgeführt wurden. (B) Graphische Darstellung der Zellviabilität (links) bzw. der FasL-Oberflächenexpression (rechts) aus drei unabhängigen Experimenten, die neun Tage nach Restimulation der Zellen durchgeführt wurden.

6. Diskussion

6.1 Biphasische Expression des FasL in aktivierten T-Zellen und NK-Zellen

Der FasL stellt ein wichtiges Effektormolekül des Aktivierungs-induzierten Zelltodes dar. Die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Stimulation aktivierter CD4⁺ T-Zellen (TH1) induziert die Biosynthese des FasL und nach etwa zwei Stunden dessen Expression auf der Zelloberfläche, welche mit der Sensitivität der Zellen gegenüber AICD korreliert (Oberg et al., 1997a; Janssen et al., 2000b). Entsprechend führt in diesem System die Inhibition der Expression des FasL durch Inhibitoren von Tyrosin-Kinasen (z.B. Herbimycin) oder durch Ligation des CD4-Korezeptors zu einer verminderten Induktion der Apoptose (Oberg et al., 1997b; Sanzenbacher et al., 1999). Andererseits wird der FasL in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und in NK-Zellen in sekretorischen Lysosomen gespeichert. Die Aktivierung zytotoxischer Effektorzellen resultiert in einer Degranulation der intrazellulären Speicherorganellen und in einer schnellen Expression des FasL auf der Zelloberfläche. Dies gewährleistet nach Erkennen einer Zielzelle die lokale Expression des FasL als Effektormolekül der zellvermittelten Zytotoxizität in der sich ausbildenden immunologischen Synapse (Bossi und Griffiths, 1999; Blott et al., 2001).

Zur Untersuchung der Kinetik der Oberflächenexpression des FasL in T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps und NK-Zellen wurden die Zellen unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors mit Phorbolster (TPA) und Kalziumionophor (Ionomycin) stimuliert und die Oberflächenexpression des Fas-Liganden durchflusszytometrisch bestimmt. Aus zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommenen individuellen Histogrammen wurden die Verläufe der Expression über einen Zeitraum von drei Stunden erstellt (Abb. 5.1.1). Interessanterweise wurde für alle untersuchten Zellen ein biphasischer Verlauf der FasL-Expression beobachtet. Dabei trat das erste Maximum in der Regel nach einer Stimulationsdauer von nur zehn Minuten auf. Bei andauernder Stimulation nahm die Oberflächenexpression wieder ab und erreichte ein Minimum nach etwa 40 Minuten. Im weiteren Stimulationsverlauf war ein Wiederanstieg zu beobachten, welcher in einem zweiten Maximum nach etwa 120 Minuten resultierte. Die FasL-Oberflächenexpression folgte in allen untersuchten Zellen diesem klaren

biphasischen Verlauf. Es wurden lediglich Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Maxima beobachtet.

Unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren der Proteinbiosynthese, des Proteintransports, der Aktinpolymerisation und von Matrix-Metalloproteasen wurde die beobachtete Kinetik näher charakterisiert (Abb. 5.1.2). Die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid, welches die Peptidyltransferase in 80s-Ribosomen hemmt (Chow et al., 1995), zeigte keinen Einfluss auf die frühe Phase der Expression. Nach dem ersten Maximum nahm jedoch die Oberflächenexpression des FasL stetig ab und ein zweites Expressionsmaximum blieb aus. Bei Inhibition des Proteintransports durch Brefeldin A, welches spezifisch den Transport von Proteinen aus dem Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat hemmt, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Das frühe Maximum blieb bei Behandlung der Zellen mit Brefeldin A unbeeinflusst, aber es wurde keine gesteigerte Oberflächenexpression des FasL zu späteren Zeitpunkten beobachtet. Das zweite Maximum beruht somit auf dem Transport neusynthetisierter FasL-Moleküle zur Zelloberfläche, während intrazellulär gespeicherter FasL das frühe Expressionsmaximum bedingt (Lettau et al., 2004).

In CD8⁺ T-Zellen und in NK-Zellen wird der FasL nach Befunden verschiedener Arbeitsgruppen in sekretorischen Lysosomen gespeichert und nach Aktivierung in einem Degranulationsprozess auf der Zelloberfläche exponiert (Bossi und Griffiths, 1999; Blott et al., 2001). Interessanterweise konnten wir auch im Falle von CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation eine schnelle Oberflächenexpression des FasL beobachten. Deshalb wurde die subzelluläre Verteilung des FasL in unterschiedlichen Zellpopulationen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 5.1.3). Wie auch in CD8⁺ T-Zellen fand sich der FasL in den analysierten CD4⁺ T-Zellen intrazellulär in distinkten Granula, wo er mit der lysosomalen Protease Cathepsin D und den zytotoxischen Effektoren Perforin und Granzym B kolokalisierte.

Zur Untersuchung der Aktin-Abhängigkeit der Mobilisierung des FasL zur Plasmamembran wurden zwei unterschiedliche Inhibitoren der Aktinpolymerisation verwendet (Abb. 5.1.2). Cytochalasin D bindet an Aktinfilamente und verhindert die Assoziation weiterer Untereinheiten (Flanagan und Lin, 1980). Latrunculin A bindet

an Aktinmonomere und inhibiert deren Bindung an das Aktinfilament (Coue et al., 1987). Die Behandlung der Zellen mit diesen Inhibitoren führte sowohl in der frühen Degranulationsphase als auch in der späten Phase der Proteinbiosynthese zu einer starken Verminderung der Oberflächenexpression des FasL.

Da FasL von Matrix-Metalloproteasen prozessiert werden kann, hat uns die Frage interessiert, inwieweit diese Prozessierung den Verlauf der Oberflächenexpression beeinflusst und ob sie durch Breitband-Inhibitoren von Matrix-Metalloproteasen (GM6001) moduliert werden kann (Abb. 5.1.2). Bei Einsatz von GM6001 wurde die Oberflächenexpression des FasL vor allem in der späten Phase stabilisiert, obgleich auch das erste Maximum in seiner Ausprägung leicht verstärkt erschien. Der Verlauf der biphasischen Expression blieb jedoch qualitativ erhalten. Matrix-Metalloproteasen sind somit an der Regulation der Oberflächenexpression des FasL in aktivierten T-Zellen beteiligt. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass der beobachteten Abnahme der FasL-Expression nach der frühen Degranulationsphase weitere Mechanismen zugrunde liegen müssen. In diesem Zusammenhang wäre eine Internalisierung des FasL denkbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Oberflächenexpression des FasL in $CD4^+$ und $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen, in $\gamma\delta$ -T-Zellen und in NK-Zellen einer biphasischen Kinetik folgt. Dabei beruht das erste Expressionsmaximum auf der Aktin-abhängigen Degranulation sekretorischer Lysosomen. Gleichzeitig induziert die Stimulation die Transkription und Biosynthese des FasL. Der neusynthetisierte FasL wird ebenfalls in einem Aktin-abhängigen Prozess zur Zelloberfläche transportiert und bedingt das zweite Expressionsmaximum. Matrix-Metalloproteasen modulieren die Oberflächenexpression des FasL, sind aber nicht an der Verminderung nach erfolgter Degranulation beteiligt.

Wie in der Einleitung erläutert, scheinen sich der Granzym B/Perforin-vermittelte und der FasL-vermittelte Weg der Zielzellyse funktionell zu ergänzen, wobei in Abhängigkeit vom physiologischen Kontext jeweils der eine oder der andere Weg dominiert (Brunner et al., 2003). Im Falle klassischer zytotoxischer Zellen wie $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen ist zur Unterstützung der Zielzellyse nach dem Erkennen einer Zielzelle eine schnelle und regulierte Oberflächenexpression des FasL in der

zytotoxischen immunologischen Synapse erforderlich, um eine lokal begrenzte Aktivität des Todesfaktors zu gewährleisten. In diesen Zellen wird der FasL deshalb gemeinsam mit weiteren exekutiven, akzessorischen und regulatorischen Komponenten der zellvermittelten Zytotoxizität in sekretorischen Lysosomen gespeichert. Diese Organellen ermöglichen so die sichere Verwahrung, die regulierte Exozytose und die lokal begrenzte Aktion der in ihnen enthaltenen Effektoren (Lettau et al., 2007). Interessanterweise konnte auch in $CD4^+$ T-Zellen und in $\gamma\delta$ T-Zellen eine schnelle, Aktivierungs-abhängige Oberflächenexpression von intrazellulär gespeichertem FasL beobachtet werden. Die Beobachtung, dass $CD4^+$ T-Zellen neben ihren etablierten Funktionen in der Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen und ihrer akzessorischen Rolle bei der Auslösung von CD8-T-Zellreaktionen auch zytotoxisches Effektorpotential aufweisen können, wurde anfangs als mögliches Zellkulturartefakt angesehen. Inzwischen konnten jedoch von anderen Arbeitsgruppen zytotoxische $CD4^+$ T-Zellen aus dem peripheren Blut humaner Spender isoliert werden, wo sie etwa 2% der $CD4^+$ T-Zellpopulation ausmachen. Diese Zellen weisen den Phänotyp stark ausdifferenzierter T-Zellen auf ($CD45RA^- / CD45RO^+ / CD11a^+$), zeichnen sich aber darüber hinaus durch den Verlust der Expression von CD27, CD28 und CCR7 auf. Funktionell exprimieren sie Perforin und Granzym und sind in der Lage Superantigen-beladene Zielzellen zu lysieren (Appay et al., 2002). Bei chronischen viralen Infektionen z.B. durch HIV, CMV oder EBV, aber auch bei einigen Tumorerkrankungen (z.B. B-CLL) ist die Menge an zytotoxischen $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut erhöht (Appay, 2004), so dass die von ihnen vermittelte MHCII-restringierte Zytotoxizität in diesen Fällen eine besondere physiologische Relevanz haben könnte. Die unterschiedlichen Effektormechanismen betreffend konnte gezeigt werden, dass zytotoxische $CD4^+$ T-Zellen EBV-infizierte B-Zellen sowohl mithilfe von Perforin/Granzym B (Su et al., 2001) als auch über das Fas/FasL-System eliminieren können (Nikiforow et al., 2003; Paludan et al., 2002).

T-Zellen unterscheiden sich neben dem Phänotyp $CD4^+$ oder $CD8^+$ auch in der Expression verschiedener T-Zell-Rezeptor-Typen. Etwa 90% der Zellen im peripheren Blut exprimieren ein Heterodimer aus α - und β -Untereinheiten und 5-10% weisen einen T-Zell-Rezeptor vom $\gamma\delta$ -Typ auf. Auch diese $\gamma\delta$ -T-Zellen haben ein ausgeprägtes zytotoxisches Potential, wobei die Zytotoxizität sowohl über

Perforin/Granzym B (Viey et al., 2005) als auch über das Fas/FasL-System vermittelt werden kann (Dalton et al., 2004).

Die Expression des FasL als Todesfaktor auf CD4⁺ T-Zellen im Verlauf des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) wird in Abhängigkeit von der vorangegangenen Stimulation nach etwa 2-3 Stunden beobachtet (Oberg et al., 1997a). Eine derartige späte Expressionsphase des FasL wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch in CD8⁺ T-Zellen, in $\gamma\delta$ T-Zellen und in NK-Zellen beobachtet. In CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen wurde bereits eine „späte“ Expression von Granzym A und B beschrieben, also von zwei zytotoxischen Effektorproteinen, die ebenfalls in sekretorischen Lysosomen gespeichert werden (Isaaz et al., 1995). In diesem Zusammenhang führte die Aktivierung der zytotoxischen Zellen zur Degranulation der Speicherorganellen und damit zur Freisetzung von Granzym A und B. Dabei wurde auch die Neusynthese beider Proteine induziert, wobei diese Proteine wieder in entsprechende Granula transportiert wurden. Ein Teil der Proteine wurde jedoch ohne Beteiligung sekretorischer Lysosomen direkt zur Plasmamembran transportiert und sezerniert. Dabei induzierten nur diese neusynthetisierten Proteine die Eliminierung benachbarter zytotoxischer Zellen („bystander killing“). Inhibitoren der Proteinbiosynthese (Cycloheximid) oder des Proteintransports (Brefeldin A) verhinderten entsprechend die Induktion des Zelltodes in benachbarten Zellen (Isaaz et al., 1995). Eine solche Modulation der proapoptischen Funktion des FasL hinsichtlich der Zielzellselektivität durch zeitliche und räumliche Unterschiede in der Oberflächenexpression würde einen neuen interessanten Aspekt der Regulation der Aktivität des FasL darstellen.

6.2 FasL-interagierende Proteine: PCH-Proteine

Ein wesentlicher Aspekt der Regulation der FasL-Expression ist seine Speicherung in sekretorischen Lysosomen und die Aktivierungs-induzierte Mobilisierung dieser Speicherorganellen in einem Aktin-abhängigen Prozess. Darüber hinaus induziert die Aktivierung die Neusynthese des FasL und dessen nachfolgenden Transport zur Zelloberfläche, welcher womöglich ohne Beteiligung sekretorischer Lysosomen erfolgt. Ferner könnten Endozytoseprozesse die Oberflächenexpression des FasL

modulieren. In Vorarbeiten anderer Gruppen wurde die Prolin-reiche Domäne funktionell mit der intrazellulären Lokalisation assoziiert. In diesen Analysen resultierte die Überexpression des FasL in leukämischen Basophilen der Ratte (RBL, rat basophilic leukemia) nur in Anwesenheit der PRD in einer lysosomalen Assoziation, während die Deletion der Prolin-reichen Region zur Expression auf der Zelloberfläche führte. Auf Grundlage dieser Daten postulierten die Autoren, dass vermutlich Proteine, die über SH3-Domänen mit dem FasL interagieren, den intrazellulären Transport und die lysosomale Assoziation vermitteln (Blott et al., 2001). Basierend auf der Identifizierung von FasL-Interaktoren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit insbesondere die PCH-Proteine untersucht, die in verschiedenen Zellsystemen funktionell mit Prozessen wie dem Transport von Organellen, der Endo- und Exozytose und der Ausbildung der immunologischen Synapse assoziiert sind.

Zunächst wurde die Interaktion dieser Proteine mit FasL verifiziert. Der FasL konnte mit GST-Fusionsproteinen von FBP17, PACSIN 1-3, CD2BP1 und CIP4 effizient aus Lysaten FasL-exprimierender Zellen präzipitiert werden (Abb. 5.2.1). Diese Interaktionen wurden in Ko-Immunpräzipitationen aus Transfektanten bestätigt (Abb. 5.2.2/5.2.3). Erwartungsgemäß führte die Deletion der SH3-Domäne im Falle von FBP17 und CIP4 oder die Einführung einer Punktmutation in die SH3-Domäne von PACSIN2 zu einem kompletten Verlust der Interaktion. Um Hinweise auf die funktionelle Rolle der PCH-Proteine für die Regulation der Expression des FasL zu erhalten, wurde ihr Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Todesfaktors in Transfektanten untersucht. Wie auch in primären humanen T-Zellen beobachtet, war der FasL bei Überexpression in hämatopoetischen Zellen (Hut78) in distinkten intrazellulären Granula lokalisiert (Abb. 5.2.4). In nicht-hämatopoetischen Zellen (293T, HeLa) wurde der FasL hingegen membranassoziiert exprimiert (Abb. 5.2.4). Die Kotransfektion von PCH-Proteinen führte in diesen Zellen zu einer zytoplasmatischen Retention des FasL und zu verminderter Oberflächenexpression (Abb. 5.2.5/5.2.6). Bei gemeinsamer Überexpression von CD2BP1 mit FasL in HeLa-Zellen führt die Deletion der Prolin-reichen Domäne zu einem Verlust der Kolo-kalisation und einer verstärkten Membranassoziation des FasL (Abb. 5.2.6). In weiteren Analysen im Rahmen der Doktorarbeit von Jing Qian und in Kooperation mit Dr. Martin Zörnig (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) konnten die intrazellulären

Granula, in denen der FasL mit Proteinen der PCH-Familie kolokalisiert, als lysosomales Kompartiment identifiziert werden (Qian et al., 2006). Weiterhin wurde die verminderte Oberflächenexpression des FasL für einige PCH-Proteine durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei korreliert die reduzierte Oberflächenexpression mit einer geringeren Zytotoxizität der FasL-exprimierenden Zellen (Baum et al., 2005).

Um die Funktion der PCH-Proteine insbesondere für die Biologie des FasL in primären humanen Zellen untersuchen zu können, wurden im Labor hergestellte monoklonale Antikörper gegen Mitglieder dieser Proteinfamilie hergestellt und auf ihre Verwendbarkeit in Western Blot, Immunpräzipitation und konfokaler Mikroskopie untersucht. Dabei wurden Antikörper gegen FBP17 (144B8, 144C6, jeweils IgG1), PACSIN1 (13E5, IgG1), PACSIN3 (106C10, IgM), CD2BP1 (129H10, IgG1) und CIP4 (208A3, IgG1) getestet. Diese Antikörper eignen sich zur Detektion der entsprechenden denaturierten Proteine im Western Blot (Abb. 5.2.7). Darüber hinaus können die mAk 13E5 (PACSIN1), 129H10 (CD2BP1) und 208A3 (CIP4) die jeweiligen PCH-Proteine effizient aus den Lysaten transient transfizierter Zellen präzipitieren (Abb. 5.2.8). PACSIN3 und FBP17 ließen sich mit den mAk 106C10 und 144C6 im Vergleich zur Präzipitation mit einem anti-myc-Antikörper nur unzureichend präzipitieren (Abb. 5.2.8/5.2.9). Weiterhin wurde die Eignung der Antikörper für die konfokale Mikroskopie evaluiert (Abb. 5.2.10). Dabei konnten FBP17, PACSIN1, CD2BP1 und CIP4 in Transfektanten nachgewiesen werden, während PACSIN3 nicht detektiert wurde.

Eine Voraussetzung für die Einflussnahme von PCH-Proteinen auf die Biologie des FasL ist deren Expression in FasL-exprimierenden Zellen. In der Literatur finden sich bereits Hinweise auf die Expression dieser Proteine. Basierend auf immunhistochemischen Untersuchungen von Gefrierschnitten konnte FBP17 in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Dabei wurde eine besonders starke Expression in epithelialen Zellen insbesondere im Bereich der Atmungsorgane, des Gastrointestinal- und des Urogenitaltrakts beobachtet. Im hämatopoetischen System konnte FBP17 bisher nur während der Erythropoese nachgewiesen werden und nicht in Zellen der myeloiden Linie (Fuchs et al., 2001). Auf der Grundlage von Northern-Blot-Analysen von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben scheint die

Expression von CD2BP1 auf das hämatopoetische System beschränkt (Li et al., 1998b). In diesem Zusammenhang wurden zwei putative Isoformen des Proteins beschrieben (CD2BP1L/CD2BP1S), von denen die lange Isoform (CD2BP1L) in hämatopoetischen Zellen verstärkt exprimiert sein soll. Dies hätte insofern funktionelle Konsequenzen, da die lange Isoform eine Prolin-reiche Domäne und ein zusätzliches Tyrosin aufweist, die sich nicht in der kurzen Isoform finden (Li et al., 1998b). CD2BP1 wurde auch auf Proteinebene in aktivierten T-Zellen nachgewiesen (Li et al., 1998b). Eine Expression von CIP4 wurde bisher für das Herz, Skelettmuskelgewebe und die Plazenta auf mRNA-Ebene gezeigt (Aspenstrom, 1997). Die PACSIN-Isoformen unterscheiden sich massiv in ihrer Gewebeverteilung. So scheint die Expression von PACSIN1 auf neuronale Gewebe beschränkt, während PACSIN2 ubiquitär exprimiert wird. PACSIN3 soll vor allem in Herz- und Skelettmuskelgewebe exprimiert sein (Kessels und Qualmann, 2004). Da der Nachweis in diesen Studien in vielen Fällen auf der Analyse von mRNA aus Gewebeproben beruhte, wurde die Expression von FasL-interagierenden PCH-Proteinen unter Verwendung der im Labor hergestellten Antikörper in primären humanen T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps im Detail untersucht.

Zunächst wurde die Expression der PCH-Proteine in leukämischen T-Zellen (Hut78), PHA-Blasten, einem CD4⁺ T-Zellklon (12603) und einer CD8⁺ T-Zelllinie (L CD8⁺) auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 5.2.11). Dabei konnte mRNA für FBP17, PACSIN2, PACSIN3, CD2BP1 und CIP4 in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden. PACSIN1 ließ sich dagegen nur in Hut78-Zellen detektieren. Wie bereits erwähnt wurden im Rahmen der Identifizierung von CD2BP1 zwei Isoformen postuliert. Mittels auf Grundlage der unterschiedlichen mRNA-Sequenzen entworfenen Primer konnte in allen untersuchten Zellen ausschließlich die putative lange Isoform von CD2BP1 nachgewiesen werden.

Auf Proteinebene wurde im Wesentlichen die Expression von CIP4, CD2BP1 und PACSIN1 untersucht, da sich insbesondere die Antikörper 208A3 (CIP4), 129H10 (CD2BP1) und 13E5 (PACSIN1) für verschiedene biochemische und zellbiologische Applikationen eignen. Ferner stellen diese Proteine jeweils prototypische Mitglieder von drei PCH-Subfamilien dar, aus denen FasL-interagierende Proteine identifiziert wurden (Abb. 1.4). CIP4 und CD2BP1 konnten in allen untersuchten T-Zellen

nachgewiesen werden (Abb. 5.2.12/5.2.13). PACSIN1 konnte auch nach Immunpräzipitation nicht in den untersuchten T-Zellen detektiert werden (Abb. 5.2.13). Die Expression der Proteine wurde mittels Immunfluoreszenz verifiziert. Da sich der monoklonale anti-FBP17-Antikörper 144B8 in Vorversuchen für Immunfluoreszenzanalysen geeignet zeigte, wurde auch die Expression von FBP17 in T-Zellen untersucht. CIP4, CD2BP1 und FBP17 konnten durchflusszytometrisch in allen analysierten T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5.2.14). Dabei zeigte die Expression der betrachteten Proteine keine deutlichen quantitativen Unterschiede hinsichtlich der untersuchten T-Zellsubpopulationen. Wie auch in den vorangegangenen Analysen konnte PACSIN1 nicht nachgewiesen werden, was die Spezifität der verwendeten Antikörper auch in dieser Applikation verdeutlicht. Darüber hinaus wurden CIP4, CD2BP1 und FBP17 fluoreszenzmikroskopisch in aktivierten primären humanen T-Zellen detektiert (Abb. 5.2.15). Die Proteine zeigten dabei eine relativ gleichmäßige Verteilung im Zytosol.

Zusammenfassend konnten auf mRNA-Ebene die Proteine FBP17, PACSIN2, PACSIN3, CD2BP1 und CIP4 in humanen T-Zellen unterschiedlichen Phänotyps nachgewiesen werden. Unter Verwendung der im Labor hergestellten Antikörper wurde die Expression von FBP17, CD2BP1 und CIP4 auf Proteinebene verifiziert. CIP4 und CD2BP1 sind in aktivierten T-Zellen im Vergleich zu frisch isolierten T-Zellen verstärkt exprimiert, was möglicherweise für eine spezifische Funktion in T-Effektorzellen spricht (Abb. 5.2.16). Das Protein PACSIN1, für das eine auf neuronale Gewebe beschränkte Expression beschrieben ist, konnte in keiner der untersuchten T-Zellen nachgewiesen werden. Hinsichtlich unterschiedlicher Isoformen von CD2BP1 wurden keine eindeutigen Befunde erhalten. Auf Grundlage der publizierten Sequenzen wurde in aktivierten T-Zellen auf mRNA-Ebene ausschließlich die putative lange Isoform nachgewiesen (Abb. 5.2.11). In nicht-aktivierten T-Zellen migrierte das Protein als Doppelbande, wobei in aktivierten T-Zellen nur die niedrigere Bande detektiert wurde. Dies könnte auch erklären, warum endogenes CD2BP1 in kultivierten T-Zellen niedriger migrierte als das überexprimierte Protein (Abb. 5.2.12/5.2.13). Weiterführende Analysen der CD2BP1-mRNA in aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen unter Berücksichtigung der Architektur des CD2BP1-Gens können in diesem Zusammenhang bei der Identifizierung unterschiedlicher CD2BP1-Isoformen helfen.

Die Hauptfunktion der PCH-Proteine besteht vermutlich in der Verschaltung von Membrankrümmungsprozessen mit der Maschinerie der Aktin-Reorganisation (Aspenstrom et al., 2006a). Strukturell sind alle Mitglieder dieser Familie durch eine FCH-Domäne und eine benachbarte Coiled-Coil-Domäne charakterisiert. Später wurde berichtet, dass diese beiden Strukturelemente eine funktionelle Einheit bilden, die als EFC-Domäne (Extended Fer/CIP4-homology domain) bezeichnet wird. Diese Region erlaubt es PCH-Proteinen, an Membranen zu binden und diese zu deformieren (Tsujita et al., 2006). Entsprechend weist die EFC-Domäne eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit der sogenannten BAR-Domäne auf, die in endozytotischen Proteinen wie Endophilin und Amphiphysin die Krümmung zellulärer Membranen vermittelt (Peter et al., 2004). Dabei scheint die FCH-Subdomäne die Bindung an Membranbestandteile zu vermitteln, während die Coiled-Coil-Domäne die Oligomerisierung von PCH-Proteinen bedingt, die die treibende Kraft der Membrankrümmung darstellt.

Weitere Adapter-Domänen in PCH-Proteinen vermitteln Interaktionen mit Proteinen, die an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind. Alle PCH-Proteine, die als Interaktionspartner des FasL identifiziert wurden, weisen SH3-Domänen auf. Darüber hinaus verfügen FBP17 und CIP4 über eine Domäne, die die Interaktion mit Rho-GTPasen erlaubt. Die als FasL-Interaktoren identifizierten PCH-Proteine interagieren mit N-WASP/WASP (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Ho et al., 2004; Kessels und Qualmann, 2004; Modregger et al., 2000). Während WASP ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, ist für N-WASP eine ubiquitäre Expression beschrieben. Die Hauptfunktion dieser Multidomänen-Adapterproteine besteht in der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes, welcher die Bildung verzweigter Netzwerke von Aktinfilamenten vermittelt (Badour et al., 2003b). WASP liegt in einer autoinhibierten Konformation vor, die eine Bindung an den Arp2/3-Komplex nicht zulässt (Badour et al., 2004). Autoinhibiertes WASP kann jedoch durch Bindung der Rho-GTPase cdc42 an eine GTPase-bindende Domäne, welche in einer Konformationsänderung resultiert, aktiviert werden, wobei diese Aktivierung durch Bindung von PIP₂ an einer weiteren Domäne kooperativ verstärkt wird (Prehoda et al., 2000). Dieser aktivierte Zustand kann durch Phosphorylierung an Tyrosinresten stabilisiert werden (Stradal et al., 2004). Darüber hinaus kann auch

die autoinhibierte Konformation von WASP durch Bindung von Proteinen der WIP-Familie stabilisiert werden. Eine zentrale Prolin-reiche Domäne erlaubt die auf der Wechselwirkung mit SH3-Domänen beruhende Interaktion mit Proteinen der PCH-Familie und weiteren Proteinen wie Nck, Grb-2 oder Intersectin (Badour et al., 2004). Auf welche Weise diese Proteine die Aktivität von WASP beeinflussen, ist dabei noch nicht im Detail verstanden.

Darüber hinaus interagieren CIP4, FBP17 und die PACSINe mit Dynamin (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006; Ho et al., 2004; Kessels und Qualmann, 2004; Modregger et al., 2000). Diese GTPase ist funktionell grundlegend an der Generierung von Vesikeln beteiligt, indem sie deren Abschnürung katalysiert. Sie spielt eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportprozessen, insbesondere bei der Endozytose (Schafer, 2004; Hinshaw, 2000). In diesem Zusammenhang könnten PCH-Proteine die Membran deformieren und simultan Dynamin zum Ort der Invagination rekrutieren. Gleichzeitig könnten sie über Interaktion mit WASP die Rekrutierung der Aktinpolymerisations-Maschinerie zu dem sich abschnürenden Vesikel vermitteln, die eine entscheidende Rolle bei dem folgenden Internalisierungsschritt spielt (Merrifield et al., 2005).

Daneben sind auch Interaktionen beschrieben, die auf individuelle Funktionen der einzelnen Mitglieder der PCH-Familie schließen lassen. **FBP17** interagiert mit SNX2 (Sorting nexin 2) (Fuchs et al., 2001), welches vermutlich ein Bestandteil des Retromer-Komplexes ist, der am retrograden Transport von Transmembranproteinen aus endolysosomalen Kompartimenten in den Golgi-Apparat verantwortlich ist (Griffin et al., 2005). Dieser zytosolische Komplex ist beispielsweise am Transport des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors von Endosomen zum Golgi-Apparat beteiligt. Da der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor seinerseits den selektiven Transport lysosomaler Hydrolasen oder von Granzym B vom Golgi-Apparat zu (sekretorischen) Lysosomen vermittelt, wird auf diese Weise dessen Rückführung ermöglicht, um so einen konstanten Transport lysosomaler Proteine zu gewährleisten (Arighi et al., 2004; Griffiths und Isaacs, 1993). Darüber hinaus scheint SNX2 an der lysosomalen Assoziation von internalisiertem EGFR beteiligt zu sein (Gullapalli et al., 2004).

CD2BP1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zellaktivierung. In diesem Zusammenhang bindet CD2BP1 mit seiner Coiled-Coil-Domäne an den intrazellulären Anteil von CD2 oder an das CD2-interagierende Adapterprotein (CD2AP) (Li et al., 1998b; Badour et al., 2003a). Nach Interaktion von CD2 mit seinen Liganden CD48/58 auf einer Antigen-präsentierenden Zelle rekrutiert CD2BP1 das Protein WASP und damit die Aktinpolymerisations-Maschinerie zum Ort des Zell-Zell-Kontakts und ermöglicht so die Ausbildung der immunologischen Synapse und die Aktivierung der T-Zelle (Badour et al., 2003a). Darüber hinaus interagiert CD2BP1 mit der Phosphatase PTP-PEST (Spencer et al., 1997), die wiederum die Aktivierung von Lymphozyten negativ regulieren kann (Li et al., 1998b; Yang und Reinherz, 2006).

CIP4 weist neben einer SH3-Domäne ein Bindungsmotiv für Rho-GTPasen auf und interagiert so direkt mit der Rho-GTPase cdc42 (Aspenstrom, 1997), welche eine fundamentale Rolle in der Aktivierung von WASP spielt (Prehoda et al., 2000). Darüber hinaus kann CIP4 das WASP-Protein zu Mikrotubuli rekrutieren, indem es direkt an diese bindet (Tian et al., 2000). Ferner interagiert CIP4 mit DAAM1, einem DRF (diaphanous-related formin), die ihrerseits die Elongation von Aktinfilamenten modulieren (Aspenstrom et al., 2006b; Badour et al., 2003b; Higgs, 2005).

Die **PACSINe 1-3** scheinen wie die anderen Mitglieder der PCH-Familie an endozytotischen Prozessen beteiligt zu sein, wobei sie in verschiedenen Zellsystemen die Endozytose inhibieren (Modregger et al., 2000; Cuajungco et al., 2006; Roach und Plomann, 2007) oder fördern (Anggono et al., 2006; Kim et al., 2006) können. Darüber hinaus scheinen sie auch an der Generierung von Vesikeln am Golgi-Apparat (trans-Golgi-network, TGN) zu partizipieren (Kessels et al., 2006).

Die Oligomerisierung von PCH-Proteinen ist einerseits die treibende Kraft bei der Membrankrümmung, bietet andererseits aber auch die Möglichkeit, hochmolekulare Komplexe mit einer Vielzahl individueller SH3-Interaktionspartner zu bilden (Tsujita et al., 2006; Halbach et al., 2007). Derzeit ist unklar, welche Rolle die PCH-Proteine bei der Regulation der Oberflächenexpression des FasL spielen. Da diese Proteine eine grundlegende Rolle insbesondere bei Endozytose-Prozessen spielen, könnten sie an der Internalisierung des FasL beteiligt sein. Denkbar wäre auch, dass PCH-Proteine

intrazelluläre Transportprozesse des FasL regulieren, wie z.B. dessen Speicherung in sekretorischen Lysosomen oder aber den Transport des FasL zur Zellmembran im Verlauf der späten Phase der Oberflächenexpression. Darüber hinaus könnten PCH-Proteine auch als akzessorische Proteine beim Transport des FasL zur immunologischen Synapse fungieren. Eine detaillierte Analyse der molekularen Netzwerke, an denen PCH-Proteine beteiligt sind, könnte zum Verständnis der Funktionen dieser Proteine vor allem in T-Zellen beitragen (medizinische Doktorarbeit, Andreas Linkermann). Inzwischen stehen mit den im Labor hergestellten monoklonalen Antikörpern die nötigen Hilfsmittel zur Untersuchung der PCH-Proteine in primären humanen Lymphozyten zur Verfügung. Des Weiteren kann die Funktion dieser Proteine insbesondere für die Regulation der Oberflächenexpression des FasL unter Verwendung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Transfektionsprotokolle für primäre T-Zellen mittels RNA-Interferenz analysiert werden.

6.3 FasL-interagierende Proteine: Nck

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass das Multidomänen-Adapterprotein Nck mit zwei seiner SH3-Domänen mit der Prolin-reichen Domäne des FasL interagiert (Lettau et al., 2006). Eine wichtige Funktion von Nck besteht in der Verschaltung von Rezeptor-Tyrosinkinasen mit der Maschinerie der Aktin-Reorganisation (Li et al., 2001). Nck interagiert mit WASP und kann dieses vermutlich direkt und unabhängig von cdc42 aktivieren (Rohatgi et al., 2001). Nck stellt in diesem Zusammenhang ein zentrales Adapterprotein für die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Umgestaltung des Zytoskeletts dar. Es interagiert mit phosphoryliertem SLP-76, das eine wichtige Komponente in der Signaltransduktion des TZR darstellt. (Zeng et al., 2003; Barda-Saad et al., 2005; Gil et al., 2002). Deshalb wurde untersucht, inwieweit dieses Adapterprotein eine Rolle bei der Aktin-abhängigen Rekrutierung des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse (IS) spielt.

Zunächst wurde die Interaktion des FasL mit Nck verifiziert. Beide Proteine kopräzipitierten aus transient transfizierten 293T-Zellen. Punktmutationen innerhalb der SH3-Domänen von Nck inhibierten die Interaktion mit FasL (Abb. 5.2.20).

Darüber hinaus führte die gemeinsame Überexpression von FasL und Nck in 293T-Zellen zu einer Assoziation beider Proteine innerhalb der Zelle (Abb. 5.2.21). Diese Assoziation konnte auch bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der endogenen Proteine in primären humanen T-Zellen beobachtet werden (Abb. 5.2.22). In den untersuchten CD4⁺ T-Zellen war FasL wie erwähnt intrazellulär in distinkten lysosomalen Granula lokalisiert. Nck zeigte eine diffusere Verteilung, war aber im Bereich dieser Speicherorganellen stark angereichert und kolokalisierte dort mit FasL. Anhand subzellulärer Fraktionierungen konnte die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine verifiziert werden (Abb. 5.2.23/5.2.24). Dabei wurde FasL ausschließlich in den LAMP1-positiven lysosomalen Fraktionen nachgewiesen. Nck zeigte, wie auch in den fluoreszenzmikroskopischen Analysen beobachtet, ein diffuseres Verteilungsmuster, war aber ebenfalls in den lysosomalen Fraktionen angereichert. Entsprechend dieser konstitutiven Assoziation des FasL mit sekretorischen Lysosomen, erfolgt die Oberflächenexpression des FasL erst nach Aktivierung der Zellen. Deshalb wurde die subzelluläre Verteilung von FasL, Nck und weiteren Komponenten sekretorischer Lysosomen bei Kontakt einer T-Zelle mit einer Zielzelle untersucht (Abb. 5.2.25/5.2.27/5.2.29). Dabei wurde beobachtet, dass die T-Zelle zunächst lokal im Bereich der sich ausbildenden Synapse aktiviert wird und F-Aktin am Ort des Zell-Zell-Kontakts akkumuliert. Darüber hinaus werden lysosomale zytotoxische Granula zur IS transportiert. Folglich konnten Granzym B, Cathepsin D und FasL im Bereich der IS nachgewiesen werden. Nck war ebenfalls in der Kontaktzone angereichert und kolokalisierte dort mit FasL.

Inhibition der Aktinpolymerisation mit Latrunculin A und Cytochalasin D führte bei Kokultivierung von T-Zellen mit Zielzellen zu einer deutlich reduzierten Mobilisierung des FasL zur IS (Abb. 5.2.26). Da Nck ein Bindeglied zwischen T-Zell-Rezeptor-Aktivierung und Rekrutierung des Zytoskeletts darstellt, deutet dies indirekt auf eine funktionelle Rolle von Nck auch im Rahmen der Rekrutierung des FasL zur IS hin. Dafür spricht auch, dass die Mobilisierung des FasL unterbleibt, wenn in Jurkat-Zellen Nck mit Punktmutationen innerhalb der SH3-Domänen exprimiert wird (Abb. 5.2.28). Außerdem führte partieller Knock-Down von Nck mittels RNA-Interferenz in primären T-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Expression des FasL in der zytotoxischen IS (Abb. 5.2.30).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die lokale Nck-vermittelte Aktin-Reorganisation bei Kontakt mit einer Zielzelle mit der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Mobilisierung des FasL zur sich ausbildenden zytotoxischen immunologischen Synapse assoziiert ist (Lettau et al., 2006). Der FasL stellt eine Transmembrankomponente sekretorischer Lysosomen dar, wobei seine Prolin-reiche Domäne ins Zytosol weist. In diesem Zusammenhang könnte die PRD als neues Rekrutierungs-Motiv angesehen werden, welches durch Interaktion mit Nck die Mobilisierung sekretorischer Lysosomen zum Ort des Zell-Zell-Kontakts vermittelt. Dies würde bedeuten, dass der FasL neben seiner Funktion als Todesfaktor eine sehr viel grundlegendere Rolle in der zellvermittelten Zytotoxizität spielt.

Bisher wurde ein Aktin- und Mikrotubuli-abhängiger Transport bereits für Melanosomen beschrieben, bei denen es sich ebenfalls um eine Variante sekretorischer Lysosomen handelt (Orlow, 1995; Wu et al., 1998). In Melanozyten speichern diese Organellen Pigmentproteine und vermitteln deren regulierte Exozytose. Dabei scheint der Transport der Melanosomen zur Zellperipherie Mikrotubuli-abhängig zu sein, wobei jedoch die Direktionalität dieses Transports, welche die regulierte Exozytose gewährleistet, Aktin-abhängig ist (Wu et al., 1998). Die letzte Phase der Mobilisierung in der Zellperipherie scheint dabei ausschließlich auf der Bewegung entlang der Aktinfilamente zu beruhen (Jordens et al., 2006). Entsprechend resultiert die Mutation des Motorproteins Myosin V in Mäusen in einem Defekt in der Fellfärbung (*dilute*) (Wei et al., 1997).

Die Mobilisierung sekretorischer Lysosomen zytotoxischer Zellen zur IS beginnt mit der Reorientierung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) zur sich ausbildenden immunologischen Synapse und einem Dynein/Dynactin-vermittelten Transport sekretorischer Granula entlang von Mikrotubuli. Nach Translokation zur IS findet die Fusion mit der Plasmamembran statt (Bossi und Griffiths, 2005). Insbesondere diese letzte Phase der Degranulation ist dabei in ihren molekularen Abläufen noch nicht im Detail charakterisiert. So könnte lokal eine Nck-induzierte Aktin-Reorganisation insbesondere für den „Kurzstreckentransport“ sekretorischer Granula vom polarisierten MTOC zur immunologischen Synapse eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass Nck gemeinsam mit Grb-2, WIP und WASP am Aktin-vermittelten Transport intrazellulärer Vesikel beteiligt ist (Benesch et al., 2002).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Störung der Interaktion des FasL mit Nck neben der Mobilisierung des Todesfaktors generell den Transport sekretorischer Lysosomen beeinträchtigt. Die Rekrutierung des FasL könnte aber auch auf anderen Ebenen beeinflusst werden. Es wäre denkbar, dass die Interaktion mit Nck nach erfolgter Degranulation der intrazellulären Speicherorganellen die lokale Expression des FasL in der zytotoxischen Synapse stabilisiert. Die IS weist eine hoch-organisierte Mikroarchitektur auf. Signalmoleküle wie der T-Zell-Rezeptor, CD2 oder CD4/CD8 sind in einer zentralen Region lokalisiert. Dieser zentrale supramolekulare Aktivierungskomplex (c-SMAC) ist umgeben von einem Ring von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1, welcher den peripheren supramolekularen Aktivierungskomplex bildet (p-SMAC). Die Degranulation sekretorischer Lysosomen erfolgt dabei in einer definierten Region innerhalb des p-SMAC in direkter Nähe des c-SMAC (Stinchcombe et al., 2001). Die zentrale Region innerhalb der immunologischen Synapse bleibt während der regulierten Exozytose vermutlich unbeeinflusst. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Aktin in der immunologischen Synapse ebenfalls einen peripheren Ring um den zentralen Bereich des Zellkontakts bildet, in dem es mit Nck kolokalisiert (Bardasaad et al., 2005). Die exakte Lokalisation des FasL innerhalb der Synapse ist derzeit unklar. Doch nach Fusion der sekretorischen Lysosomen mit der Plasmamembran im Bereich des p-SMAC wird der FasL lokal im Bereich der immunologischen Synapse exponiert. Nck könnte die lokale Oberflächenexpression des FasL stabilisieren, indem es dessen Lokalisation innerhalb der Mikroarchitektur des Zell-Zell-Kontakts beeinflusst. Die detaillierte Analyse von Mäusen, welche nur den extrazellulären Anteil des FasL membranständig exprimieren, könnte entscheidend dazu beitragen, eine mögliche regulatorische Funktion des FasL bei dem Transport sekretorischer Lysosomen zur immunologischen Synapse zu definieren.

6.4 Prozessierung des FasL

An der Prozessierung des FasL, die in der Bildung einer löslichen Form (sFasL) resultiert und dessen Oberflächenexpression moduliert, sind Matrix-Metalloproteasen beteiligt (Ethell et al., 2002; Kayagaki et al., 1995; Tanaka et al., 1998). In

verschiedenen Zellsystemen wurde eine Prozessierung des FasL durch MMP-3 (Stromelysin-1) (Matsuno et al., 2001) und MMP-7 (Matrilysin) (Mitsiades et al., 2001; Powell et al., 1999) beschrieben. Da diese Prozessierung durch TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) kaum beeinflusst wird, wurden auch ADAM-Proteasen funktionell mit der proteolytischen Spaltung des FasL assoziiert (Ethell et al., 2002).

Im Einklang mit publizierten Daten konnten wir bei Inhibition von Matrix-Metalloproteasen eine Stabilisierung der induzierten Oberflächenexpression des FasL beobachten (Abb. 5.1.2). Darüber hinaus wurden nach Überexpression des FasL in 293T-Zellen N-terminale Spaltfragmente nachgewiesen (Abb. 5.3.1). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig (Biochemisches Institut der CAU) wurde die Metalloprotease ADAM10 als FasL-Sheddase identifiziert. Initiale Analysen im Rahmen dieser Zusammenarbeit ergaben, dass die Überexpression des FasL in 293T-Zellen zur Freisetzung von löslichem FasL (sFasL) ins Medium führt. Die Menge an sFasL konnte durch Inhibition von Matrix-Metalloproteasen stark verringert werden. Der Einsatz von ADAM10/17-Inhibitoren zeigte dabei deutliche Effekte (Schulte et al., 2007). Das Hydroxamsäure-Derivat GW280264X inhibiert sowohl ADAM10 als auch ADAM17. GI254023X kann als ADAM10-Inhibitor angesehen werden, da es die Aktivität von ADAM17 deutlich weniger beeinflusst (Ludwig et al., 2005). Der MMP-Breitband-Inhibitor TAPI, der ADAM10/17-Inhibitor GW280264X und der ADAM10-Inhibitor GI254023X zeigten einen vergleichbaren Einfluss auf die Freisetzung von sFasL. Dies deuteten wir als einen ersten Hinweis auf eine Rolle von ADAM10 im Rahmen der Oberflächenprozessierung des FasL. Im Überstand ADAM10^{-/-} muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) konnte kein sFasL nachgewiesen werden, während die Menge an sFasL im Überstand ADAM17^{-/-} MEFs mit der von Wildtyp-MEFs vergleichbar war. Nach Retransfektion von ADAM10 (nicht aber ADAM17) in ADAM10^{-/-} MEFs war sFasL im Überstand nachweisbar. Nur in Wildtyp-Zellen sowie in mit ADAM10 transfizierten ADAM10^{-/-} MEFs konnten entsprechend N-terminale Spaltfragmente detektiert werden. Auch rekombinantes ADAM10 prozessierte FasL *in vitro*, wobei zwei verkürzte N-terminale Spaltfragmente von ungefähr 14 kDa und 12 kDa entstehen (Schulte et al., 2007).

Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Prozessierung von endogenem FasL in primären humanen T-Zellen untersucht. Zunächst wurde der Einfluss der ADAM-Inhibitoren auf die biphasische Kinetik der FasL-Oberflächenexpression analysiert (Abb. 5.3.2). Dabei zeigte sich, dass beide Inhibitoren die Expression des FasL vor allem in der späten Phase signifikant stabilisieren. Insbesondere GI254023X führte zu einer deutlichen Steigerung der FasL-Oberflächenexpression. Weitere Analysen im Rahmen der Kooperation mit Prof. Saftig ergaben, dass dabei die Stabilisierung durch GI254023X mit einer verminderten Menge an freigesetztem sFasL im Überstand und einer Reduktion der N-terminalen Spaltfragmente in den Zellysaten korreliert. Knock-Down von ADAM10 führte ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der Menge an sFasL im Kulturüberstand (Schulte et al., 2007).

Die Stimulation aktivierter T-Zellen über den TZR/CD3-Komplex resultiert in einer gesteigerten Expression des FasL und seines Rezeptors Fas. Bindet FasL daraufhin auf der Oberfläche derselben oder benachbarter Zellen exprimiertes Fas, so induziert dies den Tod der Zelle (Suizid/Fratrizid). Im Rahmen dieses Aktivierungs-induzierten Zelltodes ist FasL maßgeblich an der Beendigung der T-Zellvermittelten Immunantwort und damit an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems beteiligt. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Modulation der FasL-Oberflächenexpression durch ADAM10 auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod *in vitro* kultivierter humaner T-Zellen hat (Abb. 5.3.3/5.3.4). Die Inhibition von ADAM10 durch GI254023X führte bei Stimulation aktivierter CD4⁺ T-Zellen mit bakteriellen Superantigenen in der Tat zu einer Stabilisierung der Oberflächenexpression und zu gesteigertem Zelltod in den behandelten Zellen. GW280264X zeigte teilweise einen stärkeren Einfluss auf die Zellviabilität, während beide Inhibitoren die FasL-Oberflächenexpression gleichermaßen beeinflussten (Abb. 5.3.4). Das FasL-Shedding durch ADAM10 scheint somit auch den Aktivierungs-induzierten Zelltod von primären humanen T-Zellen zu beeinflussen. Die Befunde deuten auch darauf hin, dass im untersuchten System die ADAM17-vermittelte Prozessierung anderer Oberflächenproteine die in aktivierten T-Zellen induzierte Apoptose ebenfalls beeinflussen könnte. Weitere Analysen im Rahmen der Kooperation mit Prof. Saftig ergaben, dass die Inhibition der FasL-Prozessierung

in einer gesteigerten Zytotoxizität gegenüber Fas/FasL-sensitiven Zellen resultiert (Schulte et al., 2007).

Eine Spaltstelle für Metalloproteasen wurde im humanen FasL im Bereich Ser126/Leu127 beschrieben, während er in der Maus zwischen Lys129/Gln130 (Tanaka et al., 1998; Schneider et al., 1998) gespalten werden soll. Die Spaltstellen für ADAM-Proteasen sind in unterschiedlichen Substraten relativ variabel und bisher ließen sich keine Konsensussequenzen definieren. In vielen Fällen beeinflusst die Sekundärstruktur des membranproximalen Anteils des Substrats die ADAM-vermittelte Spaltung (Reiss et al., 2006). Unterschiede in der Spaltstelle könnten deshalb durch Zelltyp-bedingte Unterschiede (z.B. Glykosylierung) zustande kommen oder in strukturellen Unterschieden in der membran nahen Region des humanen und murinen FasL begründet sein.

Die ADAM-vermittelte Spaltung von Substraten kann generell konstitutiv erfolgen oder aber durch verschiedene Stimuli induziert werden. In vielen Fällen ist dabei ADAM17 an der induzierten Prozessierung von Substraten beteiligt. Aber auch ADAM10 kann neben der konstitutiven auch die regulierte Spaltung von Substraten vermitteln (Reiss et al., 2005; Maretzky et al., 2005). In den untersuchten Zellen war jeweils die basale Prozessierung des FasL sehr ausgeprägt und Induktoren des ADAM-vermittelten Sheddings wie Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) führten zu keiner signifikanten Zunahme der Freisetzung von löslichem FasL (Schulte et al., 2007). Dies lässt vermuten, dass der FasL in T-Zellen konstitutiv prozessiert wird und kann als weiterer Hinweis für die stringente Kontrolle der Oberflächenexpression dieses Todesfaktors angesehen werden.

Die bei der Prozessierung entstehende lösliche Form des FasL kann in Abhängigkeit vom lokalen Mikromilieu sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte vermitteln (Chen et al., 1998; Schneider et al., 1998). Die Spaltung erfolgt N-terminal der für die Trimerisierung des FasL verantwortlichen Region, so dass auch der lösliche FasL in der Lage ist, funktionelle Trimere zu bilden. Die Serumspiegel des sFasL scheinen mit dem Verlauf diverser Erkrankungen zu korrelieren, wie z.B. der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion, rheumatoider Arthritis und einer Vielzahl maligner Erkrankungen (Linkermann et al., 2005).

Die Prozessierung des FasL resultiert neben der Freisetzung einer löslichen Form in der Generierung von mindestens zwei N-terminalen Spaltfragmenten (Schulte et al., 2007). Da ADAM-Proteasen keine genau definierte Konsensus-Spaltstelle verwenden, könnten diese Produkte durch die Prozessierung an unterschiedlichen Stellen entstehen, insbesondere da auch die Spaltung von FasL durch rekombinantes ADAM10 *in vitro* diese Spaltfragmente erzeugt (Schulte et al., 2007). Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Proteasen an der Generierung dieser Fragmente beteiligt sind oder dass es sich bei den Spaltprodukten um nur ein Proteinfofragment mit jeweils unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen handelt.

In vielen Fällen kann die Spaltung von Membranproteinen durch ADAM-Proteasen weitere intrazelluläre Prozessierungsschritte initiieren und so in der Zelle das Signalgeschehen beeinflussen (Reiss et al., 2005; Maretzky et al., 2005). Beispielsweise generiert die Spaltung von Notch durch ADAM-Proteasen ein transmembranes Spaltfragment, welches durch den Presenilin/ γ -Secretase-Komplex weiter prozessiert wird. Dabei entsteht ein intrazelluläres Fragment, welches in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von Zielgenen aktiviert (de Strooper et al., 1999).

Es gibt Hinweise, dass die N-terminalen transmembranen Spaltfragmente durch die Aktivität der Protease SPPL2a weiter prozessiert werden, wobei ein kurzes intrazelluläres Spaltfragment erzeugt wird. Initiale Untersuchungen haben ergeben, dass dieses Fragment in den Kern transloziert und dort die Transkription von Zielgenen regulieren kann (PD Dr. Martin Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). In Anbetracht der diskutierten Rolle des FasL als akzessorisches oder kostimulatorisches Molekül, könnte ein derartiger Mechanismus an der reversen Signaltransduktion beteiligt sein. Darüber hinaus stellt die Modulation der Oberflächenexpression durch ADAM10 einen Mechanismus dar, die proapoptotische Wirkung des membranständigen FasL im Rahmen des Aktivierungs-induzierten Zelltodes von T-Zellen zu modulieren. Entsprechend könnte eine Fehlregulation in diesem System zu unzureichender Apoptose im T-Zell-Kompartiment führen und damit zu chronisch-entzündlichen Erkrankungen beitragen.

6.5 Regulation der Oberflächenexpression des Fas-Liganden

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Daten und der publizierten Befunde lässt sich zusammenfassend feststellen, dass FasL in kultivierten T- und NK-Zellen in sekretorischen Lysosomen gespeichert wird (Abb. 6.1). Erst nach Aktivierung der Zelle wird er auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei diese Expression einer biphasischen Kinetik folgt. Im Rahmen der Stimulation der Zelle führt die Ligation des T-Zell-Rezeptors über Tyrosinkinasen der Src- (Fyn, Lck) und Syk-Familie (ZAP70) und Adapterproteine wie LAT und Gads zur Rekrutierung und Phosphorylierung von SLP-76, welches daraufhin Nck zum Ort der Zellaktivierung rekrutiert.

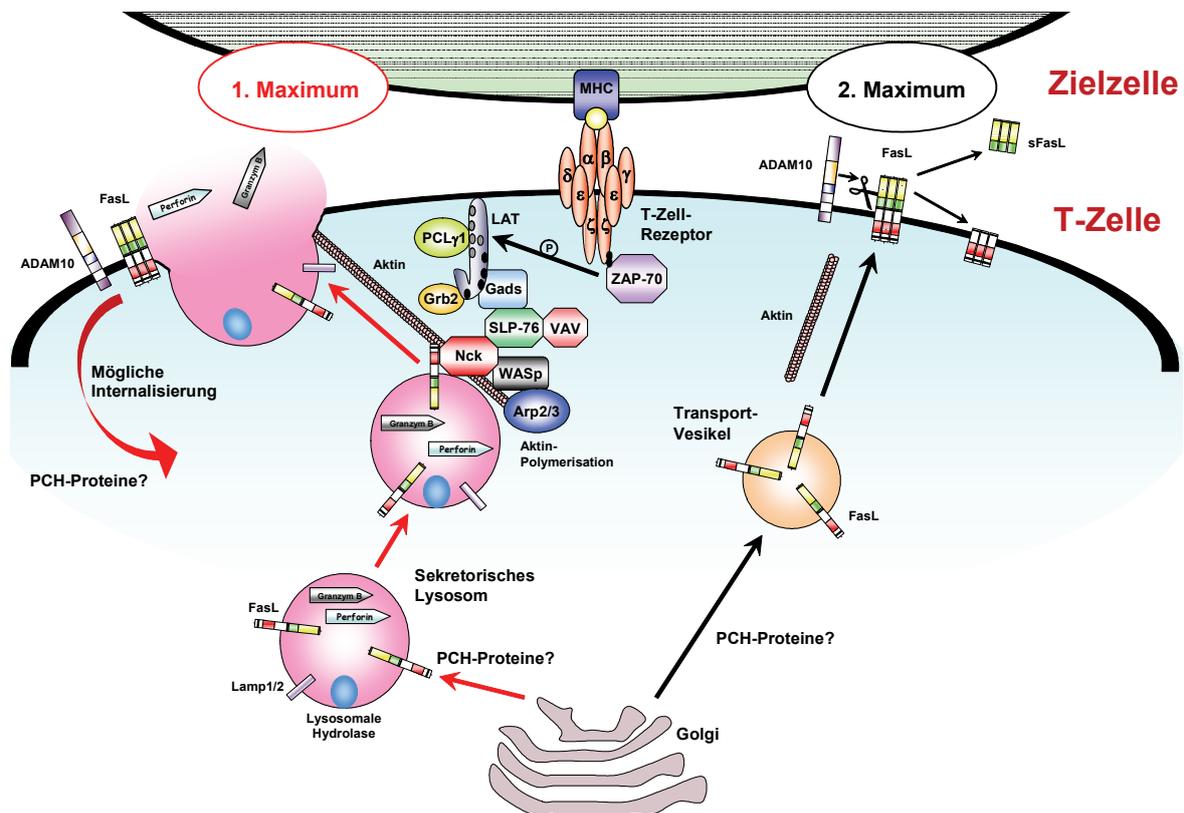


Abb. 6.1: Aktivierungs-induzierte Oberflächenexpression des FasL. Die Aktivierungs-induzierte Oberflächenexpression des FasL folgt einer biphasischen Expressionskinetik. Dabei bedingt die Degranulation sekretorischer Lysosomen die erste Phase. Die zweite Phase der Expression beruht auf *de novo*-Synthese. Dabei stellen die Speicherung in sekretorischen Lysosomen, die Aktivierungs-abhängige Mobilisierung dieser Speicherorganellen und die Prozessierung des FasL durch ADAM10 wichtige regulatorische Mechanismen dieser Oberflächenexpression dar. Das Adapterprotein Nck, ist an der Mobilisierung des FasL zur zytotoxischen immunologischen Synapse beteiligt, während PCH-Proteine an intrazellulären Transportvorgängen partizipieren könnten.

Die erste Phase der FasL-Oberflächenexpression beruht auf der Nck-abhängigen Mobilisierung des FasL und sekretorischer Lysosomen zur immunologischen Synapse, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren und FasL lokal auf der Zelloberfläche exponiert wird.

Die zweite Phase der Expression beruht auf der induzierten Neusynthese des FasL und dem nachfolgenden Transport zur Zelloberfläche. An intrazellulären Transportprozessen könnten Proteine der PCH-Familie beteiligt sein. Auf der Plasmamembran kann der FasL durch ADAM10 prozessiert werden. Die Oberflächenexpression des FasL wird somit auf unterschiedlichen Ebenen reguliert. Die detaillierte Charakterisierung der verschiedenen Regulationsmechanismen und ihrer Wechselbeziehungen sowie der zugrundeliegenden molekularen Maschinerie trägt dazu bei, die generelle Bedeutung des Fas/FasL-Systems für die funktionelle Integrität des Immunsystems besser zu verstehen und Dysregulationen in diesem System im pathophysiologischen Kontext zu beurteilen.

7. Zusammenfassung

Der Fas-Ligand induziert nach Bindung an seinen Rezeptor Zelltod in Fas-exprimierenden Zellen. Als prototypischer Todesfaktor im Rahmen des Aktivierungs-induzierten Zelltodes (AICD) und der Zielzellyse spielt FasL eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunzell-Homöostase und -Effektorfunktion. Das hohe zytotoxische Potenzial des Fas/FasL-Systems setzt eine stringente Regulation der FasL Expression und gleichzeitig eine rasche Mobilisierbarkeit voraus.

Basierend auf eigenen Vorarbeiten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst **die Kinetik der induzierbaren FasL-Expression** in humanen T- und NK-Zellen im Detail analysiert. Über die Verwendung pharmakologischer Inhibitoren wurde nachgewiesen, dass die erste Welle der FasL-Expression auf der raschen, Aktin-abhängigen Degranulation lysosomaler Speicherorganellen (den sekretorischen Lysosomen) beruht, während die zweite Phase eine Protein-Neusynthese voraussetzt.

Die lysosomale Assoziation von FasL in T- und NK-Zellen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen berichtet, ohne jedoch die molekularen Grundlagen der Rekrutierung zum lysosomalen Kompartiment bzw. zur immunologischen Synapse (IS) definiert zu haben. Untersuchungen an Transfektanten hatten ergeben, dass der Prolin-reichen Domäne (PRD) im zytoplasmatischen Anteil des FasL eine entscheidende Rolle im Rahmen der intrazellulären Retention des Moleküls zukommt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren verschiedene FasL-interagierende Proteine benannt worden, die über SH3- oder WW-Domänen mit der FasL-PRD interagieren können.

Mit Fokus auf potenzielle **Regulatoren des Vesikeltransports** wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Interaktionen zwischen FasL und Mitgliedern der **PCH-Familie** (FBP17, PACSIN 1-3, CD2BP1, CIP4) untersucht. Es konnte dokumentiert werden, dass alle untersuchten PCH-Proteine die subzelluläre Lokalisation von FasL in Richtung einer lysosomalen Assoziation nach Kotransfektion beeinflussen. Nach Herstellung **monoklonaler Antikörper** gegen verschiedene PCH-Proteine konnten wir endogenes CD2BP1, CIP4 und FBP17 (nicht PACSIN1) in humanen T-Zellen nachweisen. Diese Analysen bilden die Grundlage für zukünftige Untersuchungen

zur funktionellen Bedeutung der Interaktion von PCH-Proteinen mit FasL in primären T- und NK-Zellen und in Tumorzellen.

Darüber hinaus wurde die Interaktion von FasL mit dem **Adapterprotein Nck** im Detail analysiert, da Nck als zentrales Adapterprotein im Rahmen der T-Zell-Rezeptor-vermittelten **Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts** beschrieben wurde. Wir konnten zeigen, dass FasL in primären T-Zellen bei Kontakt mit Zielzellen im Bereich der immunologischen Synapse mit Nck kolokalisiert. Inhibition der Aktin-Polymerisation oder Störung der FasL/Nck-Interaktion verhindern gleichermaßen den Transport von FasL-assoziierten sekretorischen Lysosomen zur Kontaktzone. Diese Befunde legen nahe, dass Nck auch eine entscheidende Rolle im Rahmen des Aktivierungs-induzierten Transports von FasL zur immunologischen Synapse spielt.

Die proteolytische Spaltung (**Shedding**) von Oberflächenmolekülen durch verschiedene Metalloproteasen bietet eine weitere Möglichkeit zur Modulation der Expression und Funktion. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Saftig wurde **ADAM10 als FasL-Sheddase** identifiziert. Wir konnten zeigen, dass ADAM10 die Aktivierungs-abhängige FasL-Oberflächenexpression moduliert und so den Aktivierungs-induzierten Zelltod von T-Lymphozyten beeinflusst.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden knapp 15 Jahre nach der Entdeckung des FasL wesentliche neue Beiträge zur Biologie des Todesfaktors erbracht. Die Beschreibung der Dynamik der FasL-Expression in zytotoxischen Zellen und die ersten Hinweise auf verschiedene regulative Protein-Netzwerke zur Steuerung der Speicherung und Mobilisierung bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen, beispielsweise zur Generierung von sekretorischen Vesikeln im Rahmen der T-Zell-Differenzierung und -Effektorfunktion einerseits und zur Bedeutung der FasL-Expression im pathophysiologisch relevanten Kontext der Tumorentstehung andererseits.

8. Summary

Upon binding to its default receptor, the Fas Ligand (FasL) induces cell death in Fas-expressing cells. As a prototypic death factor for activation-induced cell death (AICD) and target cell lysis, FasL plays a pivotal role in the regulation of immune cell homeostasis and effector function. The immense cytotoxic potential of the Fas/FasL system implies a stringent control of its expression while at the same time a mechanism for rapid mobilization is required.

Based on preliminary experiments performed during my diploma thesis, I started to analyze **the kinetics of the inducible FasL expression** in human T and NK cells in more detail. Using an array of different pharmacological inhibitors, we demonstrated that the first wave of FasL expression observed after 10 minutes of activation is based on a rapid, actin-dependent degranulation of lysosomal storage vesicles (the so-called secretory lysosomes), while the second phase (maximum at 2 hrs) required protein *de novo* synthesis.

The lysosomal association of FasL in T and NK cells was also reported by other groups. However, the molecular basis for the recruitment of FasL to the lysosomal compartment or the immunological synapse (IS) has not been defined. Several lines of evidence from experiments with transfectants suggested that the proline-rich domain (PRD) within the intracellular portion of FasL plays an essential role in the context of the intracellular retention of the molecule. In addition, our group identified a number of potential FasL interacting proteins that bind to FasL via SH3 or WW domains.

With a special emphasis on **regulators of vesicular transport**, in course of the present thesis, interactions of FasL with members of the **PCH protein family** (FBP17, PACSIN 1-3, CD2BP1, CIP4) were further investigated. All tested PCH proteins influence the subcellular localization of FasL. When co-transfected, FasL surface expression and cytotoxicity is reduced presumably due to an increased lysosomal association as previously reported. The generation of a set of **monoclonal antibodies** against different PCH proteins allowed the detection of endogenous CD2BP1, CIP4 and FBP17 (but not PACSIN1) in human T cells. These analyses

form the basis for planned future experiments to clarify the role of the FasL/PCH protein interaction in primary T and NK cells and in tumor cells.

Since **Nck** was described as a central **adapter protein** during TCR-initiated **reorganisation of the actin cytoskeleton**, we followed our previous finding that FasL might directly interact with Nck. We could demonstrate that in primary T cells, FasL colocalizes with Nck in the area of the immunological synapse when cells are exposed to putative target cells. Inhibition of actin polymerization or disruption of the FasL/Nck-interaction abolish the transport of FasL-loaded secretory lysosomes to the contact area. These observations suggest that Nck also plays a crucial role for the activation-induced transport of FasL to the IS.

Proteolytic cleavage (**shedding**) of surface structures, e.g. by different metalloproteases offers an alternative mechanism to modulate expression and function of the respective receptors. In cooperation with the group of Prof. Saftig at the Biochemical Institute, we identified **ADAM10 as a FasL sheddase**. We could show that ADAM10 modulates the activation-dependent FasL surface expression and thereby influences the AICD in primary T cells.

About 15 years after the discovery of FasL, the present thesis offers several new insights into the rather complex biology of the death factor. The detailed description of the dynamics of FasL expression in cytotoxic cells and the first hints pointing to protein networks that govern lysosomal storage or mobilization of the protein form the basis for further investigations. It will now be possible to follow the fate of secretory vesicles from their generation during T cell differentiation until their use as effector organelles and it will be interesting to look at storage and expression of FasL in pathophysiologically relevant situations including tumor formation.

9. Literaturverzeichnis

1. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., Fais, S. 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J. Exp. Med.* 195:1303-1316.
2. Anggono, V., Smillie, K.J., Graham, M.E., Valova, V.A., Cousin, M.A., Robinson, P.J. 2006. Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Neurosci.* 9:752-760.
3. Appay, V. 2004. The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clin. Exp. Immunol.* 138:10-13.
4. Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., Cooper, D.A., Rowland-Jones, S.L., Kelleher, A.D. 2002. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J. Immunol.* 168:5954-5958.
5. Arighi, C.N., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Haft, C.R., Bonifacino, J.S. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* 165:123-133.
6. Aspenstrom, P. 1997. A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 7:479-487.
7. Aspenstrom, P., Fransson, A., Richnau, N. 2006a. Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 31:670-679.
8. Aspenstrom, P., Richnau, N., Johansson, A.S. 2006b. The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Exp. Cell Res.* 312:2180-2194.
9. Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M.K., Rampersad, V., Hardy, L.A., Field, D., Siminovitch, K.A. 2003a. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity.* 18:141-154.
10. Badour, K., Zhang, J., Siminovitch, K.A. 2004. Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation. *Semin. Immunol.* 16:395-407.

11. Badour, K., Zhang, J., Siminovitch, K.A. 2003b. The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation. *Immunol. Rev.* 192:98-112.
12. Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S.C., Barr, V.A., Samelson, L.E. 2005. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat. Immunol.* 6:80-89.
13. Barry, M. und Bleackley, R.C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2:401-409.
14. Baum, W., Kirkin, V., Fernandez, S.B., Pick, R., Lettau, M., Janssen, O., Zornig, M. 2005. Binding of the intracellular Fas ligand (FasL) domain to the adaptor protein PSTPIP results in a cytoplasmic localization of FasL. *J. Biol. Chem.* 280:40012-40024.
15. Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., Duke, R.C. 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-632.
16. Benesch, S., Lommel, S., Steffen, A., Stradal, T.E., Scaplehorn, N., Way, M., Wehland, J., Rottner, K. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J. Biol. Chem.* 277:37771-37776.
17. Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G.A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F.B., Pawson, T. 2003. The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol. Cell Biol.* 23:4586-4597.
18. Blott, E.J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., Griffiths, G.M. 2001. Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* 114:2405-2416.
19. Blott, E.J. und Griffiths, G.M. 2002. Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:122-131.
20. Bossi, G. und Griffiths, G.M. 1999. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat. Med.* 5:90-96.
21. Bossi, G. und Griffiths, G.M. 2005. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin. Immunol.* 17:87-94.
22. Boursalian, T.E. und Fink, P.J. 2003. Mutation in fas ligand impairs maturation of thymocytes bearing moderate affinity T cell receptors. *J. Exp. Med.* 198:349-360.

IX. Literaturverzeichnis

23. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
24. Brunner, T., Kasibhatla, S., Pinkoski, M.J., Fruttschi, C., Yoo, N.J., Echeverri, F., Mahboubi, A., Green, D.R. 2000. Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275:9767-9772.
25. Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., Corazza, N. 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin. Immunol.* 15:167-176.
26. Cahuzac, N., Baum, W., Kirkin, V., Conchonaud, F., Wawrezynieck, L., Marguet, D., Janssen, O., Zornig, M., Hueber, A.O. 2006. Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity. *Blood* 107:2384-2391.
27. Carnahan, R.H. und Gould, K.L. 2003. The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Biol.* 162:851-862.
28. Chen, J.J., Sun, Y., Nabel, G.J. 1998. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 282:1714-1717.
29. Chow, S.C., Peters, I., Orrenius, S. 1995. Reevaluation of the role of de novo protein synthesis in rat thymocyte apoptosis. *Exp. Cell Res.* 216:149-159.
30. Chow, W.A., Fang, J.J., Yee, J.K. 2000. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J. Immunol.* 164:3512-3518.
31. Coue, M., Brenner, S.L., Spector, I., Korn, E.D. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 213:316-318.
32. Cuajungco, M.P., Grimm, C., Oshima, K., D'hoedt, D., Nilius, B., Mensenkamp, A.R., Bindels, R.J., Plomann, M., Heller, S. 2006. PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4. *J. Biol. Chem.* 281:18753-18762.
33. Dalton, J.E., Howell, G., Pearson, J., Scott, P., Carding, S.R. 2004. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J. Immunol.* 173:3660-3667.
34. de Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., Kopan, R. 1999. A presenilin-1-

- dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.
35. Desbarats, J., Duke, R.C., Newell, M.K. 1998. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* 4:1377-1382.
36. 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.
37. Doan, J.E., Windmiller, D.A., Riches, D.W. 2004. Differential regulation of TNF-R1 signaling: lipid raft dependency of p42mapk/erk2 activation, but not NF-kappaB activation. *J. Immunol.* 172:7654-7660.
38. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
39. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H.W., Tzeng, S.J., Pierce, S.K. 2003. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 21:457-481.
40. Dzialo-Hatton, R., Milbrandt, J., Hockett, R.D., Jr., Weaver, C.T. 2001. Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. *J. Immunol.* 166:4534-4542.
41. Eischen, C.M., Schilling, J.D., Lynch, D.H., Krammer, P.H., Leibson, P.J. 1996. Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol.* 156:2693-2699.
42. Ethell, D.W., Kinloch, R., Green, D.R. 2002. Metalloproteinase shedding of Fas ligand regulates beta-amyloid neurotoxicity. *Curr. Biol.* 12:1595-1600.
43. Faris, M., Latinis, K.M., Kempiak, S.J., Koretzky, G.A., Nel, A. 1998. Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol. Cell Biol.* 18:5414-5424.
44. Flanagan, M.D. und Lin, S. 1980. Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* 255:835-838.
45. Fuchs, U., Rehkamp, G., Haas, O.A., Slany, R., Konig, M., Bojesen, S., Bohle, R.M., mm-Welk, C., Ludwig, W.D., Harbott, J., Borkhardt, A. 2001. The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:8756-8761.

46. Galvin, J.P., Spaeny-Dekking, L.H., Wang, B., Seth, P., Hack, C.E., Froelich, C.J. 1999. Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J. Immunol.* 162:5345-5350.
47. Ghadimi, M.P., Sanzenbacher, R., Thiede, B., Wenzel, J., Jing, Q., Plomann, M., Borkhardt, A., Kabelitz, D., Janssen, O. 2002. Identification of interaction partners of the cytosolic polyproline region of CD95 ligand (CD178). *FEBS Lett.* 519:50-58.
48. Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., Alarcon, B. 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109:901-912.
49. Giordano, C., Stassi, G., De, M.R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R., Galluzzo, A. 1997. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275:960-963.
50. Green, D.R., Bissonnette, R.P., Glynn, J.M., Shi, Y. 1992. Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin. Immunol.* 4:379-388.
51. Green, D.R. und Ferguson, T.A. 2001. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:917-924.
52. Green, D.R. und Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
53. Griffin, C.T., Trejo, J., Magnuson, T. 2005. Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:15173-15177.
54. Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189-1192.
55. Griffiths, G.M. und Isaza, S. 1993. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* 120:885-896.
56. Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274:1156-1163.
57. Gullapalli, A., Garrett, T.A., Paing, M.M., Griffin, C.T., Yang, Y., Trejo, J. 2004. A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. *Mol. Biol. Cell* 15:2143-2155.

58. Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J. 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363-1366.
59. Halbach, A., Morgelin, M., Baumgarten, M., Milbrandt, M., Paulsson, M., Plomann, M. 2007. PACSIN 1 forms tetramers via its N-terminal F-BAR domain. *FEBS J.* 274:773-782.
60. Hane, M., Lowin, B., Peitsch, M., Becker, K., Tschopp, J. 1995. Interaction of peptides derived from the Fas ligand with the Fyn-SH3 domain. *FEBS Lett.* 373:265-268.
61. Harashima, S., Horiuchi, T., Hatta, N., Morita, C., Higuchi, M., Sawabe, T., Tsukamoto, H., Tahira, T., Hayashi, K., Fujita, S., Niho, Y. 2001. Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J. Immunol.* 166:130-136.
62. Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
63. Higgs, H.N. 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* 30:342-353.
64. Higuchi, M., Nagasawa, K., Horiuchi, T., Oike, M., Ito, Y., Yasukawa, M., Niho, Y. 1997. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation--characterization of membrane TNF-alpha. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 82:133-140.
65. Hinshaw, J.E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:483-519.
66. Ho, H.Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le, M., Li, J., Gygi, S.P., Kirschner, M.W. 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118:203-216.
67. Hueber, A.O., Bernard, A.M., Herincs, Z., Couzinet, A., He, H.T. 2002. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* 3:190-196.
68. Hunt, J.S., Vassmer, D., Ferguson, T.A., Miller, L. 1997. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J. Immunol.* 158:4122-4128.

69. Iida, T., Ohno, H., Nakaseko, C., Sakuma, M., Takeda-Ezaki, M., Arase, H., Kominami, E., Fujisawa, T., Saito, T. 2000. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J. Immunol.* 165:5062-5068.
70. Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
71. Isaaz, S., Baetz, K., Olsen, K., Podack, E., Griffiths, G.M. 1995. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur. J. Immunol.* 25:1071-1079.
72. Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., De, C.P. 2005. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell* 9:791-804.
73. Janssen, O., Qian, J., Linkermann, A., Kabelitz, D. 2003. CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death. Differ.* 10:1215-1225.
74. Janssen, O., Sanzenbacher, R., Kabelitz, D. 2000a. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res.* 301:85-99.
75. Janssen, O., Stocker, A., Sanzenbacher, R., Oberg, H.H., Siddiqi, M.A., Kabelitz, D. 2000b. Differential regulation of activation-induced cell death in individual human T cell clones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121:183-193.
76. Jordens, I., Westbroek, W., Marsman, M., Rocha, N., Mommaas, M., Huizing, M., Lambert, J., Naeyaert, J.M., Neefjes, J. 2006. Rab7 and Rab27a control two motor protein activities involved in melanosomal transport
1. *Pigment Cell Res.* 19:412-423.
77. Kasibhatla, S., Genestier, L., Green, D.R. 1999. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* 274:987-992.
78. Kay, B.K., Williamson, M.P., Sudol, M. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14:231-241.
79. Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., Yagita, H. 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 182:1777-1783.

80. Kessels, M.M., Dong, J., Leibig, W., Westermann, P., Qualmann, B. 2006. Complexes of syndapin II with dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. *J. Cell Sci.* 119:1504-1516.
81. Kessels, M.M. und Qualmann, B. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 117:3077-3086.
82. Kiener, P.A., Davis, P.M., Rankin, B.M., Klebanoff, S.J., Ledbetter, J.A., Starling, G.C., Liles, W.C. 1997. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J. Immunol.* 159:1594-1598.
83. Kim, S.H., Choi, H.J., Lee, K.W., Hong, N.H., Sung, B.H., Choi, K.Y., Kim, S.M., Chang, S., Eom, S.H., Song, W.K. 2006. Interaction of SPIN90 with syndapin is implicated in clathrin-mediated endocytic pathway in fibroblasts. *Genes Cells* 11:1197-1211.
84. Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
85. Kishimoto, H., Surh, C.D., Sprent, J. 1998. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 187:1427-1438.
86. Kondo, T., Suda, T., Fukuyama, H., Adachi, M., Nagata, S. 1997. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat. Med.* 3:409-413.
87. Latinis, K.M., Carr, L.L., Peterson, E.J., Norian, L.A., Eliason, S.L., Koretzky, G.A. 1997. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *J. Immunol.* 158:4602-4611.
88. Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., Bron, C. 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF-kappaB activation. *Immunity.* 18:655-664.
89. Letourneur, F. und Klausner, R.D. 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
90. Lettau, M., Qian, J., Linkermann, A., Latreille, M., Larose, L., Kabelitz, D., Janssen, O. 2006. The adaptor protein Nck interacts with Fas ligand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:5911-5916.
91. Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., Janssen, O. 2007. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol. Lett.* 108:10-19.

IX. Literaturverzeichnis

92. Lettau, M., Qian, J., Kabelitz, D., Janssen, O. 2004. Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. *Signal. Transduction*. 4:206-211.
93. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. 1998a. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
94. Li, J., Nishizawa, K., An, W., Hussey, R.E., Lialios, F.E., Salgia, R., Sunder-Plassmann, R., Reinherz, E.L. 1998b. A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J.* 17:7320-7336.
95. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
96. Li, W., Fan, J., Woodley, D.T. 2001. Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 20:6403-6417.
97. Li-Weber, M., Laur, O., Krammer, P.H. 1999. Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 29:3017-3027.
98. Linkermann, A., Qian, J., Lettau, M., Kabelitz, D., Janssen, O. 2005. Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 9:119-134.
99. Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., Broadway, N., Andrews, R.C., Bickett, D.M., Leesnitzer, M.A., Becherer, J.D. 2005. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 8:161-171.
100. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
101. Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de, S.B., Hartmann, D., Saftig, P. 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:9182-9187.
102. Martinez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Gamen, S., Monle n I, Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Alava, M.A., Naval, J. 1999. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J. Immunol.* 163:1274-1281.

IX. Literaturverzeichnis

103. Matsuno, H., Yudoh, K., Watanabe, Y., Nakazawa, F., Aono, H., Kimura, T. 2001. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J. Rheumatol.* 28:22-28.
104. Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16:2794-2804.
105. Medvedev, A.E., Johnsen, A.C., Haux, J., Steinkjer, B., Egeberg, K., Lynch, D.H., Sundan, A., Espevik, T. 1997. Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* 9:394-404.
106. Merrifield, C.J., Perrais, D., Zenisek, D. 2005. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* 121:593-606.
107. Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C. 1991. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 266:3239-3245.
108. Mitsiades, N., Yu, W.H., Poulaki, V., Tsokos, M., Stamenkovic, I. 2001. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* 61:577-581.
109. Mittelstadt, P.R. und Ashwell, J.D. 1999. Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. *J. Biol. Chem.* 274:3222-3227.
110. Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M., Plomann, M. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J. Cell Sci.* 113 Pt 24:4511-4521.
111. Muppidi, J.R. und Siegel, R.M. 2004. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat. Immunol.* 5:182-189.
112. Nachbur, U., Kassahn, D., Yousefi, S., Legler, D.F., Brunner, T. 2006. Posttranscriptional regulation of Fas (CD95) ligand killing activity by lipid rafts. *Blood* 107:2790-2796.
113. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.
114. Nagata, S. und Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456.
115. Nagata, S. und Suda, T. 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* 16:39-43.

116. Niederkorn, J.Y. 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat. Immunol.* 7:354-359.
117. Nikiforow, S., Bottomly, K., Miller, G., Munz, C. 2003. Cytolytic CD4(+)-T-cell clones reactive to EBNA1 inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation. *J. Virol.* 77:12088-12104.
118. O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Shanahan, F. 1996. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J. Exp. Med.* 184:1075-1082.
119. Oberg, H.H., Lengl-Janssen, B., Kabelitz, D., Janssen, O. 1997a. Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. *Cell Immunol.* 181:93-100.
120. Oberg, H.H., Sanzenbacher, R., Lengl-Janssen, B., Dobmeyer, T., Flindt, S., Janssen, O., Kabelitz, D. 1997b. Ligation of cell surface CD4 inhibits activation-induced death of human T lymphocytes at the level of Fas ligand expression. *J. Immunol.* 159:5742-5749.
121. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., Nagata, S. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364:806-809.
122. Orlow, S.J. 1995. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J. Invest Dermatol.* 105:3-7.
123. Paludan, C., Bickham, K., Nikiforow, S., Tsang, M.L., Goodman, K., Hanekom, W.A., Fonteneau, J.F., Stevanovic, S., Munz, C. 2002. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol.* 169:1593-1603.
124. Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R., McMahon, H.T. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303:495-499.
125. Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F., Kramer, P.H. 1999. The death receptors. *Results Probl. Cell Differ.* 23:25-63.
126. Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 173:1099-1109.
127. Pfistershammer, K., Majdic, O., Stockl, J., Zlabinger, G., Kirchberger, S., Steinberger, P., Knapp, W. 2004. CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J. Immunol.* 173:6000-6008.

128. Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M., Matrisian, L.M. 1999. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.* 9:1441-1447.
129. Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D., Lim, W.A. 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290:801-806.
130. Qian, J., Chen, W., Lettau, M., Podda, G., Zornig, M., Kabelitz, D., Janssen, O. 2006. Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL. *Cell Signal.* 18:1327-1337.
131. Qualmann, B. und Kelly, R.B. 2000. Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J. Cell Biol.* 148:1047-1062.
132. Raja, S.M., Metkar, S.S., Honing, S., Wang, B., Russin, W.A., Pipalia, N.H., Mena, C., Belting, M., Cao, X., Dressel, R., Froelich, C.J. 2005. A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. *J. Biol. Chem.* 280:20752-20761.
133. Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Picha, K.S., Kennedy, M.K., Lynch, D.H. 1994a. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int. Immunol.* 6:1545-1553.
134. Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Tough, T.W., Alderson, M.R., Lynch, D.H. 1994b. gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur. J. Immunol.* 24:928-933.
135. Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Hadano, S., Houtzager, V.M., Seiden, I., Keen, S.L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B.F., Peterson, E.P., Thornberry, N.A., Huang, J., MacPherson, D.P., Black, S.C., Hornung, F., Lenardo, M.J., Hayden, M.R., Roy, S., Nicholson, D.W. 1998. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death. Differ.* 5:271-288.
136. Refaeli, Y., Van, P.L., London, C.A., Tschopp, J., Abbas, A.K. 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity.* 8:615-623.
137. Reiss, K., Ludwig, A., Saftig, P. 2006. Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol. Ther.* 111:985-1006.
138. Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de, S.B., Hartmann, D., Saftig, P. 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24:742-752.

139. Rengarajan, J., Mittelstadt, P.R., Mages, H.W., Gerth, A.J., Kroczeck, R.A., Ashwell, J.D., Glimcher, L.H. 2000. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity*. 12:293-300.
140. Rieux-Laucat, F., Le, D.F., Fischer, A. 2003. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death. Differ.* 10:124-133.
141. Roach, W. und Plomann, M. 2007. PACSIN3 overexpression increases adipocyte glucose transport through GLUT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355:745-750.
142. Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., Mayer, B.J. 2001. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J. Biol. Chem.* 276:26448-26452.
143. Rouvier, E., Luciani, M.F., Golstein, P. 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177:195-200.
144. Russell, J.H. und Ley, T.J. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20:323-370.
145. Salvesen, G.S. und Ratus, M. 2002. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev. Cell* 2:256-257.
146. Sanzenbacher, R., Kabelitz, D., Janssen, O. 1999. SLP-76 binding to p56lck: a role for SLP-76 in CD4-induced desensitization of the TCR/CD3 signaling complex. *J. Immunol.* 163:3143-3152.
147. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
148. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:1541-1548.
149. Schafer, D.A. 2004. Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic.* 5:463-469.
150. Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., Tschopp, J. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 187:1205-1213.

151. Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Maretzky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., de, S.B., Janssen, O., Saftig, P. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death. Differ.* 14:1040-1049.
152. Shi, Y.F., Szalay, M.G., Paskar, L., Sahai, B.M., Boyer, M., Singh, B., Green, D.R. 1990. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J. Immunol.* 144:3326-3333.
153. Simons, K. und Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
154. Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V., Lasky, L.A. 1997. PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J. Cell Biol.* 138:845-860.
155. Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., Griffiths, G.M. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity.* 15:751-761.
156. Stradal, T.E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., Scita, G. 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14:303-311.
157. Su, Z., Peluso, M.V., Raffegerst, S.H., Schendel, D.J., Roskrow, M.A. 2001. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. *Eur. J. Immunol.* 31:947-958.
158. Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., Nagata, S. 1995. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol.* 154:3806-3813.
159. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-1178.
160. Sun, M., Ames, K.T., Suzuki, I., Fink, P.J. 2006. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J. Immunol.* 177:1481-1491.
161. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
162. Suzuki, I. und Fink, P.J. 1998. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J. Exp. Med.* 187:123-128.

IX. Literaturverzeichnis

163. Suzuki, I., Martin, S., Boursalian, T.E., Beers, C., Fink, P.J. 2000. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J. Immunol.* 165:5537-5543.
164. Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C.I., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Suda, T., Nagata, S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969-976.
165. Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., Nagata, S. 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* 4:31-36.
166. Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P.H., Peter, M.E., Tschopp, J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-521.
167. Tian, L., Nelson, D.L., Stewart, D.M. 2000. Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules. *J. Biol. Chem.* 275:7854-7861.
168. Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., Hopkins, C.R. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:129-161.
169. Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., Takenawa, T. 2006. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J. Cell Biol.* 172:269-279.
170. van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P., Davis, S.J. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* 185:393-403.
171. Varadhachary, A.S., Edidin, M., Hanlon, A.M., Peter, M.E., Krammer, P.H., Salgame, P. 2001. Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95. *J. Immunol.* 166:6564-6569.
172. Varadhachary, A.S., Perdow, S.N., Hu, C., Ramanarayanan, M., Salgame, P. 1997. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:5778-5783.
173. Varadhachary, A.S., Peter, M.E., Perdow, S.N., Krammer, P.H., Salgame, P. 1999. Selective up-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activity in Th2 cells inhibits caspase-8 cleavage at the death-inducing complex: a mechanism for Th2 resistance from Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 163:4772-4779.

174. Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
175. Viey, E., Fromont, G., Escudier, B., Morel, Y., Da, R.S., Chouaib, S., Caignard, A. 2005. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J. Immunol.* 174:1338-1347.
176. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Nagata, S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
177. Watts, A.D., Hunt, N.H., Wanigasekara, Y., Bloomfield, G., Wallach, D., Roufogalis, B.D., Chaudhri, G. 1999. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J.* 18:2119-2126.
178. Wei, Q., Wu, X., Hammer, J.A., III. 1997. The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution and not cell shape, supporting a role for myosin V in melanosome transport. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18:517-527.
179. Wenzel, J., Sanzenbacher, R., Ghadimi, M., Lewitzky, M., Zhou, Q., Kaplan, D.R., Kabelitz, D., Feller, S.M., Janssen, O. 2001. Multiple interactions of the cytosolic polyproline region of the CD95 ligand: hints for the reverse signal transduction capacity of a death factor. *FEBS Lett.* 509:255-262.
180. Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., Wu, J.Y., Xiong, W.C., Rao, Y. 2001. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107:209-221.
181. Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P.H., Mountz, J.D. 1996. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest* 98:1107-1113.
182. Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., Hammer, J.A., III. 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J. Cell Biol.* 143:1899-1918.
183. Yang, H. und Reinherz, E.L. 2006. CD2BP1 modulates CD2-dependent T cell activation via linkage to protein tyrosine phosphatase (PTP)-PEST. *J. Immunol.* 176:5898-5907.
184. Zeng, R., Cannon, J.L., Abraham, R.T., Way, M., Billadeau, D.D., Bubeck-Wardenberg, J., Burkhardt, J.K. 2003. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein

- recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J. Immunol.* 171:1360-1368.
185. Zhai, D., Huang, X., Han, X., Yang, F. 2000. Characterization of tBid-induced cytochrome c release from mitochondria and liposomes. *FEBS Lett.* 472:293-296.
186. Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R.W., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J.C., Green, D., Swain, S.L. 1997. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 185:1837-1849.

10. Anhang: Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz möchte ich danken, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, die vorliegende Doktorarbeit im Institut für Immunologie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Ottmar Janssen danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rose-John recht herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bosch für die Übernahme des Koreferats. Prof. Dr. Saftig, Prof. Dr. Reiss und Marc Schulte danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zur Prozessierung des FasL.

Dr. Jing Qian danke ich für die Hilfe bei allen sich ergebenden praktischen und theoretischen Fragen.

Ganz besonders danke ich Alyn Beyer für die gute Einarbeitung, die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen technischen Fragen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin danke ich natürlich allen weiteren Mitgliedern der AG Janssen, also Ties Latendorf, Hendrik Schmidt, Maren Paulsen, Ulrike Naumann und Melanie Nebendahl.

Maren Paulsen, Susann Beetz und Tim Meyer danke ich für das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, einschließlich jener hier nicht Genannten, möchte ich für jedwede Unterstützung und die Vermittlung eines angenehmen Arbeitsklimas danken.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung danken.

Und ein ganz besonderer Dank gebührt natürlich Püppi.

10. Anhang: Curriculum vitae

Name: Marcus Lettau
Anschrift: Fürstthof 7
24534 Neumünster
Geburtsdatum: 21.10.1979
Geburtsort: Neumünster
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch

Ausbildung

1991-1999	Holstenschule Neumünster
6/1999	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1999	Beginn des Studiums der Biochemie/Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2003	Diplomhauptprüfung Hauptfach: Biochemie/Molekularbiologie Nebenfächer: Pharmazeutische Chemie, Mikrobiologie und Immunologie
12/2003-5/2004	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Ottmar Janssen im Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Expression und Sekretion des Fas-Liganden in T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen)
5/2004	Abschluss: Diplom-Biochemiker
7/2004	Beginn der Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Ottmar Janssen im Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Publikationsliste

Originalarbeiten

Lettau M, Beyer A, Janssen O. 2007. Novel monoclonal antibodies for the investigation of PCH family proteins. *Signal Transduction*, im Druck

Schulte M*, Reiss K*, **Lettau M***, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, de Strooper B, Janssen O*, Saftig P. 2007*. ADAM10 regulates FasL cell surface expression und modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ.* 14:1040-9 (* gleiche Beteiligung der Autoren)

Lettau M, Qian J, Linkermann A, Latreille M, Larose L, Kabelitz D, Janssen O. 2006. The adapter protein Nck interacts with Fas ligand: Guiding the death factor to the cytotoxic immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:5911-6

Qian J, Chen W, **Lettau M**, Podda G, Zörnig M, Kabelitz D, Janssen O. 2006. Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL. *Cell Signal.* 18:1327-37

Baum W, Kirkin V, Fernandez SB, Pick R, **Lettau M**, Janssen O, Zörnig M. 2005. Binding of the intracellular Fas ligand (FasL) domain to the adaptor protein PSTPIP results in a cytoplasmic localization of FasL. *J. Biol. Chem.* 280:40012-24

Qian J, **Lettau M**, Podda G, Janssen O. 2005. FasL associated factors and their potential role in the regulation of FasL expression. *Signal Transduction.* 5:195-201

Lettau M, Qian J, Kabelitz D, Janssen O. 2004. Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. *Signal Transduction.* 4:206-11

Übersichtsartikel

Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. 2007. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. 2007. *Immunol. Lett.* 108:10-9

Linkermann A, Qian J, **Lettau M**, Kabelitz D, Janssen O. 2005. Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 9:119-34

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Lettau M, Beyer A, Janssen O. 2006. Protein-protein interactions regulating storage, mobilization, transport and shedding of FasL. *Signal Transduction.* 6:72

Lettau M, Qian J, Janssen O. 2005. A potential role of Nck in guiding FasL to the immunological synapse. *Immunobiology.* 210:560

Qian J, **Lettau M**, Janssen O. 2005. Guiding FasL to secretory lysosomes: A protein family involved in the intracellular distribution of FasL. *Immunobiology.* 210:561

Mathew B, Qian J, **Lettau M**, Beyer A, Podda G, Janssen O. 2005. T cell activation controlled by the Fas/FasL system. *Immunobiology.* 210:562

Qian J, **Lettau M**, Podda G, Beyer A, Janssen O. 2005. FCH/SH3 proteins interact with FasL and change the subcellular distribution of the death factor in transfectants. *Signal Transduction.* 5:29

Lettau M, Qian J, Janssen O. 2005. Potential role of the adapter protein Nck in the transport of FasL and its storage granules to the immunological synapse. *Signal Transduction.* 5:48

Mathew B, Qian J, **Lettau M**, Beyer A, Podda G, Janssen O. 2005. How does the Fas/FasL system influence T cell activation?. *Signal Transduction.* 5:49

Qian J, **Lettau M**, Chen W, Kabelitz D, Janssen O. 2004. Guiding FasL to the lysosomal compartment. *Signal Transduction*. 4:148

Lettau M, Janssen O. 2004. FasL expression in activated T cells and NK cells. *Signal Transduction*. 4:146

Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. 2004. Activation-dependent biphasic expression of FasL. *Immunobiology*. 209:424

Qian J, Chen W, **Lettau M**, Kabelitz D, Janssen O. 2004. A protein family involved in the intracellular distribution of FasL. *Immunobiology*. 209:424

Weitere Vorträge

Lettau M, Janssen O. 2005. FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. 1st *Spring School on Immunology*

Lettau M, Janssen O. 2006. Storage, mobilization, transport and shedding of FasL: How to unravel the complex biology of a potentially dangerous death factor. 2nd *Spring School on Immunology*

Lettau M, Janssen O. 2005. FasL-interactors regulate storage and transport of the death factor. *Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen*

10. Anhang: Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Ottmar Janssen selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis. Teile dieser Dissertation wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, den.....

.....

Marcus Lettau

Referent/in:.....

Koreferent/in:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan