

# **Die Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Aktivierung primärer humaner T-Lymphozyten**



## **DISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Maren Paulsen**

Kiel

2009

Referent: Professor Dr. Stefan Rose-John

Korreferent: Professor Dr. Dr. Thomas Bosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 2010

Zum Druck genehmigt: 29. Januar 2010

gez. Professor Dr. Lutz Kipp, Dekan

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Immunsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1	T-Lymphozyten	2
1.1.2	Aktivierung von T-Lymphozyten	4
1.1.3	Weitere kostimulatorische Rezeptoren der T-Zellaktivierung	7
1.1.4	Beendigung der Immunantwort	8
1.1.5	Der Zellzyklus	9
<b>1.2</b>	<b>Das CD95/CD95L-System</b>	<b>10</b>
1.2.1	Apoptose	10
1.2.2	Der molekulare Mechanismus der CD95-induzierten Apoptose	11
1.2.3	AICD und ACAD	13
1.2.4	Etablierung immun-privilegierter Gewebe und Tumor-, „ <i>Counterattack</i> “	14
1.2.5	Erkrankungen durch Mutationen im CD95/CD95L-System	14
1.2.6	Pathophysiologische Bedeutung des CD95/CD95L-Systems	16
<b>1.3</b>	<b>CD95 als kostimulatorischer Rezeptor</b>	<b>17</b>
1.3.1	Struktur des Todesrezeptors CD95	17
1.3.2	Regulation der Transkription und Expression von CD95	18
1.3.3	CD95-interagierende Proteine	19
1.3.4	Anti-apoptotische Funktion von CD95	19
<b>1.4</b>	<b>CD95L als kostimulatorisches Molekül</b>	<b>21</b>
1.4.1	Struktur des CD95 Liganden	21
1.4.2	Regulation der Transkription und Expression des CD95 Liganden	22
1.4.3	CD95L-interagierende Proteine	24
1.4.4	Retrograde Signaltransduktion durch CD95L	25
<b>2.</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>27</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>30</b>

<b>3.3</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Inhibitoren</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Enzyme</b>	<b>32</b>
<b>3.6</b>	<b>Kits</b>	<b>33</b>
<b>3.7</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>33</b>
3.7.1	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE Analysen	33
3.7.2	Puffer und Lösungen für die Aufreinigung von Fusionsproteinen	35
3.7.3	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	35
3.7.4	Puffer und Lösungen für die Zellbiologie	36
3.7.5	Puffer und Lösungen für tierexperimentelle Arbeiten	37
<b>3.8</b>	<b>Antikörper</b>	<b>37</b>
3.8.1	Antikörper für Analysen im Durchflußzytometer	37
3.8.2	Antikörper für Western Blot Analysen und Immunpräzipitationen	38
3.8.3	Antikörper zur Zellstimulation	38
<b>3.9</b>	<b>Fusionsproteine</b>	<b>39</b>
<b>3.10</b>	<b>Vektoren</b>	<b>39</b>
<b>3.11</b>	<b>Primer für Real-Time PCR</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolation und Kultivierung von Zellen</b>	<b>40</b>
4.1.1	Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	40
4.1.2	Isolation von CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen mittels magnetischer Negativ-Separation	40
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
4.1.4	Kultivierung von Zellen	42
4.1.5	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	43
4.1.6	Stimulation von primären Zellen	43
<b>4.2</b>	<b>Immunpräzipitation und Western Blot Analyse</b>	<b>44</b>
4.2.1	Herstellung von Zelllysaten	44
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
4.2.3	Immunpräzipitation	45
4.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
4.2.5	Western Blot Analysen	47
4.2.6	Detektion transferierter Proteine	48
4.2.7	Entfernen von Immunkomplexen auf Blotmembranen	49

<b>4.3</b>	<b><sup>3</sup>[H] Thymidin-Einbau</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Durchflußzytometrische Untersuchungen</b>	<b>50</b>
4.4.1	Zelltodanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung	50
4.4.2	Detektion von Zelloberflächenmolekülen	50
4.4.3	Nachweis intrazellulärer Proteine	51
4.4.4	Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE-Markierung	51
4.4.5	Zellzyklusanalyse	52
4.4.6	Fluorimetrische Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration	53
<b>4.5</b>	<b>ATP-Detektionsassay</b>	<b>53</b>
<b>4.6</b>	<b>ELISA</b>	<b>54</b>
<b>4.7</b>	<b>Genexpressionsstudien mittels quantitativer Real-Time PCR</b>	<b>55</b>
4.7.1	RNA-Extraktion	55
4.7.2	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	56
4.7.3	Quantitative Real-Time PCR	56
<b>4.8</b>	<b>Generierung von Fusionsproteinen</b>	<b>58</b>
4.8.1	Transformation kompetenter Bakterien	58
4.8.2	Anlegen von Glycerol-Stocks	59
4.8.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA	59
4.8.4	Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration	60
4.8.5	Restriktionsverdau	60
4.8.6	Agarose-Gelelektrophorese	61
4.8.7	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	61
4.8.8	Aufreinigung von Fusionsproteinen	62
<b>4.9</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>63</b>
4.9.1	Herstellung von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen	63
4.9.2	Zucht	64
4.9.3	Genotypisierung	64
4.9.4	Präparation lymphoider Organe	65
4.9.5	Durchflußzytometrische Analyse muriner lymphoider Zellen	66
4.9.6	Stimulation muriner T-Zellen	66
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Retrograde Signaltransduktion des CD95L in primären T-Zellen</b>	<b>67</b>
5.1.1	Zusammensetzung und Reinheit isolierter Zellpopulationen	67
5.1.2	Überprüfung der Funktionalität von CD95Fc und CD95-TNC-Fc	69
5.1.3	Expression von CD95L auf primären humanen T-Zellen	70
5.1.4	CD95L per se hat keinen Effekt auf frisch isolierte T-Zellen	71
5.1.5	CD95Fc inhibiert die Aktivierung primärer T-Zellen	71

5.1.6	Anti-CD95L AK blockieren ebenfalls die T-Zellaktivierung	74
5.1.7	CD95L-Ligation blockiert die Expression von Aktivierungsmarkern	75
5.1.8	Einfluß der CD95L-Kostimulation auf die TZR-Signaltransduktion	76
5.1.9	CD95Fc inhibiert die TZR-Internalisierung	81
5.1.10	CD95L-Kreuzvernetzung führt zur verminderten Produktion von IL-2	82
5.1.11	Inhibition durch CD95L-Ligation bei verstärkter Kreuzvernetzung	84
5.1.12	Inhibition der T-Zellaktivierung durch CD95L in CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	87
5.1.13	Retrograde CD95L-Signaltransduktion in aktivierten PHA-Blasten	88
<b>5.2</b>	<b>Effekte von CD95 auf primäre TZR/CD3/CD28-stimulierte Zellen</b>	<b>90</b>
5.2.1	Überprüfung der biologischen Aktivität von CD95-Agonisten	91
5.2.2	Expression des Todesrezeptors CD95 auf primären T-Zellen	92
5.2.3	CD95-Ligation führt in primären T-Zellen nicht zur Apoptose	93
5.2.4	Modulation der T-Zellaktivierung durch CD95-Koligation	95
5.2.5	Dosisabhängiger Effekt von CD95-Agonisten auf TZR-stimulierte Zellen	101
5.2.6	Zytokinproduktion CD95-kostimulierter Zellen	107
5.2.7	Expression wichtiger Aktivierungsmarker nach CD95-Kostimulation	110
5.2.8	Effekt von CD95 auf die TZR/CD3-vermittelte MAPK-Aktivierung	111
5.2.9	CD95-Ligation beeinflusst PMA/Ionomycin-stimulierte T-Zellen nicht	112
5.2.10	Die Inhibition der PI3-Kinase verhindert die CD95-Signalgebung nicht	113
5.2.11	CD95-Koligation hat einen Effekt auf die TZR-Internalisierung	114
5.2.12	CD95-Stimulation ist mit einer Rezeptorinternalisierung assoziiert	115
5.2.13	Caspase-Aktivierung korreliert mit Zellproliferation	118
5.2.14	NF-κB-Aktivierung und Expression anti-apoptotischer Proteine durch CD95	119
5.2.15	Erhöhte Apoptose-Resistenz in CD95-kostimulierten primären T-Zellen	121
5.2.16	Effekte der CD95-Koligation auf die Regulation des Zellzyklus	121
<b>5.3</b>	<b>Charakterisierung von CD95LΔintra k.o./k.i.-Mäusen</b>	<b>123</b>
5.3.1	Erzeugung homozygoter CD95LΔintra k.o./k.i.-Mäuse	123
5.3.2	Phänotyp der CD95LΔintra k.o./k.i.-Maus	124
5.3.3	Analyse der Zellzusammensetzung in verschiedenen Organen	125
5.3.4	Untersuchung der Splenozytenaktivierung nach TZR-Ligation	126
5.3.5	Überprüfung der CD95L-Signalgebung in CD95LΔintra k.o./k.i.-Mäusen	127
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>129</b>
<b>6.1</b>	<b>CD95L als Modulator der T-Zellaktivierung</b>	<b>129</b>
6.1.1	CD95L inhibiert die T-Zellaktivierung	130
6.1.2	Molekularer Mechanismus des CD95L/TZR-„Cross-talks“	132
<b>6.2</b>	<b>CD95 als anti-apoptotischer Rezeptor auf T-Zellen</b>	<b>135</b>
6.2.1	Naive humane T-Zellen sind resistent gegen CD95-induzierten Zelltod	137
6.2.2	CD95 als Modulator der T-Zellproliferation	138
6.2.3	Einfluß der CD95-Koligation auf TZR-assoziierte Signalwege	141

6.2.4	Die Rolle der Rezeptorinternalisierung für Signaltransduktionsprozesse	143
6.2.5	CD95-Kostimulation induziert eine T <sub>H</sub> 1-Antwort	144
6.2.6	Anti-apoptotische Bedeutung von Caspasen in T-Zellen	145
6.2.7	cFLIP und Bcl-X als Vermittler von Apoptose-Resistenz	147
6.2.8	Potenzielle Rolle von CD95 auf T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort	149
6.2.9	CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Maus: Analyse zur Rolle des CD95/CD95L-Systems	152
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>155</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>157</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>159</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>172</b>
	Danksagung	172
	Curriculum vitae	173
	Eidesstattliche Erklärung	176

## Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid</i>
ACAD	<i>activated cell autonomous death</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADAP	<i>adhesion and degranulation-promoting adapter protein</i>
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AK	Antikörper
ALPS	Autoimmun Lymphoproliferatives Syndrom
AP-1	<i>activator protein-1</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Arp2/3	<i>actin-related protein-2/3</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma associated 2</i>
Bcl-10	<i>B-cell CLL/lymphoma associated 10</i>
Bp	Basenpaar
CAD	<i>caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CaM	Calmodulin
CARMA1	<i>CARD-containing MAGUK protein1</i>
C57BL/6	C57 black 6 Inzuchtmaus
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD2BP1	<i>CD2-binding protein-1</i>
CD95L	CD95 Ligand
CD95L $\Delta$ intra k.o/k.i.	CD95L mit deletierter intrazellulärer Domäne ( <i>knockout/knockin</i> )
CD95L-ST-Fc	CD95L Fc fusioniert an Strep-tag-Peptidsequenz
cdc42	<i>cell division cycle protein 42</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE-inhibitory protein</i>
cFLIP <sub>L</sub>	<i>cFLIP long</i>
cFLIP <sub>R</sub>	<i>cFLIP raji</i>
cFLIP <sub>S</sub>	<i>cFLIP short</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
Ci	Curie
CIP4	<i>cdc42-interacting protein-4</i>
CKI	Casein-Kinase I
CRD	cysteinreiche Domänen
Cre	<i>causes recombination of the bacteriophage P1 genome</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4</i>
Cyte	Cytochrom c
CytD	Cytochalasin D
DAG	Diacylglycerol
DED	<i>death effector domain</i>
DD	<i>death domain</i>
D4-GDI	<i>Rho GDP dissociation inhibitor beta</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid



## Abkürzungsverzeichnis

---

DN	doppelt-negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
dATP	Desoxy-ATP
dNTP	Desoxynucleotid Triphosphat
DZ	Dendritische Zelle
ECL	<i>enhanced chemoluminescence light</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fc	<i>fragment crystallizable region</i> (konstante Region eines AK)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
FWP	FACS-Waschpuffer
Gads	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>
gld	<i>generalized lymphoproliferative disease</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor</i>
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Grb-2	<i>growth factor binding protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GVHD	<i>Graft Versus Host Disease</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
Homo	Homozygot
HPK-1	<i>hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<sup>3</sup> [H] Tdr	<sup>3</sup> H Thymidin
hu	human
Hupo	Humane Polymerase II
ICAD	<i>inhibitor of capase-activated DNase</i>
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
Ig	Immunglobulin
IFN $\gamma$	<i>interferon-<math>\gamma</math></i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IL	Interleukin
IL-2R	IL-2-Rezeptor
IL-12R $\beta$ 2	$\beta$ 2-Kette des IL-12-Rezeptors
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)-Trisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Itk	<i>IL-2-inducible T cell kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz

## Abkürzungsverzeichnis

---

LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
Lat A	Latrunculin A
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
loxP	<i>locus of cross-over (x) in P1</i>
lpr	<i>lymphoproliferation</i>
LZ	Leucin-Zipper
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MALT1	<i>mucosa-associated lymphoid tissue-1</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
M.D.	<i>Medical Doctor</i>
MDC	Monodansylcadaverin
MEK	<i>mitogen-activated ERK-activating kinase</i>
MGW	Molekulargewicht
min	Minuten
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MWP	MACS-Waschpuffer
n	<i>number</i>
neo	Neomycin-Resistenzkassette
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
nm	Nanometer
NK	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet P-40
p10/43/41	Spaltprodukte der Caspase-8 von 10, 43, 41 kDa
p20/19/17	Spaltprodukte der Caspase-3 von 20, 19, 17 kDa
p22	p22-FLIP (22 kDa)
pAK	polyklonaler Antikörper
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBMZ	periphere Blut mononukleäre Zellen
PCH	<i>pombe cdc15 homology</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin-Homologie
PHA	Phytohämagglutinin
Ph.D.	<i>Doctor of Philosophy</i>
PI	Propidiumjodid
PI3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
PRD	prolinreiche Domäne
PTP-PEST	<i>protein tyrosine phosphatase-PEST</i>
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RasGRP	<i>Ras guanyl nucleotide-releasing protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

Rb	Retinoblastom-Protein
rIL-2	rekombinantes IL-2
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SH2/3	<i>Src homology 2/3</i>
SLP-76	<i>SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
SSC	<i>side scatter</i>
Std.	Stunde
ST	Strep-tag
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TAPI	TNF $\alpha$ Protease-Inhibitor
tBid	<i>truncated Bid</i>
Tdr	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T <sub>H</sub>	T-Helfer
THD	TNF-Homologie-Domäne
tk	Thymidinkinase
TNC	Tenascin-C
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFSF6	<i>TNF ligand superfamily member 6</i>
TNFR	<i>TNF receptor</i>
TNFRSF6	<i>TNFR superfamily member 6</i>
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
T <sub>reg</sub>	T regulatorische Zellen
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>units</i>
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WB	Western Blot
WM	Wortmannin
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
WW-Domäne	Proteindomäne benannt nach zwei konservierten Tryptophanen
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
ZAP-70	<i><math>\zeta</math>-chain-associated protein kinase of 70 kDa</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

## **1. Einleitung**

### **1.1. Das Immunsystem**

Das Immunsystem des Menschen ist ein hochkomplexes Abwehrsystem, in dem verschiedene Organe, Zellpopulationen und Zellprodukte zusammenwirken, um Pathogene (Viren, Bakterien oder Parasiten) oder entartete körpereigene Zelle zu erkennen und zu eliminieren. Entsprechend seiner Funktion und seines phylogenetischen Ursprungs wird das Immunsystem in angeborene („innate“) und erworbene („adaptive“) Komponenten eingeteilt.

Zum angeborenen Immunsystem können auch Barrieren gezählt werden, die über eine Ausstattung mit anti-mikrobiellen Peptiden ein Eindringen von Pathogenen verhindern. Dazu zählen beispielsweise Epithelien (Haut und Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts) oder die Tränenflüssigkeit. Zusätzlich sind zelluläre, phagozytotische oder Apoptose-induzierende Systeme (Makrophagen/Monozyten, Granulozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen) im Zusammenspiel mit humoralen Faktoren (Komplementsystem oder sezernierte Signalmoleküle/Zytokine, Defensine) in der Lage, Mikroorganismen zu attackieren und zu beseitigen. Ein wichtiger Mechanismus ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit der Makrophagen, über bestimmte Rezeptoren (z.B. Toll-like-Rezeptoren) potenziell gefährliche Pathogen-assoziierte Muster zu erkennen und eine gezielte Beseitigung der Pathogene zu initiieren.

Aufgrund der effizienten angeborenen Antwort schätzt man, dass nur in 10% der Fälle eine Ausweitung auf das adaptive System notwendig ist. Gelingt es Erregern, die Barrieren des angeborenen Immunsystems zu überwinden, startet eine nunmehr antigenspezifische Eliminierung der Pathogene, ausgelöst durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) des angeborenen Systems und exekutiert durch T- und B-Lymphozyten als zelluläre Komponenten des adaptiven Systems. Verstärkt wird die erworbene Abwehr durch humorale Komponenten, insbesondere die von Plasmazellen sezernierten spezifischen Immunglobuline. Ein Vorteil der erworbenen Immunität ist die Ausbildung von Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine beschleunigte Abwehrreaktion vermitteln können.

### 1.1.1 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten entstehen wie alle hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. Sie verlassen das Knochenmark als Vorläuferzellen und wandern in den Thymus, wo sie im Rahmen der Reifung einer Selektion unterworfen werden. Potenziell autoreaktive Thymozyten und solche, die körpereigene MHC Klasse-I (MHCI)-Moleküle nicht erkennen, werden eliminiert (negative Selektion). Thymozyten mit einer intermediären Affinität zu körpereigenen MHC-Molekülen werden positiv selektioniert. Sie verlassen als  $CD4^+$ - oder  $CD8^+$ -T-Zellen den Thymus und wandern in die sekundären lymphatischen Organe, wie die Lymphknoten oder die Milz. Dort können sie von professionellen APZ (beispielsweise dendritischen Zellen (DZ)) antigenspezifisch aktiviert werden, woraufhin sie klonal expandieren und unter dem Einfluss von Zytokinen zu zytotoxischen Effektor- oder Helferzellen differenzieren. Unstimulierte, naive und aktivierte T-Zellen können anhand ihrer CD45-Expression unterschieden werden. Während naive Zellen die CD45RA-Isoform exprimieren, tragen Antigen-erfahrene T-Zellen die Isoform CD45RO (1).

T-Lymphozyten erkennen ihr spezifisches Antigen über den so genannten T-Zell-Rezeptor (TZR). Abhängig von der Zusammensetzung der Polypeptidketten dieser Heterodimere können  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$ -T-Lymphozyten unterschieden werden, wobei  $\alpha/\beta$ -T-Zellen Antigene auf MHC-Molekülen erkennen, während die ontogenetisch älteren  $\gamma/\delta$ -T-Lymphozyten z.B. auf bakterielle Phosphoantigene reagieren. Allen T-Zellen gemeinsam ist die Assoziation des Antigenrezeptors mit Molekülen des CD3-Komplexes, die der Signalweiterleitung dienen. Entsprechend der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 wurden die  $\alpha/\beta$ -T-Zellen lange Zeit in CD8-Killer- oder CD4-Helferzellen eingeteilt. Inzwischen ist jedoch klar, dass diese strikte Eingruppierung aufgrund einer enormen funktionellen Flexibilität beider Populationen nicht mehr haltbar ist.

#### CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Reife  $CD8^+$ -T-Lymphozyten zeichnen sich durch einen Besatz mit zytotoxischen Effektormolekülen wie Perforinen oder Granzymen aus, die in sekretorischen Granula gespeichert werden. Die Aktivierung erfolgt nach Erkennung des spezifischen Antigens, welches im Falle der  $CD8^+$ -T-Zellen über MHCI-Moleküle präsentiert wird. Durch die gerichtete Freisetzung der Effektormoleküle in die zytotoxische immunologische Synapse

können veränderte körpereigene oder virusinfizierte Zellen gezielt eliminiert werden. Dieser Vorgang wird durch die gleichzeitige Expression des Todesfaktors CD95 Ligand (CD95L) unterstützt, der über die Bindung an den Todesrezeptor CD95 Zelltod durch Apoptose auslöst. Neben diesen direkt zytotoxischen Funktionen beeinflussen  $CD8^+$ -T-Zellen durch die Freisetzung verschiedener Lymphokine sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort.

### CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkennen exogene Antigene, die über MHCII-Moleküle von APZ präsentiert werden. Sie werden hinsichtlich ihrer Funktion bzw. der Freisetzung bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren in verschiedene T-Helfer-Subpopulationen gruppiert. Dabei werden naive CD4<sup>+</sup>-T-Vorläuferzellen als T<sub>H0</sub>-Zellen bezeichnet. In Reaktion auf das lokale Mikromilieu und die darin vorhandenen Mediatoren differenzieren T<sub>H0</sub>-Zellen beispielsweise in T<sub>H1</sub>-, T<sub>H2</sub>-, T<sub>H17</sub>- oder T regulatorische (Treg) Zellen.

Das primär von Makrophagen sezernierte Interleukin-12 (IL-12) hat zur Folge, dass T<sub>H0</sub>-Zellen zu T<sub>H1</sub>-Zellen differenzieren, die ihrerseits pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2, IFN $\gamma$  (*interferon- $\gamma$* ) und TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) produzieren. T<sub>H1</sub>-Zellen sind auf diese Weise in der Lage, T-Zellen mit Wachstumsfaktoren zu versorgen, aber gleichzeitig auch Makrophagen zu unterstützen und so zu einer Verstärkung der Zell-vermittelten Immunantwort beizutragen. Unter Einwirkung der Zytokine IL-4 und IL-2 entwickeln sich T<sub>H2</sub>-Zellen, die ihrerseits B-Zellen über die Produktion der Wachstumsfaktoren IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren lassen. T<sub>H2</sub>-Zellen unterstützen damit wesentlich eine humorale Immunantwort zur Eliminierung extrazellulärer Antigene (2).

Eine weitere Untergruppe der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bilden Treg, die durch die konstitutive Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), sowie einige andere Oberflächenmoleküle (CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4*), GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*)) und den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*) gekennzeichnet sind. Ihre Aufgabe besteht in der Begrenzung einer Immunantwort gegen Fremdatigene sowie der Unterdrückung potenziell autoreaktiver T-Zellen. Dementsprechend sind sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Da sowohl die Produktion löslicher Mediatoren

(IL-10 und TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )) als auch Zellkontakt-vermittelte Mechanismen im Rahmen der regulatorischen Effektorfunktion beschrieben wurden, scheint die suppressive Aktivität heterogen und Kontext-abhängig (3).

### 1.1.2 Aktivierung von T-Lymphozyten

Das erste Signal zur Aktivierung reifer ruhender T-Zellen erfolgt nach Erkennung des spezifischen Antigens über den TZR. Dabei werden unterschiedlich prozessierte antigene Peptide auf MHCII-Molekülen von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und auf MHCI-Molekülen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt. Diese MHC-Restriktion ist entscheidend für den regulierten Ablauf einer Immunantwort auf verschiedenartige Antigene. Für die vollständige Aktivierung benötigen ruhende T-Zellen neben diesem Signal 1 jedoch ein zweites Signal, welches nach Bindung kostimulatorischer Moleküle wie CD28 an entsprechende Liganden (CD80, CD86) auf Seiten der APZ initiiert wird. Durch die Bindung der Liganden werden Konformationsänderungen an den Rezeptoren induziert und es kommt zur Auslösung einer charakteristischen Signalkaskade, die unter anderem auf der Aktivität von Tyrosinkinasen beruht.

#### Signal 1

Die Ligation des TZR führt auf bis heute nicht ganz verstandene Weise zur Auslösung einer Reaktionskaskade, für die verschiedenste Enzyme und Adapterproteine zum Aktivierungskomplex rekrutiert werden. Initiator-Kinasen (in T-Zellen im Wesentlichen die Src-Kinasen p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup>) phosphorylieren charakteristische Erkennungs-Motive (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*; ITAMs) in den intrazellulären Regionen der Rezeptoren selbst oder in einer Reihe von Membran-assoziierten Adapterproteinen, zum Beispiel den CD3-Untereinheiten  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\gamma$  oder den TZR/CD3-assoziierten  $\zeta$ -Ketten. An derart phosphorylierte ITAMs können verschiedene Proteine über spezifische Interaktionsmodule, so genannte SH2 (Src Homologie-2)-Domänen, binden. Die Phosphorylierung der in Tandems angeordneten ITAMs der  $\zeta$ -Ketten durch Src-Kinasen erlaubt die Bindung der beiden SH2-Domänen der Tyrosinkinase ZAP-70 ( *$\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa*), die daraufhin ihrerseits von Lck oder Fyn phosphoryliert und damit aktiviert wird. ZAP-70 wiederum phosphoryliert eine Reihe von Substraten, darunter zentrale Transmembran-Adapterproteine wie LAT (*linker for activation of T cells*) und zytosolische Adapterproteine wie SLP-76 (*SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*) (4).

LAT verfügt über neun putative ITAMs, über die wichtige Enzyme, Adapterproteine und „second messenger“ im Aktivierungskomplex gebunden werden können. Interaktionen mit Phospholipase  $\text{C}\gamma 1$  ( $\text{PLC}\gamma 1$ ), der p85 Untereinheit der Lipidkinase Phosphoinositid 3-Kinase (PI3-Kinase), Gads (*Grb2-related adaptor downstream of Shc*), Grb-2 (*growth factor binding protein 2*) und GEFs (*guanine-nucleotide exchange factor*) untermauern die zentrale Funktion des „linkers for activation of T cells“. Da sich über die anderen Moleküle weitere Interaktionen ergeben, z.B. über Gads zu SLP-76 werden über die Phosphorylierung von LAT auch nachgeschaltete Signalkaskaden angesprochen (4).

SLP-76 seinerseits ist ein klassisches intrazelluläres Adapterprotein mit einer SH2-Domäne, einer prolinreichen Region zur Bindung von SH3-Domänen und einigen Tyrosinresten, die nach Phosphorylierung mit SH2-Domänen interagieren können. SLP-76 interagiert unter anderem mit dem Guanodin-Austauschfaktor Vav1, dem Adapterprotein Nck und mit Tec-Kinasen wie Itk (*IL-2-inducible T cell kinase*). Außerdem binden Gads und  $\text{PLC}\gamma 1$  konstitutiv an die prolinreiche Domäne, während HPK1 (*hematopoietic progenitor kinase 1*) und ADAP (*adhesion and degranulation-promoting adapter protein*) an die C-terminale SH2-Region von SLP-76 assoziieren (4).

Die durch Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) aktivierte Tec-Kinase Itk kann nachfolgend die Phosphorylierung und Aktivierung der dem SLP-76/Vav1/Nck/Itk/LAT-Komplex assoziierten  $\text{PLC}\gamma 1$  vermitteln, sodass  $\text{PLC}\gamma 1$  das Membranlipid Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu den „second messengers“ Inositol (1,4,5)-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert.  $\text{IP}_3$  vermittelt die Ausschüttung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums (ER) und damit die Öffnung von CRAC-Kanälen (*Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels*) in der Plasmamembran. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx bewirkt die Aktivierung von Calcineurin, welches NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) dephosphoryliert und so die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern auslöst (4).

Das bei der Hydrolyse durch  $\text{PLC}\gamma 1$  aus  $\text{PIP}_2$  entstehende DAG aktiviert gleichzeitig die Proteinkinase  $\text{C}\theta$  ( $\text{PKC}\theta$ ), die die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa\text{B}$  (*nuclear factor- $\kappa\text{B}$* ) aus dem  $\text{I}\kappa\text{B}$  (*inhibitor of NF- $\kappa\text{B}$* )-Kinase (IKK)-Komplex kontrolliert und damit dessen Translokation in den Zellkern. Dies geschieht durch Phosphorylierung und nachfolgende Degradation der inhibitorischen Untereinheit  $\text{I}\kappa\text{B}$  des IKK-Komplexes.



Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass die PKC auch die Ausbildung eines CARMA1/Bcl-10/MALT1-Komplexes reguliert und dass dieser Komplex die I $\kappa$ B-Phosphorylierung steuert, indem er die Degradation der regulatorischen IKK $\gamma$ -Untereinheit des IKK-Komplexes auslöst. DAG kann außerdem über die Aktivierung des G-Proteins Ras mittels der GEFs RasGRP (*Ras guanyl nucleotide-releasing protein*) und SOS (*son of sevenless*) auch den Ras/Raf/Mitogen-aktivierenden Proteinkinase (MAPK)-Signalweg aktivieren. Dies führt zur Bereitstellung und Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und dem AP-1 (*activator protein-1*)-Komplex (4).

### Signal 2

Wie erwähnt führt das TZR-Signal 1 nicht zur kompletten Aktivierung der T-Zellen, die sich in Proliferation und Differenzierung äußern würde. Signal 1 alleine, beispielsweise ausgelöst bei Kontakt mit nicht professionellen APZ (B-Zellen), bewirkt vielmehr, dass die Zellen in einen Ruhezustand übergehen, den man als Anergie bezeichnet. Dementsprechend verfügen professionelle APZ über einen Besatz an Molekülen, die in T-Zellen das erforderliche Signal 2 auslösen können. In den späten 80er Jahren wurden zwei Moleküle der B7-Familie (CD80 und CD86) auf APZ beschrieben, die den notwendigen Kostimulus über CD28 auf Seite der T-Zelle vermitteln konnten. Nach Bindung von CD80 und CD86 an CD28 phosphorylieren Tyrosinkinase den intrazellulären Anteil von CD28 und generieren dadurch SH2-Bindungsstellen für die p85 Adapter-Untereinheit der PI3-Kinase. Die enzymatisch aktive Untereinheit (p110) dieser Lipidkinase katalysiert die Umsetzung von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> an der Innenseite der Plasmamembran und erlaubt dadurch die Rekrutierung von weiteren Enzymen wie PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1*), Akt/Proteinkinase B (PKB) oder I $\kappa$ k, in diesem Falle vermittelt über Phosphoinositol-reaktive Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen. Akt phosphoryliert unterschiedliche Substrate und beeinflusst unter anderem die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF- $\kappa$ B und damit die Produktion von Wachstumsfaktoren (IL-2) und anti-apoptischen Proteinen (Bcl-X). Gleichzeitig werden Transkriptionsfaktoren inhibiert, die eine Zellzyklusprogression verhindern würden. Ein weiterer Mechanismus der CD28-vermittelten Kostimulation ist die Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Influx durch Aktivierung der PLC $\gamma$ 1. Offensichtlich besteht die Funktion der kostimulatorischen Rezeptoren nicht in der Induktion alternativer Signalkaskaden, sondern in einer Signalverstärkung und -modulation, sodass der „Anergie-Schwellenwert“ überschritten werden kann (4;5).

### 1.1.3 Weitere kostimulatorische Rezeptoren der T-Zellaktivierung

Die Relevanz von CD28 als kostimulatorisches Molekül wurde in CD28-defizienten Mäusen bestätigt (4). Da jedoch Unterschiede in der Ausbildung von Immunantworten auf verschiedene antigene Konfrontationen festgestellt wurden, lag die Vermutung nahe, dass es weitere Moleküle gibt, die das 2. Signal im Rahmen der T-Zellaktivierung vermitteln können. Inzwischen sind eine Reihe kostimulatorischer Moleküle identifiziert worden, die sich grob in zwei Gruppen unterteilen lassen: Mitglieder der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und Mitglieder der TNFR (*TNF receptor*)-Familie (5).

ICOS (*inducible costimulator*) ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie und moduliert das TZR-Signal (ähnlich wie CD28) über die PI3-Kinase, PLC $\gamma$ 1, und NF-AT (6). Im Gegensatz zu CD28 erscheint ICOS jedoch erst nach einer initialen Aktivierung auf der Oberfläche. ICOS-Ligation steigert die Proliferation, hat aber keinen Einfluss auf die IL-2 Produktion (4). Darüber hinaus spielt ICOS eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Antikörperproduktion durch B-Zellen, bei der Aktivierung von regulatorischen T-Zellen und als kostimulatorischer Rezeptor für die Feinabstimmung von Effektorfunktionen (7;8).

Die Mitglieder der TNFR-Familie können grob in drei Gruppen eingeteilt werden: *Decoy*-Rezeptoren, Rezeptoren mit Todesdomänen und TRAF (*TNFR-associated factors*)-bindende Rezeptoren. Die *Decoy*-Rezeptoren können in der Regel keine intrazellulären Signale vermitteln, Rezeptoren mit Todesdomänen können Zelltod auslösen und TRAF-interagierende Rezeptoren werden mit Überleben, Differenzierung und Aktivierung in Verbindung gebracht (9).

Den TRAF-bindenden Rezeptoren auf T-Zellen (CD27, OX-40, 4-1BB, HVEM) ist gemeinsam, dass weitere Signalmoleküle indirekt über TRAFs rekrutiert werden. Sie führen zu einer Verstärkung der JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*)-, p38 MAPK, PI3-Kinase/Akt- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung, zur vermehrten Produktion von IL-2 und zur Hochregulation von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-X (4;9). Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion über TRAFs ist insbesondere in primären T-Zellen noch unvollständig untersucht.

Interessanterweise gibt es zunehmend Hinweise, dass auch TNFR-Moleküle mit Todesdomänen anti-apoptische Funktionen ausüben können. Es wurde gezeigt, dass beispielsweise TNFR1, abhängig von der Signalstärke oder Expressionsdichte, dem Besatz mit anti-apoptischen Proteine oder der Assoziation mit verschiedenen intrazellulären Adaptermolekülen, einerseits Zelltod und andererseits Aktivierung induzieren kann (10). TNFR1 kann neben dem Apoptose-induzierenden Adaptermolekül TRADD (*TNFR1-associated protein with death domain*) auch TRAFs rekrutieren und dadurch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B- und JNK-vermittelten Signalwegen steuern. Entsprechende Befunde zu CD95 werden in Kapitel 1.3.4 ausführlich vorgestellt.

### 1.1.4 Beendigung der Immunantwort

Nach erfolgreicher Eliminierung eines Pathogens bedarf es einer regulierten Beendigung der Immunantwort. T-Zellen verfügen über eine entsprechende Ausstattung inhibitorisch wirkender Rezeptoren, Adapterproteine oder Enzyme, z.B. Phosphatasen zur Dephosphorylierung der Aktivierungsmotive. Eine Fehlregulation dieser Kontrollsysteme kann zu immunologischen Defekten wie Lymphozyteninfiltrationen und -akkumulation in verschiedenen Organen, Splenomegalie, erhöhter Antikörperproduktion aber auch Autoimmunität führen (4). Zu den am besten untersuchten inhibitorischen Rezeptoren gehören CTLA-4 und PD-1 (*programmed death-1*), die nach erfolgter Primärstimulation und Expansion vermehrt exprimiert werden. CTLA-4 besitzt 75% Sequenzhomologie zu CD28, und interagiert ebenfalls mit CD80 und CD86 auf APZ. CTLA-4 hat jedoch im Vergleich zu CD28 eine 50-2000fach höhere Affinität zu den Liganden und vermittelt kein Signal 2, sondern vielmehr ein negatives Signal, welches zur Inhibition der Zelle führt (5). Die essentielle Rolle von CTLA-4 bei der Beendigung der Immunreaktion wird an CTLA-4-defizienten Mäusen deutlich, die innerhalb der ersten Lebenswochen aufgrund einer polyklonalen Lymphoproliferation mit Lymphozyteninfiltrationen in verschiedenen Organen versterben (4). Auch PD-1 ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie. Der Wirkmechanismus und die Beeinflussung der TZR-Signalgebung durch PD-1 ist derzeit nur unzureichend untersucht (11). PD-1 wird jedoch als wichtiger Regulator der peripheren T-Zelltoleranz angesehen (8) und moduliert, möglicherweise abhängig vom Differenzierungsstatus, verschiedene Stufen der TZR-Signalkaskade (11).

### 1.1.5 Der Zellzyklus

Die antigenspezifische Aktivierung ruhender T-Zellen resultiert in der kontrollierten Expression und Modifizierung Zellzyklus-regulierender Proteine, die eine Proliferation und klonale Expansion ermöglichen. Der Zellzyklus unterliegt einem definierten zeitlichen Ablauf und wird in Interphase und Mitose eingeteilt. In der Interphase wird die DNA repliziert, während in der Mitose die Verteilung der replizierten Chromosomen auf die Tochterzellen und die eigentliche Zellteilung stattfindet. Je nach Organismus und Zelltyp dauert der Zellzyklus unterschiedlich lange. Die Zellteilung von Lymphozyten ist in der Regel nach 24-48 Stunden abgeschlossen. Die Interphase wird in drei Phasen unterteilt: die postmitotische oder Präsynthese-Phase (G1), die Replikations- oder Synthese-Phase (S) und die prämitotische oder Postsynthese-Phase (G2). Gesteuert wird der Ablauf unter anderem durch Enzyme aus der Gruppe der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK, *cyclin-dependent kinase*). Sie werden durch Bindung an ihre korrespondierenden Cycline aktiviert. Die CDKs im Cyclin/CDK-Komplex sind aktive Serin/Threonin-Kinasen und phosphorylieren zentrale Zielproteine, die für die Progression des Zellzyklus essentiell sind. Die Proteinmenge der Cycline oszilliert im Zellzyklusverlauf, was zur periodischen Aktivierung der CDKs führt. Auf diese Weise wird der Eintritt in die verschiedenen Phasen geregelt (12).

Die meisten ausdifferenzierten Zellen des Körpers teilen sich nicht ständig und befinden sich in der G1-Phase, die dann als G0 bezeichnet wird. Abhängig von exogenen Einflüssen (Antigenerkennung oder mitogene Stimulation) treten Lymphozyten aus der G0-erneut in die G1-Phase ein, wo das Zellwachstum und die Ergänzung der Zellbestandteile (Organellen, Zytoplasma) stattfinden. Außerdem erfolgt die Expression DNA-modifizierender Enzyme und Proteine als Vorbereitung für die folgende S-Phase, in der die DNA repliziert wird. Als CDK-Substrat wird das Retinoblastom-Protein (Rb) als wichtiger Regulator des G1→S-Phasenübergangs angesehen (13). Rb assoziiert mit dem Transkriptionsfaktor E2F. Nach Phosphorylierung durch CDK4/Cyclin D, CDK6/Cyclin D oder CDK2/Cyclin E gibt das Rb den Transkriptionsfaktor E2F frei, der in den Kern transloziert und für die S-Phase wichtige Zielgene induziert, z.B. DNA-Polymerasen oder -Ligasen oder PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Nach der DNA-Duplikation in der S-Phase folgt die G2-Phase, in der das ER reduziert wird, sich die Zelle durch Flüssigkeitsaufnahme vergrößert und RNA-Moleküle und Zellteilungs-spezifische Proteine synthetisiert werden.

Während des Zellzyklus müssen beim Übergang zur nächsten Phase Kontrollpunkte (*checkpoints*) überwunden werden. Diese werden entsprechend als G1-, M- und G2/M-Kontrollpunkte bezeichnet. Im Rahmen der Kontrolle wird auch die vollständige DNA-Duplikation überprüft und Reparaturen an veränderter oder falsch replizierter DNA durchgeführt. Gelingt eine DNA-Reparatur nicht, wird aktiv ein Selbstzerstörungsprogramm (programmierter Zelltod=Apoptose) induziert (12). Zellen, die erfolgreich die Interphase durchlaufen haben, gelangen in die Mitose, die aus der Pro-, Meta-, Ana- und Telophase besteht. Die Mitose enthält den M-Kontrollpunkt, der kontrolliert, ob die Verteilung der Chromosomen ordnungsgemäß stattgefunden hat. Am Ende der Mitose liegen zwei mit der Ursprungszelle genetisch identische Tochterzellen vor. Interessanterweise können sich Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen asymmetrisch teilen, sodass aus einer Zelle Effektor- und Gedächtniszellen mit derselben Antigenpezifität generiert werden können (14).

## 1.2. Das CD95/CD95L-System

### 1.2.1 Apoptose

Im Rahmen der Beendigung einer Immunantwort wird neben der Inhibition auch der aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD) diskutiert. Zelltod kann nach morphologischen Kriterien auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen, durch Apoptose oder Nekrose. Bei der Nekrose kommt es beispielsweise aufgrund einer akuten Schädigung zum Anschwellen und Platzen der Zellen. Dadurch können Zellinhaltsstoffe unkontrolliert in den interzellulären Raum gelangen und unter Umständen eine lokale Entzündung oder Gewebeschädigung verursachen. Die Apoptose dagegen folgt einem definierten Programm (programmierter Zelltod) und es tritt in der Regel keine Entzündungsreaktion ein. Diese Form des Zelltods wird daher auch als „sauberer Tod“ bezeichnet. Das genetische Programm der Apoptose führt zum Schrumpfen der Zellen, dem Zerfall des Zytoskeletts und zum Verlust des Kontakts zu Nachbarzellen. Das Chromatin kondensiert, der Kern schrumpft und die Kernhülle wird degradiert. Die Plasmamembran und die Organellen bleiben dagegen während der Apoptose weitgehend intakt. Nach der Chromatinverdichtung wird die genomische DNA durch Endonukleasen zwischen den Ribosomen in charakteristische DNA-Fragmente geschnitten (DNA-Leiter). Es kommt zur Ausstülpung der Zelle (Zeiose) und zur Abschnürung (*Blebbing*) membranumschlossener apoptotischer Körperchen mit Organellen und Kernfragmenten, die von Phagozyten erkannt und beseitigt werden (15).

Der programmierte Zelltod spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Gewebedifferenzierung während der Embryonalentwicklung, sondern auch bei der Beseitigung unbrauchbarer Zellen im Rahmen der Reifung des Immunsystems, als Effektormechanismus und im Rahmen der Beendigung einer Immunantwort. Das CD95/CD95L-System stellt dabei eines der wichtigsten Apoptose-vermittelnden Rezeptorsysteme dar. CD95L-induzierte Apoptose steuert im Rahmen des AICD die Beendigung der Immunantwort (16;17). Die Zytotoxizität von T- und NK-Zellen beruht neben anderen Mechanismen (Perforin, Granzym) auf der Aktivierung des CD95/CD95L-Systems in der immunologischen Synapse. Das CD95/CD95L-System ist an der Ausbildung so genannter immun-privilegiertes Gewebe oder Organe beteiligt. Tumorzellen nutzen ähnliche Mechanismen um aktivierte T-Zellen abzuwehren.

### 1.2.2 Der molekulare Mechanismus der CD95-induzierten Apoptose

Todesrezeptoren induzieren Zelltod über den so genannten extrinsischen apoptotischen Signalweg. Apoptose durch das CD95/CD95L-System erfolgt nach Bindung des CD95L an seinen Rezeptor CD95. Die Ligation des trimerisierten CD95L resultiert in der verstärkten Aggregation pre-assoziiertes Rezeptoren. Die Palmitoylierung des Rezeptors CD95 ist erforderlich für die Rekrutierung in *lipid-rafts* und seine nachfolgende Internalisierung (18). Die Konformationsänderung des zytoplasmatischen CD95-Rezeptors ermöglicht die Rekrutierung des Adapterproteins FADD (*Fas-associated protein with death domain*) an die intrazelluläre Todesdomäne (DD, *death domain*) von CD95. Die Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) von FADD vermittelt homotypische Wechselwirkungen mit DEDs anderer intrazellulärer Moleküle wie der Procaspase-8, was zur Ausbildung des so genannten Zelltod-induzierenden Signal-Komplexes (DISC, *death-inducing signaling complex*) führt. Die Oligomerisierung der Procaspase-8 im DISC hat eine autoproteolytische Prozessierung und Aktivierung zur Folge. Die aktive Caspase-8 spaltet und aktiviert Effektorcaspasen, zu denen beispielsweise die Caspase-3 zählt. Diese schneidet eine Reihe von Substraten (z.B. Fodrin, Gelsolin, Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)) und induziert damit den apoptotischen Zelltod (19;20). Die Exekution des apoptotischen Programms kann auf Höhe der Spaltung und Aktivierung der Procaspase-8 am DISC durch das Protein cFLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) reguliert werden (siehe Kapitel 1.3.4).

Neben den extrinsischen Signalen gibt es auch intrinsische apoptotische Signale, die zur Aktivierung von Caspasen führen. Charakteristisch ist die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, z.B. ausgelöst durch oxidativen Stress,  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, Ceramide oder Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax und Bid. Freigesetztes Cytochrom c verbindet sich mit zytoplasmatischem Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und dATP zum „Apoptosom“, was zur Rekrutierung von Caspase-9 und zur Aktivierung der apoptotischen Caspase-Kaskade führt (21). Unterstützt wird das Cytochrom c durch weitere freigesetzte mitochondriale Proteine wie den Apoptose-induzierenden Faktor AIF (*apoptosis-inducing factor*) und Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-(inhibitor of apoptosis protein)-binding protein of low pI*). AIF vermittelt die Kondensation und Degradation nukleärer DNA, während Smac/DIABLO inhibitorische Proteine der Caspasen, so genannte IAPs wie XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) blockiert. Verstärkt wird die Mitochondrien-vermittelte Apoptose durch pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bad, Bim und Bid. Diese verdrängen anti-apoptotische Mitglieder der Familie wie Bcl-X und Bcl-2 aus der Verbindung zu den pro-apoptotischen Proteinen Bax oder Bak. Möglicherweise bilden sich nachfolgend Bax/Bak-Kanäle in der Mitochondrienmembran aus (22). Dies hat zur Folge, dass zytosolische Ionen einströmen, das mitochondriale Membranpotenzial zusammenbricht und Cytochrom c freigesetzt wird. Auf der anderen Seite kann der intrinsische Signalweg durch die verstärkte Expression von Bcl-X und Bcl-2 inhibiert werden.

Unter bestimmten Voraussetzungen bedarf es einer mitochondrialen Amplifikation des extrinsischen Zelltodsignals. Entsprechend der Mitochondrienbeteiligung wird in Typ-1- und Typ-2-Zellen unterschieden. In Typ-1-Zellen führt die CD95-vermittelte Apoptoseinduktion zur Bildung großer Mengen aktiver Caspase-8 am DISC, sodass effektiv und schnell Apoptose induziert werden kann. Da die Mitochondrien nicht beteiligt sind, sind anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie hier nicht wirksam (19). Typ-2-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie sehr viel weniger Caspase-8 am DISC aktivieren können. Um dennoch ausreichend Caspase-Aktivität für die Induktion der Apoptose bereitstellen zu können, erfolgt eine Verstärkung durch die Beteiligung von Mitochondrien. Die Verbindung zwischen dem mitochondrialen und dem Rezeptor-vermittelten Signalweg der Typ-2-Zellen wird durch die Caspase-8-abhängige Spaltung von Bid zu tBid (*truncated Bid*) reguliert. tBid aktiviert die pro-apoptotischen Proteine Bax oder Bak, die wie beschrieben die Mitochondrienmembran durch Porenbildung permeabilisieren und so Zelltod induzieren (19).

### 1.2.3 AICD und ACAD

Nach antigenspezifischer Aktivierung differenzieren naive T-Zellen zu Effektorzellen. Nach klonaler Expansion und erfolgreicher Pathogenbeseitigung kann die Termination der adaptiven Immunantwort auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen können aktivierte Lymphozyten nach erneuter Stimulation durch den aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) zugrunde gehen. Alternativ können sie bei fehlender Restimulation einem autonomen Zelltod (ACAD, *activated cell autonomous death*) erliegen (23).

Naive unstimulierte T-Zellen sind weitgehend resistent gegen CD95/CD95L-vermittelten Zelltod (24). Ein wichtiger AICD-Induktor ist CD95L, der nach Restimulation der reaktiven T-Lymphozyten vermehrt auf der Oberfläche erscheint und die AICD-Sensitivität erhöht. Kürzlich wurde gezeigt, dass ausschließlich membranständiger, aber nicht löslicher CD95L für die Zytotoxizität verantwortlich ist (25). Einige wenige Zellen bleiben dauerhaft resistent gegen AICD und bilden vermutlich den Pool von Gedächtniszellen. Die Relevanz des AICD wurde insbesondere durch verschiedene Untersuchungen an natürlich vorkommenden *lpr* (*lymphoproliferation*)- oder *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*)-Mäusen untermauert, die einen mutierten, nicht bindungsfähigen CD95L (*gld*) bzw. geringere Mengen CD95 (*lpr*) exprimieren. Beide Defekte resultieren in einer Akkumulation von unreifen Lymphozyten und sind mit Splenomegalie, Autoimmunität und der vermehrten Produktion von Autoantikörpern assoziiert (26-28). Die zunehmende AICD-Sensitivität im Laufe der primären T-Zellaktivierung korreliert mit der Abnahme anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie und cFLIP. Demnach spielt auch die intrinsische Zelltodinduktion über die Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Termination der Immunantwort. Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS, *reactive oxygen species*) entstehen nach TZR-Restimulation, supprimieren das anti-apoptotische Protein Bcl-2 und vermitteln apoptotische Aktivität. HPK1 reguliert die Induktion NF- $\kappa$ B-abhängiger, anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-Familie und damit die AICD-Sensitivität (29).

ACAD wurde als zusätzlicher Mechanismus der T-Zell-Depletion im Thymus und in der Peripherie beschrieben (23). Charakteristisch für ACAD ist das fehlende Signal der TZR-Restimulation. Er wird auch als passiver Zelltod, Tod durch Zytokinmangel oder Tod durch Vernachlässigung bezeichnet. ACAD wird über pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder vermittelt, welche über den mitochondrialen Signalweg Zelltod auslösen (29).



Neuere Studien belegen, dass CD95 und das pro-apoptotische Protein Bim bei der peripheren Deletion Antigen-stimulierter T-Zellen synergistisch arbeiten. Es wird postuliert, dass sie in Kombination effektiv vor Autoimmunerkrankungen schützen können (30). Somit scheint nach erfolgreicher Eliminierung eines Pathogens die Beseitigung aktivierter T-Zellen auf einer Kooperation der extrinsischen und intrinsischen Zelltodinduktion zu beruhen.

### **1.2.4 Etablierung immun-privilegierter Gewebe und Tumor-„Counterattack“**

Der CD95L spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Etablierung so genannter immun-privilegierter Gewebe und Organe. Dazu rechnet man beispielsweise das Gehirn, das Auge, die Testes und den Uterus (Fetus). Diese Organe sind dadurch gekennzeichnet, dass allogene Gewebetransplantate keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Der Mechanismus ist nicht genau bekannt, beruht aber vermutlich zum einen auf physikalischen Barrieren und zum anderen auf immunologisch wirksamen löslichen und membrangebundenen Faktoren. Die konstitutive Expression des CD95L auf der Oberfläche der Zellen immun-privilegierter Organe verhindert die Infiltration von T-Lymphozyten, indem einwandernde T-Zellen über CD95/CD95L-vermittelte Apoptose eliminiert werden (31). Die konstitutive Expression von CD95L auf Tumorzellen oder die Sekretion von Exosomen-assoziiertem CD95L verschafft bestimmten Tumoren ein eigenes immun-privilegiertes Mikromilieu, in dem sie vor Tumorinfiltrierenden T-Zellen geschützt sind. Die biologische Signifikanz dieses Tumor-„Counterattack“ Models ist jedoch umstritten (32).

### **1.2.5 Erkrankungen durch Mutationen im CD95/CD95L-System**

Im Hinblick auf die vielfältigen und essentiellen Aufgaben des CD95/CD95L-Systems bei der Immunzellhomöostase äußern sich Defekte des Rezeptors CD95 oder seines Liganden in schweren systemischen Störungen. Im Menschen resultieren Mutationen im CD95/CD95L-System in verschiedenen Formen des Autoimmunen Lymphoproliferativen Syndroms (ALPS), die erstmals 1967 von Canale und Smith beschrieben wurden. Es handelt sich um benigne lymphoproliferative Erkrankungen, die durch Splenomegalie, Lymphadenopathie, gestörte Lymphozytenapoptose, Hypergammaglobulinämie und die Akkumulation von unreifen  $TZR\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$ -doppelt-negativen (DN) Lymphozyten gekennzeichnet sind. Die molekulare Basis der Erkrankungen wurde 1995 identifiziert. Inzwischen werden die Syndrome entsprechend der ursächlichen Mutationen und nach Sensitivität der Lymphozyten

gegenüber CD95/CD95L-induzierter Apoptose in verschiedene Untergruppen eingeteilt (28;33). Die Untergruppen ALPS-0 und -Ia bezeichnen Formen, die durch hetero- bzw. homozygote Mutationen im CD95-Gen entstehen. Mutationen im CD95L-Gen sind äußerst selten und werden als ALPS-Ib klassifiziert. Somatische Mutationen im CD95-Gen führen zum ALPS Typ Im (mosaic) (34), während Mutationen in Genen der Caspase-8 und -10 den ALPS Typ-IIa bzw. -IIb herbeiführen (35-37). Unbekannte genetische Defekte, die einen ALPS-Phänotyp zur Folge haben, werden im ALPS Typ-III zusammengefasst und Mutationen in der GTPase NRAS rufen den ALPS Typ-IV hervor (38).

In der Maus führen Mutationen des CD95L-Gens wie bereits angesprochen zu ähnlichen Phänotypen. Die natürlich vorkommende Maus-Mutante *gld* weist eine Punktmutation im CD95L-Gen auf, die einen Aminosäureaustausch im extrazellulären Teil des CD95L verursacht. Dadurch kann CD95L seinen Rezeptor CD95 nicht optimal binden und folglich keine Apoptose induzieren (26;39). Die Generierung CD95L-defizienter Mäuse unterstützt die Aussage, dass die CD95L-Mutation ursächlich ist für die Erkrankung. Da diese Mäuse ein noch schwereres Krankheitsbild zeigen als die *gld*-Mäuse, wird vermutet, dass der *gld*-CD95L möglicherweise noch eine geringe Funktion als Zelltodinduktor aufweist (40). Eine weitere natürlich vorkommende Maus-Mutante beruht auf der Insertion eines Retrotransposons in das zweite Intron des CD95-Gens. Dies resultiert in einem veränderten Transkript mit geringerer Stabilität und in verminderter Expression des CD95-Rezeptors (27;39). Auch diese *lpr*-Maus-Mutante entwickelte ebenso wie die *gld*-Mäuse eine lymphoproliferative Erkrankung, die durch den Ersatz des mutierten *lpr*-Gens mit dem normalen CD95-Gen verhindert wurde (41;42). Die Charakterisierung CD95-defizienter Mäuse bestätigte die Rolle von CD95 bei der Entstehung von Lymphoproliferation. Es konnte gezeigt werden, dass CD95 nicht nur nach antigener Stimulation benötigt wird, sondern auch eine regulatorische Funktion in naiven T-Zellen hat (43). Interessanterweise ist die Lymphoproliferation in B-Zell-defizienten *lpr*-Mäusen stark beeinträchtigt. Demnach tragen auch B-Zellen zur Entstehung des Krankheitsbildes bei (44). Weiteres Verständnis über die Erkrankung brachte eine Studie mit Mäusen, in denen CD95 spezifisch sowohl in T- oder B- als auch in B- und T-Zellen Cre-vermittelt inaktiviert wurde. Die Mäuse entwickelten nur dann eine *lpr*-ähnliche Erkrankung, wenn CD95 sowohl in lymphoiden wie auch nicht-lymphoiden Zellen fehlte. Die selektive Inaktivierung von CD95 in T-Zellen resultierte überraschenderweise in einer starken Lymphopenie, die assoziiert war mit dem Erscheinen von CD95L auf der Zelloberfläche und gesteigertem Zelltod peripherer T-Zellen (45).

### 1.2.6 Pathophysiologische Bedeutung des CD95/CD95L-Systems

Da CD95L überaus effizient Apoptose in verschiedenen CD95-sensitiven (eigentlich CD95L-sensitiven) Zellen auslöst, haben Veränderungen der CD95L-Expression pathophysiologische Konsequenzen. So ist eine gesteigerte CD95L-vermittelte Apoptose im Kontext einer akuten GVHD (*Graft Versus Host Disease*)-Erkrankung beobachtet worden, d.h. wenn sich Lymphozyten aus einem Transplantat gegen Zellen des Empfängers richten. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper gegen CD95L und TNF $\alpha$  vor der Entstehung einer akuten GVHD schützen (46). Des Weiteren scheinen CD95/CD95L-Interaktionen an der Inselzell-Schädigung bei Diabetes beteiligt zu sein. Obwohl beschrieben wurde, dass die Inselzellen beim Typ-1 Diabetes im Wesentlichen durch Perforin/Granzym-vermittelte Apoptose zugrunde gehen (47), konnte im selben Jahr gezeigt werden, dass die Zerstörung des Pankreas in *lpr*-Mäusen mit einem Diabetes Typ-1-Hintergrund (NOD (*non obese diabetic*)) deutlich reduziert ist (48).

Bei der Rheumatoiden Arthritis stellt die insuffiziente Apoptose einen fundamentalen Prozess der Erkrankung dar (49). Paradoxe Weise wurde *in vitro* eine ungewöhnliche Apoptose-Sensitivität nach CD95-Ligation detektiert, während *in situ* trotz erhöhter CD95/CD95L-Level keine Anzeichen von Zelltod zu finden waren (50). Diese Diskrepanz reflektiert möglicherweise pro- und anti-apoptotische Prozesse und/oder Phänomene der rheumatoiden Synovialflüssigkeit. So wurde in der Synovialflüssigkeit und/oder im Serum von Patienten ein erhöhter löslicher CD95-Spiegel gemessen, der mit membranständigem CD95 konkurrieren könnte und folglich Apoptose in Synovialzellen verhindern könnte (51). Weiterhin tragen von Synovial- oder Stromazellen produzierte Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 und TGF $\beta$  zum Schutz vor CD95-induzierter Apoptose bei. Inzwischen wurde an Tiermodellen und auch bei Patienten gezeigt, dass die Aktivierung des CD95-Signalweges einen erfolgreichen therapeutischen Ansatz darstellt (50).

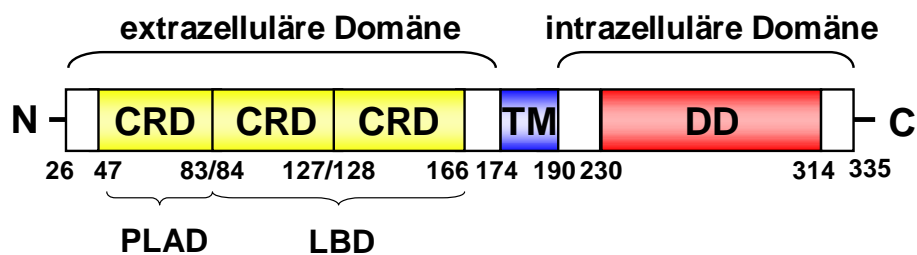
Im Laufe der Ko-Evolution haben insbesondere intrazelluläre Pathogene verschiedene Strategien entwickelt, um die Expression von CD95 und/oder CD95L zu modulieren und die vorzeitige Zerstörung der Wirtszellen zu verhindern. Gleichzeitig kann eine gesteigerte Expression der beiden Moleküle zu pathophysiologischen Kollateralschäden führen. Eine HIV (*human immunodeficiency virus*)-Infektion führt beispielsweise zur Hochregulation und Stabilisierung von CD95L in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Dies resultiert in der Induktion von Apoptose in nicht-infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und trägt maßgeblich zu deren Depletion bei (52). Auch die

erhöhte CD95L-Expression auf HIV-infizierten APZ kann durch eine (nicht-apoptotische) Blockade der TZR-Signaltransduktion eine relative Depletion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen herbeiführen (53). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das CD95/CD95L-System nicht nur an der Induktion von Apoptose beteiligt ist, sondern vielmehr auch andere Signalkaskaden nachhaltig beeinflusst, z.B. im Rahmen der Primärstimulation über den TZR/CD3-Komplex.

### 1.3 CD95 als kostimulatorischer Rezeptor

#### 1.3.1 Struktur des Todesrezeptors CD95

CD95 (Fas, APO-1) ist ein Typ-1-Transmembranprotein der TNFR-Familie (TNFRSF6) und umfasst im Menschen 335 Aminosäuren (aa (*amino acid*)), davon 148 im extrazellulären Bereich, 17 in der Transmembranregion und 145 im intrazellulären Anteil. Das Signalpeptid von CD95 besteht aus 25 Aminosäuren und ist am N-Terminus lokalisiert. Wie andere Vertreter der Familie weist CD95 drei charakteristische cysteinreiche Domänen (CRD) auf, in denen einige Glykosylierungsstellen, die Selbstaggregations- und die Liganden-Bindungsstelle lokalisiert sind. Als Todesrezeptor verfügt CD95 im intrazellulären Bereich (aa 230-314) über eine Todesdomäne, über die das Adapterprotein FADD und möglicherweise weitere Adaptermoleküle rekrutiert werden. Darüber hinaus befinden sich im intrazellulären Anteil vier putative Phosphorylierungsstellen sowie nicht genau definierte Bereiche, über die weitere Proteine zum Rezeptor rekrutiert werden könnten (54-57).



**Abb. 1.1: Struktureller Aufbau von CD95.** Im N-terminalen, extrazellulären Teil sind drei cysteinreiche Domänen (CRD) lokalisiert, die für die Ligandenbindung (LBD, *ligand binding domain*) und spontane Selbstaggregation von Trimeren (PLAD, *pre-ligand assembly domain*) verantwortlich sind. Die Transmembrandomäne (TM) erstreckt sich über die Aminosäuren 174-190. Der zytoplasmatische C-terminale Abschnitt enthält die für Todesrezeptoren charakteristische Todesdomäne (DD, *death domain*, aa 230-314). (Abb. nach Lambert et al. verändert (58))

### 1.3.2 Regulation der Transkription und Expression von CD95

CD95 kommt im Gegensatz zu seinem Liganden ubiquitär vor und ist auch auf verschiedenen Zellen in Leber, Herz, Niere, Pankreas, Gehirn, Thymus etc. exprimiert. Im Immunsystem wurde eine starke Expression auf Monozyten, B-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen (19). CD95 kommt überwiegend in membrangebundener Form vor. Durch alternatives *Splicing* oder nach *Shedding* durch Metalloproteasen können auch lösliche Formen generiert werden (59). Durch kompetitive Bindung und Neutralisation des CD95L haben diese löslichen Moleküle vermutlich eher eine anti-apoptotische Wirkung (60) und schützen so möglicherweise Tumore vor einem Angriff durch das Immunsystem (59).

CD95 wird konstitutiv oder als Reaktion auf verschiedene exogene und endogene Stimuli induzierbar exprimiert. Hierzu zählen infektiöse Agenzien, NO, Bestrahlung, Chemotherapie und Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-7, IL-1 $\beta$  und IL-6. Weiterhin wurde beschrieben, dass Immunzellen wie NK-Zellen oder zytotoxische T-Lymphozyten über direkte Interaktion mit CD40 oder CD44 CD95 auf Synovialzellen oder Tumorzellen induzieren können (61).

Die Genexpression von CD95 wird unter anderem über NF- $\kappa$ B induziert (62-64); aber über AP-1 oder STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription-3*) blockiert (65). Das CD95-Gen ist ein Zielgen des Tumorsuppressors p53, der nach DNA-Schädigung hochreguliert wird. In diesem Zusammenhang führt die verstärkte CD95-Expression zur Eliminierung veränderter Zellen und stellt so potenziell einen Schutz vor maligner Entartung dar. Auch virusinfizierte Zellen weisen teilweise hohe Level an CD95 auf und tragen damit zur Beseitigung infizierter Zellen bei. In beiden Fällen können allerdings auf verschiedenen Wegen Resistenzen gegen CD95-induzierte Apoptose ausgebildet werden. Zu den möglichen post-translationalen Modifikationen von CD95 zählen Phosphorylierung oder Glykosylierung im Zusammenhang mit Rezeptoraggregation und Oligomerisierung (66;67). Auch der Transport von CD95 aus dem Zytoplasma zur Plasmamembran kann durch die entgegengesetzt wirksamen Proteine FAP-1 (*Fas-associated phosphatase-1*) und Dynamin reguliert werden (68). Der Rezeptor CD95 kann internalisiert werden und nach Fusion mit dem endosomal-lysosomalen Kompartiment Signaltransduktion induzieren oder abgebaut und recycelt werden (20).

### 1.3.3 CD95-interagierende Proteine

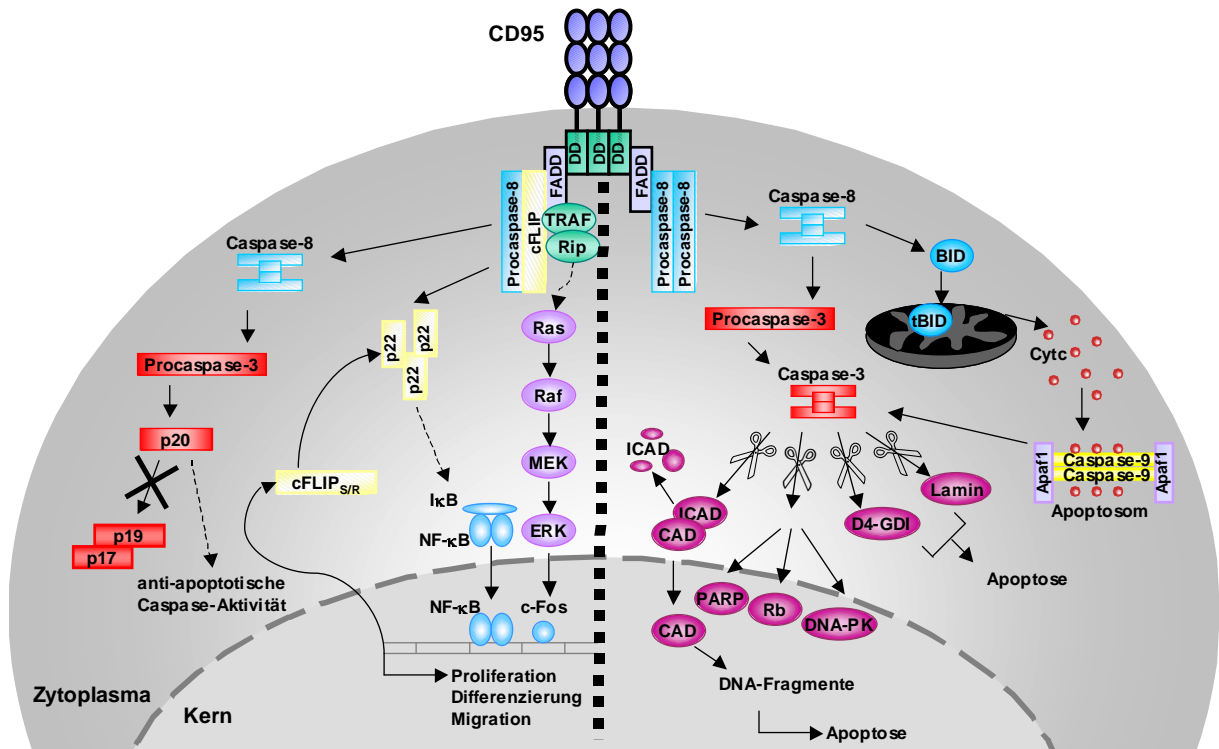
Die Auslösung des apoptotischen Programms erfordert, wie erwähnt, die Rekrutierung verschiedener Adapterproteine und Signalmoleküle zum Todesrezeptor CD95. Neben FADD wurde das Protein Daxx (*death-associated protein 6*) als Interaktionspartner von CD95 identifiziert. Im Hinblick auf seine Funktion gibt es widersprüchliche Befunde, da Daxx sowohl mit der Induktion von Zelltod (69) als auch mit nicht-apoptotischen Prozessen in Zusammenhang gebracht wurde (70). Weitere CD95-interagierende Proteine sind FAF-1 (*Fas-associated protein factor-1*), FAP-1, RIP-1 (*receptor-interacting protein*), FIST/HIPK3 (*Fas-interacting serine/threonine kinase/homeodomain-interacting protein kinase*), SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier*)/Sentrin und UBC9 (*ubiquitin-conjugating enzyme 9*). Während FAF-1 in Transfektanten die CD95-vermittelte Apoptose verstärkte (71), scheint FAP-1 anti-apoptotische Signale zu vermitteln und die Translokation von CD95 zur Zelloberfläche zu blockieren (54;68). Das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO (72) und seine Ligase UBC9 (73) regulieren den Transport von Proteinen zur Kernmembran oder intranukleären Kompartimenten (74). Die CD95-SUMO-Bindung schützt Zellen vor CD95-induzierter Apoptose (75), indem die Rekrutierung von FADD blockiert wird (72). RIP-1 ist als Interaktionspartner aller Todesrezeptoren der TNFR-Familie beschrieben und assoziiert zudem mit FADD. Auch hier erfolgt die Wechselwirkung über homotypische Interaktionen zwischen den Todesdomänen der Moleküle. RIP-1 wurde sowohl in Zusammenhang mit der Induktion anti-apoptotischer Signale wie NF- $\kappa$ B- und ERK (*extracellular-signal regulated kinase*)-Aktivierung als auch mit der Initiierung von apoptotischem und nekrotischem Zelltod gebracht. Möglicherweise wird die Funktion von RIP-1 über post-translationale Modifikationen reguliert (19).

### 1.3.4 Anti-apoptotische Funktion von CD95

Wie andere Mitglieder der TNFR-Familie induziert auch CD95 in verschiedenen Zelltypen und Geweben anti-apoptotische Signalwege und beeinflusst so die Proliferation, Differenzierung, Migration und Zytokinproduktion (19;76-79) (**Abb. 1.2**). Kürzlich wurde der lösliche CD95L für anti-apoptotische Prozesse verantwortlich gemacht, während Membran-assoziiertes CD95L eher zytotoxische Funktionen aufweist (25). Interessanterweise konnte an FADD-, RIP- und Daxx-defizienten Mäusen demonstriert werden, dass die drei DD-bindenden Proteine essentiell sind für das Überleben aber entbehrlich für Apoptose (80).

CD95 scheint essentiell für das Wachstum von Neuriten, die funktionelle Wiederherstellung geschädigter Nervenzellen und die neuronale Verästelung im zentralen Nervensystem (ZNS) zu sein (81-83). Darüber hinaus fördert CD95 die Proliferation von Fibroblasten in Mangelsituationen (84) sowie die Maturation von dendritischen Zellen (85) und ist zudem an der Regeneration der Leber beteiligt (86;87). Es konnte gezeigt werden, dass die Leberresektion zur verstärkten Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege über Akt, STAT-3 und NF- $\kappa$ B und die Expression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie führt (88). Im Einklang mit der Annahme, dass CD95 in der Leber auf diesem Weg proliferative Prozesse unterstützt, war die Regeneration der Leber in *lpr*-Mäusen deutlich reduziert (86). Widersprüchlich sind die Befunde zur Rolle CD95-assoziiertes Proteine wie FADD und Caspase-8 in diesem Szenario (19;86;89). Auch die CD95-exprimierenden Gewebe Herz, Pankreas und Dickdarm geben Hinweise auf alternative nicht-apoptotische Funktionen von CD95 (79).

Neben seiner Bedeutung für die Selektion und Reifung von Thymozyten (90;91), wurde CD95 bereits frühzeitig als Modulator der T-Zellaktivierung beschrieben. Erste Hinweise stammten von Alderson et al. (92), die feststellten, dass Antikörper gegen CD95 keinen Zelltod in frisch isolierten humanen T-Zellen induzierten. TZR-Stimulation und gleichzeitige Ligation des Rezeptors CD95 resultierten vielmehr in einer verstärkten Proliferation der Zellen. Eine optimale Aktivierung und Proliferation war paradoxerweise Caspase-8- und Caspase-3-abhängig (93-95). Inzwischen wurde zudem eine CD95-induzierte Rekrutierung von cFLIP und eine Assoziation mit TRAF1, TRAF2 und den Kinasen RIP und Raf-1 als Mechanismus zur Aktivierung der proliferativen NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalkaskaden beobachtet (96). cFLIP verhindert demnach nicht die Ausbildung des apoptotischen DISC, sondern unterstützt zusätzlich proliferative Signalwege. Daraus wurde geschlossen, dass die Level an cFLIP und seinen Isoformen pro- und anti-apoptotische Signalwege steuern (97-99). So sollen die beiden kürzeren Isoformen cFLIP<sub>R</sub> und cFLIP<sub>S</sub> die Caspase-8-vermittelte Apoptoseinduktion am DISC inhibieren. Überexpression von cFLIP<sub>L</sub> aktiviert den MAPK- und den NF- $\kappa$ B-Signalweg in Jurkat-Zellen und induziert eine verstärkte Produktion von IL-2 (96). Es wurde gezeigt, dass hierfür die Spaltung von cFLIP<sub>L</sub> zu p43-FLIP verantwortlich ist. Kürzlich konnte ein weiteres Spaltfragment von cFLIP, das p22-FLIP, identifiziert werden, welches offenbar über Interaktion mit dem IKK-Komplex NF- $\kappa$ B direkt aktiviert (100).



**Abb. 1.2: Pro- und anti-apoptotische Signaltransduktion von CD95.** CD95 ist ein dualer Rezeptor der Apoptose oder proliferative Prozesse induziert. Dargestellt sind die aus Literaturdaten bekannten aktivierten Signalkaskaden (Details siehe Text).

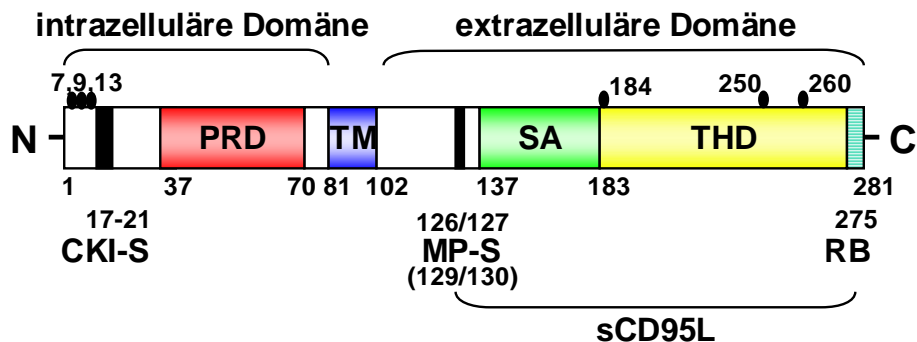
## 1.4 CD95L als kostimulatorisches Molekül

### 1.4.1 Struktur des CD95 Liganden

Der CD95L (FasL, APO-1L, CD178) ist ein Typ-2-Transmembran-Glykoprotein und gehört zur TNF-Familie der Todesfaktoren (TNFSF6). Wie alle Mitglieder der TNF-Familie trägt CD95L eine TNF-Homologie-Domäne (THD) mit drei putativen N-Glykosylierungsstellen im extrazellulären Teil (N184, N250, N260). Die THD vermittelt die Bindung an die cysteinreichen Domänen (CRD) des CD95-Rezeptors (101;102). Der CD95L ist über verschiedene Spezies stark konserviert und besteht bei der Maus aus 278 und beim Menschen aus 281 Aminosäuren. Muriner und humaner CD95L weisen eine Sequenzidentität von 76,9% auf und sind funktionell redundant (103). Im extrazellulären C-terminalen Teil befinden sich weiterhin eine Domäne, die für die Selbstaggregation (SA) und Trimerisierung des CD95L essentiell ist, sowie mehrere potenzielle Spaltstellen (aa 109-115, S126/127L, K129/130Q) für Metalloproteasen (MP-S). Alternatives *Splicing* oder die Spaltung durch Metalloproteasen führt zur Generierung von löslichem CD95L (104;105), der weniger zytotoxisch zu sein scheint als membranständiger CD95L (106) und sogar wie kürzlich



gezeigt werden konnte, die Autoimmunität und Tumorentwicklung durch Induktion anti-apoptotischer Aktivitäten fördert (25). Die Transmembranregion des CD95L erstreckt sich über die Aminosäuren 81 bis 102, an die sich eine für die TNF-Familie einzigartige intrazelluläre Region anschließt (107). Diese ist mit 80 Aminosäuren deutlich länger als die aller anderen TNF-Familienmitglieder und beinhaltet eine konservierte prolinreiche Domäne (PRD), die Interaktionen mit verschiedensten SH3- oder WW-tragenden Proteinen erlaubt (108;109). Weiterhin befinden sich in der intrazellulären Domäne drei potenzielle Phosphorylierungsstellen (Y7, Y9, Y13) (110) und ein Casein-Kinase I (CKI)-Substrat Motiv, welches auch in anderen TNF-Familienmitgliedern gefunden und mit der retrograden Signaltransduktion der entsprechenden Moleküle in Verbindung gebracht wurde (111).



**Abb. 1.3: Struktureller Aufbau von CD95L.** Im N-terminalen intrazellulären Abschnitt (aa 1-81) befinden sich drei potenzielle Phosphorylierungsstellen (aa 7, 9, 13), das Casein-Kinase I-Substrat-Motiv (CKI-S, aa 17-21) und eine prolinreiche Domäne (PRD, aa 37-70). C-terminal der Transmembrandomäne (TM, aa 81-102) schließt sich die extrazelluläre Domäne (aa 103-281) an. Sie enthält mehrere Spaltstellen für Matrix-Metalloproteasen (MP-S), einen wichtigen Bereich für die Trimerisierung (SA, Selbstaggregation) sowie die TNF-Homologie-Domäne (THD). Diese enthält putative N-Glykosylierungsstellen (aa 184, 250, 260). Am C-Terminus befindet sich die Rezeptorbindungsstelle (RB). (Abb. nach Janssen et al. verändert (107)).

#### 1.4.2 Regulation der Transkription und Expression des CD95 Liganden

Die Expression von CD95L wird auf verschiedenen Stufen reguliert und ist nach bisherigem Kenntnisstand auf deutlich weniger Zelltypen beschränkt. Dadurch wird verhindert, dass CD95L unkontrolliert Zell- und Gewebeschädigungen auslöst. Gesteuert wird die Expression auf transkriptionaler, translationaler und post-translationaler Ebene. Nach Restimulation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch APZ, anti-TZRα/β mAK, bakteriellen Superantigenen oder Phorbol ester und Calciumionophor wird CD95L auf der Zelloberfläche von T<sub>H</sub>1-Zellen im Rahmen des AICD induziert. Auf T<sub>H</sub>2-Zellen wird er auch nach Stimulation nur gering exprimiert (112). Zur Unterstützung der Zielzellyse wird CD95L innerhalb kürzester Zeit zur zytotoxischen immunologischen Synapse transportiert. CD95L

wird deshalb in zytotoxischen Effektor-T-Lymphozyten (ZTL) und NK-Zellen in so genannten sekretorischen Lysosomen gespeichert (113). Diese bifunktionalen Organellen beinhalten lysosomale Komponenten wie Hydrolasen und dienen gleichzeitig als Speicher für sezernierte Effektorproteine wie Perforin, Granzym und CD95L (31;114-116). Erst bei Konfrontation und Aktivierung durch eine entsprechende Zielzelle werden die Lysosomen zur Plasmamembran transportiert und CD95L akkumuliert in der zytotoxischen immunologischen Synapse (117;118).

Die transkriptionale Kontrolle der CD95L-Expression erfolgt nach Aktivierung verschiedener Signalwege durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie NF-AT, AP-1 und NF- $\kappa$ B. Während AP-1 für die Stress-vermittelte Expression des CD95L von Bedeutung ist, steht der Todesfaktor CD95L bei Wachstumsfaktormangel eher unter Kontrolle von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie. Ebenfalls im Zusammenhang mit der Regulation der CD95L-Expression stehen IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*), c-myc, SP-1 (*stimulating protein-1*), Egr-3 (*early growth response-3*) und der Cyclin B/CDK1-Komplex. Die transkriptionale Regulation umfasst außerdem negative Regulatoren, wie den Transkriptionsfaktor c-Fos. Somit wird die Induktion der Genaktivität des CD95L als Antwort auf zahlreiche Stimuli durch die cis-regulatorischen Kontrollelemente der Promotorregion präzise reguliert (119).

Neben der transkriptionalen Regulation spielt auch die Regulation auf post-transkriptionaler Ebene eine entscheidende Rolle zur Steuerung der CD95L-Expression (106). Das *Sorting* des CD95L vom Golgiapparat zu den sekretorischen Lysosomen wird vermutlich über Phosphorylierung der Tyrosinreste Y7, Y9 und Y13 im N-Terminus des CD95L und Ubiquitinylierung von Lysinresten, die unmittelbar an die PRD angrenzen, vermittelt (110). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die lysosomale Lokalisation von der PRD abhängt (120) und somit durch CD95L-interagierende SH3-Domänen Proteine (z.B. PCH (*Pombe Cdc15 Homology*)-Proteine) reguliert werden könnte (121;122). Der Transport der Vesikel zur immunologischen Synapse setzt ebenfalls die Anwesenheit der PRD voraus, wobei die Degranulation der Vesikel aus aktivierten T-Zellen innerhalb weniger Minuten erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von CD95L auf aktivierten T- und NK-Zellen in zwei Phasen abläuft (123). Die erste Phase (Maximum nach 10 Minuten) beruht auf einer Nck-vermittelten, Aktin-abhängigen Degranulation des lysosomal gespeicherten CD95L, während die zweiten Phase (Maximum nach 120 Minuten) eine Neusynthese des

CD95L voraussetzt (123;124). Die Expression des humanen CD95L wird weiterhin durch Matrix-Metalloproteasen moduliert. Durch dieses *Shedding* wird löslicher CD95L generiert, der aufgrund der Lokalisation der putativen Schnittstellen möglicherweise noch funktionelle Trimere bilden kann. Erst kürzlich wurde ADAM10 (*a disintegrin and metalloprotease-10*) als CD95L *Sheddase* identifiziert (104;105). Eine Inhibition dieser Protease führte zur Stabilisierung der Expression, gesteigerter Zytotoxizität und Verstärkung des AICD (104). Die pro-apoptotische Aktivität des CD95L kann außerdem über die Assoziation mit *lipid-rafts* reguliert werden. Über diese glykolipidreichen Mikrodomänen erfolgt eine selektive Rekrutierung oder ein Ausschluss von Proteinen in Signalplattformen an der Plasmamembran. Vermutlich sind für die *raft*-Assoziation von CD95L auch PRD-interagierende Proteine von Bedeutung. (31;125).

### 1.4.3 CD95L-interagierende Proteine

Die prolinreiche Domäne des CD95L erlaubt Interaktionen mit Proteinen, die über SH3- oder WW-Domänen verfügen. Bisher wurden eine Reihe von Interaktoren beschrieben, zu denen verschiedene Kinasen, wie Src, Fyn, Lyn, Lck und die p85 Adapteruntereinheit der PI3-Kinase und das Adaptermolekül Grb-2 zählen (108;109;122). Da alle genannten Proteine wichtige Signalmoleküle der TZR-Aktivierung darstellen, könnten sie an der retrograden Signaltransduktion des CD95L beteiligt sein (31;107).

Die PRD des CD95L vermittelt darüber hinaus Interaktionen mit Adapterproteinen der PCH-Familie wie CD2BP1 (*CD2-binding protein-1*), FBP17 (*formin-binding protein-17*), PACSIN1-3 (*protein kinase C and casein kinase II substrate in neurons 1-3*) und CIP4 (*cdc42 interacting protein-4*) (109;122). PCH-Proteine beeinflussen wie erwähnt die subzelluläre Lokalisation des CD95L (121;122), vermutlich indem sie den CD95L-Transport mit dem Aktinzytoskelett koppeln (126). Die Funktion von PCH-Proteinen besteht in der Verknüpfung des Zytoskeletts mit verschiedenen Membranen oder membranösen Strukturen (126). Es wird vermutet, dass unter anderem CIP4 und FBP17 über die Interaktion mit der GTPase Dynamin die Vesikelabschnürung regulieren und auf diese Weise an Endo- und Exozytoseprozessen beteiligt sind (127). Die Mitglieder der PCH-Familie werden aufgrund der kürzlich nachgewiesenen vielfältigen Interaktionen (128) auch im Kontext des CD95L als Modulatoren verschiedener Phasen des Transportes oder der lysosomalen Lokalisation, aber auch als potenzielle Regulatoren der Ausschleusung in Mikrovessikeln und einer möglichen

Reinternalisierung des CD95L oder dessen Fragmente untersucht. Die Funktion des CD95L-interagierenden Adapterproteins Nck wurde im Rahmen der aktivierungsabhängigen Rekrutierung der sekretorischen Vesikel zur immunologischen Synapse bereits erwähnt (108;124).

### 1.4.4 Retrograde Signaltransduktion durch CD95L

In den letzten Jahren wurden verschiedene Mitglieder der TNF-Familie, darunter OX-40 Ligand (OX40L), 4-1BB Ligand (4-1BBL), CD27 Ligand (CD27L), CD30 Ligand (CD30L), CD40 Ligand (CD40L), LIGHT (*lymphotoxin-like, exhibits inducible expression and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for herpes virus entry mediator, a receptor expressed by T lymphocytes*), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine receptor*), TNF und CD95L als Modulatoren der Aktivierung in unterschiedlichen Zellsystemen identifiziert. OX-40L, CD27L, CD30L, CD40L, LIGHT, 4-1BBL und CD95L wurden als kostimulatorische Rezeptoren im Rahmen der Aktivierung peripherer T-Zellen beschrieben. Für CD40L wurde gezeigt, dass dessen Stimulation die Phosphorylierung der Src-Kinase Lck und von PLC $\gamma$  verstärkt und damit bei der Aktivierung des p38 MAPK- und JNK-Signalweges eine Rolle spielt. Weiterhin wurde gezeigt, dass CD40-Transfektanten die anti-CD3-induzierte T-Zellaktivierung IL-2-abhängig steigern. Auch der Ligand LIGHT wurde in Verbindung mit retrograder Signaltransduktion in T-Zellen gebracht. LIGHT-Stimulation zeichnete sich durch eine Erhöhung der Zytotoxizität, Zytokinproduktion und Proliferation aus. Die Stimulation von membrangebundenem TNF $\alpha$ , mit anti-TNF $\alpha$  Antikörpern oder TNFR-1 exprimierenden Zellen führt in aktivierten T-Zellen zu vermehrter Zytokinsekretion (129), Calcium-Freisetzung und der Expression von Adhäsionsmolekülen (E-Selectin, CD62E) (31;111;130).

Die ersten Hinweise auf eine mögliche retrograde Signaltransduktion des CD95L ergaben zwei unabhängige Studien mit murinen T-Zellen aus *gld*- und *lpr*-Mäusen. In der ersten Arbeit von Suzuki und Fink (131) wurden CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zelllinien von Wildtyp, *lpr*- und *gld*-Mäusen im Hinblick auf ihre Proliferationsfähigkeit untersucht. Die reduzierte Zellteilungsrate TZR-stimulierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ließ vermuten, dass CD95L *in vitro* (131;132) und *in vivo* (133) ein wichtiges kostimulatorisches Molekül für CD8<sup>+</sup>- aber nicht für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist. Im Gegensatz zu diesen Befunden wurde im gleichen Jahr von Desbarats et al. eine Inhibition der TZR-vermittelten Proliferation

muriner CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Folge einer CD95L-Koligation beschrieben (134). Nachfolgende Arbeiten unterstützen die postulierte positive kostimulatorische Rolle des CD95L sowohl bei der T-Zellaktivierung als auch bei der Reifung und Selektion muriner Thymozyten (91). Inzwischen wurden in Folgearbeiten Signaltransduktionswege der TZR-Aktivierung im Kontext der CD95L-Kostimulation charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass die Signalproteine Akt, ERK und der CD95L selbst im Vergleich zu TZR-stimulierten Zellen durch CD95L-Koligation verstärkt phosphoryliert werden. Die dadurch induzierte Translokation der Transkriptionsfaktoren NF-AT und AP-1 hatte unter anderem eine gesteigerte IFN $\gamma$ -Sekretion zur Folge. Essentiell scheint in diesem Zusammenhang die Rekrutierung des CD95L zu *lipid-rafts* zu sein, in denen auf diese Weise eine Signalplattform aus TZR, CD95L und anderen Signal- und Adaptermolekülen entsteht (135).

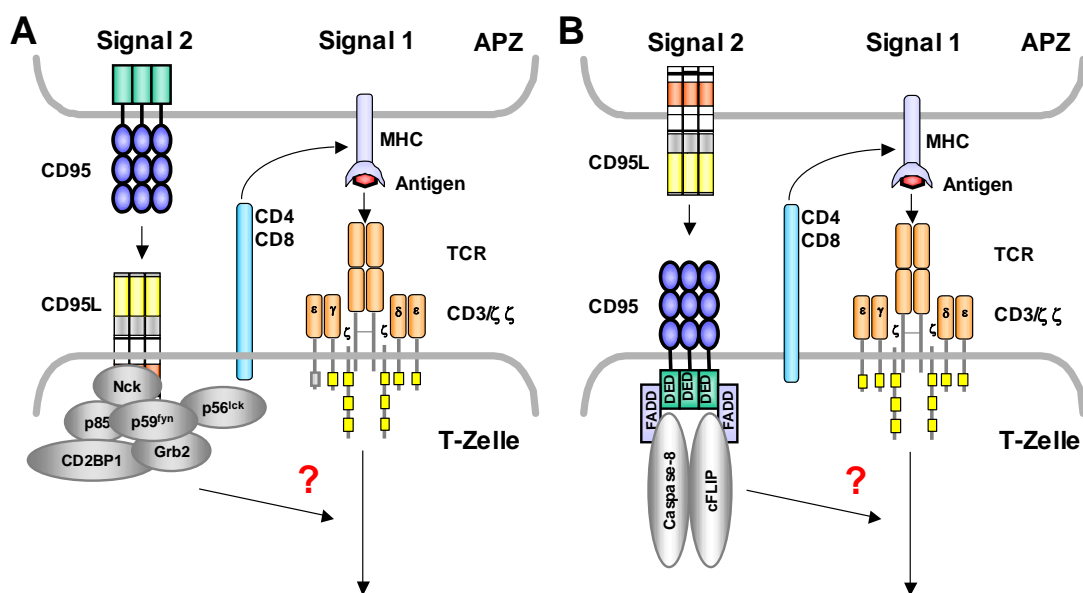
Neuere Arbeiten der Gruppe um Pamela Fink konnten in Mutagenesestudien definierte Aminosäurereste innerhalb der zytoplasmatischen Motive des CD95L identifizieren, die für die retrograde Signalgebung in murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verantwortlich sind. Die Aminosäuren 45-54 der PRD wurden als essentielle Komponenten der retrograden Signaltransduktion bezeichnet, während sie für die Induktion des Todessignals in CD95-positiven Zellen nicht erforderlich sind. Weiterhin konnte in dieser Arbeit untermauert werden, dass die CKI für die Phosphorylierung des CD95L verantwortlich ist und dass durch diese Aktivität offenbar die NF-AT-Aktivierung reguliert wird (136). Nach wie vor stehen diese Befunde im klaren Gegensatz zu der genannten Veröffentlichung von Desbarats et al. (134), die eine komplette Blockade der TZR-vermittelten Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachwies. Ob die gegensätzlichen Ergebnisse auf unterschiedliche Stimulationsbedingungen oder Zelltypen zurückzuführen sind, ist bisher nicht geklärt.

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit humanen T-Lymphozyten unterstützen jedoch im Wesentlichen die Daten zur Inhibition der TZR-Aktivierung durch CD95L-Kreuzvernetzung. So lag nach Vorarbeiten im Rahmen der Dissertationen von Jing Qian (Ph.D.) und Biny Mathew (M.D.) die Vermutung nahe, dass die Proliferation primärer PBMZ, aufgereinigter T-Zellen sowie isolierter CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen durch Kostimulation mit CD95Fc-Fusionsproteinen oder anti-CD95L-Antikörpern dramatisch reduziert wurde. Diese Vorbefunde bildeten den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit und führten zusammen mit der Beobachtung, dass auch die Ligation des CD95-Moleküls die T-Zellaktivierung beeinflusst, zu der im Folgenden formulierten Fragestellung.

## 2. Fragestellung

Ruhende T-Lymphozyten erkennen über den T-Zell-Rezeptor ihr spezifisches Antigen im Kontext von MHC-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Dieses Signal 1 reicht für eine vollständige Aktivierung nicht aus. Vielmehr benötigen ruhende T-Zellen ein Signal 2, welches über die Bindung kostimulatorischer Moleküle (wie CD28) an entsprechende Liganden auf APZ induziert wird.

Es ist bekannt, dass neben klassischen kostimulatorischen Molekülen auch weitere Rezeptor-Ligand-Interaktionen die initiale T-Zellaktivierung verstärken oder abschwächen können. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich in diesem Zusammenhang mit der Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Primärstimulation humaner T-Zellen. Ein Ziel dieser Untersuchungen war die Analyse einer möglichen retrograden Signalgebung über CD95L. Die Vorarbeiten hatten in der Tat ergeben, dass die Koligation von CD95L mit immobilisierten CD95Fc-Fusionsproteinen die TZR/CD3/CD28-induzierte Proliferation deutlich inhibiert. Weitere Analysen unter Verwendung diverser Agonisten für CD95L und CD95 ergaben jedoch, dass nicht nur die Koligation von CD95L, sondern auch die von CD95 die Aktivierung und Proliferation ruhender humaner T-Zellen nachhaltig beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Analyse der Veränderungen der Signalgebung wie auch die Analyse der Effekte der Signalmodulation auf zellulärer Ebene.



**Abb. 2.1: Untersuchung zum kostimulatorischen Potenzial von CD95L (A) und CD95 (B) im Rahmen der T-Zellaktivierung.** Primäre T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung zwei Signale, das TZR-Signal und ein zweites kostimulatorisches Signal. Ziel der Arbeit war die Analyse der kostimulatorischen Signalkapazitäten von CD95L und CD95 in frisch isolierten humanen T-Lymphozyten.

**Die Ziele der Arbeit im Einzelnen:**

1. Überprüfung der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erhaltenen Daten zur Beeinflussung der TZR/CD3/CD28-induzierten Aktivierung primärer T-Zellen durch das CD95/CD95L-System unter Verwendung verschiedener Analysemethoden (u.a. Aktivierungsmarker, Zelltodinduktion, Proliferation).
2. Detaillierte Analyse der retrograden Signaltransduktion über CD95L im Kontext der TZR/CD3/CD28-Stimulation ruhender T-Zellen.  
Welchen Einfluss hat die gleichzeitige Ligation von CD95L auf die intrazelluläre Signalgebung bei suboptimaler CD3/CD28-Stimulation? Auf welcher Ebene wird die beobachtete Inhibition eingeleitet bzw. manifest? Folgende Parameter sollten unter anderem analysiert werden: Phosphorylierung verschiedener Signalmoleküle, Calcium-Mobilisierung, Zellzyklusprogression.
3. Analyse der nicht-apoptotischen Effekte einer CD95-Ligation auf die TZR/CD3/CD28-Stimulation ruhender T-Zellen.  
Dabei sollte insbesondere der in Vorarbeiten beobachtete Unterschied der Ligation mit immobilisiertem CD95LFc (komplette Inhibition) und anti-CD95 mAK (fulminante Kostimulation) aufgeklärt werden. Es sollte zudem untersucht werden, auf welcher Ebene die beobachtete Inhibition oder Signalverstärkung reguliert wird. Neben den unter Punkt 2 aufgeführten Parametern sollten im Kontext der CD95-Kostimulation detaillierte Analysen zur anti-apoptotischen Signalgebung über CD95 durchgeführt werden.
4. Zur Untersuchung der reversen Signalgebung über CD95L erhielt die Arbeitsgruppe im Laufe der vorliegenden Arbeit fünf heterozygote CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse, die ursprünglich im Labor von Dr. Martin Zörnig (Frankfurt) etabliert wurden. Die Zucht der Mäuse sollte eingeleitet und genotypisch kontrolliert werden. Außerdem sollte nach einer entsprechenden Zahl von Rückkreuzungen eine erste Phänotypisierung Aufschluss über die zelluläre Zusammensetzung verschiedener lymphatischer Organe geben und eine erste Analyse der T-Zellaktivierung durchgeführt werden.

### 3. Material

#### 3.1 Geräte

Absaugvorrichtung Filter Mate Harvester	Perkin Elmer, Dreieich
Agarose-Gel-Dokumentationsanlage Gel Imager	Intas, Göttingen
Agarose-Gel-Kammer Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT	Bio Rad, München
Agarose-Gel-Kammer Wide Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT	Bio Rad
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
β-Szintillationszähler	Inotech, Schweiz
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Forma Scientific, USA
Digitales Aufnahmegerät (Digital Slight DS-L1)	Nikon, Düsseldorf
DNA/RNA-Photometer Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies, USA
Durchflußphotometer Uvicord SII	Pharmacia, Freiburg
Durchflußzytometer FACS Calibur	Becton Dickinson(BD), Heidelberg
Einkanalschreiber REC	Pharmacia, Freiburg
Elektroporationsgerät Gene PulserXcell <sup>™</sup>	Bio Rad
Entwicklermaschine	Agfa, Gera
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Fraktionssammler RediFrac	Pharmacia
Gelelektrophorese-Kammer Protean <sup>®</sup> Xi Cell	Bio Rad
Gelelektrophorese-Kammer X Cell SureLock <sup>™</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Heizblock Thermostat (DB2A und DB3A)	Techne, Wertheim
Heizblock HB-2	Wealtec, USA
iCycler <sup>™</sup> Real-Time PCR Detektionssystem	Bio Rad
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Osterode
LAS3000 ( <i>image capturing unit</i> )	Fujifilm, Düsseldorf
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Lichtmikroskop Axiovert 10	Zeiss
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroplatten-Photometer 'infinite <sup>™</sup> M200'	Tecan, Crailsheim
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Netzgerät Power Supply 250-2	Sigma Techware, München
Netzgerät Power Pack 200/300	Bio Rad
Neubauer-Zählkammer	Fischer, Frankfurt am Main
PCR-Maschine T Gradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Reagenzglasschüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Rollen-Mischgerät 'Assistent' RM-5	Hecht, Sondheim
Rotator 'Rotamix'	Heto-Holten, Wettenberg
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Schütteltisch	IKA Labortechnik
Schüttelwasserbad	GFL
Spektrometer SmartSpec <sup>™</sup> 3000	Bio Rad
Sterilbank 'Lamin air <sup>®</sup> '	Heraeus
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415C, 5417C und 5417R	Eppendorf
Wasserbad	GFL
Western Blot Transfer-Kammer 'Trans-blot Cell'	Bio Rad



Wipptisch 'Rocky'	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zentrifuge Avanti™ J-25I	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus

### 3.2 Verbrauchsmaterial

Amicon Ultra-15	Millipore, Eschborn
Bakterienimpfösen und -nadeln	Greiner, Frickenhausen
Einfrierröhrchen CryoTube™	Nunc, DK
Elektroporationsküvetten (0,2 und 0,4 cm)	Bio Rad
Dynabeads® M-450 Epoxy	Invitrogen
FACS-Röhrchen	Greiner
Filterpapier	Whatman, UK
Hyperfilm™ ECL-Chemilumineszenz-Film	Amersham, Freiburg
Luminometerplatten(weiß)	BD
MACS-LS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Nitrozellulose-Membran Hybond™ C Extra	Amersham
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pasteurpipetten ungestopft	Hecht
PCR-Röhrchen Multiply® -µ Strip 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nürnberg
PCR-Röhrchen Deckelkette	Sarstedt
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner
Pipettierhilfen (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe pipetus® akku	Hirschmann, Eberstadt
Pre-Separationsfilter	Miltenyi
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Spektrometerküvetten	Sarstedt
Spitzbodenplatte mit 96 Kavitäten	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Spritzenvorsatzfilter	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen Cellstar (50, 250, 650 ml)	Greiner
Zellkulturflasche mit 3 Böden	Nunc
Zellkulturplatten (12, 24, 96 Kavitäten)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner

### 3.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Roth
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE)	Fluka, Deisenhofen
Coomassie-Protein-Assay-Reagenz	Pierce, IL, USA
Coomassie-Brilliant-Blau G250	Merck

## Material

---

DMEM ( <i>Dulbecco's minimum essential medium</i> )	PAA, Österreich
DNA 1kb Marker	NEB, Frankfurt
DNA 100bp Marker Hyperladder IV	Bioline, Luckenwalde
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
$\text{d}_4\text{H}_2\text{O}$	Braun, Melsungen
dNTP Satz (100 mM)	Invitrogen
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Merck
Eisessig	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Ethanol (absolut)	Merck
Ethanol (absolut)	Sigma
Ethidiumbromid	Merck
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Fluo-3 AM	Invitrogen
Freestyle-Medium <sup>TM</sup> 293T	Invitrogen
Glucose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Merck
Hefe-Extrakt	Roth
ImmoMix <sup>TM</sup> /ImmoMix <sup>TM</sup> Red	Bioline
Ionomycin	Calbiochem, Darmstadt
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Lymphozytenseparationsmedium	Biochrom AG
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck
Magermilchpulver	Frema, Lüneburg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Calbiochem
Methanol	Sigma
Methyl- <sup>3</sup> [H] Thymidin	Amersham
Mistellektin	Sigma
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Natriumchlorid	Roth
Nonidet <sup>®</sup> P-40 (NP-40)	Fluka
NuPAGE <sup>®</sup> MES SDS-Laufpuffer (20X)	Invitrogen
NuPAGE <sup>TM</sup> 4-12% Bis-Tris-Gel (10 well, 1.5 mm)	Invitrogen
NuPAGE <sup>TM</sup> 4-12% Bis-Tris-Gel (15 well, 1.5 mm)	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000 $\mu\text{g}$ )	Biochrom AG
Pepton	Roth
Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma
Phosphat gepufferte Saline (PBS, 1 Einheit auf 10l $\text{d}_4\text{H}_2\text{O}$ )	Biochrom AG
Phytohämagglutinin (PHA)	Remel, Dartford, UK
Pluronic F-127 20% Solution	Invitrogen
Ponceau S-Konzentrat	Sigma
1640-PRMI-Kulturmedium	Invitrogen
Propidiumjodid (PI)	Serva
Protein Marker „Precision Plus“	Bio Rad
Protein Marker „Novex <sup>®</sup> Sharp“	Invitrogen

Protein-A-Sepharose™ 4B	Zymed, München
Random Primer	Invitrogen
rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2)	Chiron GmbH, Marburg
rekombinater RNAsin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
Rinderserum-Albumin (BSA)	Roth
Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
ROX Referenz Puffer	Bioline
Sodium Dodecyl Sulfate (10% SDS in Wasser)	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate	Serva
SYBR® Green Solution (50X)	Molecular Probes, Leiden, ND
TEMED (N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck
Test-Neuraminidase	Dade Behring, Marburg
Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Merck
Trypanblau (0,1% in PBS)	Merck
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2% (w/v))	Biochrom AG
Tween 20	Merck
Zellkulturmedium X-VIVO 15	Lonza, Belgien

### 3.4 Inhibitoren

Colchicin (10 µg/ml)	Sigma
Cytochalasin D (5 µg/ml)	Calbiochem
Latrunculin A (5 µg/ml)	Sigma
GM6001 (Ilomastat, Galardin, 5 µg/ml)	Calbiochem
TAPI (TNFα Protease-Inhibitor) (50 µM)	Calbiochem
Aprotinin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma
Monensin	Calbiochem
Monodansylcadaverin (MDC, 0,05 mM)	Sigma
Natriumorthovanadat	Merck
Natriumfluorid	Fluka
Natriumpyrophosphat	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Wortmannin	Sigma

### 3.5 Enzyme

#### Restriktionsenzyme

BamH1	NEB
EcoRI	NEB
HindIII	NEB
Sall	NEB

#### Weitere Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Pronase E	Sigma
Proteinase K	Sigma

### 3.6 Kits

ATP-Detektionsassay ViaLight <sup>®</sup> Plus Kit	Lonza
ELISA Quantikine <sup>®</sup> Humanes IL-2	R&D Systems, UK
ELISA Quantikine <sup>®</sup> Humanes IFN- $\gamma$	R&D Systems
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellisolationskit	Miltenyi
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellisolationskit	Miltenyi
CD45RO-Depletionskit	Miltenyi
Cytofix/Cytoperm Kit	BD
ECL-Detektionskit	GE-Healthcare, München
HotStarTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Kompetente Bakterien (One Shot <sup>®</sup> TOP10 E.coli)	Invitrogen
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond <sup>®</sup> PC500	Macherey-Nagel

### 3.7 Puffer und Lösungen

#### 3.7.1 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE Analysen

Laufgel (Bio Rad, 10%-ig)	Acrylamid/Bisacrylamid	10 ml
	Tris-Puffer 1M, pH 8,8	11,2 ml
	SDS 10%	300 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	8,7 ml
	APS 20%	100 $\mu$ l
	TEMED	<u>20 <math>\mu</math>l</u>
		30 ml
Sammelgel (Bio Rad)	Acrylamid/Bisacrylamid	1,67 ml
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	1,25 ml
	SDS 10%	100 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	7,03 ml
	APS 20%	50 $\mu$ l
	TEMED	<u>10 <math>\mu</math>l</u>
		10 ml
Elektrophoresepuffer (Bio Rad, 10X)	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1l
	pH auf 8,2 - 8,3 einstellen	
Elektrophoresepuffer (NuPAGE)	NuPAGE <sup>®</sup> MES-Puffer	50 ml
	ddH <sub>2</sub> O	auf 1l
Probenpuffer (Bio Rad)	SDS	6% (w/v)
	Glycerin	30% (v/v)
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM
	Bromphenolblau	0,005% (v/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	2-5% (v/v)

## Material

---

Coomassie-Färbelösung	Methanol	410 ml
	Eisessig	70 ml
	Coomassie-Brilliant-Blau	0,125 g
	ddH <sub>2</sub> O	520 ml
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol	410 ml
	Eisessig	70 ml
	ddH <sub>2</sub> O	520 ml
Western Blot-Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS (10%)	0,015% (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	auf 4 l
Western Blot-Waschpuffer (TBS)	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	
Western Blot-Waschpuffer (TBST)	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	
	Tween 20	0,05% (v/v)
Milchpulver-Blockierungslösung	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	
	Tween 20	0,05% (v/v)
	Magermilchpulver	5% (w/v)
BSA-Blockierungslösung	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	
	10% NaN <sub>3</sub>	1% (v/v)
	BSA	5% (w/v)
<i>Stripping</i> -Lösung	Tris pH 6,8	62,5 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM
	10% SDS	2% (v/v)
	auf 500 ml	
	ddH <sub>2</sub> O	

### 3.7.2 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung von Fusionsproteinen

Säulenmaterial	Protein A-Sepharose™ 4B	
Equilibrierungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5)	1) 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O ddH <sub>2</sub> O Mit ddH <sub>2</sub> O 1/50 verdünnen (20 mM, pH 4,75-4,50) NaCl	68,995 g 500 ml 17,532 g
	2) 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O ddH <sub>2</sub> O Mit ddH <sub>2</sub> O 1/50 verdünnen (20 mM, pH 9,30-8,90) NaCl Lösungen 1) und 2) mischen: pH 6,5 einstellen Sterilfiltration und Entgasung anschließen	88,995 500 ml 17,532 g
Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl-Puffer, pH 2,7)	Glycin Mit HCl auf pH 2,7 einstellen ddH <sub>2</sub> O	3,7525 g auf 500 ml
Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0)	Tris Mit 1 M NaOH auf pH 9,0 einstellen ddH <sub>2</sub> O	12,113g auf 100 ml

### 3.7.3 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

50X TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer)	Tris Eisessig 0,5 M EDTA, pH 8 ddH <sub>2</sub> O	242 g 57,1 ml 100 ml auf 1 l
2% Agarose-Gel	Agarose 1X TAE-Puffer	2% (w/v) 50-200 ml
DNA-Auftragungspuffer	Bromphenolblau Glycerin in ddH <sub>2</sub> O	0,25% (w/v) 30% (v/v)
LB-Medium	Pepton Hefe-Extrakt NaCl autoklavieren Ampicillin ddH <sub>2</sub> O autoklavieren, Lagerung bei 4°C	10 g 5 g 0,25 g 50 µg/ml auf 1 l

## Material

---

LB-Agar	LB-Medium	1 l
	Agar-Agar	20 g
	autoklavieren, 20 ml Agar/Platte, Lagerung: 4°C	
	Ampicillin	100 µg/ml
	Bei Bedarf :X-Gal (40 mg/ml): 40 µl/Platte	
SOC-Medium	Pepton	10 g
	Hefe-Extrakt	2,5 g
	NaCl	0,25 g
	KCl	1,25 g
	pH auf 7,0 einstellen, mit Wasser auf 485ml auffüllen und autoklavieren	
	Glucose 1 M	10 ml
	MgCl <sub>2</sub> 1 M	5 ml

### 3.7.4 Puffer und Lösungen für die Zellbiologie

MACS-Waschpuffer (MWP)	BSA	5% (w/v)
	EDTA	2 mM
	PBS	auf 0,5-1l
Lysepuffer für Zellen	NP-40	1% (v/v)
	Tris pH 7,4	20 mM
	NaCl	0,15 M
	EDTA	5 mM
	Aprotinin	2 µg/ml
	Leupeptin	2 µg/ml
	PMSF	1 mM
	Natriumorthovanadat	1 mM
	Natriumfluorid	10 mM
	Natriumpyrophosphat	1 mM
	Pepstatin A	2 µg/ml
FACS-Waschpuffer (FWP)	PBS	1 l
	BSA	10 g
	NaN <sub>3</sub>	1 g
FACS-Fixierlösung (1% PFA)	PBS	1 l
	PFA	1 g
Puffer 1 für Epoxy-Partikel-Beladung (0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,4)	ddH <sub>2</sub> O	1 l
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2,62 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,42 g
Puffer 2 für Epoxy-Partikel-Beladung	BSA	0,1% (w/v)
	PBS	auf 1l

### 3.7.5. Puffer und Lösungen für tierexperimentelle Arbeiten

TNE-Puffer (pH 8,0)	Tris-Puffer	10 mM
	EDTA	0,1 mM
	NaCl	150 mM
Gewebelysepuffer	TNE-Puffer	500 µl
	10% SDS-Lösung	50 µl
	Pronase E	25 µl
	Proteinase K	2,5 µl

## 3.8 Antikörper

### 3.8.1 Antikörper für Analysen im Durchflußzytometer

Tabelle 3.1: Verwendete Antikörper für FACS-Analysen im humanen System

Antikörper	Wirt/Isotyp	Markierung	Applikation	Hersteller
α-CD3	Maus IgG1	FITC/PE	1/5	BD
α-CD4	Maus IgG1	FITC	1/5	BD
α-CD8	Maus IgG1	PE	1/5	BD
α-CD25	Maus IgG1	FITC/PE	1/5	BD
α-CD28	Maus IgG1	PE	1/5	BD
α-CD45RA	Maus IgG1	FITC	1/5	BD
α-CD45RO	Maus IgG2a	PE	1/5	BD
α-CD69	Maus IgG1	FITC	1/5	BD
α-CD69	Maus IgG1	PE	1/5	BD
α-CD95	Maus IgG1	PE	1/5	BD
α-CD95L	Maus IgG1	PE	unverdünnt	Invitrogen
α-CD134	Maus IgG1	FITC	1/2	BD
α-CD141	Maus, IgG1	PE	1/5	Miltenyi
α-CD152	Maus IgG2a	PE	1/2	BD
α-CD303	Maus IgG1	PE	1/5	Miltenyi
α-IL-2Rβ	Maus IgG1	PE	1/2	BD
α-IL-12β2	Ratte IgG2a	PE	1/2	BD
α-TZRα/β	Maus IgG1	FITC	1/8	Caltag, USA
α-TZRγ/δ	Maus IgG1	PE	1/5	BD
Isotypkontrolle	Maus IgG1	PE	1/2-1/5	BD
Isotypkontrolle	Maus IgG2a	FITC	1/2-1/5	BD
Isotypkontrolle	Maus IgG2a	PE	1/2-1/5	BD
Isotypkontrolle	Ratte IgG2a	PE	1/2	BD
α-Maus IgG (H+L)	Ziege F(ab') <sub>2</sub>	PE	1/60	Caltag

Abkürzungen: F(ab')<sub>2</sub>=2 F(ab') variable Untereinheiten des IgG AK verbunden über 2 S-S-Bindungen, H=*heavy* (schwere Kette), L=*light* (leichte Kette)

Tabelle 3.2: Verwendete Antikörper für FACS-Analysen im murinen System

Antikörper	Wirt/Isotyp	Markierung	Applikation	Hersteller
α-CD3ε	Hamster IgG	FITC	1/6	Immunotools, Friesoythe
α-CD4	Ratte IgG2b	PE	1/6	Immunotools
α-CD8	Ratte IgG2a	FITC	1/6	Immunotools
α-CD11b	Ratte IgG2b	FITC	1/6	Immunotools
α-CD19	Ratte IgG2a	PE	1/6	Immunotools
α-CD25	Ratte IgG1	FITC	1/6	Immunotools
α-CD69	Hamster IgG	PE	1/6	Immunotools
Isotypkontrolle	Ratte IgG2b	FITC	1/6	Immunotools



### 3.8.2 Antikörper für Western Blot Analysen und Immunpräzipitationen

Tabelle 3.3: Verwendete Antikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	Wirt	MGW (kDa)	Methode	Applikation	Hersteller
$\alpha$ -Bcl-X	Maus	25-29	WB	1 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -Caspase-3	Kaninchen	35, 20, 19, 17	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -Caspase-8 (C-15)	Maus	57, 43, 18	WB	1/10	P. H. Krammer, Heidelberg
$\alpha$ -Caspase-8	Maus	57, 43, 18	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -CDK1	Maus	34	WB	0,25 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -CDK2	Maus	33	WB	0,1 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -CDK4	Maus	33	WB	1 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -CDK6	Kaninchen	40	WB	1/1000	BD
$\alpha$ -Cyclin B1	Maus	62	WB	1 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -Cyclin D1	Kaninchen	38	WB	0,2 $\mu$ g/ml	Santa Cruz
$\alpha$ -Cyclin D2	Maus	35	WB	1 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -Cyclin E	Maus	50	WB	1 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -ERK1/2	Kaninchen	42, 44	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -cFLIP (NF-6)	Maus	55, 43, 26, 24, 22	WB	1/10	P. H. Krammer
$\alpha$ -I $\kappa$ B	Kaninchen	39	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -PCNA	Maus	36	WB	0,05 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -PARP	Maus	116, 85	WB	1/2000	BD
$\alpha$ -phospho-ERK1/2	Kaninchen	42, 44	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-I $\kappa$ B	Maus	41	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-LAT	Kaninchen	36, 38	WB	1/500	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-Lck	Kaninchen	56	WB	1 $\mu$ g/ml	Biosources
$\alpha$ -phospho-PLC $\gamma$	Kaninchen	155	WB	1/500	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-Rb (Ser780)	Kaninchen	110	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-Rb (Ser795)	Kaninchen	110	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-Rb (Ser807/811)	Kaninchen	110	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-STAT-1	Kaninchen	84, 91	WB	1/1000	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-STAT-4	Maus	89	WB	0,25 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -phospho-ZAP70	Kaninchen	70	WB	1/500	Cell Signaling
$\alpha$ -phospho-ZAP70	Kaninchen	70	IP	2 $\mu$ g	Cell Signaling
$\alpha$ -PLC $\gamma$ 1	Kaninchen	145	WB	0,2 $\mu$ g/ml	Santa Cruz
$\alpha$ -T-bet	Kaninchen	62	WB	0,2 $\mu$ g/ml	Santa Cruz
$\alpha$ -ZAP-70	Kaninchen	70	WB	0,2 $\mu$ g/ml	Santa Cruz
$\alpha$ -Kaninchen-IgG-HRP	Esel	-	WB	1/7500	GE Healthcare
$\alpha$ -Maus-IgG-HRP	Schaf	-	WB	1/7500	GE Healthcare

Abkürzungen: MGW=Molekulargewicht, HRP=Meerrettich-Peroxidase, WB=Western Blot, IP=Immunpräzipitation

### 3.8.3. Antikörper zur Zellstimulation

Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper für die Stimulation von Zellen

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
$\alpha$ -CD3 (OKT3)	human	2 $\mu$ g/ml	Janssen-Cilag, Neuss
$\alpha$ -CD3 (2C11)	murin	2,5 (2,5-10) $\mu$ g/ml	eBioscience, San Diego, USA
$\alpha$ -CD28	human	5 $\mu$ g/ml	BD
$\alpha$ -CD95L (anti-CD95L)	human	5 (0,004-5) $\mu$ g/ml	Santa Cruz
$\alpha$ -CD95 (anti-APO-1)	human	5 (0,625-80) $\mu$ g/ml	P. H. Krammer
$\alpha$ -CD95 (7C11)	human	2 $\mu$ g/ml	M.J.Robertson, Indianapolis, USA
$\alpha$ -huIgGFc	human	5 $\mu$ g/ml	Sigma

Abkürzungen: hu= human, Fc= konstante AK-Region

### 3.9 Fusionsproteine

Tabelle 3.5: Verwendete Fusionsproteine für die Stimulation von Zellen

Fusionsprotein	Konzentration	Hersteller
CD95Fc	20 (0,16-40) µg/ml	Mol. Immunologie, Labor Janßen, Kiel
CD95-TNC-Fc	20 (1,25-40) µg/ml	eigene Herstellung
CD95L-Fc	20 (0,16-20) µg/ml	Mol. Immunologie, Labor Janßen
CD95L-ST-Fc	2,5 und 20 (0,16-20) µg/ml	eigene Herstellung
huIgGFc	20 µg/ml	Bethyl Laboratories, Texas, USA
LZ-CD95L	k.A.	I. Lavrik und D. Riess, Heidelberg

Abkürzungen: Fc=konstante AK-Region, TNC=Tenascin-C, hu=human, ST=Strep-tag, LZ=Leucin-Zipper

### 3.10 Vektoren

Tabelle 3.6: Verwendete Vektorkonstrukte

Insert	Vektor	Hersteller
Transfektionskontrolle	pEGFP-C1	Invitrogen
CD95Fc	pcDNA3/Fc-CD95	Mol. Immunologie, Labor Janßen
CD95L-Fc	pCR3/HA-Fc-Flag-CD95L	Mol. Immunologie, Labor Janßen
CD95L-ST-Fc	pCR3/HA-ST-Fc-Flag-CD95L	U. Bertsch, Labor Schütze, Kiel
CD95-TNC-Fc	pCR3/Flag-Fc-TNC-CD95	H. Wajant, Würzburg

Abkürzungen: Fc=konstante AK-Region, HA=Hämagglutinin, ST=Strep-tag, TNC=Tenascin-C

### 3.11 Primer für Real-Time PCR

Tabelle 3.7: Verwendete Primer

Name	Sequenz (5'-3')
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) F	5'-ACAGAGTGAGCCCTTCTTCAA
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) R	5'-ATAGGAGTTGCGGGCAAAG
Humane Polymerase II (Hupo) F	5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT
Humane Polymerase II (Hupo) R	5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG
Interleukin-2 (IL-2) F	5'-AACTCACCAGGATGCTCACATTT
Interleukin-2 (IL-2) R	5'-TTAGCACTTCCTCCAGAGGTTTG
Interferon-γ F	5'-TCAGCTCTGCATCGTTTTGG
Interferon-γ R	5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA
GM-CSF F	5'-TCTCAGAAATGTTTGACCTCCA
GM-CSF R	5'-GCCCTTGAGCTTGGTGAG

Abkürzungen: F=*forward*; R=*reverse*

## **4 Methoden**

### **4.1 Isolation und Kultivierung von Zellen**

#### **4.1.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut**

Humane mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMZ) wurden aus Leukozytenkonzentraten (*Buffy-Coats*) gesunder Spender isoliert, die vom Institut für Transfusionsmedizin, UK-SH Campus Kiel/Lübeck zur Verfügung gestellt wurden. Durch Dichtezentrifugation über einen Ficoll-Gradienten sammeln sich die PBMZ, bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Plasma- und Thrombozytenüberstand und der Ficoll-Lösung an. Im Zellsediment befinden sich Erythrozyten, Granulozyten und gegebenenfalls tote PBMZ, die eine höhere spezifische Dichte als das verwendete Ficoll aufweisen.

In mittleren Zellkulturflaschen wurde 100 ml PBS vorgelegt und der *Buffy-Coat* (üblicherweise ca. 30 ml) darin verdünnt. Es wurden 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit 15 ml Lymphozytenseparationsmedium/Ficoll ( $d=1,077$  g/ml) vorbereitet. Anschließend wurden 30-35 ml des verdünnten *Buffy-Coats* vorsichtig über das Separationsmedium gegeben. Die Zentrifugationsröhrchen wurden bei 2000 rpm für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, sodass sich ein Zellsediment und ein Interphasenring zwischen der Ficoll-Lösung und dem Plasmaüberstand bildete. Die im Interphasenring befindlichen PBMZ wurden vorsichtig abgenommen und in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1 x 5 min, 1600 rpm; 2 x 10 min, 1000 rpm) zur Entfernung von Ficollrückständen, Serum und Thrombozyten, wurden die frisch isolierten PBMZ in 40 ml X-VIVO oder alternativ in RPMI mit 5% FKS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C (maximal über Nacht) aufbewahrt.

#### **4.1.2 Isolation von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mittels magnetischer Negativ-Separation**

Humane CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus PBMZ mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, *magnetic-activated cell sorting*) isoliert. Die verwendeten Kits der Firma Miltenyi sind zur Separation humaner CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen geeignet. Bei der magnetischen Negativ-Separation werden zunächst die unerwünschten Zellen mit Biotin-

konjugierten Antikörpern markiert (z.B. Monozyten mit  $\alpha$ -CD14). Im zweiten Schritt erfolgt eine Kopplung an anti-Biotin-konjugierte paramagnetische Partikel. Bei der Passage durch ein Magnetfeld werden Partikel mit unerwünschten Zellen zurückgehalten, während unmarkierte CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen passieren können. Für die Negativ-Isolation der T-Zellsubpopulationen wurden PBMZ eingesetzt, die zuvor aus dem Vollblut gesunder Spender generiert und über Nacht bei 4°C gelagert wurden. Zunächst wurden 100 x 10<sup>6</sup> PBMZ bei 1400 rpm für 5 Minuten sedimentiert, zweimal in MACS-Waschpuffer (MWP) gewaschen (1400 rpm, 5 min) und in 400  $\mu$ l MWP resuspendiert. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Biotin-Antikörper-Cocktail erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurden dem Ansatz 300  $\mu$ l MWP und 200  $\mu$ l anti-Biotin Partikel (*microbeads*) zugeführt und erneut für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem der Inkubationsansatz einmal mit dem 20fachen Volumen MWP gewaschen wurde (1300 rpm, 7 min), erfolgte die Resuspension der Zellen in 500  $\mu$ l MWP. Die Zellsuspension wurde auf vorbereitete äquilibrierte Trennsäulen mit einem Pre-Separationsfilter gegeben. Der Durchlauf wurde nach Zugabe von 4 x 1 ml MWP auf die Trennsäule in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation des Durchlaufes bei 1400 rpm für 5 Minuten wurden die negativ-isolierten CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in X-VIVO resuspendiert und für die weitere Verwendung bei 4°C gelagert. Die Reinheit der MACS-separierten CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde routinemäßig mittels Durchflußzytometrie überprüft.

In einigen Experimenten wurde mit CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gearbeitet, die durch Depletion der CD45RO<sup>+</sup>-Zellen mittels magnetischer anti-CD45RO-beladener Partikel der Firma Miltenyi aus CD4<sup>+</sup>-T-Zellen separiert wurden. Hierfür wurden zunächst 10 x 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zentrifugiert (1300 rpm, 10 min) und das entstandene Zellsediment in 80  $\mu$ l MWP resuspendiert. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l der anti-CD45RO-beladenen Magnetpartikel wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis belassen und nachfolgend nach Zugabe von 2 ml MWP erneut zentrifugiert (1300 rpm, 10 min). Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l MWP resuspendiert und auf eine vorbereitete Trennsäule gegeben. Der Durchlauf mit den CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen wurde wie oben für CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beschrieben gesammelt und weiter verwendet. Die CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen wurden erhalten nachdem 5 ml MWP auf die Säule gegeben wurde und die Zellen mittels eines Stempels durch die Säule gedrückt wurden.

### 4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Durch die Methode der Kryokonservierung können Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Da ihre Vitalität auf diese Art erhalten bleibt, können die Zellen bei Bedarf aufgetaut und erneut in Kultur genommen werden. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (1400 rpm, 5 min). Anschließend wurden 20-30 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Aliquot in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und auf Eis in Kryoröhrchen überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO diffundiert in die Zellen, sodass durch eine Verhinderung der Kristallbildung auch die Zerstörung der Zellmembran vermieden wird. Die Kryoröhrchen wurden in Luftpolsterfolie gewickelt und in der ersten Einfrierphase bei -20°C für eine Stunde und in der Zweiten bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Beim Auftauen der Zellen wurde auf eine schonende stufenweise Erhöhung der Temperatur geachtet, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Hierzu wurde die Zellsuspension unter tropfenweiser Zugabe von 20 ml RPMI-Medium mit 10% FKS gemischt. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI-Medium mit 10% FKS (1300 rpm, 5 min) wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellvitalität und der Zellzahl wurde nach der Färbung mit 0,1% Trypanblau-Lösung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### 4.1.4 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung sämtlicher Zellen erfolgte in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C. Die für die Herstellung von Fusionsproteinen eingesetzten adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde in DMEM-Medium mit 10% FKS (v/v), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 1% L-Glutamin (v/v) kultiviert. Das verwendete FKS wurde vor Gebrauch bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert, um störende Substanzen wie Fibrin und Komplement zu zerstören. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C bis zum Ablösen inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, die Zellkulturflasche mit DMEM-Medium mit 10% FKS gespült und ebenfalls in das Zentrifugationsröhrchen gegeben. Die Zellen wurden bei 1400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium ausgesät.

Zur Herstellung von PHA-Blasten wurden frisch isolierte PBMZ in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit PHA (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert und in RPMI-Medium mit HEPES (10 mM), L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 10% FKS (v/v) kultiviert. Nach 3-5 Tagen wurden die toten Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation entfernt und die lebenden Zellen zum Entfernen des Ficolls dreimal mit RPMI-Medium gewaschen. Die weitere Kultivierung der generierten PHA-Blasten erfolgte in RPMI-Medium mit 10% FKS in Gegenwart von rekombinantem IL-2 (10 U/ml) für bis zu drei Wochen.

### **4.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität**

Zur Bestimmung der in einem definierten Volumen vorhandenen Zellzahl wurden 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 90  $\mu\text{l}$  Trypanblau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Kammervolumen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die genaue Zellzahl ergab sich aus der Multiplikation des Mittelwertes zweier ausgezählter Eckquadrate mit dem Verdünnungsfaktor (hier 10) und dem Kammerfaktor ( $10^4$ ). Tote Zellen werden aufgrund ihrer erhöhten Membrandurchlässigkeit selektiv blau gefärbt, was eine gleichzeitige Beurteilung der Zellvitalität zulässt.

### **4.1.6 Stimulation von primären Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend Versuchsansätze mit frisch isolierten humanen PBMZ,  $\text{CD4}^+$ -,  $\text{CD8}^+$ -,  $\text{CD45RA}^+$ - und  $\text{CD45RO}^+$ -T-Zellen durchgeführt. Die Stimulation der Zellen erfolgte je nach Versuchsziel mit immobilisiertem anti-CD3 mAK (OKT3, 2  $\mu\text{g/ml}$ ) plus/minus anti-CD28 mAK (5  $\mu\text{g/ml}$ ), mit löslichem Phytohämagglutinin (PHA, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder mit löslichem PMA/Ionomycin in unterschiedlichen Konzentrationen. Je nach Fragestellung wurden die Zellen zusätzlich über den Rezeptor CD95 oder den CD95 Liganden mit spezifischen Fusionsproteinen oder Antikörpern kostimuliert, die in löslicher oder plattengebundener Form in unterschiedlichen Konzentrationen angeboten wurden. Zur Immobilisierung von Antikörpern oder Fusionsproteinen wurden die Proteine in der gewünschten Konzentration in PBS verdünnt, auf die Zellkulturplatten oder -flaschen gegeben und für 3 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Für eine Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten wurde 50  $\mu\text{l}$  und für Platten mit 24 Kavitäten 250  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung eingesetzt. Überschüssiges Protein wurde durch zweifaches Spülen mit PBS entfernt und die Platten oder Flaschen bis zur weiteren Verwendung bei  $4^\circ\text{C}$  (maximal über Nacht)

aufbewahrt. Frisch isolierte Zellen wurden in einer Dichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-Medium mit 10% FKS oder in X-VIVO-Medium kultiviert. Je nach Versuchsziel erfolgte die Kultivierung im Brutschrank bei 37°C für wenige Minuten bis hin zu mehreren Tagen oder Wochen.

Alternativ wurden primäre T-Zellen mit magnetischen Epoxy-Partikeln stimuliert, die zuvor mit den entsprechenden Stimuli beladen wurden. Im ersten Schritt wurden die Stimuli kovalent an die Epoxy-Partikel gekoppelt. Dazu wurden die Partikel zunächst dreimal mit Puffer 1 für Epoxy-Beladung gewaschen und auf einem Rotor im Brutschrank bei 37°C mit den zu koppelnden Proteine im gewünschten Verhältnis in Puffer 1 inkubiert. Pro 25 µl Epoxy-Partikel wurde 5 µg AK/Fusionsprotein eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die Partikel dreimal mit Puffer 2 für Epoxy-Beladung für 5 Minuten unter ständiger Rotation gewaschen. Die Partikel wurden im ursprünglichen Volumen in Puffer 2 aufgenommen und bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert. Die Stimulation der Zellen erfolgte im Verhältnis von zwei Zellen pro Partikel und wurde in X-VIVO-Medium bei 37°C durchgeführt.

## **4.2 Immunpräzipitation und Western Blot Analyse**

### **4.2.1 Herstellung von Zelllysaten**

Um Western Blot Analysen durchführen zu können, müssen die Proteine durch Zellyse aus den verschiedenen Zellkompartimenten extrahiert werden. Eine definierte Anzahl Zellen (abhängig von Zelltyp und Applikation) wurde einmal mit PBS gewaschen und bei 1400 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1% NP-40 Lysepuffer resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Dem Lysepuffer wurden die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid, Pepstatin A, Natriumorthovanadat, EDTA, Natriumfluorid und Natriumpyrophosphat zugesetzt, um eine Degradation der Proteine durch Proteasen oder eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen zu verhindern. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten bei 4°C wurde der Überstand mit den darin befindlichen löslichen Proteinen abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Das Zelllysate wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.

#### **4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit einem modifizierten Bradford-Test (1976, Pierce) nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt. Dieses Standard-Verfahren beruht auf der spezifischen Komplexbildung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G-250 mit Proteinen, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes in phosphorsaurer, ethanolischer Lösung von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Es wurden üblicherweise 995 µl Coomassie-Protein-Assay-Reagenz mit 5 µl Probe gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde im Spektrometer bei 595 nm gegen einen Standard (Albumin, PBS) gemessen und die Proteinkonzentration in der Probe automatisch auf Basis der Kalibrierungsgeraden rechnerisch ermittelt.

#### **4.2.3 Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation mittels spezifischer Antikörper diente der Anreicherung von Proteinen aus Zelllysaten. Die Zelllysate wurden zunächst bei 4°C mit 25-50 µl Protein G-Sepharose-Partikeln (50% (v/v) in PBS) auf einem Rotor inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aus dem Zellgemisch zu eliminieren. Nach Zentrifugation der Sepharose-Partikel wurden diese verworfen und dem Zelllysate wurde 2 µg spezifischer Antikörper zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation, um eine Bindung des Antikörpers an die Zielproteine im Lysat zu ermöglichen. Nach Zugabe von 30-50 µl Protein G-Sepharose-Partikeln wurde der Ansatz erneut für zwei bis vier Stunden bei 4°C rotiert. Die Partikel wurden abzentrifugiert, der Ansatz drei- bis fünfmal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen und mit Probenpuffer wie im nächsten Punkt erläutert versetzt, aufgeköcht und weiter verarbeitet.

#### **4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteingemische in einem elektrischen Feld unabhängig von ihrer Ladung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS denaturiert die Proteine indem es sich an hydrophobe Bereiche der Proteine anlagert. Durch die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS kann die Eigenladung der Proteine maskiert werden, indem ein konstantes Ladungs-zu-Masse-Verhältnis erreicht wird. Dadurch



ist die Auftrennung im elektrischen Feld nicht mehr abhängig von der Nettoladung und dem damit verbundenen isoelektrischen Punkt des Proteins, sondern lediglich von der Masse. In dieser Arbeit wurde die SDS-Gelelektrophorese nach der Standardmethode von Lämmli (1970) durchgeführt. Verwendet wurde zum einen das Protean II-System der Firma Bio Rad und zum anderen das NuPAGE-System mit 4-12% Gradienten-Fertiggelen der Firma Invitrogen.

### SDS-PAGE-System der Firma Bio Rad

Beim Protean II-System wurde die Porengröße des Trenngels über den Acrylamidanteil festgelegt, wobei für die Auftrennung von zu detektierenden Proteinen mit einem hohen Molekulargewicht ein niedriger Anteil an Acrylamid (10%) und für kleinere Proteine ein höherer Anteil (15%) verwendet wurde. Das Trenngel wurde bis zur Polymerisation mit 96%igem Ethanol überschichtet, um eine optimale Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels, wurde das Ethanol abgossen und das Gel dreimal zur Entfernung von restlichem Ethanol mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde das Sammelgel vorbereitet und auf das Trenngel gegeben. Der Probenkamm mit der gewünschten Anzahl an Vertiefungen wurde luftblasenfrei in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Die Polymerisation des Gels erfolgte bei RT für ca. 30 Minuten. Die Proben wurden für die SDS-PAGE vorbereitet indem zunächst 5-60 µg Protein mit 3fach Probenpuffer versetzt wurde. Nachfolgend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol löst die Disulfidbindungen der Proteine durch Reduktion auf, sodass das Protein durch Zerstörung der Quartärstruktur linearisiert wird. Das Aufkochen der Proben mit einem Überschuss SDS bewirkt die Aufspaltung der Tertiär- und Sekundärstruktur indem Wasserstoffbrücken zerstört werden. Die aufgekochten Proben wurden nach kurzer Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge in die mit Laufpuffer gefüllten Geltaschen des Sammelgels gegeben. Präzipitate wurden nach dem Aufkochen in trockene Geltaschen geladen, die nachfolgend vorsichtig mit Laufpuffer überschichtet wurden. Als Proteinstandard diente der „Precision Plus“ Molekulargewichtsmarker der Firma Bio Rad. Die Auftrennung im elektrischen Feld wurde mit einem Vorlauf von 10-30 Minuten bei 100-120 Volt und einem Gellauf bei 50-60 Volt über Nacht bis zum Rauslaufen der durch Bromphenolblau sichtbaren Lauffront durchgeführt.

### SDS-PAGE-System der Firma Invitrogen

Bei der SDS-PAGE mit dem System von Invitrogen wurden 4-12% Bis-Tris-Gradienten-Fertiggele verwendet, die 10 oder 15 Vertiefungen aufwiesen. Eingesetzt wurden 20-40 µg Protein pro Geltasche, die wie im folgenden Schema angezeigt vorbereitet wurden.

Tabelle 4.1: Pipettierschema für die SDS-PAGE (Invitrogen-System)

Reagenz	Menge [µl]
Probe	x
NuPAGE® LDS Probenpuffer	2,5 µl
DTT (10X)	1 µl
destilliertes Wasser	auf 6,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Abkürzungen: DTT= Dithiothreitol

Nachfolgend wurden die Proben für 10 Minuten bei 70°C zur Denaturierung der Proteine erhitzt, kurz mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in die Geltaschen überführt. Als Proteinmarker dienten 5-10 µl des Molekulargewichtsstandards „Novex® Sharp“ der Firma Invitrogen. Die Proteine beim NuPAGE-System wurden bei 200 Volt für ca. eine Stunde im 1X NuPAGE®-MES-SDS-Laufpuffer (in ddH<sub>2</sub>O) aufgetrennt.

#### **4.2.5 Western Blot Analyse**

Beim Western Blot-Verfahren werden elektrophoretisch separierte Proteine auf eine proteinbindende Membran überführt und nachfolgend analysiert. Der Transfer der Proteine erfolgt durch ein senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegtes elektrisches Feld.

Die Komponenten der Transfer-Kammer wurden zunächst in Western Blot-Transferpuffer äquilibriert. Die Blotkassetten wurden in einer mit Blotpuffer gefüllten Schale von der Kathode zur Anode wie folgt zusammengebaut: Schwamm, zwei Whatman-Filterpapiere, Gel, Nitrozellulose-Membran, zwei Whatman-Papiere, Schwamm. Die Blotkassette wurde mit der Gel-Seite Richtung Kathode in den mit Blotpuffer gefüllten Tank gehängt. Der Transfer der Proteine aus Bio Rad-Gelen wurde bei 4°C über Nacht bei 0,15 Ampere durchgeführt, während Proteine aus NuPAGE-Gelen für eine Stunde transferiert wurden. Aufgrund der möglichen Wärmeentwicklung durch den hohen Leistungswiderstand bei der hier angelegten Spannung von 200 V wurde ein auf -20°C vorgekühlter Kühlakku in den Tank eingesetzt.

Die Effizienz des Transfers und die gleichmäßige Beladung der Gelspuren wurden durch Färbung mit Ponceau S überprüft. Die Membran wurde zunächst mit Wasser äquilibriert und für 5 Minuten mit Ponceau S gefärbt. Nach erneutem kurzem Spülen mit Wasser erfolgte die Visualisierung und Ablichtung der Membran. Nachfolgend wurde die Membran mit TBS entfärbt und für die Detektion von Proteinen weiterverwendet.

### **4.2.6 Detektion transferierter Proteine**

#### Immunodetektion transferierter Proteine

Der Nachweis transferierter Proteine wurde mittels Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Membran wurde zunächst für eine Stunde bei RT mit 5% Milchpulver oder 5% BSA blockiert. Die Blockierung diente der Verhinderung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membran. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 5 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C in einem 50 ml Röhrchen mit 3 ml Gesamt-Antikörpervolumen auf einem Rollen-Mischgerät durchgeführt. Die Antikörper wurden in TBS-T, 5% BSA oder 5% Milchpulver (in TBS-T) verdünnt. Nach erfolgter Primärantikörperinkubation wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper bei RT auf einem Schütteltisch inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut dreimal für mindestens 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die markierten Proteine wurden durch eine Meerrettich-Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL-Reagenz (Luminol, Wasserstoffperoxid) und der nachfolgenden Belichtung der Hyper-ECL-Filme sichtbar gemacht. Die Expositionszeit betrug abhängig vom zu detektierenden Protein und/oder der verwendeten Antikörper wenige Sekunden bis zu 4 Stunden.

#### Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist ein einfaches Verfahren zur Visualisierung von sämtlichen Proteinen nach der SDS-PAGE und diente hier in erster Linie zur Überprüfung neu hergestellter Fusionsproteine. Die Gele wurden mindestens eine Stunde bei RT auf einem Schütteltisch in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Das saure Milieu der Färbelösung ermöglicht die Bindung des Farbstoffes an die Proteine und denaturiert und fixiert die Proteine gleichzeitig. Nach Entfärbung der überschüssigen Farbe mit der Coomassie-Entfärbelösung wurden die gefärbten Gele abgelichtet.

#### 4.2.7 Entfernen von Immunkomplexen auf Blotmembranen

Um verschiedene Proteine nacheinander auf derselben Membran nachweisen zu können, müssen die gekoppelten Antikörper mit einem Verfahren, welches man als *Strippen* bezeichnet, von der Membran abgelöst werden. Beim *Strippen* wird dieses durch thermische Energie, und die in der *Stripping*-Lösung enthaltenen Detergenzien und Reduktionsmittel erreicht. Die auf die Membran transferierten Proteine bleiben dabei weitgehend gebunden und können erneut mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Zur Detektion des nächsten Proteins wurde die Blotmembran zwei- bis dreimal mit TBS-T gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membran in *Stripping*-Lösung bei 56°C im Schüttelwasserbad für 25 Minuten zur Ablösung der gebundenen Antikörper. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T gewaschen und erneut nach Blockierung mit Antikörpern wie unter 4.2.6 beschrieben inkubiert.

#### 4.3. <sup>3</sup>[H] Thymidin-Einbau

Bei der Methode des <sup>3</sup>[H] Thymidin-Einbaus wird radioaktiv-markiertes Thymidin anstelle des natürlich vorkommenden Nukleotids während der DNA-Synthese des Zellzyklus in die sich replizierende DNA einbaut. Damit eignet sich das Verfahren für Zellproliferationsstudien, da die DNA-Replikationsrate in der Regel der Zellteilungsrate direkt proportional ist.

Frisch isolierte PBMZ wurden in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten als Triplikate in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angesetzt und entsprechend stimuliert. Nach drei Tagen wurde pro Vertiefung 1  $\mu\text{Ci}$  <sup>3</sup>[H] Thymidinlösung (20  $\mu\text{l}$  10 Ci <sup>3</sup>[H] Thymidin/ml Medium) zugesetzt und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die behandelten Zellen wurden bei -20°C eingefroren oder direkt im Anschluss an die Inkubation mit einer Absaugvorrichtung (Harvester) auf eine Filtermatte übertragen. Die Matten wurden für eine Stunde bei 80°C getrocknet und mit einem Szintillationsgel versiegelt. Das Gel ermöglicht die Umsetzung der schwachen radioaktiven Strahlung des <sup>3</sup>[H] Thymidins in Lichtenergie, die mit einem  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen wurde.

#### **4.4 Durchflußzytometrische Untersuchungen**

Die Durchflußzytometrie umfasst die Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen erhalten werden. Sie ermöglicht so die Aussage über Zellgröße und Granularität und wird zudem für Zelltod- sowie Zellzyklusanalysen eingesetzt. Weiterhin können durch die Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper quantitative Aussagen über die Expression von Oberflächenmolekülen oder das Vorkommen von intrazellulären Proteinen gemacht werden.

##### **4.4.1 Zelltodanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung**

Durchflußzytometrisch ist die Bestimmung des Anteils toter Zellen mit der Propidiumjodid (PI)-Färbung möglich. Aufgrund der Desintegration der Plasmamembran apoptotischer Zellen diffundiert das PI in die toten Zellen und interkaliert in die DNA. Das interkalierte PI fluoresziert ca. 20-30mal stärker als ungebundenes und kann durchflußzytometrisch erfasst werden.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (1400 rpm, 5 min), in 100 µl PI-Lösung (2,5 µg/ml PI in PBS) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung am Durchflußzytometer wurde nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln innerhalb der ersten 45 Minuten durchgeführt.

##### **4.4.2 Detektion von Zelloberflächenmolekülen**

Bei der Expressionsanalyse von Zelloberflächenmolekülen werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper eingesetzt.  $1 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in Mikrotiterspitzenbodenplatten mit 96 Kavitäten überführt, bei 1000 rpm für 4 Minuten zentrifugiert und einmal mit 100 µl kaltem FACS-Waschpuffer (FWP) gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in 5-10 µl der gewünschten Fluorochrom-konjugierten Antikörper oder Isotypkontrollen resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Alternativ wurden einige Proben mit unkonjugierten Antikörpern inkubiert. In diesen Fällen war eine zweite 30-minütige Inkubation mit einem spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper notwendig. Nach der Färbung wurden die Zellen dreimal mit FWP gewaschen (1000 rpm, 4 min) und in 1% PFA-Lösung aufgenommen. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten wurde

mit dem Durchflußzytometer innerhalb der nächsten 48 Stunden durchgeführt. In einigen Fällen wurden die Zellen nach der Färbung zur parallelen Beurteilung der Zelltodinduktion in PI-Lösung (siehe 4.4.1) aufgenommen und innerhalb von 45 Minuten analysiert.

### **4.4.3 Nachweis intrazellulärer Proteine**

Zur Detektion intrazellulärer Proteine werden spezifische Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet. Diese erfordern eine vorherige Permeabilisierung und Fixierung der zu untersuchenden Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflußzytometer-basierte Analyse intrazellulärer Proteine für die Bestimmung der intrazellulären Zytokinexpression von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und IL-4 verwendet.

Zuvor stimulierte primäre Zellen wurden in Mikrotiterspitzenbodenplatten mit 96 Kavitäten überführt, abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min) und einmal mit 100  $\mu\text{l}$  kaltem FWP gewaschen. Die Zellen wurden zur Permeabilisierung und Fixierung in 100  $\mu\text{l}$  Cytotfix/Cytoperm resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis belassen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 100  $\mu\text{l}$  Perm/Wash-Lösung wurden die sedimentierten Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Antikörper-Verdünnung in Perm/Wash-Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut zweimal mit Perm/Wash-Lösung gewaschen, in 1% PFA-Lösung aufgenommen und innerhalb von 48 Stunden im Durchflußzytometer gemessen und analysiert.

### **4.4.4 Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE-Markierung**

Die CFSE-Markierung von Zellen ist eine Methode zur Analyse der Zellproliferation. Die zu untersuchenden Zellen wurden vor der Stimulation mit dem zunächst nicht-fluoreszierenden Farbstoff CFSE beladen. Durch unspezifische Esterasen in der Zelle wird Acetat abgespalten, sodass das CFSE nicht mehr zellmembranpermeabel ist. Die dabei entstandene Succinimidyl-Ester-Gruppe reagiert mit intrazellulären Aminen und bildet fluoreszierende Konjugate. Bei jeder Zellteilung verteilt sich der Farbstoff je zur Hälfte auf die Tochterzellen, was durchflußzytometrisch als Abnahme der Fluoreszenzintensität gemessen wird. Die Detektion der Proliferation mittels CFSE hat gegenüber dem  $^3\text{[H]}$  Thymidin-Einbau den Vorteil, dass tatsächliche Zellteilungen detektiert werden.

Die Beladung der Zellen mit CFSE wurde mit 5  $\mu\text{M}$  CFSE in PBS im Dunkeln bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Nach 10-minütiger Inkubation zur Aufnahme des CFSE wurden 5-10 ml kaltes X-VIVO Medium zugesetzt und die Zellen für 5 Minuten auf Eis belassen. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen zum Entfernen von überschüssigem CFSE dreimal mit Medium gewaschen, erneut in Medium resuspendiert und entsprechend der Fragestellung stimuliert. Am Tag der Messung wurden die Zellen in eine Mikrotiterspitzenbodenplatte mit 96 Kavitäten überführt, abzentrifugiert (1000 rpm, 4 min) und einmal mit 100  $\mu\text{l}$  kaltem FWP gewaschen. Die Zellen wurden entweder in 100  $\mu\text{l}$  FWP oder in 100  $\mu\text{l}$  PI-Lösung resuspendiert. Nach 5-10-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden 50.000 Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

### 4.4.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) wird verwendet um Proliferationsraten einer Zellpopulation zu bestimmen. Der Zellzyklus wird je nach DNA-Gehalt in 5 verschiedene Phasen eingeteilt. PI interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren. Auf diese Art ist eine den Fluoreszenzsignalen entsprechende Bestimmung der DNA-Menge in der Zelle und damit eine Zuordnung zu einer Zellzyklusphase möglich (G0/G1 diploid,  $2n < S < 4n$ , G2/M tetraploid).

Die zu untersuchenden Zellen ( $2-4 \times 10^6$  pro Ansatz) wurden für die Analyse vorbereitet indem sie aus den Zellkulturplatten in 15 ml-Röhrchen überführt, zweimal mit 1 ml PBS/EDTA (2 mM) gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  PBS/EDTA (2 mM) resuspendiert wurden. Die Zellen wurden tropfenweise unter sanftem Schütteln mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol versetzt und durch 30-minütige Inkubation bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  PBS/EDTA aufgenommen, mit 4  $\mu\text{l}$  RNase (1 mg/ml) und 100  $\mu\text{l}$  PI-Lösung (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt und schließlich für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe des Durchflußzytometers bei 560-640 nm gemessen und mittels WinMDI ausgewertet. Zur Dubletten-Diskriminierung wurde bei der Auswertung im FL-2A/FL-2W-Dotplot eine neue Region definiert. Die Einzelzellpopulation aus dieser Region wurde für die nachfolgende quantitative Beurteilung der Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus im FL-2A-Histogramm verwendet.

#### **4.4.6 Fluorimetrische Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration**

Die Veränderung der zytosolischen Calciumionenkonzentration in der intakten Zelle wurde mit Hilfe von fluoreszierenden, zellmembrandurchlässigen Substanzen im Durchflußzytometer untersucht. Die Messung der Calciumionenkonzentration wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 durchgeführt. Fluo-3 wird im Kanal 1 (FL-1) des Durchflußzytometers bei 530 nm gemessen und reagiert bei ansteigender Calciumionenkonzentration mit einer Zunahme der Intensität des emittierten Lichtes.

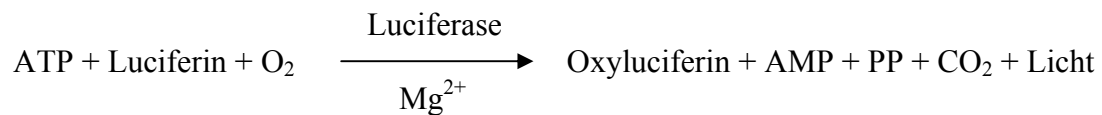
1-2 x 10<sup>6</sup> der zu analysierenden Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1,5 ml Calcium-Medium (RPMI-Medium+50 µM β-Mercaptoethanol+10% FKS) resuspendiert. Dem Ansatz wurden 15 µl einer Färbelösung (7,75 µl H<sub>2</sub>O + 6,75 µl Lösungsvermittler Pluronic F-127 + 1 µl Fluo-3 AM) zugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C im Wasserbad. In dieser Zeit diffundieren die lipophilen Farbstoffe als Ester (Fluo-3 Acetomethylester (AM)) durch die Zellmembran. Die Hydrolyse des Esters durch unspezifische intrazelluläre Esterasen resultiert in der Umsetzung zur freien calciumbindenden Säure. Der Farbstoff ist durch eine höhere Hydrophilie gekennzeichnet, sodass keine Rückdiffusion in den extrazellulären Raum möglich ist. Nach der Färbung der Zellen wurden diese erneut zentrifugiert (1300 rpm, 5 min, RT) und zweimal mit 1 ml Calcium-Medium gewaschen. Die Zellen wurden in 1,5 ml Calcium-Medium aufgenommen und je 200 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Vor jeder Messung wurden die Zellen aus einem Reaktionsgefäß für 10 Minuten im Heizblock auf 37°C gebracht, zügig in Röhrchen transferiert und schließlich im Durchflußzytometer gemessen. Die intrazelluläre Calciumionenkonzentration wurde über 200 Sekunden erfasst, wobei nach ca. 20-30 sek der Stimulus und nach weiteren 160-180 sek zur Kontrolle Ionomycin (500 ng/ml) zugegeben wurde. Die Auswertung wurde mittels WinMDI durchgeführt.

#### **4.5 ATP-Detektionsassay**

Der ATP-Detektionsassay ViaLight<sup>®</sup> Plus eignet sich als Zellproliferations- und Zytotoxizitäts-Assay. Das Kit beruht auf dem Prinzip einer Biolumineszenzmessung von ATP, das in allen metabolisch aktiven Zellen vorhanden ist. ATP eignet sich als Messgröße zur Unterscheidung zwischen lebenden, toten und proliferierenden Zellen. Die Menge an ATP



ist dabei direkt proportional zur Zellzahl und nimmt bei Zelltodinduktion ab. Das ViaLight® Plus Kit der Firma Lonza basiert auf der oxidativen Decarboxylierung von Luciferin in Anwesenheit von Sauerstoff,  $Mg^{2+}$ -Ionen und ATP zu Oxyluciferin und  $CO_2$  durch das Enzym Luciferase. Die dabei frei werdende Energie in Form von Licht korreliert mit der ATP-Menge.



Für den ATP-Detektionsssssay wurden frisch isolierte PMBZ,  $CD4^+$  oder  $CD8^+$ -T-Zellen für drei Tage in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten als Doppelansatz kultiviert. Die Durchführung des ATP-Detektionsassays erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zu den stimulierten Zellen (250  $\mu$ l) wurden 50  $\mu$ l Zellysepuffer gegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Je 100  $\mu$ l des erhaltenen Lysats wurde in weiße Luminometerplatten überführt, mit 100  $\mu$ l AMR Plus Substrat versetzt und für zwei Minuten bei RT belassen. Anschließend erfolgte die Detektion der Lumineszenz im Plattenluminometer der Firma Tecan bei 22°C. Die Lumineszenzwerte jeder Vertiefung wurden für 1000 msek dreifach bestimmt und gemittelt. Die gemessene Intensität des emittierten Lichts wird in relativen Lichteinheiten RLU (*relative light unit*) angegeben und ist der ATP-Menge direkt proportional. Die RLU wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Excel als Balkendiagramm dargestellt.

## 4.6 ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) basiert auf einer spezifischen Antigenerkennung durch Antikörper. Zur quantitativen Bestimmung von sezerniertem humanen IL-2 wurde in dieser Arbeit ein Sandwich-Enzym-Immunoassay der Firma R&D Systems verwendet. Dieser bestand aus bereits vorgefertigten Mikrotiterplatten mit einer Beschichtung aus einem monoklonalen Antikörper spezifisch für IL-2. Nach Probenzugabe kann ein darauffolgend zugesetzter Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter polyklonaler Antikörper das gebundene IL-2 erkennen und ebenfalls binden. Das Enzym setzt das farblose Substrat Tetramethylbenzidin um, sodass ein farbiges Produkt entsteht, dessen Farbintensität photometrisch gemessen werden kann und direkt proportional zur Menge an gebundenem IL-2 ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion von humanem IL-2 von primären T-Zellen nach entsprechender Stimulation analysiert. Die Kulturüberstände wurden nach Zentrifugation abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Jede Versuchsreihe enthielt eine Negativkontrolle und Standardprotein in absteigender Konzentration zur Anfertigung einer Standardkurve. Es wurden  $100\ \mu\text{l}$  Assay-Puffer in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden  $100\ \mu\text{l}$  Standardprotein in verschiedenen Konzentrationen oder Probe in verdünnter und unverdünnter Form in die Kavitäten gegeben und der Ansatz bei RT für zwei Stunden inkubiert, um die Bindung des IL-2 an die Antikörper zu ermöglichen. Es folgten drei gründliche Waschschriffe mit dem vorgegebenen Waschpuffer. In jede Vertiefung wurden  $200\ \mu\text{l}$  Meerrettich-Peroxidasegekoppelte polyklone anti-IL-2 AK gegeben und der Ansatz erneut für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschriffen wurde das Substrat zugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit  $50\ \mu\text{l}$  Stopplösung beendet und die Umsetzung zum farbigen Substrat wurde photometrisch bei  $450\ \text{nm}$  im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Unter Verwendung der Standardwerte wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer die Quantifizierung des sezernierten IL-2 durch die Zellen möglich war.

## 4.7 Genexpressionsstudien mittels quantitativer Real-Time PCR

### 4.7.1 RNA-Extraktion

$2-4 \times 10^6$  Zellen wurden nach der Stimulation in  $15\ \text{ml}$ -Röhrchen überführt und bei  $1400\ \text{rpm}$  für 5 Minuten sedimentiert. Die Zellen wurden einmal mit  $1\ \text{ml}$  PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem Nucleospin<sup>®</sup> RNA II-Kit der Firma Macherey-Nagel. Die pelletierten Zellen wurden hierbei vorsichtig in  $350\ \mu\text{l}$  RA1-Puffer mit  $3,5\ \mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Lysate auf eine Filtersäule gegeben und abzentrifugiert ( $11000 \times g$ ,  $1\ \text{min}$ ). Der Durchlauf wurde mit 70%-igem Ethanol versetzt und zur Bindung der RNA über eine Nucleospin<sup>®</sup> RNA II-Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 30 Sekunden bei  $11000 \times g$  wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und durch Zusatz von  $350\ \mu\text{l}$  MDB (*membrane desalting buffer*)-Puffer und anschließender Zentrifugation ( $11000 \times g$ ,  $1\ \text{min}$ ) zur Erhöhung der RNA-Ausbeute entsalzt. Zur Entfernung von eventuell vorhandener DNA wurde die Silikamembran für 15 Minuten mit  $95\ \mu\text{l}$  DNase inkubiert. Nachfolgend wurde die Säule mit  $200\ \mu\text{l}$  RA2-Puffer gewaschen ( $11000 \times g$ ,  $30\ \text{sek}$ ). Es folgten 2 weitere

Waschschritte mit 600 (11000 x g, 30 sek) bzw. 250 µl RA3-Puffer. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 11000 x g erfolgte die Elution der RNA indem 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und diese bei 11000 x g erneut für 1 Minute zentrifugiert wurde. Die Menge der isolierten RNA wurde mittels Nanodrop bestimmt. Bis zur Verwendung wurde das Material bei -20°C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

### **4.7.2 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA**

Mittels der Reversen Transkriptase (RT)-PCR wird mRNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Zur Herstellung von cDNA wurden 1 µg der isolierten RNA eingesetzt und auf 12,5 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Zum Ansatz wurde 1 µl Random Primer gegeben und für 5 Minuten im PCR-Gerät bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden 4 µl 5X PCR-Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl RNase-Inhibitor (RNasin) sowie 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C im PCR-Gerät inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **4.7.3 Quantitative Real-Time PCR**

Die quantitative Real-Time (qRT) PCR beruht auf einer herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion und eignet sich für die quantitative Bestimmung der Genexpression spezifischer Zielgene mit bekannter Sequenz. Die Quantifizierung erfolgt über den so genannten 'Starting Quantity' (SQ)-Wert, der die Anzahl an mRNA-Kopien zu Beginn der qRT-PCR angibt. Die Normalisierung der Expressionsergebnisse erfolgte über den Bezug der Zielgenexpression auf ein konstant exprimiertes Haushaltsgen, in unserem Fall die humane Polymerase II (HuPo) oder Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH). Für die PCR wurden dem Zielgen entsprechend spezifische Primerpaare verwendet. Die Primer wurden in 50 µl Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurden die Primer (100 µM) auf Eis aufgetaut und mit Wasser auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Es wurden 2 µl genomische DNA mit 10 µl 2X ImmoMix<sup>TM</sup>/ImmoMix<sup>TM</sup> Red, 2 µl ROX Referenz Puffer, 0,4 µl SYBR<sup>®</sup> Green, 1 µl der jeweiligen Primer, 0,6 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 3 µl Wasser auf Eis versetzt. Der fluoreszierende Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green ermöglicht im iCycler die direkte Verfolgung der vermehrten Zielgen-kodierenden cDNA. Das Temperaturprofil des PCR-Programms ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: PCR-Programm

Bezeichnung	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Denaturierung/Hot Start	05:30	95	1
Denaturierung	00:15	95	40
Primeranlagerung	00:15	X	
Elongation/Synthese	00:10	72	
Schmelzkurve	00:10	55+ 0,5 (bis zu 95)	80
Abkühlung	∞	20	1

Abkürzungen: X= 60°C für Hupo, G6PDH, IL-2, GM-CSF; 58°C für IFN $\gamma$

Für die Standardverdünnungsreihe wurde bei jeder Messung cDNA eines quantifizierten DNA-Standards mitgeführt. Zur Erstellung des Standards wurde zunächst RNA aus expandierten PHA-Blasten isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation des entsprechenden Genabschnittes, wurde die DNA routinemäßig im Agarose-Gel kontrolliert und wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben in kompetente Bakterien kloniert. Die Plasmid-DNA wurde mittels Miniprep gewonnen und dessen Konzentration im Nanodrop bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde zur Herstellung einer Standardverdünnungsreihe verwendet. Alle Proben und Standards wurden in zwei Replikaten gemessen.

Die im Anschluss an den letzten Amplifikationszyklus hergestellte Schmelzkurve reflektiert die schrittweise Erhitzung der Probe auf 95°C nach kontinuierlicher Fluoreszenzmessung. Wird die Schmelztemperatur der DNA erreicht, kommt es zur Abnahme der Fluoreszenz. Die Software erstellt die erste negative Ableitung  $-d(\text{RFU})/dT$  der gemessenen Fluoreszenz und trägt diese gegen die Temperatur auf. Der plötzliche Abfall der Fluoreszenz durch das Aufschmelzen der DNA nach Überschreiten der Schmelztemperatur stellt sich so als Spitze (*Peak*) dar. Die Schmelzkurve wird als Kontrolle für die Amplifikation eines Produkts verwendet.

Nach der PCR-Reaktion erfolgte die Auswertung der Rohdaten unter Benutzung der iCycler-Software<sup>TM</sup> Version 3.1 der Firma Bio Rad. Der Schwellenwertzyklus (*Thresholdcycle* [ $C_T$ ]) wurde ermittelt aus der Darstellung der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl. Dieser Wert ist definitionsgemäß die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen dem  $C_T$  und dem Logarithmus der Kopienanzahl (*log Starting Quantity (SQ), copy number*). Anhand der aus der Standardverdünnungsreihe erstellten Regressionsgeraden der  $C_T$ -Werte wurde die

Kopienanzahl der Zielgen-DNA in den Proben bestimmt. Unter Berücksichtigung der Expression des Kontrollgens wurde die relative Anzahl an mRNA-Kopien bzw. die Expressionsrate des Zielgens vor der qRT-PCR ermittelt:

$$\text{Expressionsrate} = \text{Kopienzahl (SQ) Zielgen} / \text{Kopienzahl (SQ) Kontrollgen}$$

### **4.8 Generierung von Fusionsproteinen**

In dieser Arbeit wurden neben Antikörpern für die Stimulation von Zellen auch Fusionsproteine verwendet. Bis auf den Leucin-Zipper LZ-CD95L, der freundlicherweise von Inna Lavrik aus Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde, wurden alle Fusionsproteine im Labor hergestellt. In den meisten Fällen waren entsprechende Glycerol-Stocks bei  $-80^{\circ}\text{C}$  vorhanden. Ausgangsmaterial für CD95-TNC-Fc war Plasmid-DNA, die von Harald Wajant aus Würzburg zur Verfügung gestellt wurde.

#### **4.8.1 Transformation kompetenter Bakterien**

Zur Transformation wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien verwendet. Die Transformation erfolgte mit leichter Modifikation nach der von Hanahan (1983) beschriebenen Methode.

50  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-2  $\mu\text{l}$  Vektor-DNA versetzt. Während der nachfolgend 30-minütigen Inkubation auf Eis adsorbiert die DNA an die Bakterien. Die eigentliche Transformation der DNA erfolgt durch Hitzeschock für 30 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$ . Nach weiteren zwei Minuten Inkubation auf Eis wurden 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zum Transformationsansatz gegeben. Dieser wurde für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  belassen, um eine Regeneration der Bakterien und die Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz zu ermöglichen. 50 bzw. 200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden auf Antibiotikahaltige LB(Luria Bertani)-Agarplatten mit X-Gal ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Anzucht einer weißen Einzelkolonie von der bebrüteten Platte erfolgte in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.8.2 Anlegen von Glycerol-Stocks**

Das Anlegen von Glycerol-Stocks diente der Aufbewahrung transformierter Bakterien. Es wurden Bakteriensuspensionen verwendet, die wie unter 4.8.1 beschrieben über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen wurden. Die Bakteriensuspension wurde bei 2000 rpm für 5 Minuten sedimentiert und in 500 µl Antibiotika-haltiges LB-Medium aufgenommen. Dem Ansatz wurde 500 µl Glycerol zugesetzt und die angelegten Stocks bei -80°C gelagert.

#### **4.8.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA**

##### Miniprep

Ausgangsmaterial für die Gewinnung von kleinen Mengen Plasmid-DNA waren 5 ml Bakteriensuspensionen. Die über Nacht vermehrten Bakterien wurden bei 2000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und das Bakteriensediment in 250 µl RA1-Puffer resuspendiert und lysiert. Nachdem das Bakterienlysat in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 250 µl RA2-Puffer versetzt wurde, wurde vorsichtig gemischt und der Ansatz für 5 Minuten bei RT inkubiert. Es wurden 300 µl Neutralisationspuffer (RA3) zum Ansatz gegeben und der Ansatz abermals durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach Zentrifugation bei 11000 rpm für 10 Minuten bei 4°C wurde das klare Lysat auf vorbereitete NucleoSpin<sup>®</sup> Plus Säulen gegeben, die auf neue Reaktionsgefäße platziert wurden. Die nachfolgende Zentrifugation (11000 rpm, 10 min) diente der DNA-Bindung an die Säule. Der erhaltene Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 600 µl Waschpuffer (RA4) gewaschen (11000 rpm, 10 min). Zur Trocknung der Silikamembran wurde die Säule abermals für 2 Minuten bei 11000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es folgte die Elution der DNA durch die Zugabe von 50 µl destilliertem Wasser, einer kurzen Inkubation für eine Minute bei RT und nachfolgender Zentrifugation bei 11000 rpm für 2 Minuten.

##### Maxiprep

Zur Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurden über Nacht 350 ml-Kulturen angezchtet. Die Bakteriensuspension wurde bei 5000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und das Sediment in 12 ml RNase-haltigem Lysepuffer (S1) resuspendiert. Nach Überführung des Lysats in neue Zentrifugationsröhrchen wurde 12 ml Lysepuffer (S2) zugesetzt, vorsichtig geschwenkt und der Ansatz für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 12 ml Neutralisationspuffer (S3) zugefügt und der Ansatz für 15 Minuten auf Eis belassen. Das

Bakterienlysat wurde 40 Minuten bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Zwischenzeitlich erfolgte die Equilibrierung der NucleoBond®AX500-Säulen durch Zugabe von 6 ml Equilibrierungspuffer (N2). Das nach der Zentrifugation erhaltene Lysat wurde zunächst filtriert und nachfolgend auf die vorbereitete Säule gegeben, um die Bindung der DNA an die Säulenmatrix zu gewährleisten. Die Säule wurde mit 32 ml Waschpuffer (N3) gewaschen und die DNA durch die Zugabe von 15 ml Elutionspuffer (N5) eluiert. Das erhaltene Eluat wurde mit 11 ml Isopropanol versetzt, leicht geschwenkt und bei 13000 rpm für eine Stunde zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 5 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, 15 min) und der Überstand verworfen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde bei RT getrocknet, in 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen und bei 4°C gelagert.

#### **4.8.4 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration**

Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Nanodrop Spektrometers ermittelt. Es wurde 1 µl Probe aufgetragen und anhand der Absorption bei 260 nm die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet. Das Verhältnis der Absorption 260/280 wurde gleichzeitig ermittelt und zeigte die Reinheit der DNA oder RNA in der Probe an.

#### **4.8.5 Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um aufgereinigte DNA-Plasmide zu überprüfen. Es wurden 1 µg der zu untersuchenden DNA mit jeweils 0,5 µl der entsprechenden Restriktionsenzyme und 1 µl des geeigneten Reaktionspuffers versetzt. In einigen Fällen wurde 1 µl BSA (10X) hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf 10 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Analyse wurde nach Auftrennung der Fragmente im Agarose-Gel vorgenommen.

#### **4.8.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus dem Restriktionsverdau nach ihrer Größe erfolgte mit 0,7-2%-igen Agarose-Gelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, wandert die DNA entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld Richtung Anode.

Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1X TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid versetzt und in eine geeignete Gelkammer gegossen. In das noch flüssige Gel wurde der gewünschte Probenkamm eingesetzt. In die Vertiefungen des polymerisierten Agarose-Gels wurden 3,5 µl DNA-Molekulargewichtsstandard gegeben und die DNA-Proben nach Zugabe von 1/10 Auftragspuffer ebenfalls aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt im elektrischen Feld mit 1X TAE-Puffer als Laufpuffer und wurde mit einer Spannung zwischen 70 und 100 Volt durchgeführt. Die Auswertung der Gele wurde auf dem UV-Tisch zur Visualisierung der durch interkaliertes Ethidiumbromid sichtbaren DNA mit angeschlossener Kamera und PC vorgenommen.

#### **4.8.7 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen**

Die in dieser Arbeit eingesetzten Fusionsproteine wurden in adhärent wachsenden HEK293-Zellen hergestellt. Diese wurden mit dem zuvor präparierten und aufgereinigten Expressionsplasmid mittels Elektroporation transient transfiziert. Die Fusionsproteine konnten nachfolgend aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden.

Zur Herstellung großer Mengen Fusionsprotein wurden HEK293-Zellen in bis zu 16 Dreibodenflaschen in DMEM-Medium mit 10% FKS und Antibiotika expandiert. Konfluente Kulturen wurden am Tag der Transfektion mit 50 ml 37°C-warmen Trypsin/EDTA pro Flasche abgelöst und in zwei 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden mit DMEM-Medium auf 50 ml aufgefüllt, bei 1400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und die sedimentierten Zellen einmal mit 50 ml DMEM-Medium gewaschen. Nachfolgend wurden alle zu transfizierenden HEK293-Zellen in ein 50 ml Röhrchen vereinigt, erneut zweimal mit 50 ml DMEM-Medium gewaschen (1400 rpm, 5 min) und mit DMEM-Medium auf eine Dichte von  $100 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Für die Elektroporation wurden  $20 \times 10^6$  Zellen (200 µl Zellsuspension) in einer GenePulser-Küvette mit 20 µg Expressionsplasmid-DNA



bzw. 10 µg Kontrollvektor (EGFP-C1) vermischt. Die Transfektion erfolgte im Gene Pulser II (mit RF Modul) mit einer Frequenz von 40 kHz, 5 Pulsen pro Sekunde, bei 300 Volt, 100% Modulation und einer Pulsdauer von 5 msec. Die elektroporierten Zellen wurden in Zellkulturplatten mit 10 ml Freestyle-Medium überführt und für 4 bis 5 Tage bei 37°C im Brutschrank belassen. Am Tag nach der Elektroporation wurde die Transfektionseffizienz anhand der Expression des Kontroll-EGFP im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

### **4.8.8           Aufreinigung von Fusionsproteinen**

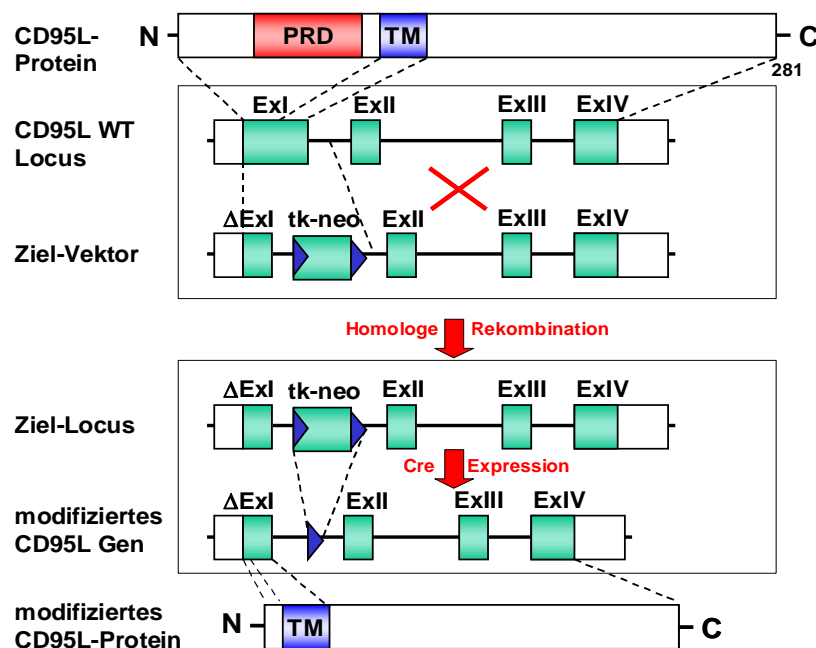
Die von den HEK293-Zellen exprimierten Fusionsproteine wurden aus dem Kulturüberstand mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Als Säulenmatrix wurde Protein A-Sepharose verwendet, welches die Fusionsproteine spezifisch über ihr fusioniertes Fc-Fragment bindet.

Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Protein A-Sepharose-Säule mit Startpuffer äquilibriert und mehrfach gewaschen. Die Zellkulturüberstände der transfizierten HEK293-Zellen wurden gesammelt und nach Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 Minuten in eine 1 l Glasflasche überführt, auf pH 7 eingestellt und nachfolgend auf die äquilibrierte Säule gegeben. Nach mehrfachem Waschen der Säule zur Entfernung unspezifisch zurückgehaltener Proteine, wurde das gebundene Protein mit Elutionspuffer von der Säule in Sammelröhrchen eines Fraktionssammlers eluiert. Durch den in die Sammelröhrchen vorgelegten Neutralisationspuffer wurden die Eluate gleichzeitig neutralisiert. Die Elution des Fusionsproteins konnte mittels eines mit dem Fraktionssammler verbundenen UV-Messgeräts mit Schreiber verfolgt werden. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mittels Amicon Ultra-15-Konzentrator ankonzentriert und in PBS umgepuffert. Das Fusionsprotein wurde üblicherweise auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml in PBS gebracht, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Routinemäßig wurde das aufgereinigte Fusionsprotein mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung auf seine Reinheit überprüft. Die Bioaktivität von CD95L-Konstrukten wurde durch Induktion von Apoptose in CD95-sensitiven Zellen ermittelt, während die Aktivität der CD95-Konstrukte durch die Inhibition der CD95-vermittelten Lyse von Jurkat Zellen (nicht gezeigt) oder AICD von expandierten PHA-Blasten kontrolliert wurde.

## 4.9 Versuchstiere

### 4.9.1 Herstellung von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen

In dieser Arbeit wurde zur detaillierteren Analyse des retrograden CD95L-Signalweges mit der phänotypischen Charakterisierung von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen begonnen. Die k.o./k.i.-Mutanten wurden ursprünglich von Dr. Martin Zörnig aus Frankfurt hergestellt (Abb. 4.1). Durch das zielgerichtete Verfahren der homologen Rekombination (oder *gene targeting*) in embryonalen Stammzellen (ES) wurde das Exon 1 (ExI) und ein kurzer Bereich des folgenden Introns des WT-CD95L durch ein deletiertes Exon 1 ( $\Delta$ ExI) und eine mit *loxP*-Sequenzen flankierte Thymidinkinase-Neomycin(tk-neo)-Kassette ersetzt. Die selektierten ES wurden in Blastozysten injiziert, die in eine Scheinschwangere Maus transferiert wurden. Durch Rückkreuzungen wurden schließlich Mäuse erhalten, die einen modifizierten CD95L tragen, dem die Aminosäuren 1-76 fehlen. Die tk-neo-Selektionskassette wurde durch die Verpaarung mit CMV-Cre-„deleter“-Mäusen beseitigt.



**Abb. 4.1: Generierung von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen.** Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Zörnig Mäuse generiert, deren CD95L nur aus einer Transmembrandomäne (TM) und einem extrazellulären C-terminalen Teil bestehen (aa 77-281). Die Deletion der tk-neo-Kassette erfolgte durch Verpaarung der CD95L $\Delta$ intra-tk-neo-Mäuse mit Cre-exprimierenden Mäusen. Ex=Exon,  $\Delta$ Ex=deletiertes Exon, tk=Thymidinkinase, neo=Neomycin-Resistenzkassette, blaue Pfeile=*loxP*-Sequenzen.

### 4.9.2 Zucht

Da das Gesundheitszeugnis der CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse von Martin Zörnig aus Frankfurt Infektionen mit einigen pathogenen und fakultativ pathogenen Erregern anzeigte, wurde zur Sanierung der Zucht ein Embryonen-Transfer mit gefrorener mutierten Embryonen im „EMMA-European Mouse Mutant Archive“ in München durchgeführt. Hierzu wurden schwangeren mutierten Weibchen Embryonen entnommen und diese in pathogenfreie, scheinträchtige Ammentiere überführt. Der Ausgangspunkt unserer Zucht nach dem Transfer waren vier heterozygote Männchen und ein heterozygoten Weibchen. Diese wurden in unseren Tierställen mit Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) gekreuzt. Die so generierten Würfe enthielten heterozygote und Wildtyp-Tiere, wovon die heterozygoten Nachkommen nach dem Erreichen der Geschlechtsreife untereinander weiter verpaart wurden. Die Entwicklung der Mauslinie CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i erfolgte durch Geschwisterverpaarung hetero- und schließlich homozygoter Tiere. Im Tierstall wurde parallel eine CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mauslinie und eine C57BL/6-Mauslinie aufrechterhalten, um in Experimenten mutierte Tiere mit Wildtyp-Mäusen vergleichen zu können.

### 4.9.3 Genotypisierung

Zur Genotypisierung von Mäusen wird genomische DNA benötigt, die aus ca. 5 mm Schwanzspitze vier bis fünf Wochen alter Mäuse extrahiert wurde. Die gekappten Schwanzspitzen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 577,5  $\mu$ l Gewebelysepuffer versetzt und über Nacht bei 56°C im Heizblock proteolytisch verdaut. Nachdem der Verdau in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben wurde, wurde zur Extraktion genomischer DNA 1 ml Roti<sup>®</sup>-Phenol C/I zugesetzt und der Ansatz 10 x vorsichtig invertiert. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 13000 rpm für 5 Minuten nach der die obere wässrige Phase mit der isolierten DNA in ein neues Reaktionsgefäß transferiert wurde. Dem Ansatz wurde zur Präzipitation der DNA 750  $\mu$ l Ethanol (absolut) zugefügt und erneut 10 x invertiert. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 40 Minuten bei 4°C wurde die pelletierte genomische DNA mit 100  $\mu$ l 70%-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet, in 20  $\mu$ l destilliertem Wasser aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Die Genotypisierung der Versuchsmäuse bezüglich ihres CD95L-Status wurde mit extrahierter genomischer DNA mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Für die PCR wurde ein spezifisches Primerpaar verwendet, welches uns von der Arbeitsgruppe um Martin Zörnig vorgeschlagen wurde (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Verwendete Primer für die Genotypisierung

Name	Sequenz (5'-3')
LoxP-ctrl-for	5'-CCATGAAATCATTTTATGGTTGGGG
LoxP-ctrl-rev	5'-GAACAAGACACAAAATTGATTTTCATC

Abkürzungen: ctrl = *control* (Kontrolle); for = *forward*; rev = *reverse*

Die Primer wurden in 50 µl Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurden die Primer (Stocklösung, 100 µM) auf Eis aufgetaut und auf eine Gebrauchskonzentration von 10 µM gebracht, indem sie 1/10 mit Wasser verdünnt wurden. Es wurden 1 µl genomische DNA mit 2,5 µl PCR-Puffer (10X), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl der jeweiligen Primer, 1 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase sowie 17,25 µl Wasser auf Eis versetzt. Als Kontroll-DNA diente extrahierte DNA aus Schwanzbiopsien von Wildtyp-, homozygoten und heterozygoten Versuchstieren, die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Martin Zörnig zur Verfügung gestellt wurden. Die PCR-Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert und in das PCR-Gerät gestellt. Nach Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 Minuten erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen. Nach einer initialen Denaturierungsphase bei 94°C für eine Minute fand die Bindung der Primer bei 57°C für eine Minute statt. Die Elongationsphase erfolgte bei 72°C für eine Minute. Die PCR wurde durch eine zehnminütige Synthesephase bei 72°C abgeschlossen. Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Auswertung der Genotypisierung wurde die Auftrennung der DNA-Fragmente auf dem UV-Tisch visualisiert und abgeleitet.

#### 4.9.4 Präparation lymphoider Organe

Die Versuchstiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Maus wurde gewogen, mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank auf dem Rücken liegend fixiert. Nach Öffnung der Bauch- und Brusthöhle wurden Milz und Thymus sowie inguinale (Leiste) und mesenteriale (Darm) Lymphknoten steril entnommen. Die Organe wurden mit einem Glasstempel durch Metallsiebe gedrückt und in 10 ml RPMI-Medium mit 10% FKS homogenisiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden in

15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen (1400 rpm, 5 min), das Sediment in RPMI-Medium mit HEPES (10 mM), L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 10% FKS (v/v) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### **4.9.5 Durchflußzytometrische Analyse muriner lymphoider Zellen**

Die Analyse von Oberflächenmolekülen im Durchflußzytometer wurde zur Charakterisierung der Zellzusammensetzung in verschiedenen Organen und zur Bestimmung des Aktivierungsstatus stimulierter Splenozyten durchgeführt. Die Färbung der Zellen erfolgte mit spezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD19, CD11b, CD25 und CD69 wie in Kapitel 4.4.2 für humane Lymphozyten beschrieben.

### **4.9.6 Stimulation muriner T-Zellen**

Für Stimulationsexperimente wurden Splenozyten verwendet, die durch Homogenisierung der Milzen gewonnen wurden. Die Zellen wurden auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium eingestellt und auf Zellkulturplatten gegeben, die mit anti-CD3 mAK 2C11 in An- und Abwesenheit von CD95Fc in den angegebenen Konzentrationen beschichtet waren. Die Beladung der Platten mit den Stimuli erfolgte, wie für humane primäre T-Zellen beschrieben, für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Die Splenozyten wurden über Nacht in RPMI-Medium mit HEPES (10 mM), L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) und 10% FKS (v/v) kultiviert und nachfolgend für durchflußzytometrische Analysen verwendet.

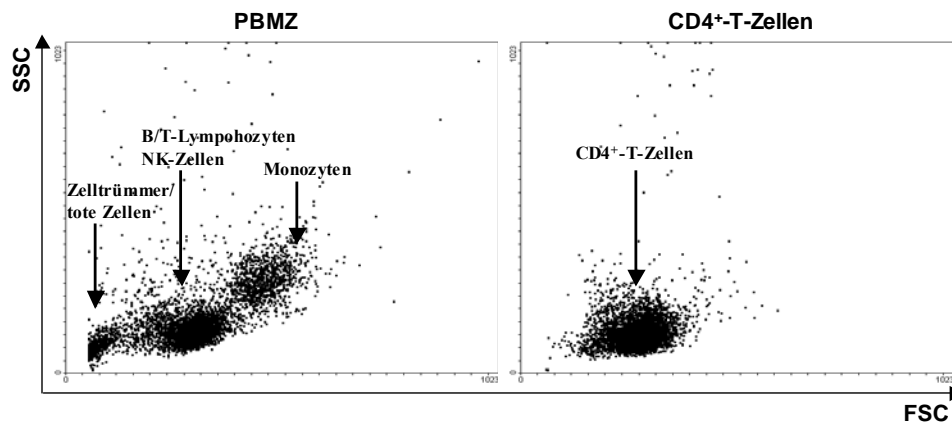
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Retrograde Signaltransduktion des CD95L in primären T-Zellen

CD95L löst als prototypischer Todesfaktor apoptotischen Zelltod in CD95-sensitiven Zellen aus. In jüngerer Zeit wurde jedoch für verschiedene Mitglieder der TNF-Familie eine bi-direktionale Signalgebung beschrieben, d.h. eine Signalweiterleitung in die Rezeptor-tragende Zelle wie auch eine retrograde Signalgebung durch die Liganden. Auch für CD95L gibt es Hinweise auf eine derartige reverse Signaltransduktion, insbesondere in T-Zellen. In der Literatur finden sich jedoch zum Teil widersprüchliche Daten. So wurde zum einen eine komplette CD95L-induzierte Blockierung (134) und zum anderen eine Steigerung (131) der TZR-vermittelten Aktivierung beschrieben. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe deuteten eher in Richtung einer inhibitorischen Wirkung des CD95L auf die T-Zellproliferation hin. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher eine genaue Analyse und Charakterisierung der reversen Signalübertragung durch den CD95L in frisch isolierten humanen T-Lymphozyten.

#### 5.1.1 Zusammensetzung und Reinheit isolierter Zellpopulationen

Zur Untersuchung frisch isolierter humaner PBMZ sowie von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden zunächst PBMZ mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gesunder Spender gewonnen. Je nach Fragestellung folgten weitere Aufreinigungsschritte zur Isolation von CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durch magnetische Negativ-Separation. Vor den Versuchsansätzen wurden die Zellpopulationen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert. Anhand der Streulichteigenschaften war erkennbar, dass die PBMZ neben Lymphozyten wie erwartet Monozyten, tote Zellen und Zelltrümmer enthielten. Nach magnetischer Separation waren diese Kontaminationen in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen kaum noch nachzuweisen (**Abb. 5.1.1**). Die Auswertung der individuellen Analysen ergab, wie in Tabelle 5.1.1 exemplarisch für eine Separation zusammengestellt, eine Zusammensetzung der PBMZ-Population aus 24,4% Monozyten (CD14), 35% CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (CD4), 21,6% CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CD8), 4,4%  $\gamma\delta$ -T-Zellen (TZR $\gamma/\delta$ ), 5,7% NK-Zellen (CD56) und 8,2% B-Zellen (CD19).



**Abb. 5.1.1: Durchflußzytometrische Analyse von PBMZ und MACS-isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.** PBMZ wurden aus Lymphozytenkonzentraten gesunder Spender isoliert. Durch magnetische Separation wurden aus PBMZ CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gewonnen. Die Zellen wurden durchflußzytometrisch nach Granularität (SSC) und Größe (FSC) analysiert.

Nach magnetischer Negativ-Separation wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit einer relativen Reinheit von 98% gewonnen, bei nur geringer Verunreinigung durch Monozyten,  $\gamma\delta$ -T-, B- und NK-Zellen. Die Negativ-Isolation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war in der Regel weniger effizient und ergab eine Reinheit von 85-90%. Die Verunreinigung bestand überwiegend aus  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie wenigen Monozyten, B-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (**Tab. 5.1.1**).

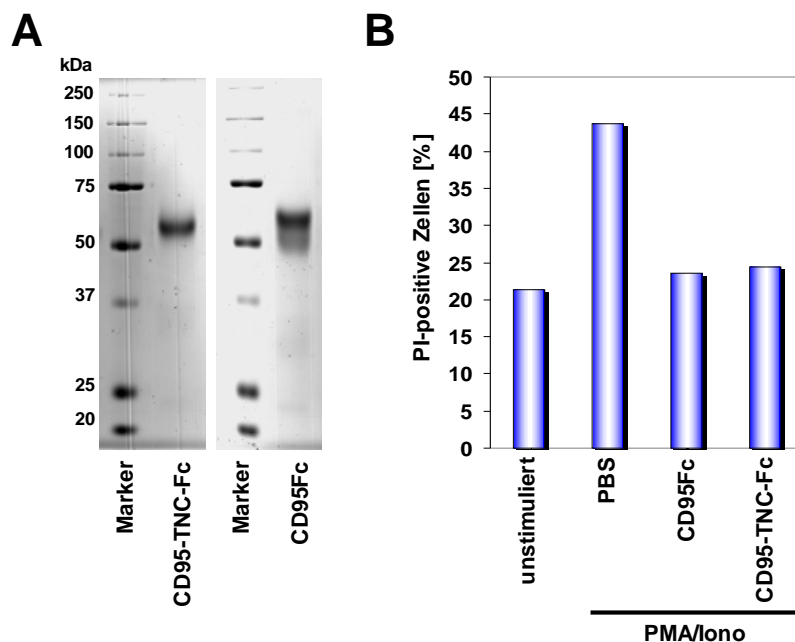
**Tabelle 5.1.1: Prozentuale Zusammensetzung von PBMZ, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.**

	PBMZ	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen
CD3 <sup>+</sup>	66,9%	98,9%	97,1%
CD4 <sup>+</sup>	35,0%	97,8%	1,2%
CD8 <sup>+</sup>	21,6%	0,5%	85,6%
CD14 <sup>+</sup>	24,4%	1,1%	2,6%
CD19 <sup>+</sup>	8,2%	0,6%	1,1%
CD56 <sup>+</sup>	5,7%	0,7%	0,8%
TZR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup>	4,4%	1,2%	5,5%

### 5.1.2 Überprüfung der Funktionalität von CD95Fc und CD95-TNC-Fc

Die Stimulation von CD95L auf den T-Zellpopulationen sollte mit verschiedenen Fusionsproteinen oder Antikörpern erfolgen. Die Fusionsproteine CD95Fc und CD95-TNC-Fc wurden im Labor nach Expression in HEK293-Zellen über den Fc-Anteil aufgereinigt und in PBS umgepuffert. Anschließend wurde das Molekulargewicht und die Reinheit der Eluate im SDS-Gel überprüft. Pro Spur wurden dabei 5 µg Protein aufgetragen und die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Das SDS-Gel der Fusionsproteine zeigt je eine Bande bei ca. 60 kDa und keine wesentlichen Verunreinigungen (**Abb. 5.1.2A**).

Zur Überprüfung der biologischen Funktionalität wurden 14 Tage alte expandierte AICD-sensitive PHA-Blasten verwendet. Diese wurden für zwei Tage mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) in An- und Abwesenheit von 50 µg/ml löslichem CD95Fc oder CD95-TNC-Fc inkubiert. Die Induktion von Zelltod wurde nach Färbung der Zellen mit Propidiumjodid (PI) durchflußzytometrisch bestimmt. Die eindeutige Reduktion des AICD durch beide Fusionsproteine belegt die biologische Aktivität der Reagenzien im Sinne einer Blockade der CD95L/CD95-Interaktion (**Abb. 5.1.2B**).

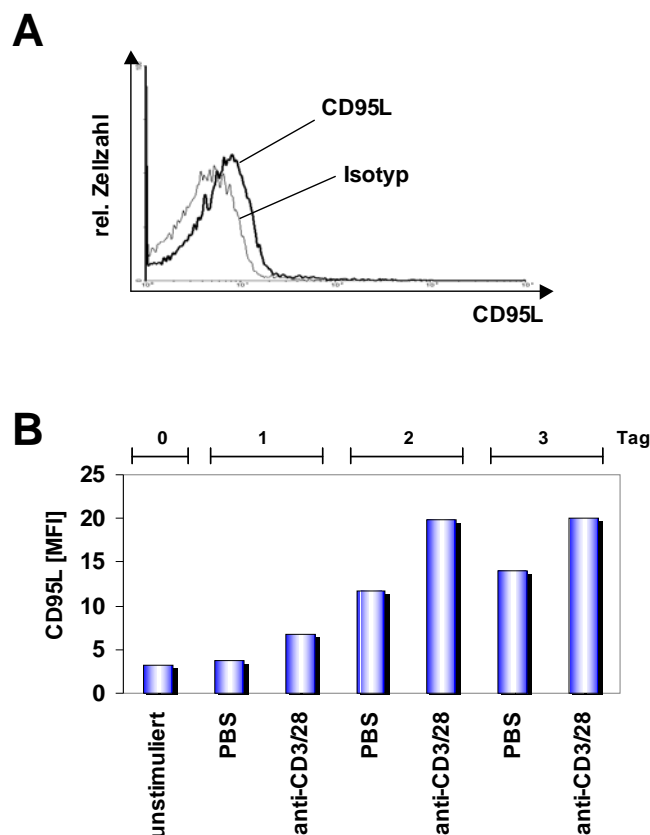


**Abb. 5.1.2: Überprüfung der Fusionsproteine CD95Fc und CD95-TNC-Fc auf Reinheit und Funktionalität.** (A) Die Fusionsproteine CD95Fc und CD95-TNC-Fc wurden im Gel auf ihre Reinheit überprüft. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie visualisiert. (B) PHA-expandierte Zellen wurden mit PMA/Ionomycin (PMA/Iono) in An- und Abwesenheit der löslichen Fusionsproteine behandelt. Nach zweitägiger Inkubation wurde eine Zelltodanalyse mit PI durchgeführt.



### 5.1.3 Expression von CD95L auf primären humanen T-Zellen

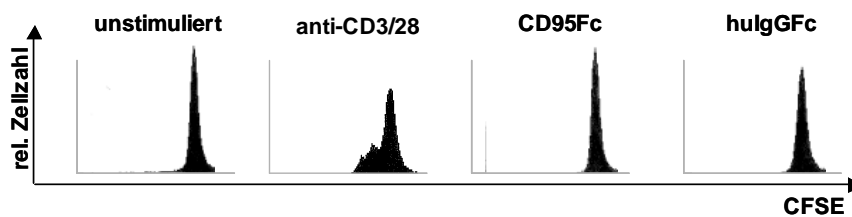
Es ist bekannt, dass im Laufe der Aktivierung von T-Lymphozyten CD95L auf der Zelloberfläche erscheint. Zur Untersuchung der bi-direktionalen Signaltransduktion in primären humanen T-Zellen war es jedoch erforderlich, CD95L auch auf „ruhenden“ Zellen nachzuweisen. In Vorarbeiten konnte CD95L mittels konfokaler Mikroskopie auf der Oberfläche frisch isolierter T-Zellen detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es ebenfalls gelungen, die CD95L-Expression mittels eines direkt markierten anti-CD95L mAK reproduzierbar nachzuweisen (**Abb. 5.1.3A**). Im Vergleich zur Isotypkontrolle war stets eine schwache CD95L-Färbung zu beobachten. Im Gegensatz zur bisherigen „Lehrmeinung“ ist CD95L demnach auf der Oberfläche von frisch isolierten ( $CD4^{+}$ ) T-Zellen vorhanden. Dass diese geringe Expression für verschiedene Prozesse im Rahmen der T-Zellreifung und -aktivierung bedeutsam ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt. Die Zunahme der CD95L-Expression nach CD3/CD28-Stimulation für 1-3 Tage wurde ebenfalls nachgewiesen. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten ([MFI]) lagen dabei deutlich über den auf ruhenden Zellen gemessenen Werten (**Abb. 5.1.3B**).



**Abb. 5.1.3: CD95L-Expression auf frisch isolierten (A) und stimulierten (B) humanen T-Zellen.** (A) CD95L wurde auf der Oberfläche primärer T-Zellen durchflußzytometrisch nachgewiesen (CD95L=schwarze Linie; Isotypkontrolle=graue Linie). (B) Frisch gereinigte T-Zellen wurden für 1-3 Tage mit anti-CD3/28 stimuliert. Gemessen wurde die Expression von CD95L mit und ohne Stimulation. [MFI]=mittlere Fluoreszenzintensität.

### 5.1.4 CD95L per se hat keinen Effekt auf frisch isolierte T-Zellen

Zur Analyse der retrograden Signaltransduktion in primären humanen T-Zellen wurde zunächst untersucht, ob die Zellen auf eine alleinige Ligation von CD95L reagieren. Hierfür wurden frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit CFSE markiert und in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml auf unbehandelte oder CD95Fc-beschichtete Platten gegeben. Als Kontrolle wurden anti-CD3/CD28 mAK oder huIgGFc ebenfalls immobilisiert.



**Abb. 5.1.4: CD95Fc beeinflusst das Proliferationsverhalten primärer T-Zellen nicht.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden durch magnetische Negativ-Separation gewonnen, mit dem Farbstoff CFSE beladen und in Zellkulturplatten mit Medium oder immobilisierten anti-CD3 (2 µg/ml) und CD28 (5 µg/ml) mAK oder CD95Fc bzw. huIgGFc Kontrollprotein (je 20 µg/ml) inkubiert. Nach dreitägiger Inkubation wurden die CFSE-markierten Zellen zur Analyse der Proliferation im Durchflußzytometer gemessen.

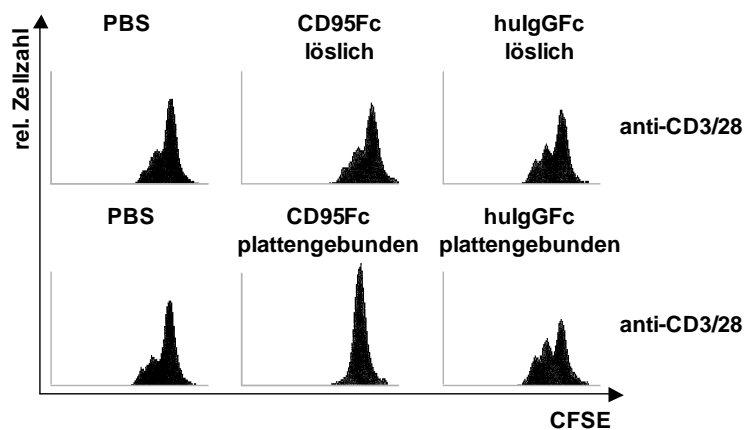
Nach dreitägiger Inkubation wurde die CFSE-Verdünnung in den T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. CD95L-stimulierte T-Zellen zeigten einen prominenten Peak hoher CFSE-Fluoreszenz, der vergleichbar war mit dem unstimulierter oder huIgGFc-behandelter Zellen. Im Gegensatz dazu führte die CD3/CD28-Stimulation zu einer deutlichen Proliferation und damit einer zellteilungsabhängigen Ausdünnung des Farbstoffes (**Abb. 5.1.4**). Die Ligation des CD95L induziert demnach per se keine Zellteilung in primären T-Lymphozyten.

### 5.1.5 CD95Fc inhibiert die Aktivierung primärer T-Zellen

Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass die reverse Signaltransduktion über Liganden der TNF-Familie und insbesondere auch über CD95L in T-Zellen, im Sinne einer Kostimulation manifest wird. Im Falle des CD95L war also davon auszugehen, dass Effekte erst nach oder im Rahmen einer Aktivierung der Zellen über den TZR/CD3-Komplex nachweisbar würden. Auch in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe waren die inhibitorischen Effekte der CD95L-Ligation bei einer „suboptimalen“ CD3/CD28-Aktivierung beobachtet worden.

### Immobilisiertes, nicht aber lösliches CD95Fc blockiert die T-Zellaktivierung

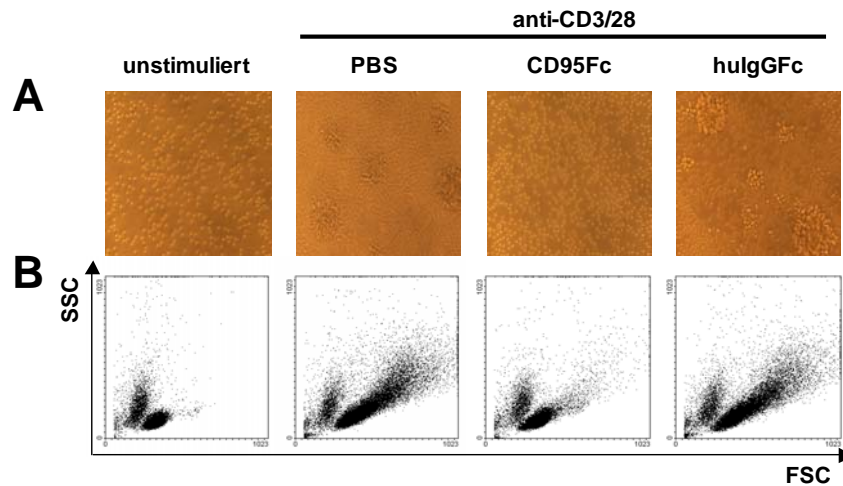
Die bisherigen Befunde der Arbeitsgruppe deuteten des Weiteren darauf hin, dass die retrograde Signaltransduktion über CD95L auch eine Kreuzvernetzung des CD95L erfordern könnte. Mit dem folgenden CFSE-Verdünnungsexperiment wurden die Vorbefunde bestätigt. Dazu wurden die Platten mit relativ geringen Mengen anti-CD3 und anti-CD28 mAK beschichtet. Die Fusionsproteine wurden entweder ebenfalls immobilisiert oder löslich eingesetzt. Das Ergebnis war eindeutig: die CD3/CD28-induzierte Aktivierung frisch isolierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurde durch plattengebundenem CD95Fc nahezu vollkommen blockiert, während das in löslicher Form zugegebene Fusionsprotein die Proliferation nicht beeinträchtigte (**Abb. 5.1.5**).



**Abb. 5.1.5: CD95Fc blockiert die CD3/CD28-induzierte Zellprogression in plattengebundener, nicht aber in löslicher Form.** MACS-separierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit CFSE markiert und mit 2 µg/ml immobilisierten anti-CD3 und anti-CD28 (5 µg/ml) mAK stimuliert. Die CD95L-Koligation erfolgte mit plattengebundenem oder löslichem CD95Fc (20 µg/ml). Die durchflußzytometrische Messung wurde nach drei Tagen durchgeführt.

### CD95Fc verhindert die Bildung von Blasten und Proliferationsclustern

Eine der ersten mikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen nach TZR/CD3/CD28-Stimulation ist die blastische Transformation der T-Zellen und die Bildung von Proliferationsclustern. Zur Untermauerung des oben dargestellten Befundes wurden die gereinigten T-Lymphozyten mit anti-CD3 in An- und Abwesenheit von CD95Fc behandelt. Nach drei Tagen wurde der Einfluss von CD95L auf die Aktivierung mikroskopisch untersucht und dokumentiert (**Abb. 5.1.6A**). Im Anschluss wurde die Bildung von Blasten in den Kulturen anhand der Streulichtparameter durchflußzytometrisch bestimmt (**Abb. 5.1.6B**).

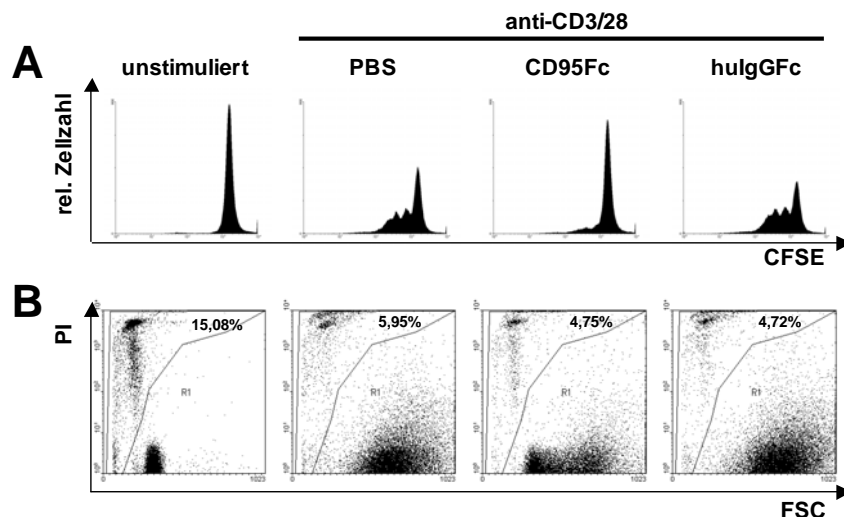


**Abb. 5.1.6: Einfluss von CD95Fc auf die Entstehung von Aktivierungsclustern und Blasten.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit immobilisierten anti-CD3/CD28 mAK +/- CD95Fc stimuliert und für drei Tage kultiviert. HuIgGFc wurde als Kontrolle in Kombination mit anti-CD3/CD28 mAK mitgeführt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert (A) oder durchflußzytometrisch nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) analysiert (B).

In den mikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Ligation von CD3 und CD28 zur Aktivierung der Zellen und damit zur Bildung von Proliferationsclustern führt. Die Kostimulation mit immobilisiertem CD95Fc (nicht aber mit huIgGFc) verhinderte dies vollkommen (**Abb. 5.1.6A**). Die Analyse der Zellen im Durchflußzytometer bestätigte diese Beobachtung. Große, granuläre Zellen waren nach CD3/CD28-Behandlung in den entsprechenden Kontrollen nachzuweisen, während die meisten Zellen in Anwesenheit des CD95Fc-Fusionsproteins klein und wenig granulär verblieben (**Abb. 5.1.6B**).

### CD95Fc blockiert die TZR/CD3-induzierte Proliferation

Durch Analyse der Zellteilungsrate, der Zellzyklusprogression und der Vitalität sollte in der Folge überprüft werden, ob der inhibitorische Effekt der CD95L-Ligation auf das Proliferationsverhalten möglicherweise auch auf zytotoxische Aktivität der eingesetzten Fusionsproteine im Sinne einer Überstimulation zurückzuführen sein könnte. Dazu wurden CFSE beladene CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eingesetzt, die für drei Tage wie in **Abb. 5.1.7** angegeben stimuliert wurden. Neben der CFSE-Verdünnung wurde die Aufnahme von PI als Indikator für Zelltod analysiert. Der in **Abb. 5.1.5** bereits beschriebene Befund, dass immobilisiertes CD95Fc einen Zellteilungsarrest in CD3/CD28-stimulierten primären T-Zellen auslöst, wurde auch in diesem Experiment verifiziert (**Abb. 5.1.7A**). Darüber hinaus ergab die PI-Messung keine Zunahme an toten Zellen, weder in den deutlich proliferierenden Kontrollpopulationen, noch in den CD95Fc-behandelten Zellen (**Abb. 5.1.7B**).

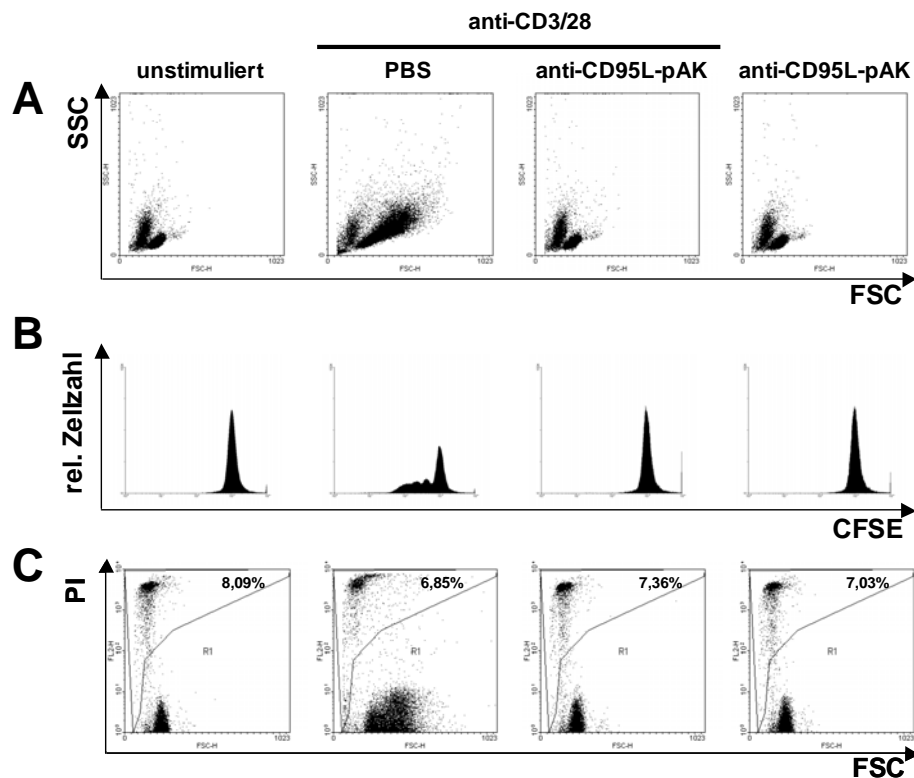


**Abb. 5.1.7: Verminderte Zellteilungsrate in CD3/CD28/CD95Fc-kostimulierten T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit CFSE beladen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in anti-CD3/CD28 mAK +/- CD95Fc beschichteten Zellkulturplatten für drei Tage. Am Tag der durchflußzytometrischen Messung wurden die CFSE-markierten Zellen in PI-Lösung aufgenommen, um parallel zur Zellteilungsrate (A) den prozentualen Anteil toter Zellen zu erfassen (B).

### 5.1.6 Anti-CD95L AK blockieren ebenfalls die T-Zellaktivierung

Die Stimulation der T-Zellen erfolgte wie geschildert mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAK in An- und Abwesenheit von ebenfalls immobilisiertem CD95Fc-Fusionsprotein. Es stellte sich daher die Frage, ob CD95Fc die Bindung der T-Zellen an die anti-CD3/CD28 mAK sterisch behindern und dadurch die Aktivierung blockieren könnte. Da CD95Fc in der Regel in einer höheren Konzentration als die mAK eingesetzt wurde, sollte mit den nächsten Versuchen unter Verwendung eines polyklonalen anti-CD95L Antikörpers ausgeschlossen werden, dass die Inhibition der T-Zellen auf einer sterischen Hinderung beruht.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dazu mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAK inkubiert, wobei die Stimulation des CD95L mit immobilisierten polyklonalen anti-CD95L pAK erfolgte (5 µg/ml). Nach drei Tagen wurden die Streulichteigenschaften, die CFSE-Profile und die PI-Aufnahme verglichen. Auch der relativ gering dosierte polyklonale anti-CD95L Antikörper inhibierte die CD3/CD28-vermittelte Blastenbildung und Proliferation komplett (**Abb. 5.1.8A,B**), ohne die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen (**Abb. 5.1.8C**).



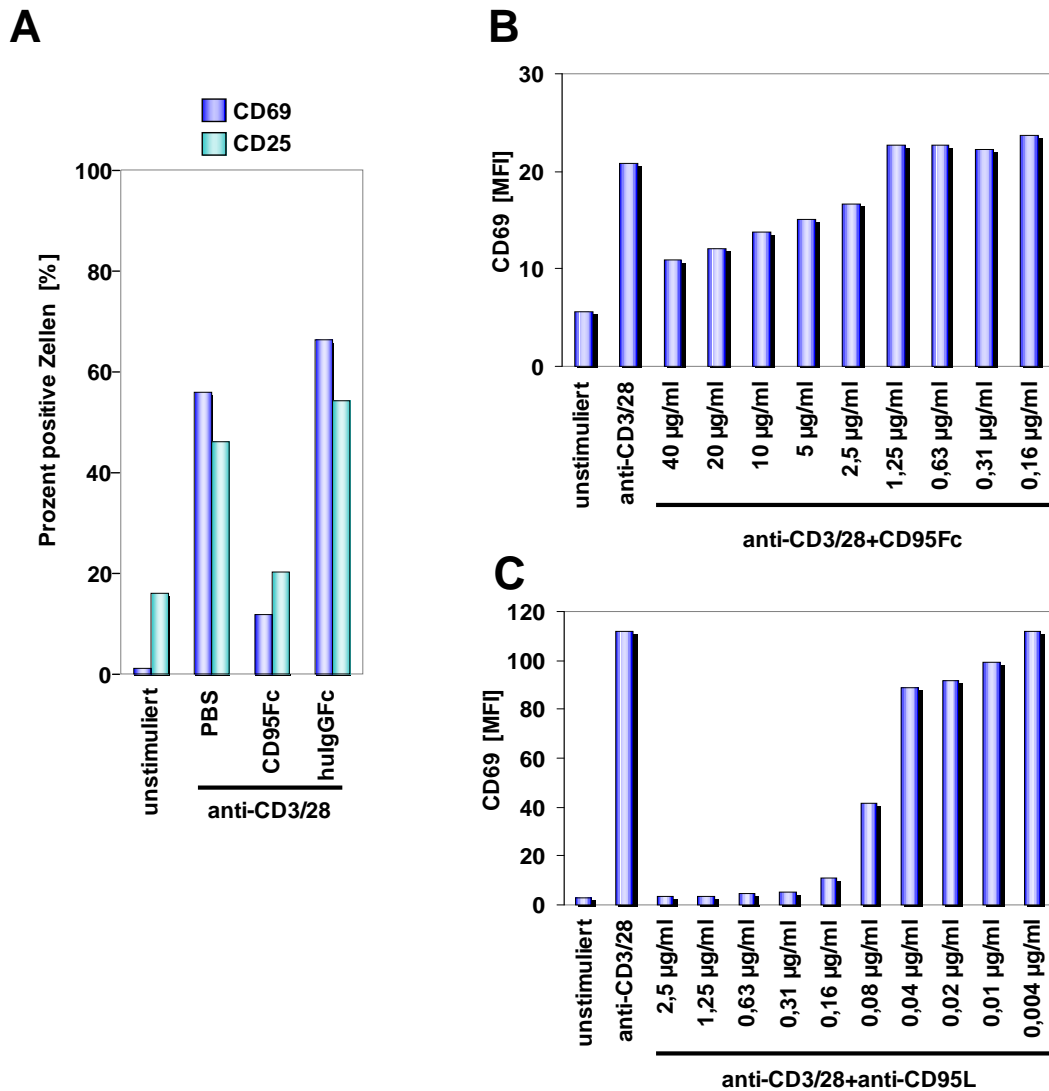
**Abb. 5.1.8: Anti-CD95L pAK wirkt ebenso wie CD95Fc inhibitorisch auf die Aktivierung von T-Zellen.** Die Stimulation der MACS-separierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAK, während CD95L mit anti-CD95L pAK ligiert wurde. Die CFSE-beladenen Zellen wurden an Tag 3 der Kultivierung in PI-Lösung resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert.

### 5.1.7 CD95L-Ligation blockiert die Expression von Aktivierungsmarkern

Die bisher durchgeführten Analysen waren im Wesentlichen nach zwei- bis dreitägiger Inkubation der Zellen durchgeführt worden. Die Signalgebung im Rahmen der Aktivierung von T-Lymphozyten lässt sich jedoch anhand verschiedener Parameter auch zu früheren Zeitpunkten charakterisieren. So kommt es sowohl *in vivo* als auch *in vitro* innerhalb weniger Stunden zu Veränderungen in der Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren. Neben der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), der als Wachstumsfaktorrezeptor eine zentrale Rolle bei der klonalen Expansion von T-Zellen spielt, wurde beispielsweise CD69 als früher Aktivierungsmarker beschrieben. Es sollte daher im Folgenden untersucht werden, ob CD95L einen Einfluss auf die Induktion dieser beiden frühen Aktivierungsmarker hat.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dazu unter den beschriebenen Bedingungen für 18-24 Stunden stimuliert, bevor die Expression von CD69 und CD25 analysiert wurde (**Abb. 5.1.9A**). Auch hier zeigte sich eine deutliche Inhibition unter Einsatz des plattengebundenen CD95Fc-Fusionsproteins anhand der Abnahme CD69- oder CD25-positiver Zellen. In der Folge wurde

die Analyse der CD69-Expression auch eingesetzt, um die Konzentration des CD95Fc-Fusionsproteins (Abb. 5.1.9B) bzw. des anti-CD95L pAK zu bestimmen, die den beschriebenen inhibitorischen Effekt hervorruft (Abb. 5.1.9C).



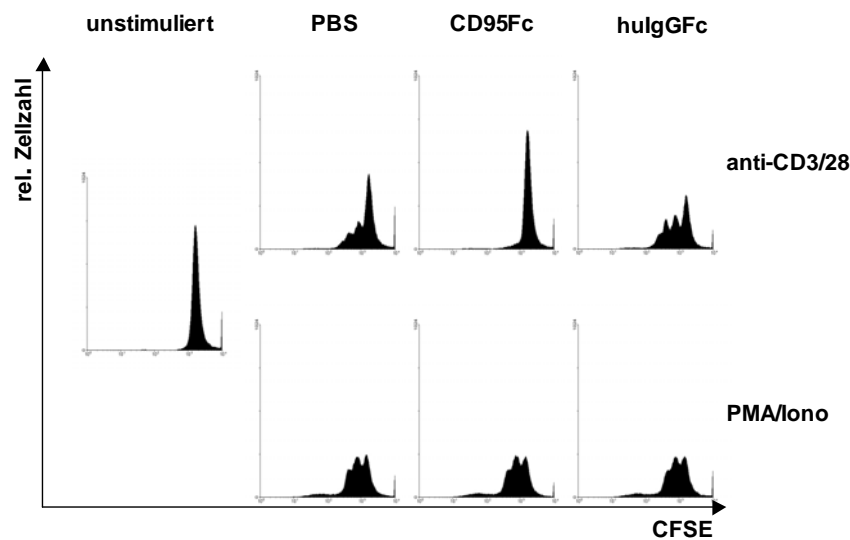
**Abb. 5.1.9: CD95L-Ligation verhindert die CD3/CD28- induzierte Expression von CD25 und CD69.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden auf mit Antikörpern und/oder Fusionsproteinen in unterschiedlichen Konzentrationen beschichteten Platten inkubiert. Die Oberflächenexpression von CD25 (A) und CD69 (A-C) wurde jeweils am Folgetag bestimmt. [MFI]=mittlere Fluoreszenzintensität.

### 5.1.8 Einfluss der CD95L-Kostimulation auf die TZR-Signaltransduktion

Die bereits auf Ebene der CD69- und CD25-Expression beobachtete Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch CD95L-Ligation ließ vermuten, dass die mögliche retrograde Signalgebung bereits in einer sehr frühen Phase mit der TZR/CD3-induzierten Signalkaskade interferiert. Im Folgenden wurden deshalb einige Schlüsselwege der T-Zellaktivierung im Kontext einer CD95L-Kostimulation im Detail analysiert.

## PKC-Aktivierung und Calcium-Mobilisierung

Im Rahmen der T-Zellaktivierung wurden die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) sowie die Mobilisierung von Calcium als frühe Schlüsselereignisse der intermediären Signalweiterleitung definiert. PKC und Calcium-Mobilisierung lassen sich durch Phorbol ester (PMA) und Ionophore (Ionomycin) pharmakologisch aktivieren. Um einen Eindruck zu erhalten, ob die Inhibition der T-Zellaktivierung oberhalb der PKC-Aktivierung und der Calcium-Freisetzung stattfindet, wurden CFSE-beladene  $CD4^+$ -T-Zellen in An- und Abwesenheit des immobilisierten CD95Fc mit anti-CD3/CD28 mAK oder mit PMA und Ionomycin stimuliert (**Abb. 5.1.10**).



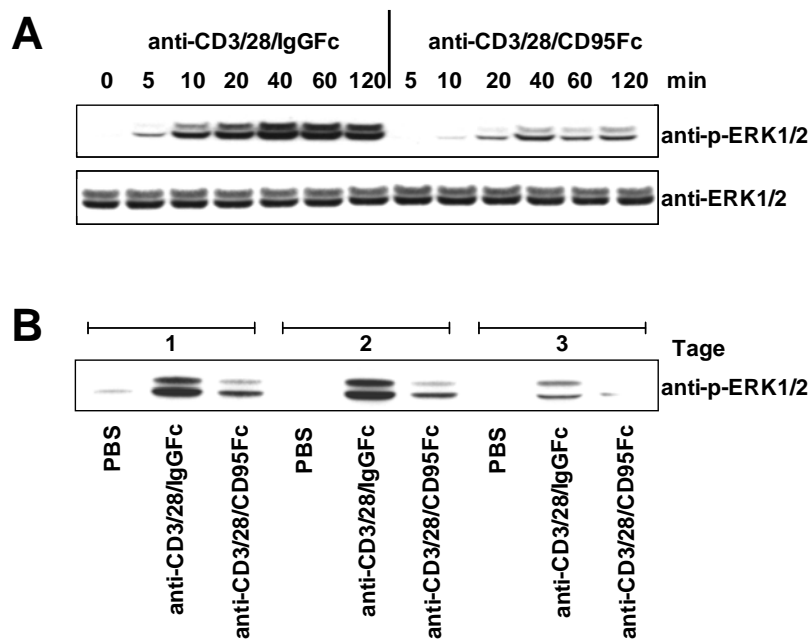
**Abb. 5.1.10: CD95Fc inhibiert die Proliferation nach CD3/CD28-Stimulation, nicht aber nach Stimulation mit Phorbol ester und Calciumionophor.**  $CD4^+$ -T-Zellen wurden CFSE-markiert und mit immobilisierten anti-CD3/CD28 (2 bzw. 5  $\mu\text{g/ml}$ ) mAK oder PMA (10  $\text{ng/ml}$ ) und Ionomycin (500  $\text{ng/ml}$ ) in An- und Abwesenheit von plattengebundenem CD95Fc oder huIgGfc (jeweils 20  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Die gezeigten CFSE-Profile wurden nach drei Tagen erstellt.

Durch den direkten Vergleich der beiden Stimuli wird evident, dass CD95L das TZR-Signal entweder unabhängig oder oberhalb der PKC-Aktivierung und Calcium-Freisetzung blockiert. So wird die CD3/CD28-induzierte Proliferation durch CD95Fc vollkommen inhibiert, während das Fusionsprotein keinen Einfluss auf die PMA/Ionomycin-induzierte Aktivierung hat.



### Inhibition der TZR/CD3/CD28-vermittelten MAPK-Aktivierung durch CD95Fc

Auch die Aktivierung von MAP-Kinasen ist von zentraler Bedeutung im Rahmen der TZR/CD3-induzierten Aktivierungskaskade. Am Ende der MAP-Kinasen-Kaskade werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die notwendige Gene zur Proliferation und zur Wachstumsfaktorexpression regulieren. Im folgenden Experiment wurde daher der Einfluss des CD95L-Signals auf die Aktivierung der wichtigen MAPK ERK1/2 untersucht.



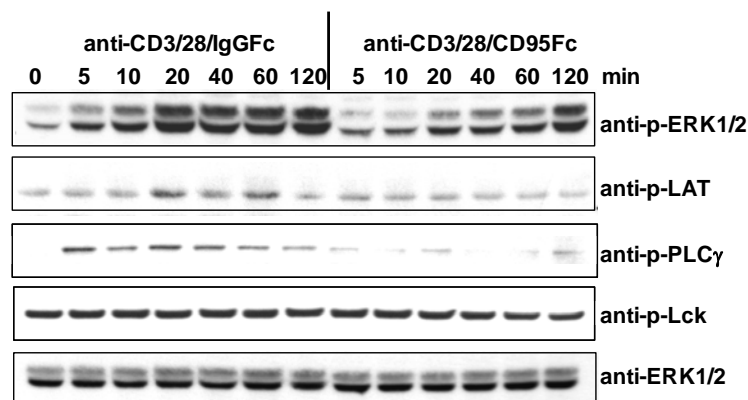
**Abb. 5.1.11: CD95L-Kostimulation verhindert die Phosphorylierung von ERK1/2.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden in Kulturplatten mit 24 Kavitäten für die angegebenen Zeitpunkte kultiviert. Die Stimulation wurde mit Partikeln durchgeführt, die mit den angegebenen Antikörpern und Fusionsproteinen beladen waren. Je 20 µg der Gesamtzelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot auf die Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht.

Die Stimulation der T-Zellen erfolgte diesmal im Zeitrahmen von 5 bis 120 Minuten bzw. über drei Tage mit anti-CD3/CD28/huIgGFc-beladenen bzw. anti-CD3/CD28/CD95Fc-beladenen Partikeln (*beads*). Es sollten Auswirkungen der CD95L-Kostimulation auf das Phosphorylierungsmuster der Kinase ERK1/2 in Lysaten von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt werden. Die Western Blot Analysen wurden mit einem spezifischen anti-phospho-ERK1/2 mAK durchgeführt. Bereits nach 10 Minuten war in der anti-CD3/CD28/huIgGFc-stimulierten Kontrolle eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisbar. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung bei Verwendung der anti-CD3/CD28/CD95Fc-beladenen Partikel über den gesamten Meßzeitraum massiv vermindert (**Abb. 5.1.11A,B**). Als Beladungskontrolle diente ein nicht phospho-spezifischer Antikörper gegen ERK1/2.

## CD95L blockiert die TZR-induzierte Phosphorylierung von PLC $\gamma$ , ZAP-70 und LAT

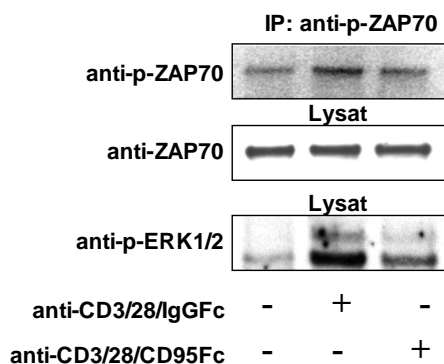
Im Rahmen der proximalen TZR-Signalweiterleitung werden Tyrosinkinasen aktiviert, die über den Phosphorylierungsstatus einiger Schlüsselmoleküle die Ausbildung von nachgeschalteten Proteinkomplexen regulieren. Wichtig sind dabei insbesondere die an die phosphorylierten ITAMs des TZR/CD3-Komplexes rekrutierte Tyrosinkinase ZAP-70, das Transmembran-Adapterprotein LAT sowie die an phosphorylierte Tyrosinreste von LAT bindende PLC $\gamma$ . Die Beeinflussung der MAPK ERK1/2 durch CD95L deutete darauf hin, dass die Interferenz mit dem TZR-Signal bereits oberhalb der MAP-Kinase-Kaskade stattfindet.

Zur Analyse der Phosphorylierung der genannten Proteine wurden Western Blots unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper durchgeführt. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dazu mit Partikeln stimuliert, an die zusätzlich zu anti-CD3/CD28 mAK entweder CD95Fc oder huIgGfc kovalent gebunden war. Zelllysate wurden in einem Zeitraum zwischen 5 und 120 Minuten hergestellt. Auch in diesen Analysen war im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Beeinflussung der TZR/CD3/CD28-induzierten Signaltransduktion durch CD95Fc nachzuweisen. Während die Phosphorylierung des regulatorischen Tyrosinrestes 505 der Src-Kinase Lck keine Veränderung zeigte, war die Phosphorylierung von LAT und PLC $\gamma$  deutlich reduziert (**Abb. 5.1.12**), einhergehend mit der verminderten Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2.



**Abb. 5.1.12: Die Phosphorylierung von LAT und PLC $\gamma$  wird durch CD95Fc-Koligation gehemmt.** MACS-separierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit kovalent beladenen Mikropartikeln stimuliert. Nach Lyse der Zellen und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2, LAT, PLC $\gamma$  und Lck überprüft. ERK1/2 diente als Ladungskontrolle.

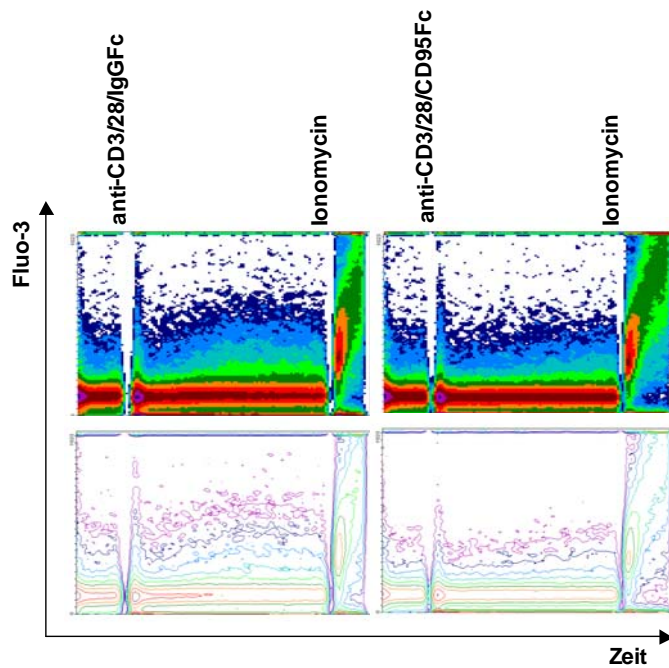
Zur Analyse der Phosphorylierung von ZAP-70 (hier Tyrosin 319) wurde nach 10-minütiger Stimulation mit den beladenen Partikeln eine Immunpräzipitation mit einem phospho-ZAP-70-spezifischen Antikörper durchgeführt. Für die Färbung des Immunpräzipitats im Western Blot wurde der gleiche Antikörper verwendet. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Ausgangsmenge wurde ZAP-70 vor der Präzipitation im Gesamtzelllysat mittels Western Blot mit einem ZAP-70-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Auch im Falle von ZAP-70 konnte so eine reduzierte Phosphorylierung nach Koligation von CD95L nachgewiesen werden (**Abb. 5.1.13**).



**Abb. 5.1.13: Die TZR-induzierte Phosphorylierung von ZAP-70 wird in Gegenwart von CD95Fc inhibiert.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden über Mikropartikel für 10 Minuten aktiviert und nachfolgend lysiert. Die Immunpräzipitation des phosphorylierten ZAP-70 aus dem Gesamtzelllysat erfolgte über Nacht mit einem phospho-spezifischen Antikörper (pTyr319). Präzipitiertes phospho-ZAP-70 wurde mit dem gleichen Antikörper nachgewiesen. Parallel wurden je 20 µg Gesamtzelllysat elektrophoretisch separiert, um nachfolgend die Aktivierung der MAPK ERK1/2 nach CD3/CD28-Stimulation zu bestätigen. Als Kontrolle wurde die Menge an ZAP-70 im Gesamtlysat überprüft.

### CD95L-Ligation beeinträchtigt die Calcium-Mobilisierung

Die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern ist als rasche Konsequenz auf verschiedenste äußere Einflüsse zu beobachten. Im Rahmen der T-Zellaktivierung kommt es nicht nur zum einfachen Anstieg der Calciumionenkonzentration, sondern zu einem oszillierenden Calciumsignal. In Abhängigkeit der Amplitude und Dauer des Signals werden über nachgeschaltete Ionen-sensitive „second messenger“ unterschiedliche Transkriptionsfaktoren angesteuert und damit verschiedene Antworten der Zelle initiiert (137). Es ist seit langem bekannt, dass PLC $\gamma$  durch Spaltung von PIP<sub>2</sub> in DAG und IP<sub>3</sub> die Calcium-Mobilisierung aus dem ER steuert. Da wie oben beschrieben im Zuge der CD95L-Kostimulation die PLC $\gamma$ -Aktivierung reduziert ist, lag die Vermutung nahe, dass auch die Freisetzung von Calcium aus dem ER in diesem Ansatz inhibiert wird.



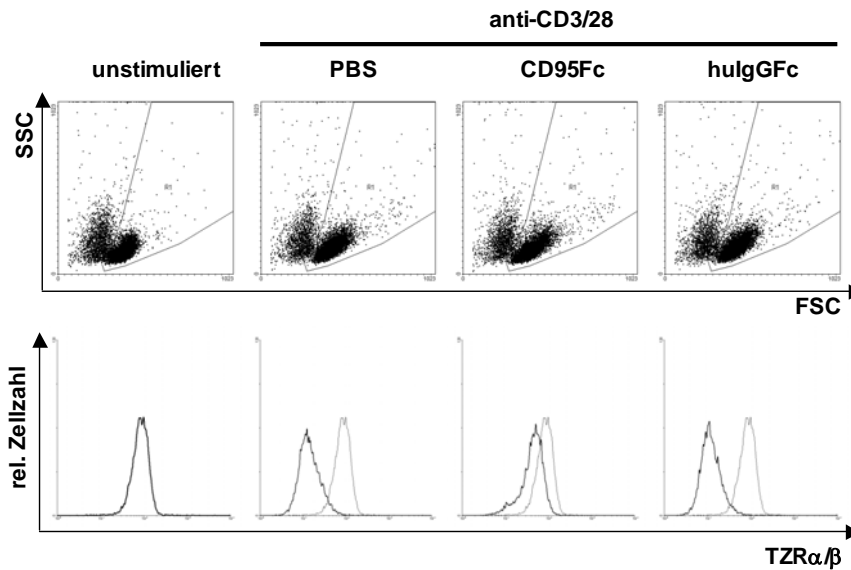
**Abb. 5.1.14: Verringerte Calcium-Freisetzung in CD95L-kostimulierten T-Zellen.** Primäre humane CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo-3 beladen. Vor jeder durchflußzytometrischen Messung erfolgte eine Inkubation für 3 Minuten bei 37°C. Die Stimulation wurde mit anti-CD3/CD28/IgGfc- bzw. anti-CD3/CD28/CD95Fc-Partikeln durchgeführt und die Veränderung der Calciumionenkonzentration für ca. 200 Sekunden aufgezeichnet. Der Zusatz von Ionomycin diente als Kontrolle der Calcium-Freisetzung.

Insgesamt waren nach CD3/CD28-Stimulation der ruhenden Zellen relativ geringe Signalamplituden messbar. Allerdings zeigte sowohl die Darstellung im Dichte- als auch Konturendiagramm nach CD3/CD28-Ligation einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Nach der Zugabe der anti-CD3/CD28/CD95Fc-Partikel wurde diese induzierte Calcium-Freisetzung nicht beobachtet (**Abb. 5.1.14**). Erwartungsgemäß ergab die Zugabe von Ionomycin in beiden Ansätzen einen deutlichen Ausschlag.

### 5.1.9 CD95Fc inhibiert die TZR-Internalisierung

Die Internalisierung von Rezeptoren führt nicht zwangsläufig zu einer Degradation der Proteine, sondern kann über die Fusion verschiedener Kompartimente zur Ausbildung neuer Signalplattformen beitragen, in denen essentielle Signal- und Adaptermoleküle zu entsprechenden Komplexen zueinander finden. Deshalb wurde die Veränderung der TZR-Expression in Abhängigkeit der CD95L-Koligation untersucht.

Die Histogramme verdeutlichen, dass die nach CD3/CD28-Stimulation nachweisbare Reduktion der Fluoreszenz in Anwesenheit des CD95L-Stimulus stark vermindert war (**Abb. 5.1.15**). Obwohl der zugrunde liegende molekulare Mechanismus nicht weiter charakterisiert wurde, deutet diese Beobachtung darauf hin, dass die CD95L-Bindung die aktivierungsinduzierte TZR-Modulation und -Internalisierung deutlich inhibiert.



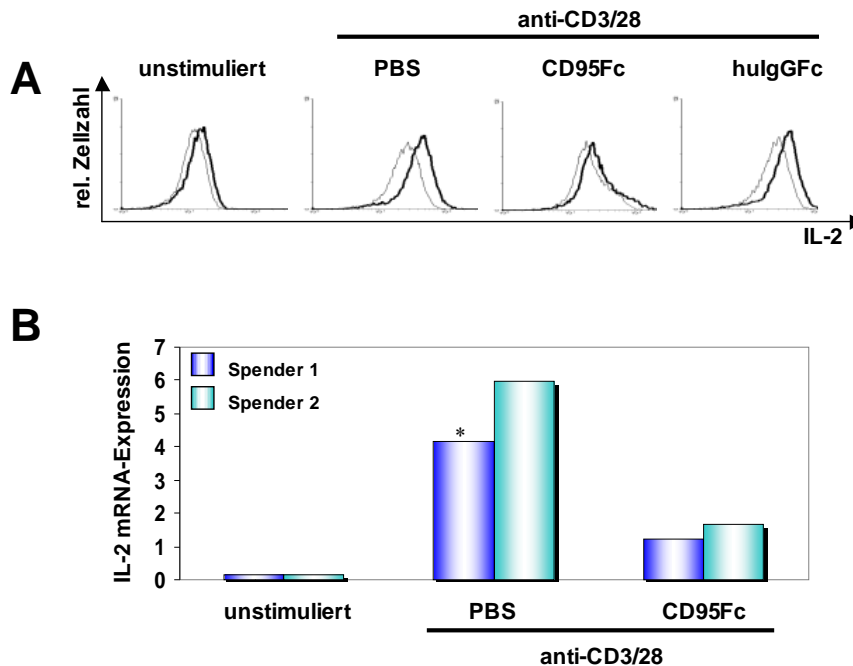
**Abb. 5.1.15:** Die TZR-Internalisierung wird durch das retrograde CD95L-Signal beeinträchtigt. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit immobilisierten anti-CD3/CD28 mAK in An- und Abwesenheit von CD95Fc oder dem Kontrollprotein huIgGFc stimuliert. Die TZR-Expression wurde nach 24 Stunden mit einem TZR $\alpha/\beta$ -spezifischen mAK analysiert. Die FSC/SSC-Darstellung zeigt die analysierte Population vitaler Zellen. In den Histogrammen ist die TZR-Expression unstimulierter (graue Linie) und stimulierter Zellen (schwarze Linie) dargestellt.

#### 5.1.10 CD95L-Kreuzvernetzung führt zur verminderten Produktion von IL-2

Nach initialer Aktivierung benötigen T-Zellen für die Expansionsphase ein Mikromilieu mit ausreichenden Konzentrationen an Wachstumsfaktoren, insbesondere IL-2. IL-2 wird autokrin sezerniert und gilt als der T-Zell-Wachstumsfaktor (synonym *T cell growth factor* (TCGF)). IL-2 wirkt bereits in der Frühphase nach Aktivierung sobald der hochaffine Rezeptor komplett auf der Oberfläche erscheint (siehe oben – Messung von CD25 als Aktivierungsmarker).

Um die TZR/CD3/CD28-induzierte Zytokinproduktion in Abhängigkeit von der Koligation von CD95L zu untersuchen, wurden verschiedene Nachweismethoden angewendet. Die Zytokinproduktion in einzelnen Zellen kann über intrazelluläre Färbungen durchflußzytometrisch bestimmt werden. Der Proteintransportinhibitor Monensin verhindert dabei die Sekretion von IL-2 und anderen Zytokinen und bewirkt deren Akkumulation in Golgi-Vesikeln. Unter Verwendung IL-2-spezifischer Antikörper lassen sich daher die IL-2-produzierenden Zellen identifizieren (**Abb. 5.1.16A**). Aussagen über die Induktion der IL-2-Genexpression erlaubt weiterhin die quantitative Amplifizierung der spezifischen Boten-RNA mittels qRT-PCR (**Abb. 5.1.16B**).

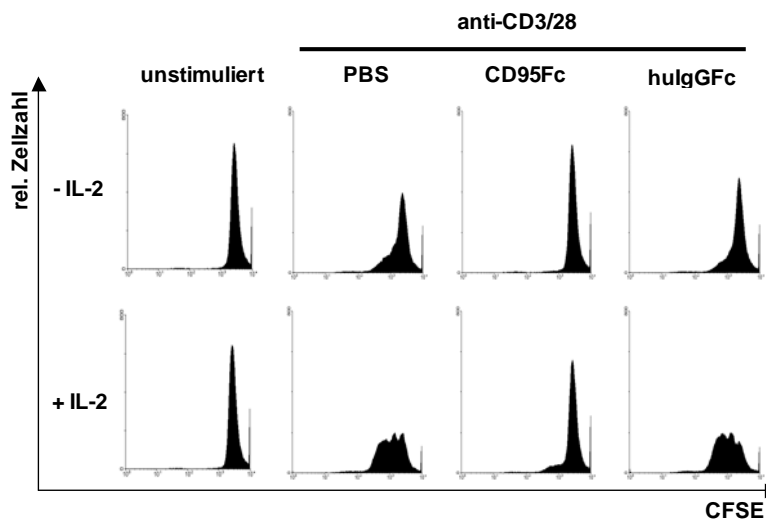
CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit plattengebundenen Antikörpern und Fusionsproteinen für drei Tage stimuliert. Die Zellen wurden anschließend für die intrazelluläre Färbung vorbereitet oder es wurden Zellysate hergestellt, aus denen mRNA isoliert wurde, die nachfolgend in cDNA umgeschrieben und für die qRT-PCR zur Bestimmung der IL-2 mRNA-Expression verwendet wurde.



**Abb. 5.1.16: Reduktion der IL-2 Produktion in CD3/CD28-stimulierten Zellen durch CD95L-Koligation.** Frisch isolierte humane CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit plattengebundenen Stimuli für drei Tage kultiviert. (A) Intrazelluläres IL-2 wurde mit einem PE-markierten anti-IL-2 Antikörper nachgewiesen (IL-2-spezifischer Antikörper=schwarze Linie; Isotypkontrolle=graue Linie). (B) Zur Bestimmung der IL-2 mRNA-Expression wurden Zellysate hergestellt. Die relative Quantifizierung der Genexpression von IL-2 erfolgte mittels qRT-PCR unter Berücksichtigung der Expression von G6PDH. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. \* Einfachwert.

Beide Analysen ergaben eindeutig, dass die CD95L-Kostimulation auch die CD3/CD28-induzierte Zytokinproduktion verminderte. Zur Auswertung der intrazellulären IL-2-Färbung wurde die IL-2-Fluoreszenz im Histogramm gegen die Zellzahl aufgetragen. Das Histogramm der CD3/CD28-stimulierten Zellen zeigt in PBS eine moderate Verschiebung der Kurve zu höheren Fluoreszenzintensitäten (**Abb. 5.1.16A**). Durch das huIgGFc-Kontrollprotein wurde die IL-2-Sekretion nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu war die Menge an intrazellulärem IL-2 in Anwesenheit von CD95Fc reduziert. Verifiziert wurden die Ergebnisse durch die zusätzlich durchgeführte qRT-PCR-Analyse. Die IL-2-Genexpression ist in T-Zellen der beiden untersuchten Spender bei alleiniger CD3/CD28-Ligation ca. dreimal höher als bei zusätzlicher CD95L-Stimulation (**Abb. 5.1.16B**).

Für verschiedene inhibitorische Korezeptoren wie z.B. CTLA-4 ist bekannt, dass exogen zugeführtes IL-2 die Inhibition aufheben kann. Wir haben deshalb überprüft, ob auch der inhibitorische Effekt der CD95L-Ligation durch Zugabe von Interleukin-2 neutralisiert werden kann. CFSE-markierte T-Lymphozyten wurden dazu in An- und Abwesenheit von rekombinantem, löslichem IL-2 mit plattengebundenen Agonisten stimuliert und für drei Tage inkubiert. Die CFSE-Profile ergaben die erwartete Steigerung der Zellteilungsrate in CD3/CD28-stimulierten Zellen nach Zugabe von rIL-2. Die CD95Fc-vermittelte Inhibition der Proliferation konnte jedoch durch die Gabe von rIL-2 nur marginal verändert werden (Abb. 5.1.17).



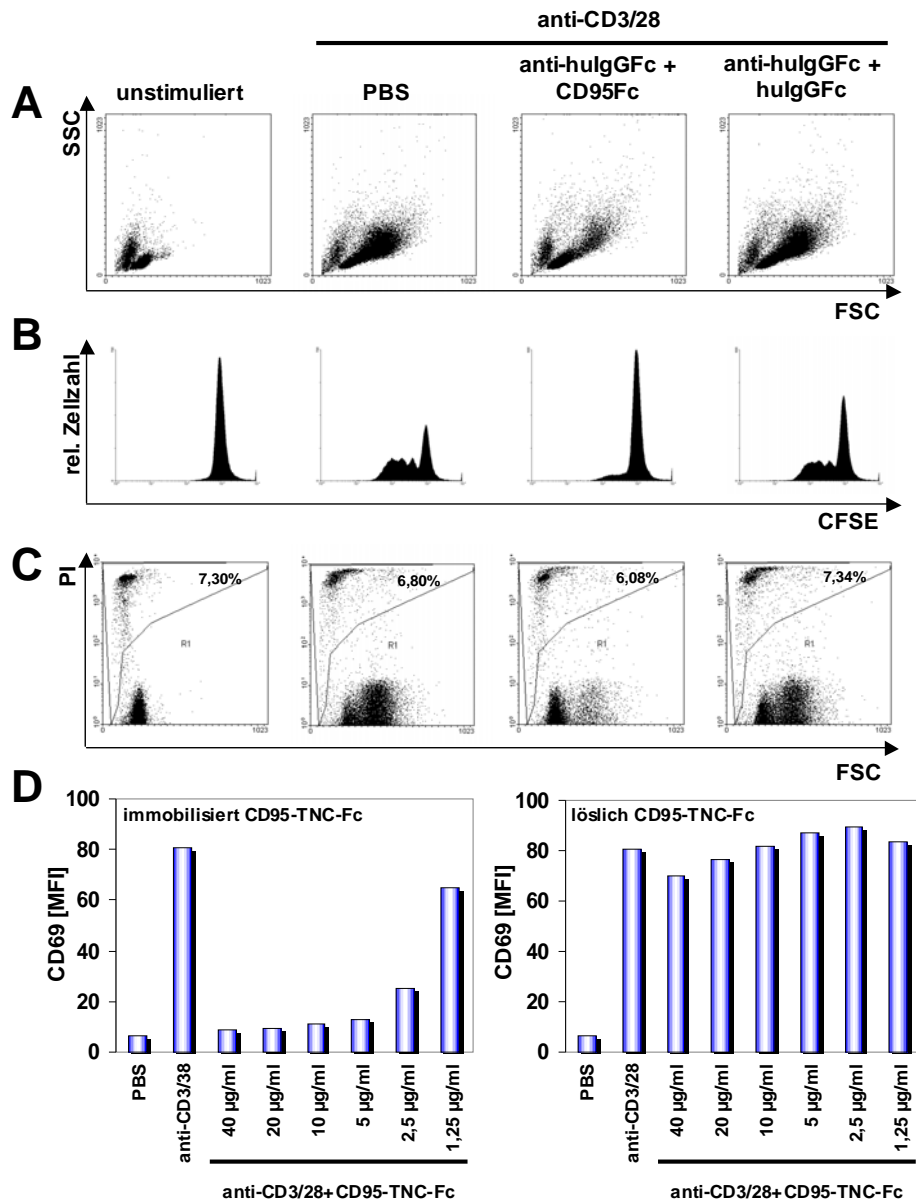
**Abb. 5.1.17: IL-2 hebt die Blockade der Proliferation durch CD95Fc nicht auf.** CFSE-markierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden über den TZR mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAK stimuliert. Die CD95L-Ligation erfolgte durch den Zusatz von CD95Fc in immobilisierter Form. HuIgGFc diente als Kontrolle für das Fusionsprotein. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für drei Tage in An- und Abwesenheit von exogenem rekombinantem IL-2 (10 U/ml), bevor die CFSE-Verdünnung durchflußzytometrisch analysiert wurde.

### 5.1.11 Inhibition durch CD95L-Ligation bei verstärkter Kreuzvernetzung

Es ist bekannt, dass viele Zelloberflächenrezeptoren nach Bindung ihrer Liganden aggregieren und erst dadurch oligomere Komplexe gebildet werden, die eine optimale Signalweiterleitung ins Zellinnere ermöglichen. Auch im Falle einer TZR-Stimulation wurde die Aggregation zahlreicher Rezeptoren als für die Aktivierung der T-Zelle essentiell beschrieben (138). Die Bildung von Rezeptorkomplexen soll die Rekrutierung von Signalmolekülen in ausreichender Zahl ermöglichen, die letztendlich für eine effiziente Signalweiterleitung erforderlich sind. Zur Förderung der Rezeptoraggregation werden *in vitro* häufig plattengebundene Stimuli oder Stimuli in Anwesenheit kreuzvernetzender Antikörper eingesetzt.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass auch die CD95L-Ligation eine Kreuzvernetzung erfordert (132;134). Unsere Versuche ergaben, dass lösliches CD95Fc-Fusionsprotein keine Auswirkung auf die CD3/CD28-induzierte Proliferation hatte, während plattengebundenes CD95Fc diese komplett inhibierte. Basierend auf diesen Befunden sollte überprüft werden, ob eine zusätzliche Kreuzvernetzung des plattengebundenen CD95Fc die Inhibition der T-Zellproliferation beeinflusst. CFSE-markierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dazu mit anti-CD3/CD28 mAK stimuliert. Zur stärkeren Kreuzvernetzung des CD95Fc wurden die Zellkulturplatten vor der Inkubation mit CD95Fc mit einem anti-human Fc-spezifischen AK beschichtet. Die Zellen wurden für 3 Tagen inkubiert, bevor die Streulichteigenschaften, die CFSE-Profile und die Vitalität der Zellen analysiert wurden (**Abb. 5.1.18A-C**). Nach diesen Befunden hat die verstärkte Kreuzvernetzung des CD95Fc keine Auswirkung auf die beschriebene Inhibition der Proliferation. Auch der Einsatz eines weiteren, vermutlich per se hexameren Fusionsproteins (CD95-TNC-Fc) bestätigte die inhibitorische Wirkung der CD95L-Stimulation. CD95-TNC-Fc ist als Fusionsprotein aus zwei dicht gepackten CD95-Trimeren beschrieben, die über starke nicht-kovalente Bindungen und Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Die Stabilität scheint dabei vorwiegend auf der blockierten Dissoziation der Trimere in Monomere zu beruhen (139-141). Anhand der CD69-Expression wurde auch für dieses Fusionsprotein überprüft, ob und ab welcher Einsatzkonzentration es in löslicher und/oder immobilisierter Form die CD3/CD28-induzierte T-Zellaktivierung beeinflusst (**Abb. 5.1.18D**). Die dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass auch CD95-TNC-Fc nur in immobilisierter Form einen Effekt auf die T-Zellaktivierung hat, die sich wiederum dosisabhängig in einer kompletten Blockade der CD69-Expression manifestiert.





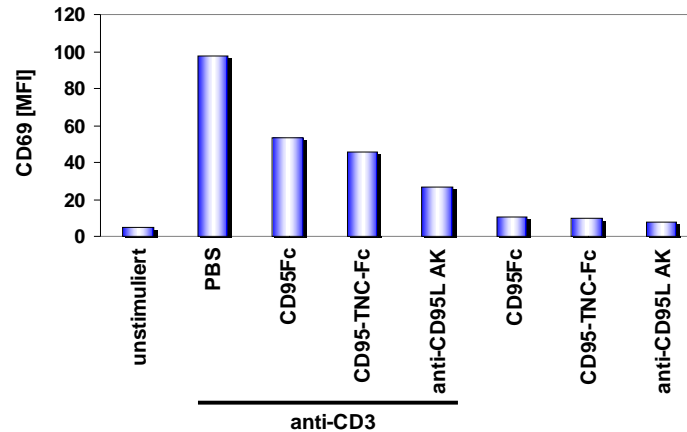
**Abb. 5.1.18: Sowohl CD95-TNC-Fc als auch die Kombination aus CD95Fc und anti-huIgGFc AK blockieren die T-Zellaktivierung.** (A-C) CFSE-markierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden auf beschichtete Zellkulturplatten gegeben, die vorab mit anti-huIgGFc mAκ und nachfolgend mit CD95Fc bzw. huIgGFc-Kontrollprotein koimmobilisiert wurden. Die Stimulation erfolgte mit immobilisierten anti-CD3/CD28 mAκ. Nach dreitägiger Inkubation wurden die (A) Streulichteigenschaften bestimmt und die (B) CFSE-Analyse durchgeführt. (C) Parallel durchgeführte Vitalitätsmessung mit PI.

(D) T-Zellen wurden mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAκ in An- und Abwesenheit von immobilisiertem oder löslichem CD95-TNC-Fc in unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert und am Folgetag die Expression von CD69 durchflußzytometrisch untersucht. [MFI]=mittlere Fluoreszenzintensität.

### **5.1.12 Inhibition der T-Zellaktivierung durch CD95L in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen**

Bisher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen der Einfluss der CD95L-Kostimulation auf die Aktivierung ruhender bzw. frisch isolierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. In der Literatur findet man jedoch Zellpopulations-abhängig widersprüchliche Daten zu CD95L als kostimulatorischen Rezeptor der T-Zellaktivierung (131;134;135). Die Arbeitsgruppe um Pamela Fink konnte für murine CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen, dass diese durch CD95L-Koligation verstärkt proliferieren (131;133). Im Gegensatz dazu wurde bei murinen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in einem anderen Bericht eine CD95L-vermittelte Proliferationsinhibition beobachtet (134). Fink et al. schlugen daher eine duale Funktion von CD95L in der Regulation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vor (132). Aber auch die weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten die Frage nach Populations-spezifischen Effekten nicht definitiv beantworten, insbesondere deshalb, weil für die mechanistischen Untersuchungen verschiedene Zelltypen (ruhend, aktiviert, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Linien, Klone) eingesetzt wurden (130;135;136). Die bisher dargestellten Befunde zu primären humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der vorliegenden Arbeit unterstützen eher die Daten von Desbarats et al..

Es sollte daher abschließend überprüft werden, ob eine CD95L-Bindung ähnliche Effekte in ruhenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder in polyklonal aktivierten PHA-Blasten zeigen würde. Die Untersuchung zum Einfluss der CD95L-Koligation auf die Aktivierung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte unter gleichen Stimulationsbedingungen wie für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beschrieben, ebenfalls mit negativ-isolierten (MACS), primären Zellen. Zur Aktivierung wurden immobilisierte anti-CD3 mAK in einer niedrigen Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt, während CD95L mit plattengebundenem CD95Fc (20 µg/ml), CD95-TNC-Fc (20 µg/ml) oder anti-CD95L AK (1 µg/ml) ligiert wurde. Die T-Zellaktivierung wurde am Folgetag anhand der CD69-Expression analysiert.

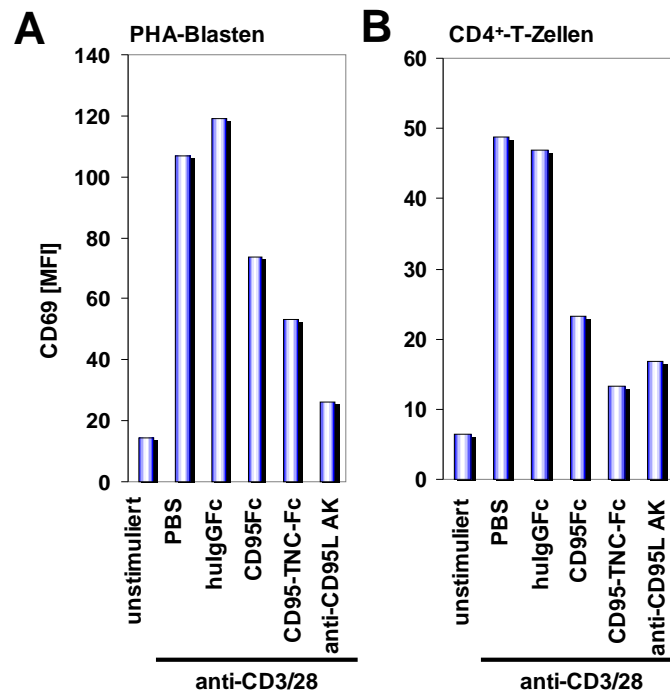


**Abb. 5.1.19: Inhibition CD3-stimulierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch CD95L.** MACS-separierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden auf Zellkulturplatten gegeben, die mit anti-CD3 mAK (2 µg/ml) +/- CD95Fc, CD95-TNC-Fc (jeweils 20 µg/ml) oder anti-CD95L pAK (1 µg/ml) beschichtet waren. Nach über Nacht Inkubation wurde die CD69-Expression durchflußzytometrisch bestimmt.

Anti-CD3-Stimulation führte auch in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zur vermehrten Expression von CD69. Alle eingesetzten CD95L-Liganden hatten per se keinen Einfluss auf diesen Parameter der Zellaktivierung. Die gleichzeitige Ligation von CD95L mit dem CD3-Signal über CD95Fc, CD95-TNC-Fc oder anti-CD95L pAK reduzierte die Induktion der CD69-Expression jedoch erheblich (**Abb. 5.1.19**).

### 5.1.13 Retrograde CD95L-Signaltransduktion in aktivierten PHA-Blasten

Nachdem der inhibitorische Effekt der CD95L-Bindung auch auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen war, stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Bindung der Fusionsproteine oder Antikörper im Rahmen der Restimulation aktivierter Zellen haben würde. Es wurden daher polyklonal stimulierte, mit IL-2 expandierte PHA-Blasten untersucht. **Abb. 5.1.20** veranschaulicht die stimulations-induzierte Expression von CD69 auch auf PHA-expandierten Zellen. Im Vergleich zu den parallel gemessenen primären T-Lymphozyten ist die mittlere Fluoreszenzintensität bei dieser Restimulation deutlich höher als bei den primären Zellen. Interessanterweise wird das Erscheinen von CD69 auf der Zelloberfläche voraktivierter Blasten (**Abb. 5.1.20**) in ähnlicher Weise inhibiert wie für die isolierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen beschrieben (**Abb. 5.1.9, 5.1.18, 5.1.19**).



**Abb. 5.1.20: CD95L-Ligation blockiert die CD69-Expression in PHA-Blasten.** (A) 14 Tage alte PHA-Blasten oder (B) frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (B) wurden mit immobilisierten anti-CD3/CD28 mAK mit oder ohne plattengebundenem huIgGfc, CD95Fc, CD95-TNC-Fc oder anti-CD95L AK über Nacht stimuliert. Die Aktivierung der Zellen wurde anhand der CD69-Expression überprüft.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die CD95L-Ligation mit immobilisierten Fusionsproteinen oder Antikörpern die T-Zellaktivierung nahezu komplett blockiert. Dieser Befund ließ sich für alle untersuchten T-Zellpopulationen bestätigen und ist, zumindest auf Ebene der Expression von Aktivierungsmarkern, auch für aktivierte Zellen nachweisbar. Die CD95L-Bindung scheint in ruhenden Zellen die CD3/CD28-induzierte Signalgebung zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu blockieren. Alle gemessenen Parameter werden gleichermaßen inhibiert. Eine toxische Wirkung der eingesetzten Liganden konnte ausgeschlossen werden, die biologische Aktivität und Bindungsspezifität der Faktoren wurde überprüft. Die Befunde wurden inzwischen 2009 in „*International Immunology*“ publiziert (142).

## 5.2. Effekte von CD95 auf primäre TZR/CD3/CD28-stimulierte Zellen

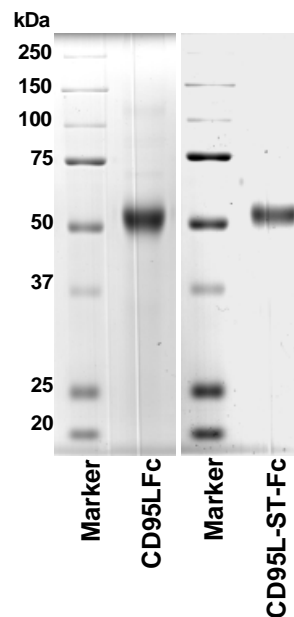
CD95 ist als Mitglied der TNF-Familie seit langem für seine Fähigkeit bekannt, apoptotischen Zelltod im Rahmen des AICD in T-Zellen auszulösen. CD95 ist konstitutiv auf primären T-Lymphozyten exprimiert, jedoch gelten diese Zellen als CD95-resistent (24). 1993 gab es erste Berichte, dass CD95 auf ruhenden T-Zellen kostimulatorische Funktionen ausüben kann (92). Seither wurde sporadisch beschrieben, dass CD95 oder CD95-assoziierte Signalmoleküle wie FADD oder Caspase-8 die T-Zellaktivierung nach TZR/CD3-Stimulation beeinflussen. CD95 wurde dabei als kostimulatorischer Aktivator der T-Zellprogression diskutiert (143;144). Auch FADD und Caspase-8 scheinen für eine optimale Aktivierung der T-Zellen erforderlich (95;145-147). Kürzlich publizierte Befunde von Strauss et al. zeigen im Gegensatz dazu, dass CD95L-exprimierende APZ oder CD95L-Fusionsproteine die T-Zellaktivierung nahezu komplett inhibieren (53).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst CD95L als potenziell kostimulatorischer Rezeptor der T-Zellaktivierung untersucht werden. Wie erwähnt wird die Analyse der retrograden Signaltransduktion dadurch erschwert, dass auch über CD95 eine Signalgebung in primären T-Zellen erfolgen kann. Es konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob die CD95L-bindenden Fusionsproteine oder der anti-CD95L AK ihre Aktivität über eine retrograde Signalgebung induzieren oder ob bei Verwendung dieser Agonisten die möglicherweise kostimulatorische Interaktion zwischen CD95 und CD95L inhibiert wird. Unter der Annahme einer essentiellen Rolle von CD95 für die Aktivierung von T-Zellen, würde eine Blockade von CD95L das CD95-vermittelte Signal verhindern und folglich die Aktivierung nur indirekt inhibieren. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein CD95LFc-Fusionsprotein als Kontrolle für die CD95Fc-vermittelte reverse Signalgebung eingesetzt. Es zeigte sich allerdings, dass auch immobilisiertes CD95LFc die CD3/CD28-induzierte T-Zellproliferation reduzierte. Somit konnte erneut nicht eindeutig geklärt werden, ob die beobachteten Effekte durch CD95Fc direkt über CD95L oder indirekt über CD95 vermittelt wurden. Es galt daher zu klären, welchen Einfluss die CD95-Stimulation auf die Aktivierung primärer humaner T-Lymphozyten hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine detaillierte Analyse der Signaltransduktion von CD95 im Kontext der CD3/CD28-induzierten T-Zellaktivierung durchgeführt.

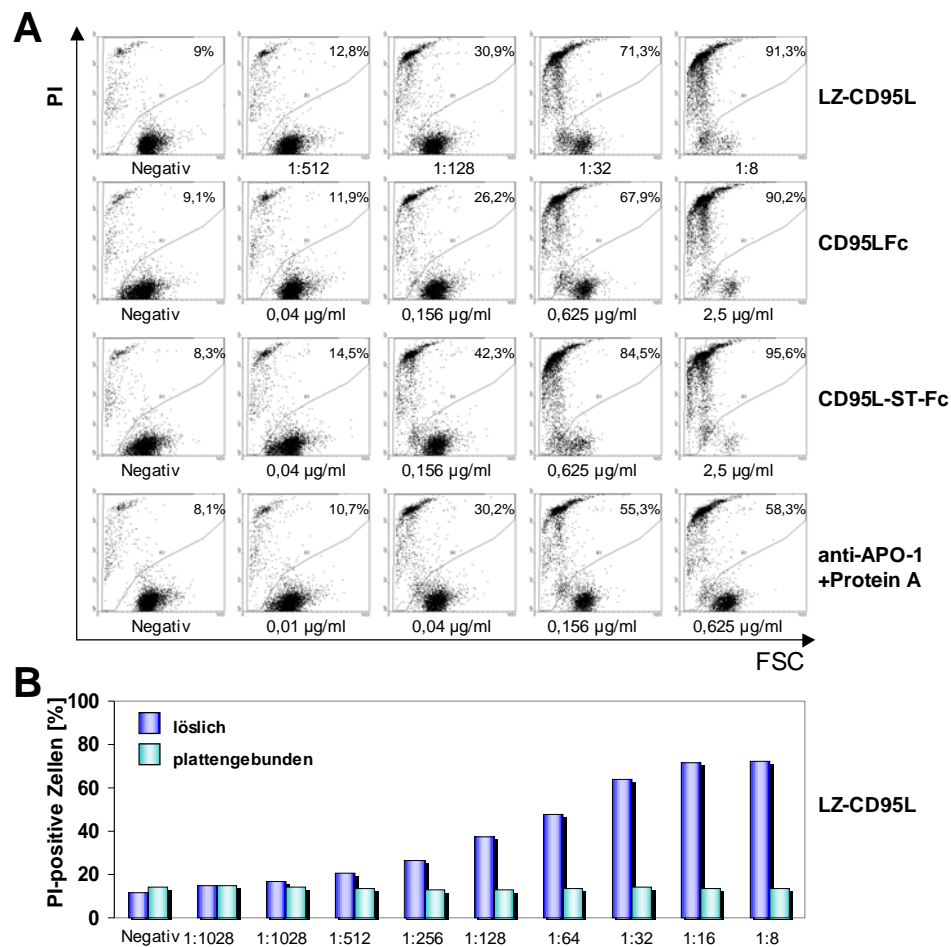
### 5.2.1 Überprüfung der biologischen Aktivität von CD95-Agonisten

Zur Untersuchung der CD95-vermittelten Effekte auf die TZR-Aktivierung wurden die Fusionsproteine CD95LFC, CD95L-ST-Fc und LZ-CD95L, sowie agonistische Antikörper gegen CD95 (anti-APO-1 (IgG3) und 7C11 (IgM)) verwendet. Einige Fusionsproteine wie CD95LFC und CD95L-ST-Fc wurden im Labor hergestellt und routinemäßig auf ihre Größe im SDS-Gel (**Abb. 5.2.1**) und ihre biologische Aktivität überprüft. Dazu wurde untersucht, ob die CD95-Agonisten in der Lage sind, Apoptose in aktivierten PHA-Blasten zu induzieren (**Abb. 5.2.2**).

**Abb. 5.2.1: Reinheitskontrolle der Fusionsproteine.** Die im Labor generierten Fusionsproteine CD95LFC und CD95L-ST-Fc wurden durch Separation im SDS-Gel und nachfolgender Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit überprüft. Es wurden 5 µg Protein pro Spur aufgetragen.



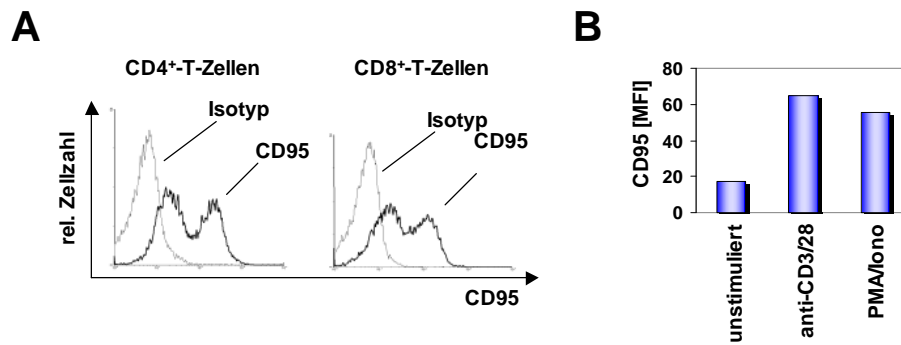
CD95-sensitive PHA-Blasten wurden über Nacht mit löslichen Fusionsproteinen oder Antikörpern in der angegebenen Konzentration inkubiert (**Abb. 5.2.2**). Zur Bestimmung des CD95-vermittelten Zelltods, wurde eine PI-Färbung durchgeführt. Die Dotplots spiegeln die konzentrationsabhängige Induktion von Zelltod durch die eingesetzten Fusionsproteine und Antikörper wider. Demnach waren alle Agonisten in der Lage, sehr effizient Apoptose in den aktivierten PHA-Blasten auszulösen. Lediglich im Falle des anti-CD95 mAK anti-APO-1 war trotz Einsatz von kreuzvernetzendem Protein A eine leicht reduzierte Zelltodinduktion im Vergleich zu den anderen CD95-Agonisten festzustellen (**Abb. 5.2.2A**). Interessanterweise trat kein Zelltod auf, wenn PHA-Blasten mit immobilisierten CD95-Agonisten z.B. LZ-CD95L behandelt wurden (**Abb. 5.2.2B**).



**Abb. 5.2.2: Lösliche CD95-Agonisten induzieren Apoptose in CD95-sensitiven Zellen.** (A) PHA-Blasten (Tag 14) wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit steigenden Konzentrationen der löslichen Agonisten über Nacht inkubiert. Im Falle des anti-CD95 mAK anti-APO-1 wurde zusätzlich Protein A (10 µg/ml) zum Ansatz gegeben. (B) PHA-Blasten wurden über Nacht mit löslichem oder plattengebundenem LZ-CD95L kultiviert. Die Zelltodanalyse wurde mittels PI-Färbung durchgeführt. Angegeben ist der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen.

## 5.2.2 Expression des Todesrezeptors CD95 auf primären T-Zellen

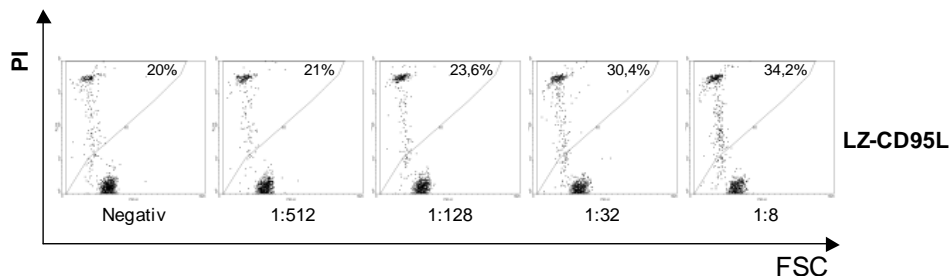
CD95 wird im Gegensatz zu seinem Liganden CD95L konstitutiv auf vielen Zellen exprimiert und unterliegt einer weitaus geringeren Expressionsregulation. Untersucht wurde die CD95-Expression auf primären frisch isolierten  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen (**Abb. 5.2.3A**) und auf stimulierten Zellen (**Abb. 5.2.3B**). Die dargestellten Histogramme veranschaulichen die Präsenz von CD95 auch auf unstimulierten T-Zellen (**Abb. 5.2.3A**). Dabei waren in der Regel zwei Populationen mit unterschiedlicher Expressionsdichte nachweisbar. Nach dreitägiger T-Zellaktivierung war erwartungsgemäß ein Anstieg der CD95-Expression festzustellen (**Abb. 5.2.3B**).



**Abb. 5.2.3: CD95-Expression auf frisch isolierten (A) und aktivierten T-Zellen (B).** CD4<sup>+</sup>- (A, B) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (A) wurden aus PBMZ isoliert und durchflußzytometrisch auf das Vorhandensein von CD95 auf der Zelloberfläche analysiert. (A) Graue Linie=Isotypkontrolle. Schwarze Linie=CD95. (B) Die mittlere Fluoreszenzintensität ([MFI]) entsprechend der Expression von CD95 auf CD3/CD28- und PMA/Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach dreitägiger Inkubation wurde unter Berücksichtigung der Fluoreszenz des isotypspezifischen Antikörpers berechnet.

### 5.2.3 CD95-Ligation führt in primären T-Zellen nicht zur Apoptose

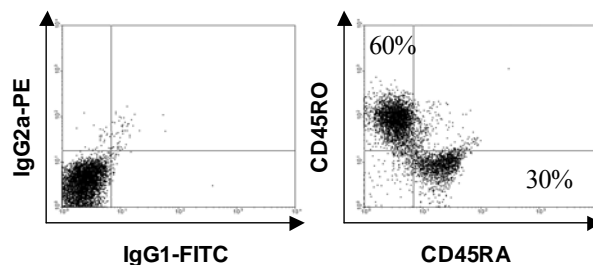
Da auch frisch isolierte T-Lymphozyten CD95 auf ihrer Oberfläche tragen (**Abb. 5.2.3A**), wurde zunächst überprüft, ob durch CD95-Stimulation in diesen Zellen Apoptose ausgelöst werden kann. Dazu wurde eine PI-Färbung mit frisch isolierten humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durchgeführt, die über Nacht mit steigender Konzentration LZ-CD95L behandelt wurden. Es ist zu erkennen, dass frisch isolierte T-Zellen überwiegend resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose sind. Selbst bei einer 1:8-Verdünnung des Fusionsproteins erhöhte sich die Zahl PI-positiver Zellen nur um 14% (**Abb. 5.2.4**). Unter gleichen Bedingungen waren 70-80% aller aktivierten PHA-Blasten in die Apoptose getrieben worden (**Abb. 5.2.2A**).



**Abb. 5.2.4: Frisch isolierte humane T-Lymphozyten sind vorwiegend resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit löslichem LZ-CD95L in steigender Konzentration behandelt. Die Zelltodanalyse nach Inkubation über Nacht wurde mittels PI-Färbung durchgeführt. Angegeben ist der prozentuale Anteil toter Zellen an der Gesamtzellpopulation.

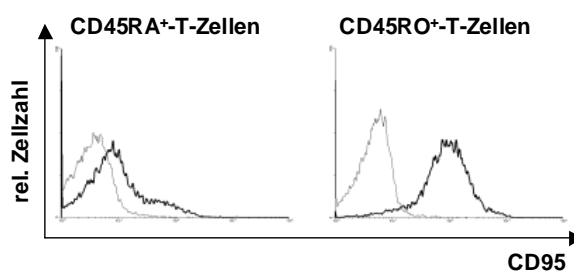


Die weitgehende Resistenz frisch isolierter Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose konnte für verschiedene Spender nachgewiesen werden. Es wurde jedoch beobachtet, dass der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen spenderabhängigen Schwankungen unterlag. So waren die Zellen einiger Spender fast komplett resistent gegen die Induktion von Zelltod über CD95, während bei anderen Spendern unter gleichen Bedingungen nahezu 40% der Zellen PI-positiv waren. Dies ließ eine unterschiedliche Zusammensetzung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellsubpopulation aus Apoptose-resistenten und -sensitiven Zellen vermuten, die möglicherweise auch mit der unterschiedlichen Expressionsdichte von CD95 korreliert. Wir stellten fest, dass frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus naiven CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen (ca. 15-30%) und einem prozentual größeren Anteil CD45RO<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen (ca. 60-80%) bestehen (**Abb. 5.2.5**).

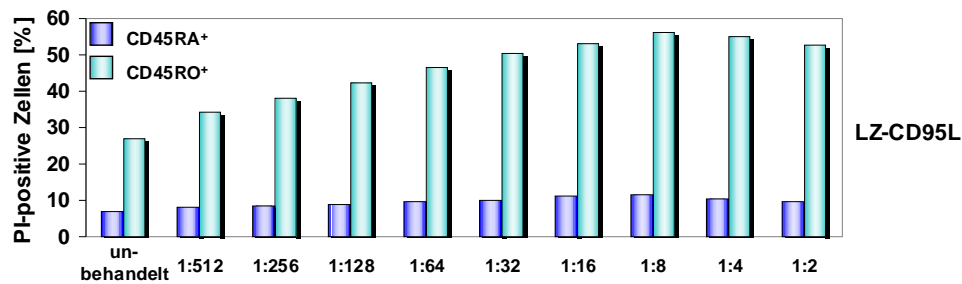


**Abb. 5.2.5: CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestehen aus naiven Zellen (CD45RA<sup>+</sup>) und Gedächtniszellen (CD45RO<sup>+</sup>).** Primäre CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden im Durchflußzytometer nach Färbung mit FITC-konjugierten anti-CD45RA und PE-konjugierten anti-CD45RO mAK analysiert. Dargestellt sind Dotplots der Isotypkontrolle (links) im Vergleich zu CD45RA/CD45RO-gefärbten Zellen (rechts).

Mit dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen eine gesteigerte CD95-Expression aufweisen und ob dies mit einer höheren Apoptose-Sensitivität einhergeht. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden daher in CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen separiert. Es zeigte sich, dass CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen CD95 in deutlich geringerem Maße exprimieren als CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen (**Abb. 5.2.6**).



**Abb. 5.2.6: Gesteigerte CD95-Expression auf CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen.** Aus PBMZ wurden zunächst CD4<sup>+</sup>-T-Zellen separiert. Durch CD45RO-Depletion wurden CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-Zellen erhalten, die im Durchflußzytometer auf die Präsenz von CD95 hin analysiert wurden.



**Abb. 5.2.7: CD45RA<sup>+</sup>-Zellen sind im Gegensatz zu CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen resistent gegen CD95-induzierte Apoptose.** Die über das MACS-System aufgereinigten CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen wurden für 2 Tage in Anwesenheit von löslichem LZ-CD95L kultiviert. Der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen ist als Maß für den CD95-induzierten Zelltod dargestellt.

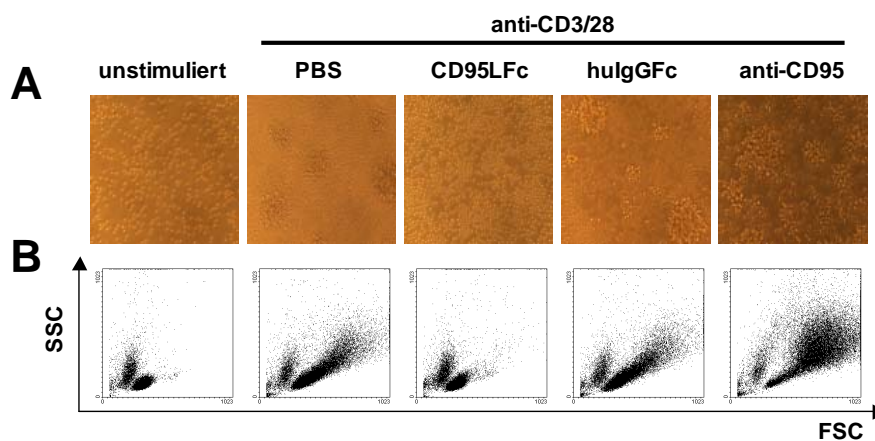
Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob frisch isolierte CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen unterschiedlich auf CD95-Ligation reagieren. Wie **Abb. 5.2.7** darstellt ergab das Experiment eindeutig, dass in CD45RO<sup>+</sup>-, nicht aber in CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen nach Ligation von CD95 Zelltod ausgelöst wurde. Trotz eines relativ hohen Anteils PI-positiver Zellen ohne Stimulation, war dennoch eine deutliche Zunahme toter Zellen (26% auf 55%) nach LZ-CD95L-Stimulation nachweisbar. Voraktivierte CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen werden demnach über CD95 vermehrt in den Zelltod getrieben, während naive T-Zellen bei vergleichbar geringerer CD95-Expression weitgehend resistent sind.

#### 5.2.4 Modulation der T-Zellaktivierung durch CD95-Koligation

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das ursprünglich als Kontrolle zur Untersuchung der reversen CD95L-Signaltransduktion hergestellte Fusionsprotein CD95LFc die T-Zellaktivierung ebenfalls blockierte. Gleichzeitig zeigte ein agonistischer Antikörper (7C11) einen entgegengesetzten Effekt und resultierte in einer massiv gesteigerten Proliferation. Beide CD95-Agonisten lösten jedoch Apoptose in aktivierten Zellen aus. Die Vorbefunde deuteten darauf hin, dass der Todesrezeptor CD95 auf naiven Zellen sowohl inhibitorische als auch aktivierende Funktionen im Rahmen der T-Zellaktivierung haben könnte.

## CD95-Ligation beeinflusst die Bildung von Blasten und Proliferationsclustern

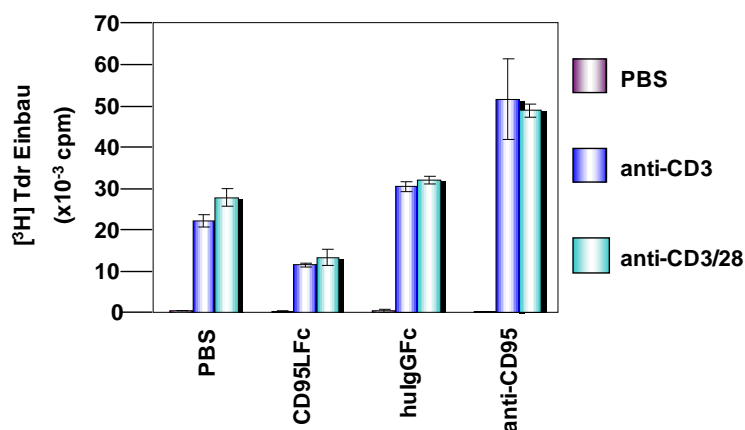
Die Aktivierung von T-Zellen mit Antikörpern gegen CD3 führt in Anwesenheit eines zweiten kostimulatorischen Signals (beispielsweise über CD28) zur Proliferation, was sich in der Bildung von großen, granulären Blasten und Proliferationsclustern äußert. Die Stimulation wurde wie in den Vorarbeiten mit frisch aufgereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durchgeführt, die mit anti-CD3/CD28 stimuliert und über den Rezeptor CD95 mit CD95LFc (20 µg/ml) oder anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) kostimuliert wurden. Nach drei Tagen wurden die Zellen zunächst mikroskopisch analysiert und fotografiert (**Abb. 5.2.8A**). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich die Bildung von Proliferationsclustern nach CD3/CD28-Stimulation. Dies scheint in Anwesenheit von CD95LFc komplett blockiert. Die Kostimulation mit dem anti-CD95 mAK führte jedoch zu einer vermehrten Clusterbildung (**Abb. 5.2.8A**). Gleichzeitig war bereits bei der mikroskopischen Inspektion der Zellen in der Kultur zu erkennen, dass die anti-CD95 mAK-kostimulierten T-Zellen deutlich größer erscheinen als die Zellen, die lediglich über CD3 und CD28 stimuliert wurden. Die nachfolgend durchgeführte durchflußzytometrische Messung bestätigte diese Annahme (**Abb. 5.2.8B**). So waren anhand der Streulichteigenschaften die mit anti-CD95 mAK-kolierten T-Zellen deutlich größer und granulärer als die CD3/CD28-stimulierten Zellen.



**Abb. 5.2.8: CD95LFc inhibiert und anti-CD95 mAK fördert die Bildung von Proliferationsclustern und Blasten.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden für drei Tage auf Zellkulturplatten gegeben, die mit anti-CD3/CD28 (2 bzw. 5 µg/ml) +/- CD95LFc, hulgGfC-Kontrollprotein (jeweils 20 µg/ml) oder anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) beschichtet waren. (A) Die Beurteilung der Blastenbildung erfolgte nach mikroskopischer Inspektion. (B) Die FSC/SSC-Dotplots erlauben eine Aussage über die Granularität (SSC) und Größe (FSC) der Zellen.

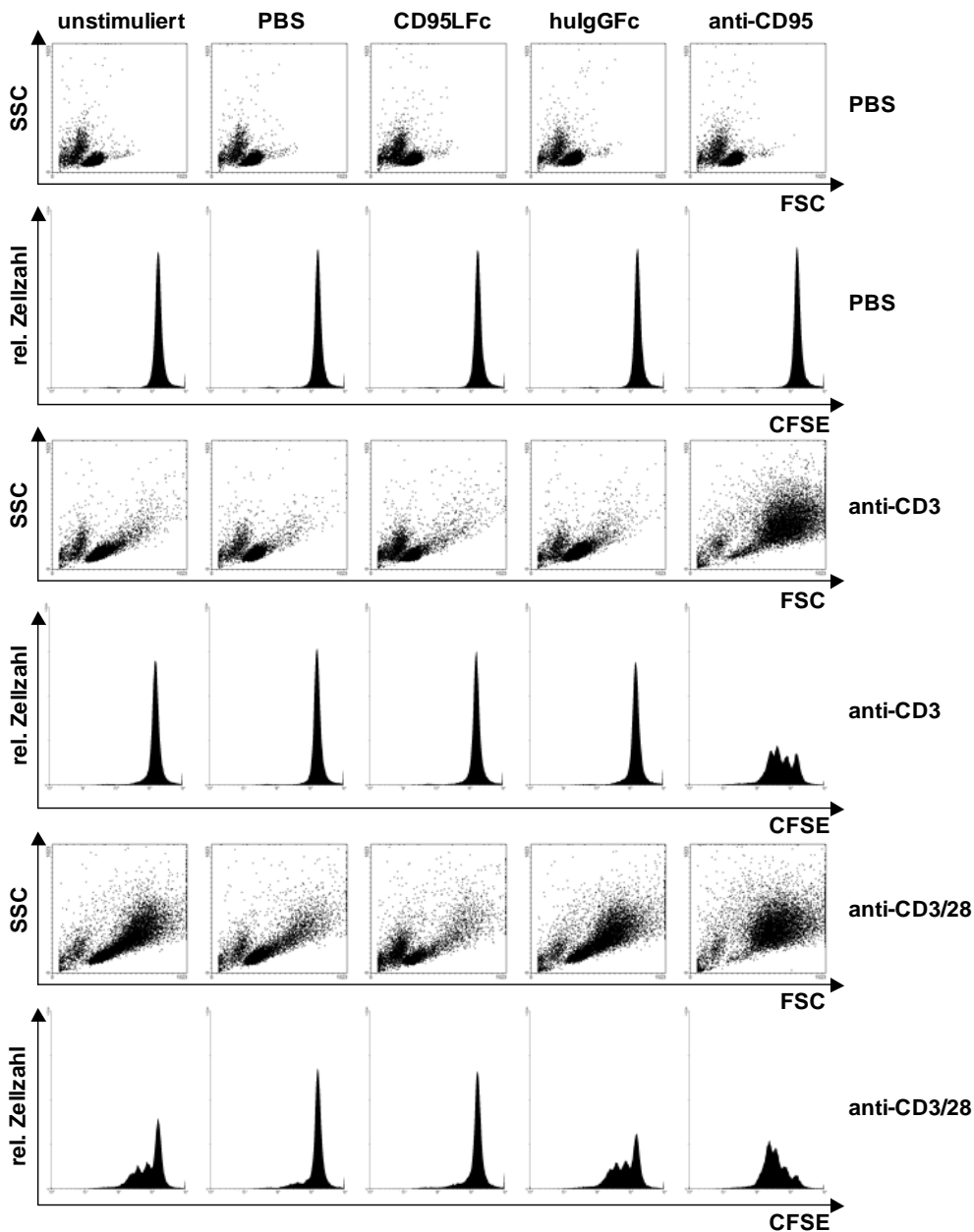
### Effekt der CD95-Ligation auf den Einbau von $^3\text{[H]}$ Thymidin und die Zellteilungsrate

Die Inkorporation von  $^3\text{[H]}$  Thymidin während der DNA-Synthese gilt als Maß für die Zellproliferation. Im Folgenden sollten die Vorbefunde zum Einfluss von CD95LFC und des anti-CD95 Antikörpers (7C11) auf die Proliferation untersucht werden.



**Abb. 5.2.9: Inhibition bzw. Steigerung des Thymidin-Einbaus durch CD95-Koligation.** Frisch isolierte PBMZ wurden für drei Tage mit anti-CD3 alleine oder in Kombination mit anti-CD28 in An- oder Abwesenheit von 20  $\mu\text{g/ml}$  CD95Fc, huIgGFC oder 2  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD95 mAK 7C11 inkubiert. 18 Stunden nach Zugabe von 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{[H]}$  Thymidin wurde der Einbau im  $\beta$ -Zähler gemessen. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Parallelansätzen mit Standardabweichung.

Die Quantifizierung eingebauter Radioaktivität von  $^3\text{[H]}$  Thymidin erfolgte in PBMZ, die wie in **Abb. 5.2.9** angegeben stimuliert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Fusionsproteine oder der anti-CD95 mAK per se keinen Effekt auf den  $^3\text{[H]}$  Thymidin-Einbau und damit auf die Proliferation haben. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Zunahme der Radioaktivität in T-Zellen, die zusätzlich zur CD3/CD28-Stimulation mit anti-CD95 inkubiert wurden. Im klaren Gegensatz dazu war die Proliferation bei Ligation mit CD95LFC deutlich reduziert. Die Inkubation mit dem Kontrollprotein huIgGFC hatte keinen nennenswerten Effekt (**Abb. 5.2.9**). Voraussetzung für einen Einfluss der CD95-Ligation auf ruhende T-Zellen war die gleichzeitige Stimulation des CD3-Komplexes. Interessanterweise spielte es dabei keine Rolle, ob die Stimulation über CD3 alleine oder zusätzlich über CD28 durchgeführt wurde. Der blockierende Effekt von CD95LFC scheint demnach dominant, da selbst die CD3/CD28-Koligation der inhibitorischen Wirkung des CD95LFC nicht entgegenwirken konnte. Vieles deutete zudem darauf hin, dass der anti-CD95 ein kostimulatorisches Signal 2 hervorrufen kann. Es stellte sich daher auch die Frage, ob CD95 unter diesen Bedingungen den klassischen CD28-Kostimulus ersetzen oder modulieren könnte.

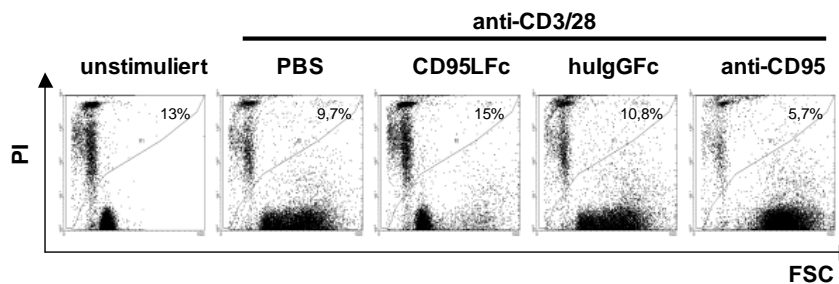


**Abb. 5.2.10: CD95 beeinflusst die CD3/CD28-induzierte Zellproliferation.** Die Stimulation CFSE-beladener  $CD4^+$ -T-Zellen erfolgte mit plattengebundenen anti-CD3 +/- anti-CD28 mAK. Die Kultivierung der Zellen wurde in An- und Abwesenheit der CD95-Agonisten CD95LFc (20  $\mu\text{g/ml}$ ) oder anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder des Kontrollproteins hulGFc (20  $\mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt. Nach drei Tagen wurden FSC/SSC- sowie CFSE-Profile der Zellen erstellt.

Obwohl in der Regel anzunehmen ist, dass DNA-Synthese (Thymidin-Einbau) und Zellteilung eng miteinander verknüpft sind, wurden die Daten mittels CFSE-Analyse verifiziert. Die Streulichteigenschaften und die CFSE-Profile der Zellen zeigen an, dass die CD95-Agonisten die T-Zellen per se nicht beeinflussen (siehe PBS-Kontrollen). Die CD3/CD28-induzierte Zellteilung führt dazu, dass die CFSE-Histogramme neben einem prominenten Peak hoher Fluoreszenz auch mehrere Peaks geringerer Fluoreszenz aufwiesen. Wie erwartet hatte die alleinige CD3-Stimulation einen wesentlich schwächeren Einfluss auf

die Teilungsrate, was eindeutig die Notwendigkeit des zweiten Signals bei der TZR/CD3-Stimulation widerspiegelt. Die Anwesenheit von 5 µg/ml anti-CD95 mAK unterstreicht auch unter diesen Bedingungen den starken kostimulatorischen Effekt auf die Zellteilung und legt nahe, dass CD95 einen noch effektiveren kostimulatorischen Rezeptor darstellen kann als CD28 (**Abb. 5.2.10**). CD95-Ligation erhöhte dementsprechend selbst die Teilungsrate in CD3/CD28-stimulierten T-Zellen. Im Gegensatz dazu war in Anwesenheit des Fusionsproteins CD95LFc (20 µg/ml) nur ein Peak hoher Fluoreszenz detektierbar und damit eine deutliche Inhibition der Zellteilungsrate auch bei einem zusätzlichen Signal über CD28 erkennbar (**Abb. 5.2.10**).

Parallel konnte durch Färbung der stimulierten CFSE-beladenen T-Zellen mit PI gezeigt werden, dass die CD95-Agonisten keine Apoptose auslösten (**Abb. 5.2.11**). Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Inhibition durch CD95LFc in einer verstärkten Zelltodinduktion begründet liegt. Da die Kostimulation des CD95-Rezeptors zum einen in einer deutlich gesteigerten Zellteilung resultiert und auf der anderen Seite die Zellaktivierung komplett blockieren kann, scheint CD95 zwei augenscheinlich widersprüchliche und bisher nicht bekannte Funktionen auf die T-Zellprogression auszuüben, welche im Folgenden genauer analysiert werden sollten.

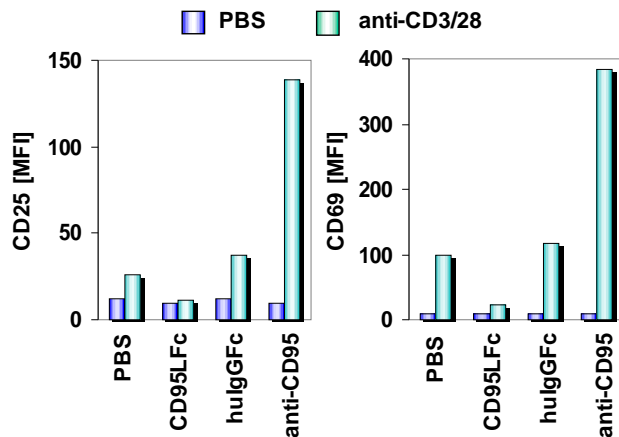


**Abb. 5.2.11: Kostimulatorisches Potenzial von CD95 ohne Induktion von Zelltod.** Abgebildet sind die anti-CD3/CD28-stimulierten Zellen aus Abb. 5.2.10 in An- und Abwesenheit der CD95-Agonisten nach dreitägiger Kultivierung. Die zusätzlich zur CFSE-Analyse durchgeführte Zelltodanalyse demonstriert durch die Definition einer Region PI-positiver Zellen den prozentualen Anteil toter Zellen an der Gesamtpopulation.

### Modulation der CD25- und CD69-Expression durch CD95-Koligation

Innerhalb kurzer Zeit nach TZR/CD3/CD28-Stimulation erscheinen Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der Zellen, zu denen unter anderem auch CD25 und CD69 zählen. Basierend auf den bisher gezeigten Daten, die einen deutlichen Effekt von CD95 auf die T-Zellproliferation nach mehrtägiger Inkubation demonstrieren, sollte überprüft

werden, ob ein Einfluss auf die Expression dieser klassischen Aktivierungsmarker zu verzeichnen ist. Auch auf Ebene der Aktivierungsmarker resultierte die Anwesenheit von CD95LFc auf CD3/CD28-stimulierten Zellen in einer Reduktion der CD25- und CD69-Expression (**Abb. 5.2.12**). Im Gegensatz dazu veranschaulichen die Balkendiagramme die fulminante Zunahme der Oberflächenexpression beider Moleküle nach Inkubation mit anti-CD95 mAK. Auch in diesem Experiment zeigten die eingesetzten Proteine per se keinen Effekt.



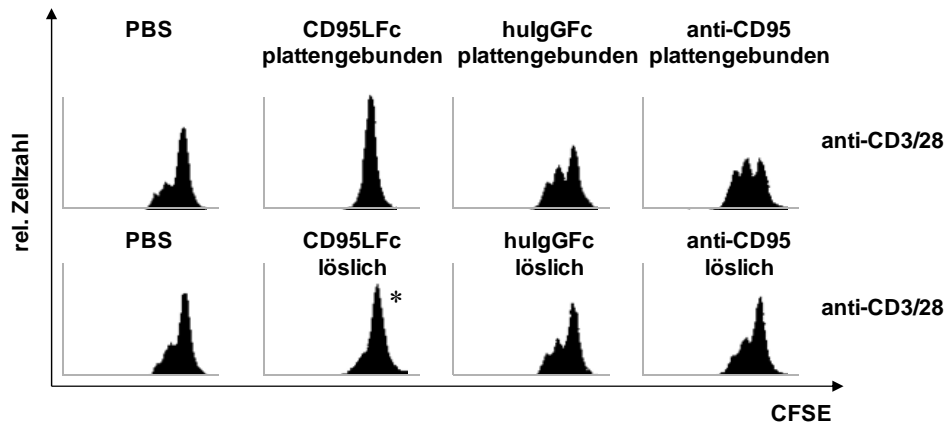
**Abb. 5.2.12: Expression von Aktivierungsmarkern auf CD95-kostimulierten Zellen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden in Zellkulturplatten kultiviert, die mit anti-CD3/CD28 mAK mit und ohne CD95LFc, hulGFc (jeweils 20 µg/ml) oder anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5 µg/ml) beschichtet waren. Die Analyse der CD25- und CD69-Oberflächenexpression wurde nach eintägiger Inkubation durchgeführt.

### Die CD95-Signalgebung ist abhängig von der Immobilisierung der CD95-Agonisten

Es wurde beschrieben, dass die Auslösung des apoptotischen Programms die Trimerisierung von CD95L und CD95 sowie die Aggregation und Oligomerisierung der Rezeptoren erfordert. Bekannt war, dass Membran-assoziiertes CD95L ein höheres zytotoxisches Potenzial aufweist als lösliches CD95L, da dieses eine geringere Fähigkeit zur CD95-Komplexbildung hat. Es sollte daher nachfolgend untersucht werden, ob die CD95-Agonisten CD95LFc und anti-CD95 mAK bereits in löslicher Form aktiv sind oder ob die Immobilisierung der Proteine auf Zellkulturplatten notwendig ist.

Die Primärstimulation CFSE-markierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAK. Zusätzlich wurden die Zellen mit immobilisierten oder löslichen CD95-Agonisten kokultiviert (**Abb. 5.2.13**). Die CFSE-Histogramme zeigen deutlich die Teilung der Zellen nach CD3/CD28-Stimulation an, die nach gleichzeitiger Ligation von CD95 durch plattengebundenen anti-CD95 mAK noch verstärkt wurde. Löslicher anti-CD95 mAK hatte hingegen keinen Effekt auf die CD3/CD28-induzierte Zellprogression. Auch CD95LFc war in löslicher Form nicht in der Lage, die Proliferation

wesentlich zu beeinflussen. Beim Einsatz desselben Fusionsproteins in plattengebundener Form, wurde die Proliferation wieder komplett blockiert (**Abb. 5.2.13**). Somit konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung der CD95-Agonisten erforderlich ist, um eine Beeinflussung der Proliferation zu erhalten.



**Abb. 5.2.13: Plattengebundene CD95-Agonisten beeinflussen die CD3/CD28-induzierte Proliferation.** CFSE-beladene CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 mAK (2 bzw. 5 µg/ml) in An- und Abwesenheit von löslichem oder immobilisiertem CD95LFC, huIgGFc (jeweils 20 µg/ml) oder anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) kultiviert. Die CFSE-Analyse zeigt die Zellteilungsrate der Zellen an Tag 3 an. \* Induktion von Zelltod durch lösliches CD95LFC täuscht Inhibition vor.

### 5.2.5 Dosisabhängiger Effekt von CD95-Agonisten auf TZR-stimulierte Zellen

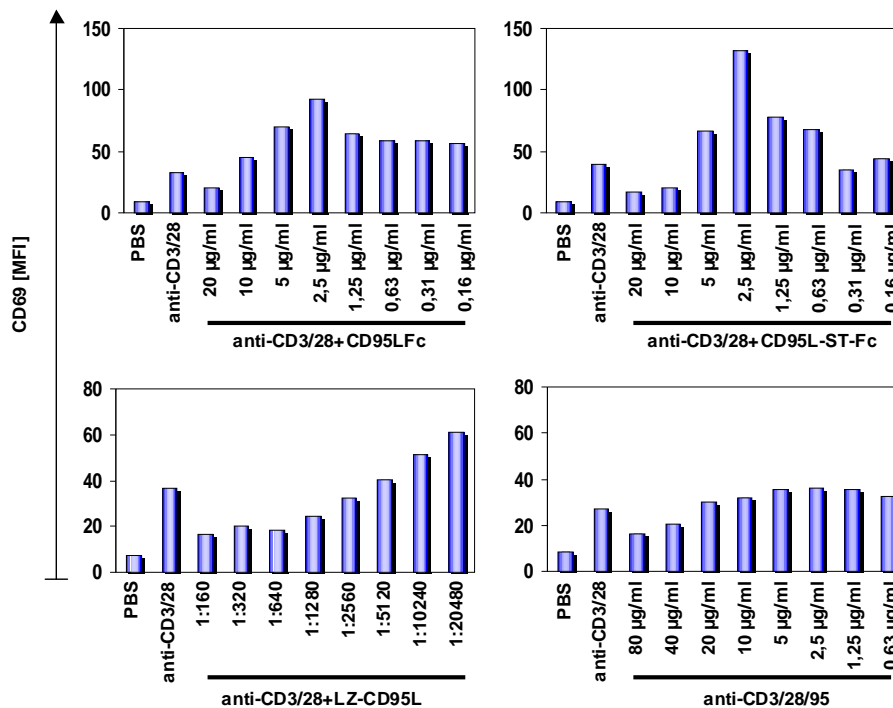
Da lösliche und plattengebundene CD95-Agonisten unterschiedliche Effekte auf die Aktivierung zeigten, lag die Vermutung nahe, dass der Grad der Kreuzvernetzung die Signalgebung beeinflusst. Die Verwendung eines LZ-CD95L sollte zur Aufklärung dieser Hypothese beitragen. Dieses Fusionsprotein wurde uns freundlicherweise von Inna Lavrik aus Heidelberg zur Verfügung gestellt. Durch Fusion der extrazellulären CD95L-Domäne mit einem modifizierten (148;149) trimerisierenden Leucin-Zipper-Motiv (150-152) soll LZ-CD95L quasi membranständigen CD95L ersetzen können.

### Expression des Aktivierungsmarkers CD69 bei CD95-Kostimulation

Zur Untersuchung des LZ-CD95L-Effektes auf die T-Zellaktivierung wurde das Fusionsprotein zunächst in steigender Konzentration auf Zellkulturplatten gegeben die gleichzeitig mit anti-CD3 und anti-CD28 beladen waren. Parallel erfolgte die Kostimulation mit weiteren CD95-Agonisten wie CD95LFC oder CD95L-ST-Fc (CD95LFC fusioniert an eine Strep-tag-Peptidsequenz) sowie dem anti-CD95 mAK anti-APO-1. (**Abb. 5.2.14**). Nach CD3/CD28-Stimulation war der erwartete Anstieg der CD69-Oberflächenexpression zu



verzeichnen. Überraschenderweise zeigte sich bei der Titration für alle verwendeten CD95-Agonisten ein dosisabhängiger Effekt auf die Expression des Aktivierungsmarkers. Die Kostimulation durch die CD95-Agonisten in hoher Konzentration resultierte in einer verminderten Expression, mit abnehmender Konzentration wurde jedoch ein positiver Effekt auf die CD69-Expression evident. Im dargestellten Experiment war dieser Effekt bei Kostimulation mit CD95L-ST-Fc für den hier gezeigten Spender bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml am deutlichsten. In diesem Fall konnte eine Verdreifachung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD69 im Vergleich zur alleinigen CD3/CD28-Stimulation festgestellt werden (Abb. 5.2.14). Der Befund legt nahe, dass CD95 die T-Zellaktivierung abhängig von der Konzentration des CD95L beeinflusst.

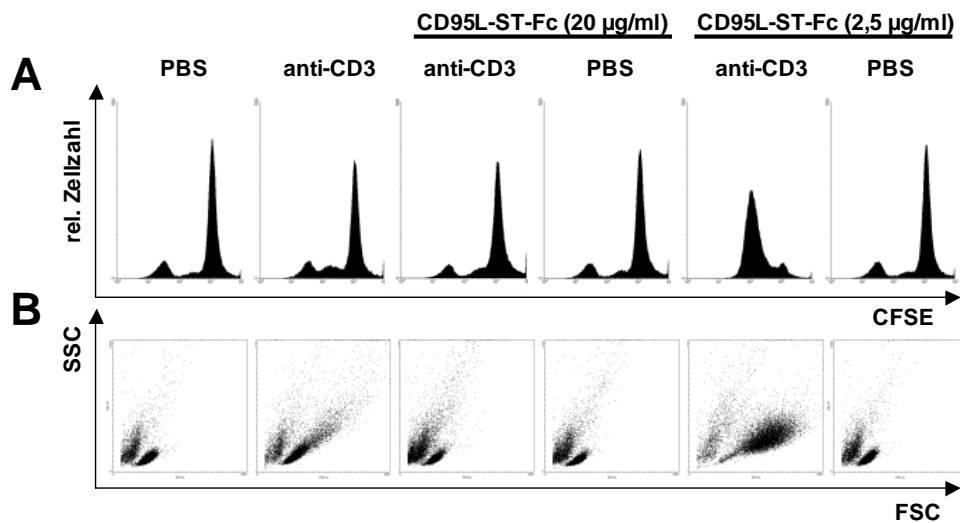


**Abb. 5.2.14: Dosisabhängige Modulation der CD69-Expression durch CD95-Koligation.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit plattengebundenen anti-CD3/CD28 (2 bzw. 5 µg/ml) +/- CD95LFc, CD95L-ST-Fc, LZ-CD95L oder anti-CD95 mAK anti-APO-1 in abnehmender Konzentration kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die Oberflächenexpression von CD69 auf den Zellen visualisiert. Im Balkendiagramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität ([MFI]) entsprechend der CD69-Expression angegeben.

### CD95-Agonisten beeinflussen die Zellteilungsrate dosisabhängig

Der konzentrationsabhängige Effekt der CD95-Agonisten sollte im Folgenden auch mittels CFSE-Analyse überprüft werden. CFSE-markierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dazu auf Platten ausgesät, die mit anti-CD3 mAK in An- und Abwesenheit von CD95L-ST-Fc in hoher und niedriger Konzentration immobilisiert waren. Kostimulation mit 2,5 µg/ml CD95L-ST-Fc

bewirkte eine deutliche Zunahme der Proliferationsrate. Nach fünftägiger Kultur zeigte das CFSE-Profil, dass sich fast alle Zellen in der Zellpopulation geteilt hatten (Abb. 5.2.15A).



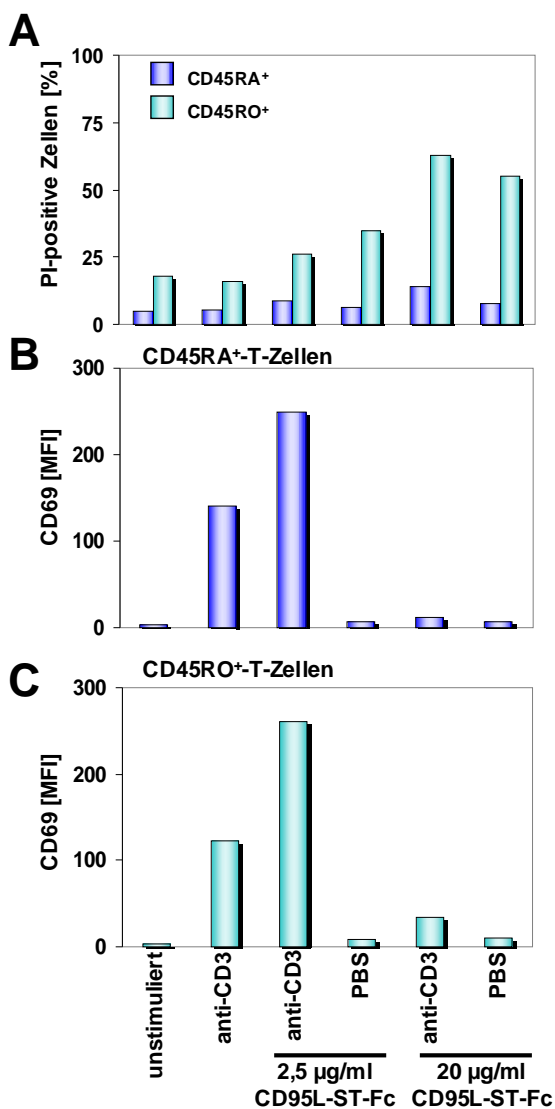
**Abb. 5.2.15: Konzentrationsabhängiger Effekt von CD95 auf anti-CD3-stimulierte T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit dem fluoreszierenden Zellfarbstoff CFSE beladen und mit anti-CD3 mAK (2 µg/ml) in An- und Abwesenheit von CD95L-ST-Fc (2,5 bzw. 20 µg/ml) stimuliert. Dargestellt sind (A) CFSE- und (B) FSC/SSC-Profile der an Tag 5 gemessenen Zellen.

Da bei CD3-Stimulation nur eine relativ geringe Abnahme der CFSE-Fluoreszenz festzustellen war, erlaubte dieses Experiment keine gesicherte Aussage über die inhibitorische Wirkung des CD95L-ST-Fc in hoher Konzentration. Aus diesem Grund wurden die Zellen auch hinsichtlich ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) untersucht (Abb. 5.2.15B). Die CD95L-ST-Fc (20 µg/ml)-koinkubierten T-Zellen bildeten ebenso wie unstimulierte Zellen keine Blasten, während die CD3-stimulierten Zellen etwas größer und granulärer erschienen. Somit bestätigte sich auch auf Ebene der Zellteilungen eine von der Konzentration der CD95-Agonisten abhängige Modulation.

Insbesondere bei Verwendung von 20 µg/ml CD95L-ST-Fc war anhand der Streulichteigenschaften für den hier untersuchten Spender ein deutlicher Hinweis auf Apoptoseinduktion zu erkennen. Es stellt sich daher die Frage, ob dies möglicherweise in der Zusammensetzung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation aus CD95-resistenten CD45RA<sup>+</sup>- und CD95-sensitiven CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen begründet liegt.

### CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen werden dosisabhängig durch CD95 moduliert

Das Verhältnis zwischen CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen könnte aufgrund der Vorbefunde bedingen, dass in einem Teil der Zellen durch CD95-Agonisten Zelltod ausgelöst wird. Im Folgenden galt es daher zu klären, ob Apoptose-resistente CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen trotz ihrer geringen CD95-Expression über CD95 kostimuliert werden können. Im Vergleich dazu sollten CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen unter identischen Bedingungen kultiviert werden. Neben der Untersuchung des Aktivierungsstatus, sollte die Induktion von Zelltod mittels PI-Färbung verfolgt werden (Abb. 5.2.16).

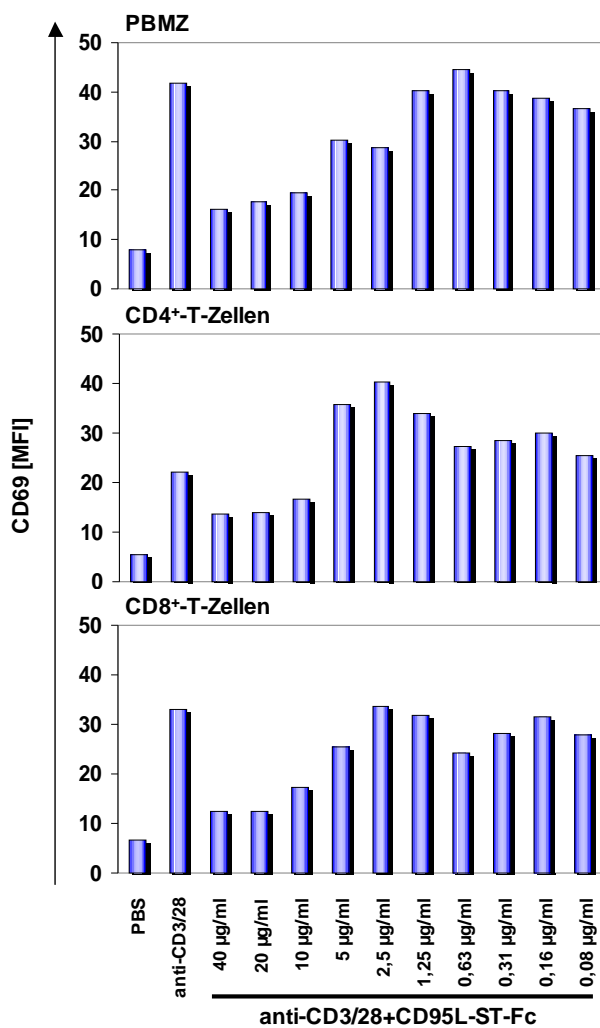


Wie erwartet, waren CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen resistent gegen CD95-vermittelte Apoptose (Abb. 5.2.16A). Gleichzeitig zeigte CD95 einen deutlichen kostimulatorischen Effekt auf die Induktion von CD69. Auch in diesem Experiment wurde eine Inhibition bei hoher und eine gesteigerte Aktivierung bei geringer CD95L-ST-Fc-Konzentration beobachtet (Abb. 5.2.16B). Ein ähnliches CD69-Aktivierungsmuster stellte sich bei den CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen dar (Abb. 5.2.16C). Zusätzlich ist allerdings zu berücksichtigen, dass das CD95L-ST-Fc-Fusionsprotein insbesondere bei hoher Konzentration vermehrt Apoptose in CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen induzierte (Abb. 5.2.16A).

**Abb. 5.2.16: Dosisabhängige CD95-Kostimulation in CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen.** CD45RA<sup>+</sup>- und CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie in Abb. 5.2.15 angegeben stimuliert. (B,C) Nach Inkubation über Nacht wurde die CD69-Expression auf der Zelloberfläche analysiert. (A) Parallel wurde der Anteil PI-positiver Zellen bestimmt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen generell besser zur Untersuchung des kostimulatorischen Effektes von CD95 geeignet scheinen, weil keine Verfälschungen der Ergebnisse durch zusätzliche Induktion von Zelltod auftreten. Jedoch wird ebenfalls deutlich, dass die Aktivierung nach CD95-Koligation gemessen an der CD69-Expression in beiden Zellpopulationen nahezu identisch und dosisabhängig verläuft. Demnach sind auch Gesamt-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zur Analyse der CD95-vermittelten Kostimulation geeignet.

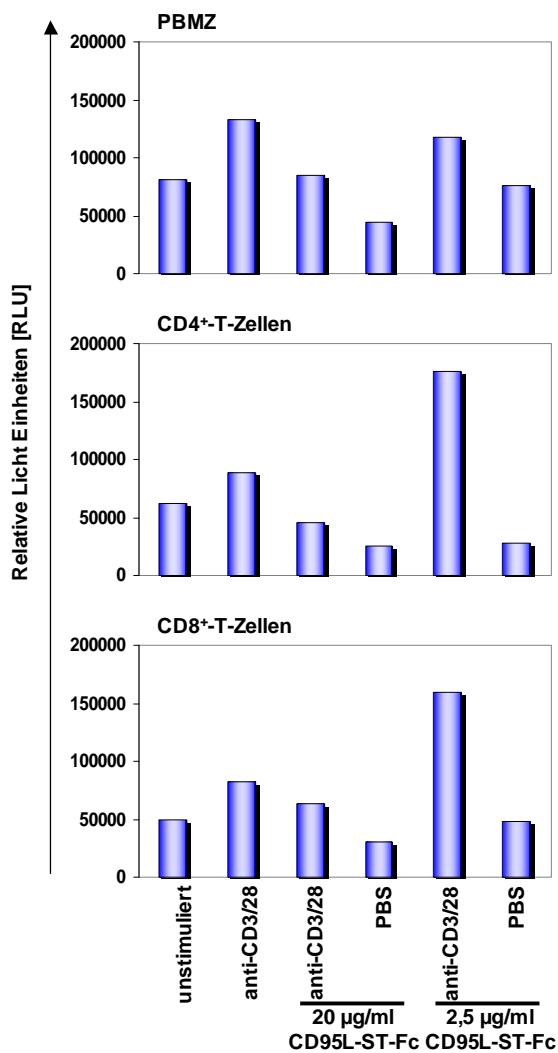
### Dosisabhängige CD95-Kostimulation in PBMZ, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Zellen



Im nächsten Schritt galt es zu klären, ob die in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene Dosisabhängigkeit der CD95-Kostimulation auch auf frisch isolierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen übertragbar ist oder ob es sich bei dem Ereignis um ein rein CD4<sup>+</sup>-T-Zell-spezifisches Phänomen handelt. Die Analyse der CD69-Expression auf stimulierten PBMZ, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als Maß für die Zellaktivierung ergab, dass die dosisabhängige positive Kostimulation im Wesentlichen in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachweisbar ist. Der inhibitorische Effekt zeigte sich dagegen auch in PBMZ und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb. 5.2.17).

**Abb. 5.2.17: CD69-Expression auf CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und PBMZ.** Die frisch aufbereiteten CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und PBMZ wurden wie angegeben stimuliert und nach 18 Stunden auf die Expression von CD69 hin analysiert.

In einer nächsten Serie von Experimenten wurde die ATP-Produktion der Zellen bestimmt, die neben der Bestimmung des Proliferationsverhaltens auch eine Aussage über das Auftreten von Zelltod erlaubt. Überprüft wurden erneut PBMZ, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die wie in der **Abb. 5.2.18** angegeben stimuliert wurden. Nach dreitägiger Inkubation wurde die ATP-Menge mittels eines Luciferase-basierten Assays bestimmt. Die Lichtemission der Luciferase-katalysierten Luciferinreaktion dient als Messgröße, die der ATP-Menge direkt proportional ist und damit ein Maß für die Proliferationsrate der Zellen darstellt.

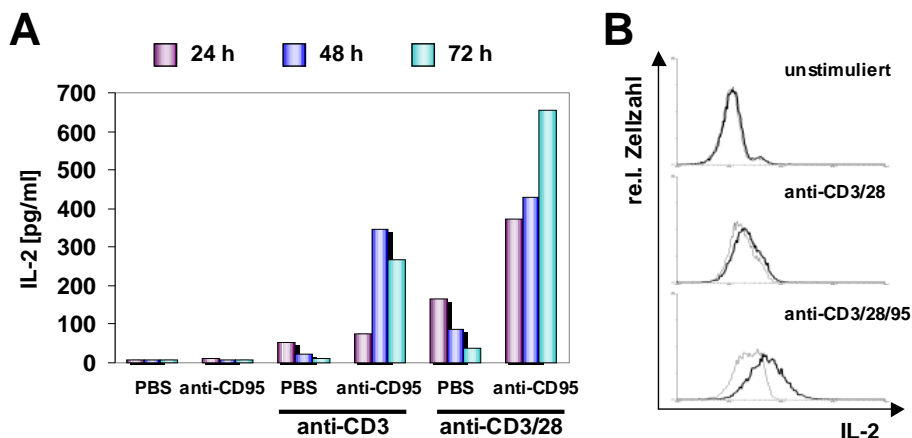


Erwartungsgemäß wiesen unstimulierte, vitale Zellen nur eine moderate Produktion von ATP auf. Die CD3/CD28-induzierte Proliferation der PBMZ, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen resultierte in metabolischer Zellaktivität, was in allen Fällen zu erhöhter ATP-Produktion führte. Während 2,5 µg/ml CD95L-ST-Fc die Proliferation und die damit verbundene ATP-Produktion deutlich erhöhte, führte die Kostimulation mit 20 µg/ml CD95L-ST-Fc zu einer kompletten Inhibition (**Abb. 5.2.18**). Wie erwähnt, spiegelt die Abnahme der ATP-Menge bei hoher Konzentration von CD95L-ST-Fc auch die vermehrte Induktion von Zelltod in CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen wieder.

**Abb. 5.2.18: Analyse des Proliferationsverhaltens anhand der ATP-Produktion.** PBMZ, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eines Spenders wurden mit anti-CD3/CD28 mAK (2 bzw. 5 µg/ml) stimuliert. CD95 wurde parallel mit 20 µg/ml bzw. 2,5 µg/ml CD95L-ST-Fc koligiert. Die Produktion von ATP wurde an Tag 3 gemessen. Die Lichtemission als Maß für die ATP-Menge ist in relativen Lichteinheiten (*relative light units* [RLU]) angegeben (Mittelwerte aus zwei parallelen Ansätzen).

### 5.2.6 Zytokinproduktion CD95-kostimulierter Zellen

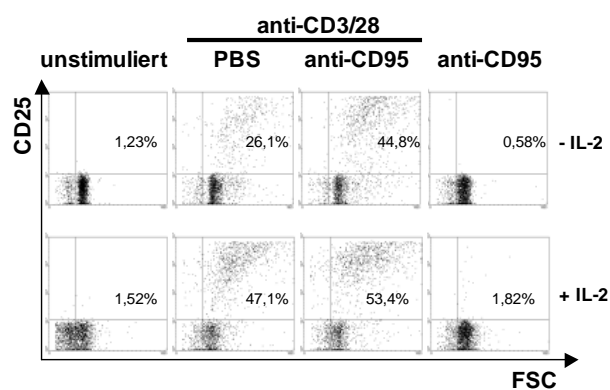
T-Zellen sezernieren nach Aktivierung Zytokine, die an die Umgebung abgegeben werden. Das bereits erwähnte IL-2 hat als autokrines Zytokin essentielle Aufgaben im Rahmen der Reifung und des Wachstums der T-Zellen. Andere von T-Lymphozyten sezernierte Zytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  oder IL-4 wirken auf andere Zellen des Immunsystems und mobilisieren wichtige Effektor- und/oder Regulatorfunktionen. Auf Grundlage ihres Zytokinmusters und der damit verbundenen Aufgabe im Immunsystem, werden die T-Effektorzellen in verschiedene Subtypen eingeteilt beispielsweise in  $\text{T}_\text{H}1$  und  $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen.



**Abb. 5.2.19: Erhöhte IL-2-Produktion nach CD95-Koligation.**  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen wurden wie angegeben aktiviert und mit (A) anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. (B) 7C11 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) koligiert. (A) Die Überstände wurden nach den angegebenen Zeitpunkten gesammelt und die Konzentration von IL-2 mittels ELISA in Bezug auf eine Standardkurve ermittelt. (B) Die intrazelluläre IL-2-Färbung erfolgte nach zweitägiger Kultivierung. Graue Linie=Isotypkontrolle. Schwarze Linie=IL-2-spezifischer mAK.

Die Koligation des CD95-Rezeptors mit geringer Dosis von CD95-Agonisten führte zu einer deutlichen Erhöhung der T-Zellaktivierung und -proliferation. Dies geht in der Regel einher mit gesteigerter Produktion von IL-2, was im nächsten Schritt untersucht werden sollte (**Abb. 5.2.19**). Die IL-2-Ausschüttung war strikt abhängig von der Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3 mAK und konnte durch den zusätzlichen Stimulus über CD28 noch weiter erhöht werden. Dabei war die maximale IL-2-Sekretion CD3/CD28-stimulierter Zellen bereits am ersten Tag nachzuweisen. Während CD95-Koligation an Tag 1 zunächst zu keiner gesteigerten IL-2 Produktion führte, war der Effekt an den beiden Folgetagen umso deutlicher. Die IL-2-Konzentration in den Überständen von CD3/CD28/CD95-stimulierten Zellen lag besonders an Tag 3 weit über dem Niveau einer CD28-Kostimulation (**Abb. 5.2.19**). Dieses Ergebnis konnte mittels intrazellulärer IL-2-Färbung nach zweitägiger Inkubation verifiziert werden (**Abb. 5.2.19B**)

Diese intrinsische IL-2-Produktion scheint für die massive CD95-vermittelte T-Zellaktivierung und -expansion ausreichend zu sein, da die zusätzliche Gabe von exogenem rekombinantem IL-2 (rIL-2) keine Aktivitätssteigerung zur Folge hatte. In **Abb. 5.2.20** sind T-Zellen dargestellt, die nach 16 Stunden auf die Expression von CD25 hin untersucht wurden. Nach CD3/CD28-Stimulation exprimierten 26,1% der T-Zellen CD25. Nach Zusatz von rIL-2 stieg der Anteil positiver Zellen auf 47,1% an. Bei der Kostimulation mit anti-CD95 mAK war ein solch starker Anstieg nicht mehr nachweisbar. Es war lediglich eine Steigerung um knapp 9% in Anwesenheit von rIL-2 zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass CD95-Koligation bereits zur weitgehend maximalen Ausschüttung von IL-2 führt.

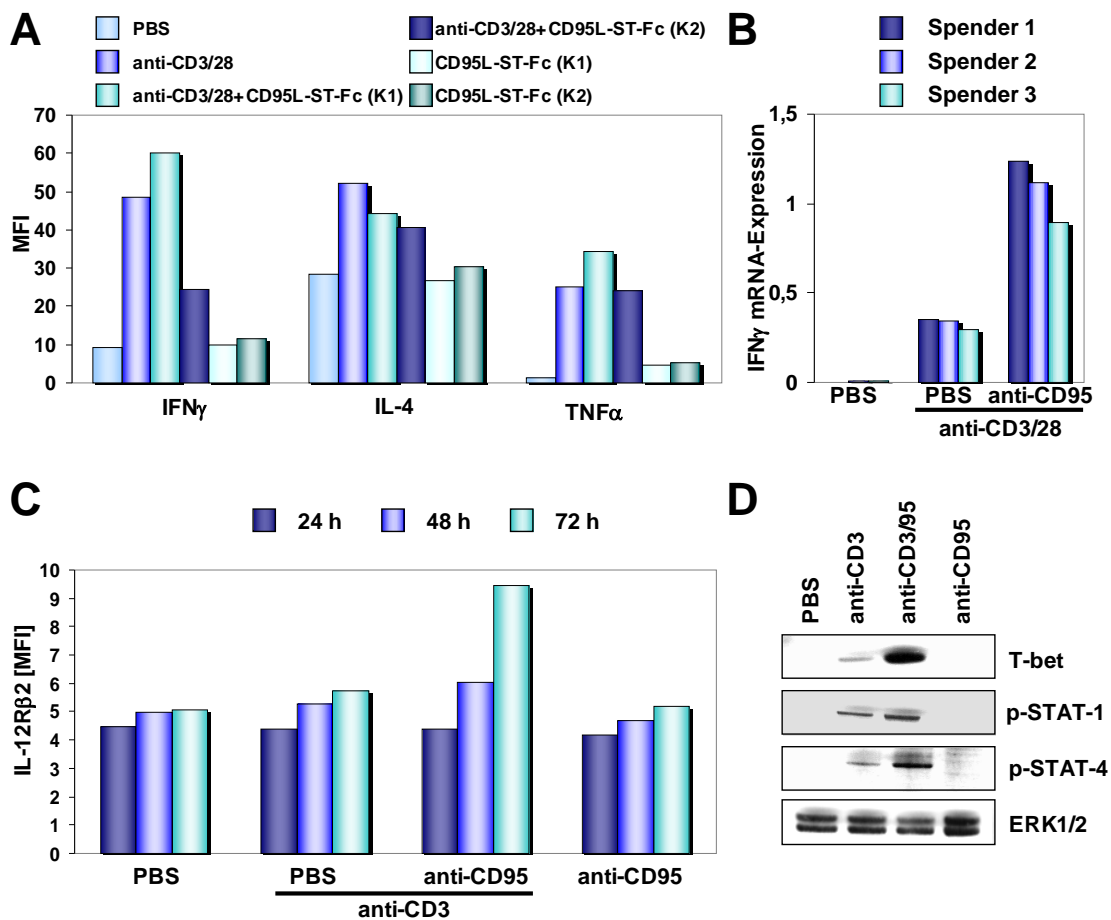


**Abb. 5.2.20: Marginale Effekte von rIL-2 auf CD3/CD28/CD95-stimulierte Zellen.** CD3/CD28-stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit oder ohne anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) kultiviert. Die Zugabe von löslichem rIL-2 erfolgte wie angegeben (10 U/ml). Nach 16 Stunden wurde die Expression von CD25 bestimmt und gegen die Zellgröße (FSC) aufgetragen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil CD25-positiver Zellen an der Gesamtzellpopulation an.

Im weiteren Verlauf wurde die Produktion der Zytokine IL-4, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  mittels intrazellulärer Färbung überprüft (**Abb. 5.2.21A**). Nach CD95-Kostimulation mit geringer Dosis CD95L-ST-Fc waren die Zytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Vergleich zu CD3/CD28-stimulierten Zellen erhöht. Interessanterweise war die Sekretion des Zytokins IL-4 beinahe unverändert, was auf eine Beteiligung von CD95 bei der Differenzierung in Richtung eines T<sub>H</sub>1-Phänotyps hindeuten könnte (**Abb. 5.2.21A**). In aktivierten T-Zellen konnten hohe Mengen CD95L-ST-Fc die Produktion von IFN $\gamma$ , nicht aber die von IL-4 und TNF $\alpha$  reduzieren.

Die deutlich verstärkte IFN $\gamma$ -Produktion nach CD95-Koligation mit geringer Konzentration des CD95-Agonisten konnte auch mittels qRT-PCR bestätigt werden. Es zeigte sich für alle 3 Spender eine signifikant höhere IFN $\gamma$  mRNA-Expression, wenn T-Zellen über CD3/CD28 und über CD95 stimuliert wurden (**Abb. 5.2.21B**).

Im Einklang mit diesen Befunden konnte nach CD95-Kostimulation eine gesteigerte Oberflächenexpression der IL-12R $\beta$ 2-Kette detektiert werden, die eine wichtige Rolle bei der T<sub>H</sub>1-Expansion spielt (Abb. 5.2.21C). Weiterhin war der T<sub>H</sub>1-Schlüsselregulator T-bet unter diesen Bedingungen verstärkt in Zelllysaten mittels Western Blot nachweisbar (Abb. 5.2.21D). Auch die Phosphorylierung der T<sub>H</sub>1-typischen STAT-Proteine-1 und -4 wurde in Lysaten von T-Zellen, die zusätzlich zur anti-CD3-Stimulation über CD95 ligiert wurden, verstärkt nachgewiesen. Die Überprüfung der ERK-Expression diente als Beladungskontrolle.



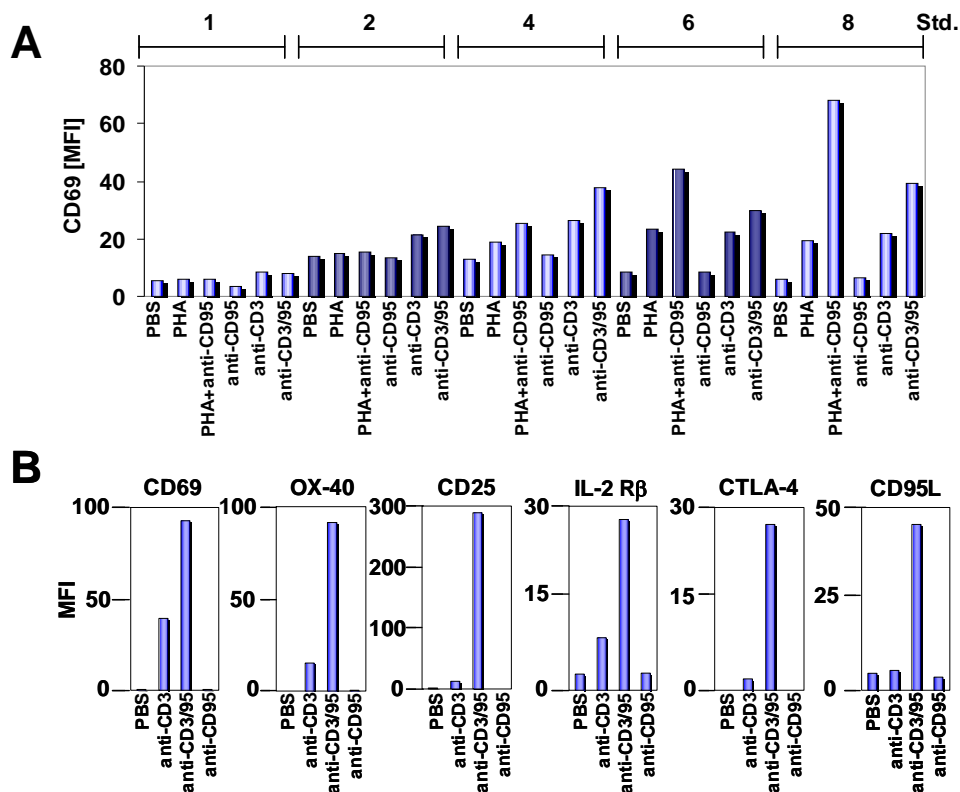
**Abb. 5.2.21: T<sub>H</sub>1-Differenzierung nach CD95-Koligation.** CD3- oder CD3/CD28-stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit (A) CD95L-ST-Fc (2,5 (K1) bzw. 20 (K2)  $\mu$ g/ml) oder (B-D) anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5  $\mu$ g/ml) kultiviert. (A) Intrazelluläre Färbung von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-4 nach dreitägiger Inkubation. (B) Die IFN $\gamma$  mRNA-Expression an Tag 3 wurde in Bezug auf die Expression von HuPo mittels qRT-PCR ermittelt. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. (C) Oberflächenexpression von IL-12R $\beta$ 2. (D) Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen T-bet, p-STAT-1/4 und ERK1/2 wurden nach zweitägiger Inkubation der Zellen durchgeführt.



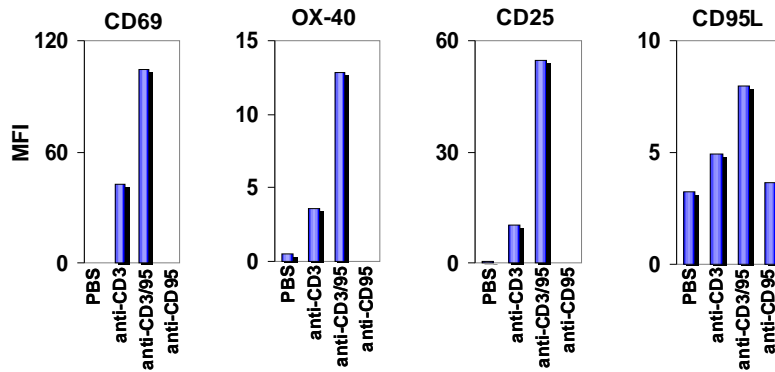
### 5.2.7 Expression wichtiger Aktivierungsmarker nach CD95-Kostimulation

Um abschätzen zu können, auf welcher Ebene CD95 das TZR-Signal beeinflusst, sollte zunächst analysiert werden, wann CD95 die Expression von CD69 auf der Zelloberfläche beeinflusst, die nach wenigen Stunden der TZR-Aktivierung erfolgt. Die dargestellten Fluoreszenzintensitäten demonstrieren den Einfluss des anti-CD95 mAKs auf die PHA- oder CD3-induzierte CD69-Expression nach 2-4 Stunden (**Abb. 5.2.22A**). Am dritten Tag der Inkubation war dieser Effekt um ein Vielfaches erhöht (**Abb. 5.2.22B**). Gleichzeitig war auch die Expression anderer Aktivierungsmarker wie OX-40 (CD134), IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122), CTLA-4 (CD152) und CD95L (CD178) deutlich verstärkt.

Obwohl nach den bereits gezeigten Ergebnissen (**Abb. 5.2.18**) zu erwarten war, dass die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ähnlich auf die Kostimulation über CD95 reagieren würden, wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD25, OX-40 und CD95L auch in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt (**Abb. 5.2.23**). Die Daten dokumentieren, dass sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei schwacher CD95-Koligation verstärkt aktiviert werden und folglich verschiedene Oberflächenmarker auf der Zelle induziert werden.



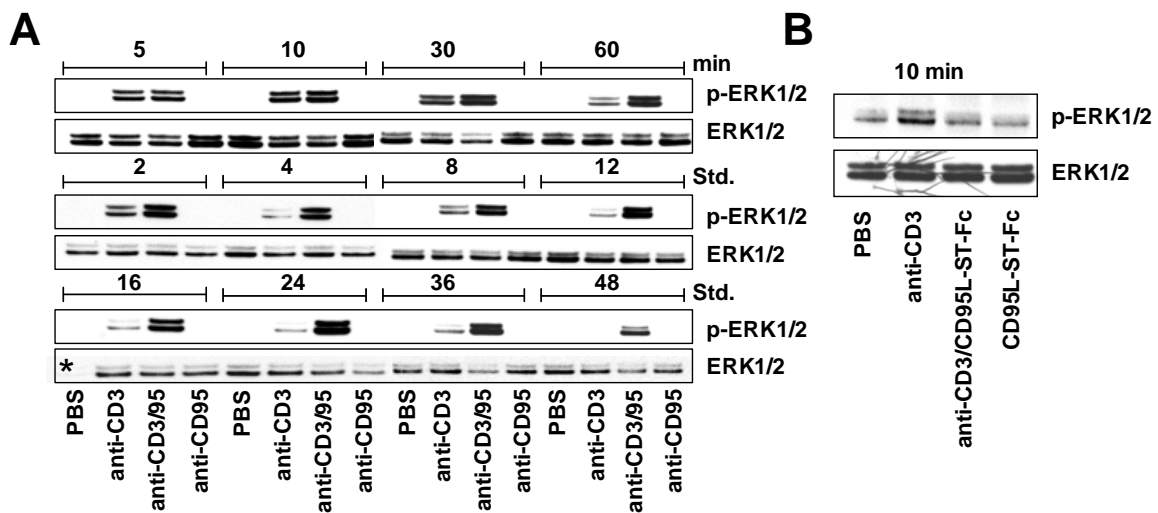
**Abb. 5.2.22: Effekt von CD95 auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie angegeben mit PHA (0,5  $\mu$ g/ml) oder anti-CD3 (2  $\mu$ g/ml) für (A) 1-8 Stunden oder (B) zwei Tage stimuliert. Die CD95-Kostimulation erfolgte mit 5  $\mu$ g/ml anti-APO-1 mAK. Die Oberflächenexpression von CD69, CD25, OX-40, IL-2R $\beta$ , CTLA-4 und CD95L wurde mit spezifischen Antikörpern bestimmt.



**Abb. 5.2.23: CD95 beeinflusst auch in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die Expression von Aktivierungsmarkern.** CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Abb. 5.2.22 beschrieben für drei Tage kultiviert und auf die Expression der Marker CD69, OX-40, CD25 und CD95L untersucht.

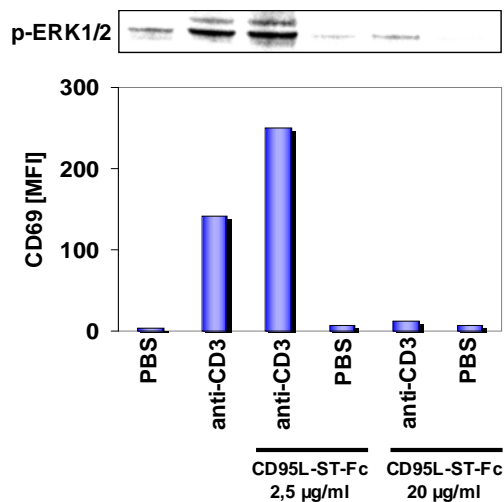
### 5.2.8 Effekt von CD95 auf die TZR/CD3-vermittelte MAPK-Aktivierung

Die Auswirkung der CD95-Koligation auf die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 war bereits nach 2 Stunden sichtbar (**Abb. 5.2.22A**). Daher lag die Vermutung nahe, dass die TZR-Signalkaskade direkt durch CD95 modifiziert werden könnte. Es stellte sich folglich die Frage, ob CD95 die Aktivierung des TZR-induzierten MAPK-Signalweges über Ras/Raf/MEK/ERK1/2 beeinflusst.



**Abb. 5.2.24: CD95-Ligation beeinflusst die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2.** CD3-stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit (A) anti-APO-1 mAK (5 µg/ml) oder (B) 20 µg/ml CD95L-ST-Fc koligiert. Es wurden Zelllysate zu den angegebenen Zeitpunkten hergestellt und die Proteine elektrophoretisch separiert. Mittels Western Blot Analyse wurden die Ansätze auf die Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Die Überprüfung der ERK1/2-Expression im selben Experiment diente als Beladungskontrolle. \*=kein Protein.

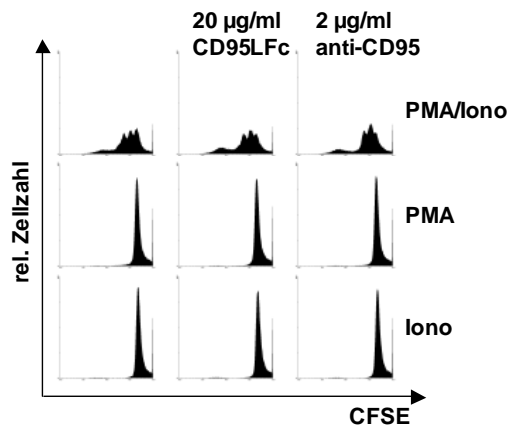
CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden für 10 Minuten bis 2 Tage wie angegeben stimuliert. Mittels Western Blot wurde eine Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung erstellt. Es konnten keine Unterschiede in der ERK-Phosphorylierung innerhalb der ersten 10-30 Minuten zwischen CD3-stimulierten und mit CD95-kostimulierten Zellen detektiert werden. Jedoch war die ERK1/2-Phosphorylierung bei CD95-Kostimulation wesentlich länger auf einem hohen Niveau nachweisbar (Abb. 5.2.24A), während sie nach alleiniger CD3-Stimulation bereits nach 30 Minuten wieder abnahm. Der inhibitorische Effekt der CD95-Ligation bei hoher Konzentration von CD95-Agonisten war bereits nach 10-minütiger Inkubation sichtbar (Abb. 5.2.24B). Auch nach zwei Tagen war bei Verwendung von 20 µg/ml CD95L-ST-Fc keine CD3-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung nachweisbar (Abb. 5.2.25). Gleichzeitig bedingte die Kostimulation mit 2,5 µg/ml CD95L-ST-Fc stärkere phospho-ERK1/2-Banden als nach alleiniger CD3-Ligation (auch nachgewiesen mittels CD69-Expression).



**Abb. 5.2.25: Dosisabhängiger Einfluss von CD95 auf die MAPK-Aktivierung.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden in Zellkulturplatten kultiviert, die mit den angegebenen Agenzien beladen waren. Nach zweitägiger Inkubation wurde ein Teil der Zellen für die Analyse der CD69-Expression verwendet. Die restlichen Zellen wurden lysiert und der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 mittels Western Blot überprüft.

### 5.2.9 CD95-Ligation beeinflusst PMA/Ionomycin-stimulierte T-Zellen nicht

Die Auswirkung des kostimulatorischen CD95-Signals auf den TZR-assoziierten ERK-Signalweg konnte eindeutig gezeigt werden. Im nachfolgenden Experiment sollte untersucht werden, ob CD95 auch die Proliferation und Expansion von T-Zellen modifizieren kann, wenn diese unter Umgehung des TZR mit dem Calciumionophor Ionomycin und/oder dem PKC-Aktivator PMA stimuliert wurden. Die dargestellten CFSE-Profile demonstrieren, dass CD95 die PMA/Ionomycin-induzierte Zellteilung weder inhibiert noch verstärkt.



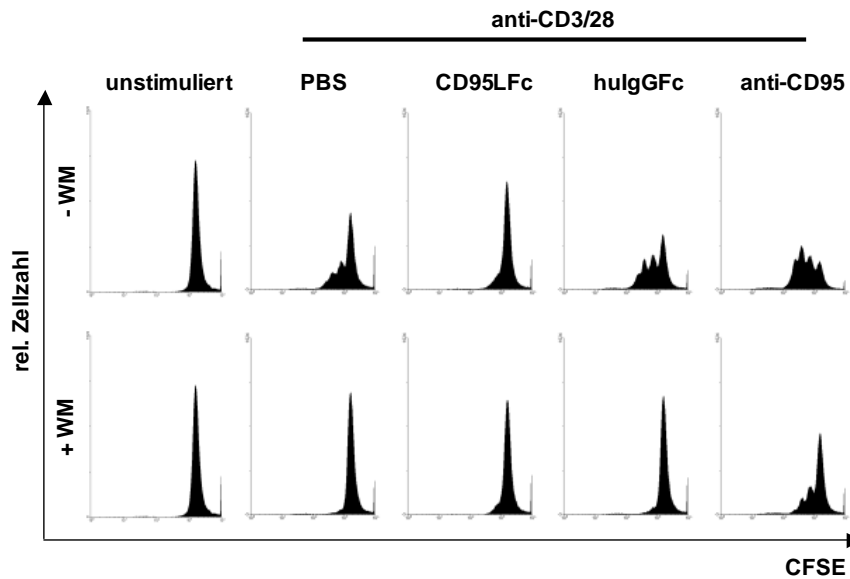
**Abb. 5.2.26: PMA/Ionomycin-induzierte Proliferation wird durch CD95 nicht moduliert.** CFSE-beladene CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit PMA (10 ng/ml), Ionomycin (500 ng/ml) oder PMA/Ionomycin in An- und Abwesenheit von CD95LFC (20 µg/ml) oder anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) inkubiert. Die Proliferationsrate wurde nach dreitägiger Kultivierung mittels CFSE-Analyse bestimmt.

Weiterhin hatten die kostimulatorischen CD95-Agonisten bei Stimulation mit PMA oder Ionomycin alleine keinen Effekt auf die Zellteilungen (**Abb. 5.2.26**). Zusammenfassend scheint der CD95/TZR-"Cross-talk" entweder oberhalb oder unabhängig von der PKC-Aktivierung und Calcium-Mobilisierung zu verlaufen. Ferner kann das kostimulatorische CD95-Signal offensichtlich weder die PKC noch Ionomycin in seiner Wirkung als T-Zellstimulus ersetzen.

### 5.2.10 Die Inhibition der PI3-Kinase verhindert die CD95-Signalgebung nicht

Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) wurde ursprünglich als essentielles Signalmolekül der CD28-Koligation beschrieben (153;154). Inzwischen ist jedoch umstritten, ob der PI3-Kinase tatsächlich eine solch tragende Rolle zugesprochen werden kann (155), unter anderem da die PI3-Kinase nach Bindung an CD28 die IL-2-Promotor-Aktivität möglicherweise auch negativ regulieren kann (156).

Wortmannin, ein spezifischer Inhibitor der PI3-Kinase, wurde im Folgenden verwendet, um den Einfluss der PI3-Kinase bei der CD95-Kostimulation in T-Zellen zu analysieren. Es stellte sich heraus, dass auch in Anwesenheit des Inhibitors Zellteilungen nachgewiesen wurden, wenn anti-CD95 mAK in geringer Dosis als Kostimulus verwendet wurde (**Abb. 5.2.27**). Im Gegensatz dazu wurde die CD3/CD28-induzierte Proliferation komplett inhibiert. Obwohl die Proliferation auch bei CD95-Kostimulation deutlich beeinträchtigt ist, legt dies nahe, dass der positiv kostimulatorische Effekt von CD95 nicht primär über den PI3-Kinase-Signalweg verläuft.

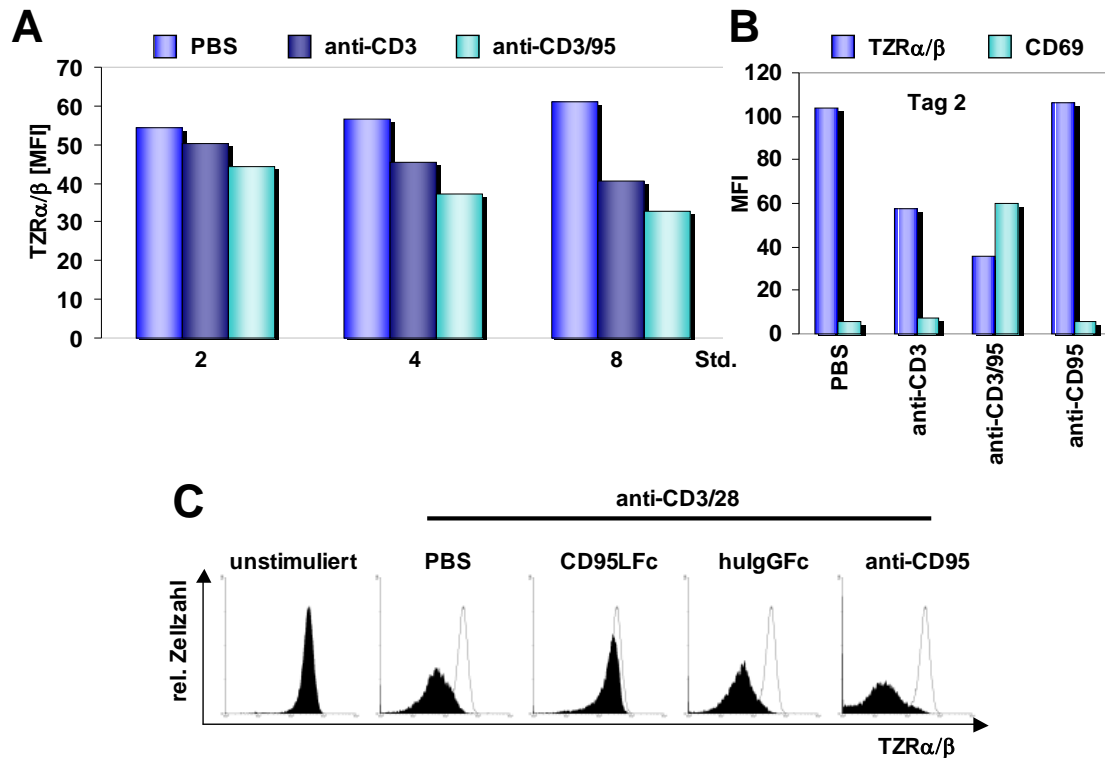


**Abb. 5.2.27: CD95-Signaltransduktion ohne PI3-Kinase-Aktivierung.** CD3/CD28-ligierte CFSE-markierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden über CD95 mit CD95Lfc (20 µg/ml) oder anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) kostimuliert und in An- und Abwesenheit von Wortmannin (WM) (10 mM) kultiviert. Die CFSE-Histogramme zeigen die Zellteilungsrate an.

### 5.2.11 CD95-Koligation hat einen Effekt auf die TZR-Internalisierung

Neben Degradation und Recycling scheint nach Stimulation die endozytische Aufnahme des TZR/CD3-Komplexes für die Bildung intrazellulärer Signalplattformen aus aufgenommenen TZR-Vesikeln und frühen Endosomen wichtig, um weitere Signalmoleküle für die optimale T-Zellantwort zu rekrutieren. Obwohl bisher nur der kostimulatorische Rezeptor CD28 mit der Stärke der Oberflächenexpression des TZR in Verbindung gebracht wurde (157), wurde eine Analyse zur Kinetik der TZR-Internalisierung mit und ohne CD95-Kostimulation durchgeführt.

Bereits nach 4-8 Stunden war erkennbar, dass die Internalisierung des TZR durch gleichzeitige CD95-Stimulation mit anti-CD95 beschleunigt wurde (**Abb. 5.2.28A**). Der Effekt war nach 2 Tagen sogar noch ausgeprägter (**Abb. 5.2.28B**). Wie erwartet hatte die alleinige Stimulation über CD95 keinen Einfluss auf die TZR-Internalisierung, während die Stimulation mit anti-CD3 zu einer Abnahme der Oberflächenexpression des TZR führte (**Abb. 5.2.28A,B**). Als Kontrolle wurde parallel der Aktivierungsmarker CD69 analysiert und darüber die durch CD95-Koligation ausgelöste gesteigerte T-Zellaktivierung nachgewiesen (**Abb. 5.2.28B**). Im Gegensatz zu diesen Befunden führte die Koligation des CD95-Rezeptors mit hoher Dosis CD95Lfc zu einer stark reduzierten TZR-Internalisierung (**Abb. 5.2.28C**).



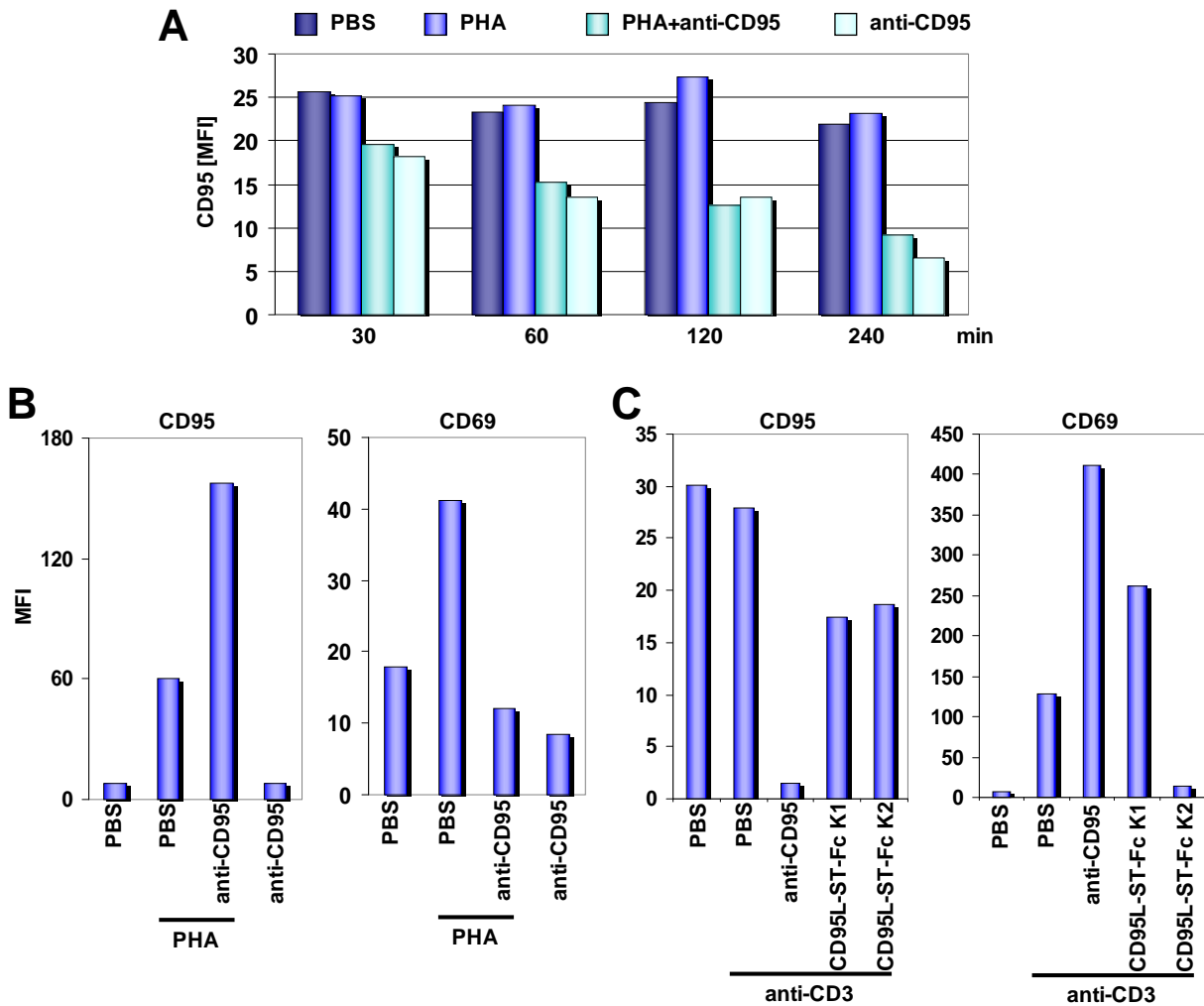
**Abb. 5.2.28: Beschleunigte oder erschwerte TZR-Internalisierung durch CD95-Kostimulation.** Plattengebundene anti-CD3 (2 µg/ml) +/- anti-CD28 mAK (5 µg/ml) wurden für die Stimulation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verwendet. Die Ligation von CD95 erfolgte mit koimmobilisiertem anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5 µg/ml) oder CD95LFC (20 µg/ml). Die Internalisierung des TZR wurde im Durchflußzytometer analysiert. Parallel wurde in B auch die Expression von CD69 erfasst. Die Analysen wurden nach (A) 2-8 Stunden, nach (B) zweitägiger oder nach (C) Inkubation über Nacht durchgeführt. (C) Linie=unstimulierte Zellen. Füllung=stimulierte Zellen wie angegeben.

### 5.2.12 CD95-Stimulation ist mit einer Rezeptorinternalisierung assoziiert

Für einige Mitglieder der TNFR-Familie wurde die Rezeptorinternalisierung bereits mit der Bildung essentieller Signalplattformen in Verbindung gebracht. Am Beispiel des TNFR1 und CD95 wurden endozytierte Rezeptosomen für die Bereitstellung von Signalmolekülen verantwortlich gemacht, insbesondere im Zusammenhang mit der Induktion von apoptotischem Zelltod (18). Bisher ist unklar, ob auch bei CD95-vermittelten anti-apoptotischen Prozessen eine Internalisierung des Rezeptors erforderlich ist. Um die Frage zu klären, ob die CD95-Kostimulation in T-Zellen mit der Internalisierung des CD95-Rezeptors assoziiert ist, wurde die Oberflächenexpression von CD95 im Zeitraum von 30 Minuten bis zu zwei Tagen analysiert.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit PHA in An- und Abwesenheit des anti-CD95 mAK anti-APO-1 stimuliert. Zur Detektion der CD95-Oberflächenexpression wurden nach der Inkubation zunächst alle CD95-Rezeptoren mit demselben anti-APO-1 mAK markiert. Im nächsten Schritt folgte die Färbung mit einem PE-beladenen Sekundärantikörper (**Abb. 5.2.29A,B**). Interessanterweise beobachteten wir sowohl in An- als auch in Abwesenheit von PHA eine durch anti-CD95 vermittelte Abnahme der CD95-Oberflächenfärbung. Demnach scheint der CD95-Rezeptor alleine durch seine Ligation bereits innerhalb weniger Minuten internalisiert zu werden, obwohl der anti-CD95 mAK für sich genommen keinen Effekt auf die T-Zellaktivierung zeigte (**Abb. 5.2.29A**). Die durchflußzytometrische Analyse an Tag 2 der Stimulation verdeutlichte den Effekt und zeigte zudem eine nicht unerwartete PHA-induzierte Induktion der CD95-Oberflächenexpression an (**Abb. 5.2.29B**). Durch die simultane Färbung des Aktivierungsmarkers CD69 wurde zudem sichergestellt, dass die CD95-Koligation in diesem Experiment eine Steigerung der T-Zellaktivierung zur Folge hatte (**Abb. 5.2.29B**). Die T-Zellstimulation wurde in den Experimenten mit PHA durchgeführt, um eine Bindung des PE-markierten Sekundärantikörpers an die anti-CD3 mAK zu umgehen. Auf einen direkt markierten anti-CD95 mAK wurde zunächst verzichtet, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der zur Stimulation verwendete anti-CD95 mAK (anti-APO-1) die Bindung des PE-markierten anti-CD95 mAK unterbinden könnte. In Folgeexperimenten konnte dies allerdings ausgeschlossen werden. So wurden die weiterführenden Versuche mit anti-CD3 als TZR/CD3-Stimulus und einem PE-konjugierten anti-CD95 mAK durchgeführt (**Abb. 5.2.29C**).

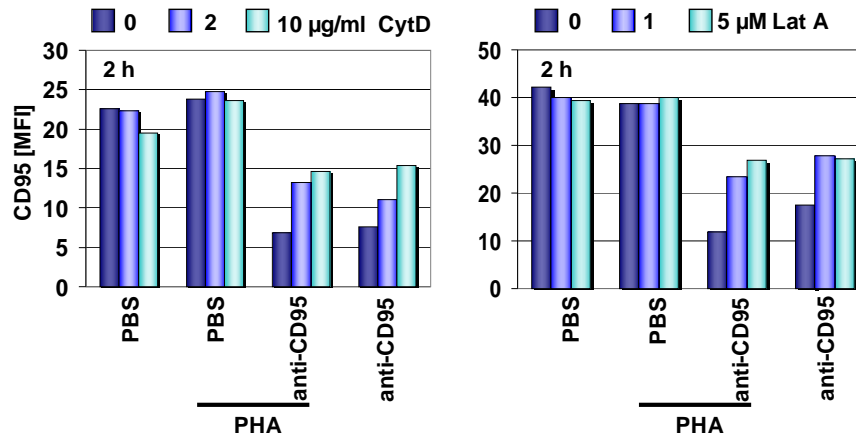
Die hier untersuchten Zellen wurden wie angegeben mit 2,5 (K1) bzw. 20 (K2) µg/ml CD95L-ST-Fc koinkubiert. Die Balkendiagramme belegen, dass CD95 auch nach Behandlung mit dem Fusionsprotein CD95L-ST-Fc internalisiert wird. Jedoch geschieht dies wesentlich langsamer als nach anti-CD95-Stimulation. Interessanterweise führen sowohl hohe als auch niedrige CD95L-ST-Fc-Konzentrationen zu diesem Effekt. Abermals erfolgte auch in diesem Versuch die Untersuchung der CD69-Expression als Kontrolle.



**Abb. 5.2.29: Internalisierung von CD95.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie angegeben mit PHA oder anti-CD3 mAK stimuliert. Die Ligation von CD95 wurde mit (A,B) anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5 µg/ml) oder (C) CD95L-ST-Fc (2,5 (K1) bzw. 20 µg/ml (K2)) durchgeführt. Die Analyse der CD95- bzw. CD69-Expression erfolgte nach (A) 30-240 Minuten, (B) zwei Tagen oder nach (C) Inkubation über Nacht. Die CD95-Expression wurde mit (A,B) anti-APO-1 und PE-markierten anti-Maus mAK oder (C) direkt markiertem anti-CD95 mAK bestimmt.

Im Folgenden stellte sich die Frage nach dem Mechanismus der CD95-Expressionsabnahme. Es wurden verschiedene pharmakologische Inhibitoren eingesetzt, die sich gegen Metalloproteasen (GM6001, TAPI), Clathrin-abhängige Endozytose (MDC), Mikrotubuli (Colchicin) oder Aktinpolymerisation (Cytochalasin D, Latrunculin A) richteten. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte in löslicher Form in unterschiedlichen Konzentrationen. Interessanterweise konnte nur in Anwesenheit von Inhibitoren der Aktinpolymerisation (Cytochalasin D und Latrunculin A) eine partielle Aufhebung der CD95-Internalisierung festgestellt werden (**Abb. 5.2.30**). Das bedeutet, dass der endozytotischen nicht-apoptotischen Aufnahme von CD95 in primären T-Zellen ein Aktin-abhängiger Mechanismus zugrunde liegen muss.



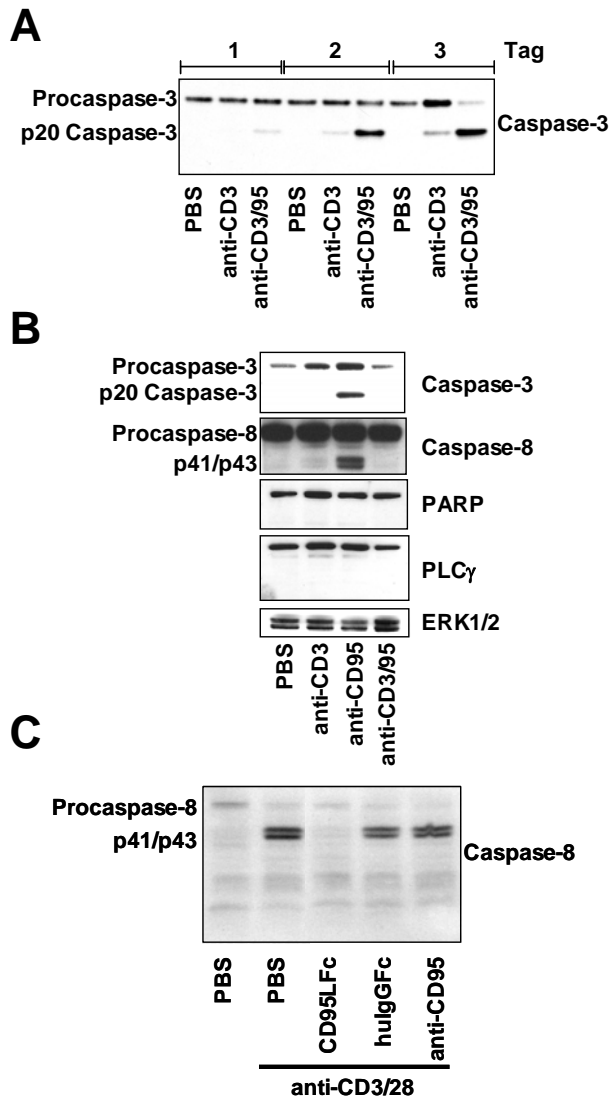


**Abb. 5.2.30: Die CD95-Internalisierung ist abhängig von der Aktinpolymerisation.** Frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie angegeben und in Abbildung 5.2.29 beschrieben kultiviert. Die Inkubation erfolgte in An- und Abwesenheit von Cytochalasin D (CytD) oder Latrunculin A (Lat A) in den angegebenen Konzentrationen. Die Auswertung der CD95-Expression auf der Zelloberfläche erfolgte wie in Abbildung 5.2.29A,B geschildert.

### 5.2.13 Caspase-Aktivierung korreliert mit Zellproliferation

Die Aktivierung einer Caspase-Signalkaskade ist charakteristisch für das apoptotische Programm ausgelöst durch CD95. Die Caspasen-vermittelte Spaltung zellulärer Proteine, die Fragmentierung der nukleären DNA, die Veränderungen des Zytoskeletts sowie die Desintegration der Zelle sind charakteristisch für den apoptotischen Zelltod. Caspasen wurden zudem jüngst als essentielle Mediatoren in anti-apoptischen Prozessen, wie Migration und Zellaktivierung beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die TZR-vermittelte Proliferation in Anwesenheit eines Caspase-Inhibitors komplett blockiert wurde (95;143). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, dass die Caspasen-3 und -8 durch die CD3-Ligation aktiviert werden und anti-CD95 mAK 7C11 (2 µg/ml) diese Induktion weiter verstärken konnte. CD95LFC (20 µg/ml) hingegen blockierte auch die Aktivierung der Caspasen nahezu vollständig. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, wie die aktiven Caspasen unter den Bedingungen der CD95-Koligation gespalten werden.

Die TZR/CD3-Stimulation führte am dritten Tag der Inkubation zur Spaltung der 32 kDa großen Procaspase-3 in ein 20 kDa großes Fragment. Interessanterweise konnte die Prozessierung der Caspase-3 zum p20-Fragment bei zusätzlicher Koligation über den CD95-Rezeptor bereits nach zwei Tagen nachgewiesen werden. An Tag 3 war die Caspase-3 vollständig fragmentiert und ausschließlich das p20-Fragment nachweisbar (**Abb. 5.2.31A**). Die T-Zellaktivierung ging neben der Prozessierung der Caspase-3 einher mit der Spaltung der p55 Procaspase-8 in die Intermediate p41/p43 (**Abb. 5.2.31B,C**).



**Abb. 5.2.31: Caspasen werden in proliferierenden Zellen gespalten.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit anti-CD3 +/- anti-CD28 mAK für (A) 1-3 Tage, (B) zwei oder (C) drei Tage kultiviert. CD95 wurde mit anti-CD95 mAK (A,B) anti-APO-1, (C) 7C11 oder CD95LFC (20  $\mu$ g/ml) koligiert. Die Western Blot Analysen wurden mit Antikörpern spezifisch für Caspase-3, Caspase-8, PARP, PLC $\gamma$  und ERK1/2 durchgeführt.

In proliferierenden T-Zellen wurde stets nur eine Spaltung der Procaspase-3 bis zum p20-Fragment nachgewiesen. Die aus apoptotischen Zellen bekannten kleineren Spaltprodukte p19 und p17 traten auch in den mit CD95-kostimulierten T-Zellen nicht auf. Trotz der hier dargestellten Caspase-Prozessierungen waren die Caspasen nicht in der Lage, die aus apoptotischen Zellen bekannten Substrate PARP und PLC $\gamma$  zu spalten (**Abb. 5.2.31B**). Die bei hoher Konzentration von CD95-Agonisten auftretende Inhibition der

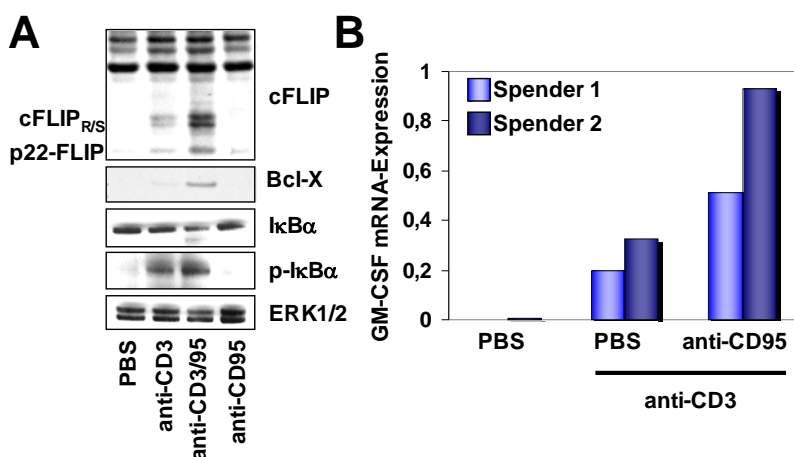
Zellproliferation korrelierte ebenfalls mit der Aktivierung von Caspasen. Wie beispielhaft für die Caspase-8 gezeigt, resultiert die Kostimulation CD3/CD28-stimulierter T-Zellen mit 20  $\mu$ g/ml CD95LFC nach drei Tagen in einem Ausbleiben der Caspase-8-Spaltung in die Intermediärprodukte p41/p43 (**Abb. 5.2.31C**). Im Vergleich dazu hatte das Kontrollprotein huIgGfc keinen Effekt auf das Spaltmuster.

#### 5.2.14 NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Expression anti-apoptotischer Proteine durch CD95

Die Apoptoseinduktion durch Todesrezeptoren wie CD95 kann auf zahlreichen Ebenen moduliert werden. Wichtige anti-apoptotische Regulatorproteine sind die drei Isoformen von cFLIP, deren Spaltprodukte p43-FLIP und p22-FLIP, sowie Mitglieder der Bcl-2-Familie zu denen Bcl-2 und Bcl-X zählen. Im folgenden Experiment sollte der Einfluss

der CD95-Kostimulation auf die TZR-induzierte Expression dieser Apoptose-kontrollierenden Proteine näher charakterisiert werden. Die dreitägige simultan zur CD3-Ligation durchgeführte Stimulation des CD95-Rezeptors resultierte in verstärkter Expression der anti-apoptotischen Isoformen cFLIP<sub>R</sub> und cFLIP<sub>S</sub> sowie in der Prozessierung von cFLIP in p22-FLIP. Zusätzlich war auch das anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bcl-X in diesen Zellen deutlich verstärkt exprimiert (**Abb. 5.2.32A**).

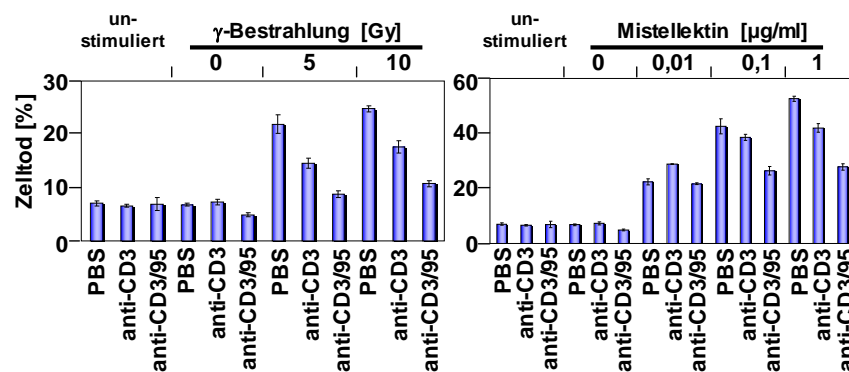
cFLIP und insbesondere das Spaltprodukt p22-FLIP wurden als wichtige Mediatoren nicht-apoptotischer Signaltransduktion beschrieben, indem sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B regulieren (100). Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges resultiert in der Transkription zahlreicher Überlebensgene, zu denen auch Bcl-X zählt. Es wurde daher der Effekt der CD95-Kostimulation auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B analysiert. Die gesteigerte Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit des IKK-Komplexes, I $\kappa$ B $\alpha$ , und die gleichzeitig verminderte Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  im Western Blot zeigten an, dass CD95 zunächst die Phosphorylierung und nachfolgend den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  katalysiert (**Abb. 5.2.32A**). Dies hat die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Kern zur Folge, was zur Expression anti-apoptotischer Zielproteine wie Bcl-X führt. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde durch qRT-PCR verifiziert, indem die mRNA-Menge des NF- $\kappa$ B-induzierten Zielgens GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor*) bestimmt wurde. Für beide untersuchten Spender konnte eindeutig eine gesteigerte Induktion der GM-CSF-Genexpression in Anwesenheit von anti-CD95 mAK nachgewiesen werden (**Abb. 5.2.32B**). Somit führt die CD95-Kostimulation zur gesteigerten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die wiederum assoziiert ist mit der Induktion von anti-apoptotischen Proteinen.



**Abb. 5.2.32: Induktion anti-apoptotischer Proteine und Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch CD95-Koligation.** CD3-ligierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden für drei Tage in An- und Abwesenheit von anti-CD95 mAK anti-APO-1 (5  $\mu$ g/ml) kultiviert. (A) Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ERK1/2, cFLIP, Bcl-X, I $\kappa$ B oder phosphoryliertes I $\kappa$ B. (B) Analyse der GM-CSF mRNA-Genexpression mittels qRT-PCR. Die relative Quantifizierung erfolgte unter Berücksichtigung der HuPo-Expression. Die Werte sind Mittelwerte aus 2 Messungen.

### 5.2.15 Erhöhte Apoptose-Resistenz in CD95-kostimulierten primären T-Zellen

Aufgrund des starken Vorkommens an Proteinen, die für die Blockierung von Zelltod bekannt sind, stellte sich die Frage einer generalisierten Apoptose-Resistenz der TZR/CD95-stimulierten Zellen. Zunächst wurden die humanen CD3-stimulierten T-Zellen in An- und Abwesenheit von anti-CD95 über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder bestrahlt oder unterschiedlichen Konzentrationen Mistellektin ausgesetzt und erneut bei 37°C belassen. Am Folgetag wurde der prozentuale Anteil toter Zellen mittels PI-Färbung bestimmt. Tatsächlich zeigte sich eine deutlich reduzierte Apoptose-Sensitivität der CD95-kostimulierten T-Zellen, sowohl nach Bestrahlung als auch nach Inkubation der Zellen mit Mistellektin (**Abb. 5.2.33**). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die CD95-Koligation CD3-stimulierter Zellen in der verstärkten Expression anti-apoptotischer Proteine und einer generalisierten Apoptose-Resistenz resultiert.

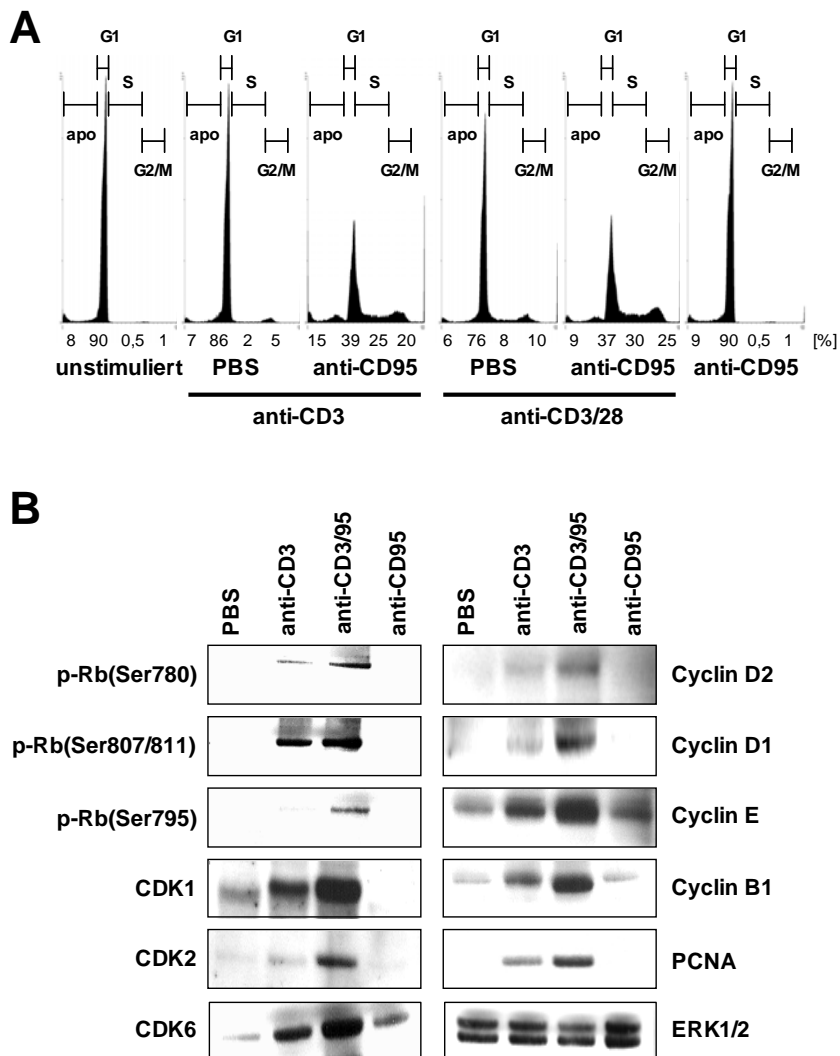


**Abb. 5.2.33: CD95-kostimulierte T-Zellen weisen eine erhöhte Apoptose-Resistenz auf.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden zunächst wie angegeben über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden nachfolgend bestrahlt (links) oder mit Mistellektin behandelt (rechts). Es folgte eine Inkubation in unbeschichteten Platten über Nacht. Die unbehandelten Zellen wurden in ihren ursprünglichen beladenen Kavitäten der Zellkulturplatte belassen. Am Folgetag wurde der Anteil toter Zellen in [%] mittels PI-Färbung bestimmt.

### 5.2.16 Effekte der CD95-Koligation auf die Regulation des Zellzyklus

Der positive Einfluss von CD95 auf die Zellteilungsrate führte zu der Überlegung, den Effekt von CD95 auf den Zellzyklus näher zu charakterisieren (**Abb. 5.2.34A**). Um zu untersuchen, ob und welche Zellzyklusproteine durch CD95 differentiell reguliert werden, wurden diese durch Verwendung entsprechender Antikörper im Western Blot analysiert. Alle getesteten Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) zeigten sich erwartungsgemäß in TZR/CD3-stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen verstärkt exprimiert. CD95-Koligation konnte die Induktion der Cycline und der CDKs noch deutlich steigern

(Abb. 5.2.34B). Das Retinoblastom (Rb)-Protein wird durch Phosphorylierung reguliert und bestimmt den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Es konnte festgestellt, dass CD95-Kostimulation zu einer gesteigerten Phosphorylierung aller Serinreste (780, 795, 807/811) des Rb-Proteins führte. Die Behandlung naiver T-Zellen mit anti-CD95 mAK hatte per se keinen Effekt. Auch die Bande des Proliferationsantigens PCNA im Western Blot war wesentlich kräftiger, wenn die T-Zellen auf Platten gegeben wurden, die nicht nur mit anti-CD3 sondern auch mit anti-CD95 beschichtet waren. Somit scheinen alle untersuchten Zellzyklus-regulierenden Proteine durch CD95 moduliert zu werden (Abb. 5.2.34B).



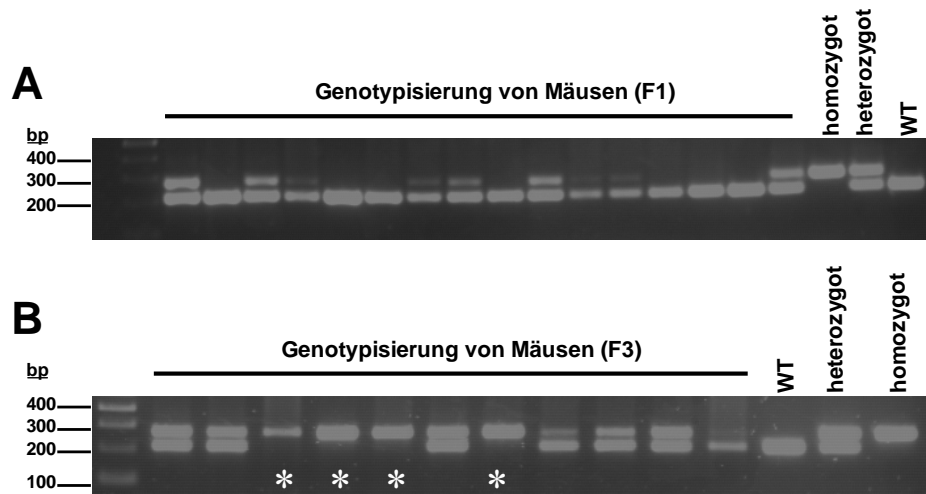
**Abb. 5.2.34: CD95-Kostimulation steigert die Zellzyklusprogression.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit anti-CD3 (2 µg/ml) +/- anti-CD28 mAK (5 µg/ml) stimuliert und mit 5 µg/ml anti-CD95 mAK anti-APO-1 koligiert. (A) Nach dreitägiger Kultivierung der Zellen wurde eine Zellzyklusanalyse angeschlossen. Alternativ wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen PCNA, CDK1, 2 und 6, Cyclin D1, D2, E und B1 sowie gegen phosphoryliertes Rb-Protein (Serin 780, 795 und 807/811) durchgeführt. Die Expression von ERK1/2 diente als Ladungskontrolle. apo=apoptotische Zellen.

### **5.3 Charakterisierung von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen**

Die beobachteten inhibitorischen Effekte durch CD95Fc auf die Aktivierung von T-Lymphozyten erschienen eindeutig, berücksichtigten jedoch potenzielle Signale des Rezeptors CD95 nicht. Durch Verwendung von CD95Fc oder eines der anderen CD95L-bindenden Proteine ist eine Blockierung des membranständigen CD95L denkbar. Dies würde einen in der Literatur erwähnten (92;144) und in der vorliegenden Arbeit charakterisierten kostimulatorischen Effekt von CD95 auf die Zellproliferation verhindern und so indirekt zur Inhibition der Zellaktivierung führen. Eine definitive Aussage über die Existenz einer bidirektionalen Signaltransduktion durch CD95L sollte die Untersuchung von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen erlauben, deren CD95L nur aus der Transmembrandomäne und dem extrazellulären Teil besteht. Es wurde beschrieben, dass CD95L auf Zellen dieser Mäuse zwar effizient Apoptose induzieren kann, der Verlust der intrazellulären Domäne jedoch eine mögliche retrograde Signalgebung verhindert (158). Die CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse sollten sich demnach zur eindeutigen Abklärung einer reversen CD95L-Signalübertragung in primären murinen T-Zellen eignen. Ziel der initialen Versuche war zu überprüfen, ob die Inhibition auf die Zellproliferation durch CD95Fc auf reverser Signaltransduktion beruht oder ob es sich bei dem Phänomen um eine Blockierung des CD95-Signals handelt.

#### **5.3.1 Erzeugung mutierter homozygoter CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse**

Basis der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere waren heterozygote Mäuse (1 Weibchen, 4 Männchen), die mittels Embryonen-Transfer (siehe Kapitel 4.9.1) in München hergestellt wurden. Diese wurden zunächst mit WT-C57/Bl6-Mäusen gekreuzt und die resultierenden heterozygoten Geschwistertiere weiter verpaart. Parallel zur generierten homozygoten CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mauslinie wurde auch eine WT-Linie aufrechterhalten. Die Nachkommen der verpaarten Tiere wurden routinemäßig genotypisiert. Hierfür wurde Gewebe aus Schwanzbiopsien verwendet und die isolierte DNA, wie im Methodenteil beschrieben, mittels PCR analysiert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde auf ein Agarose-Gel geladen und nachfolgend auf dem UV-Tisch visualisiert.

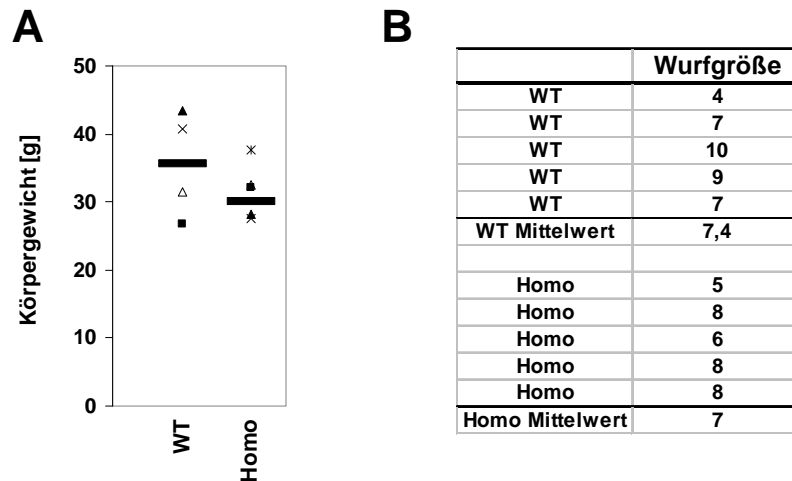


**Abb. 5.3.1: Beispiel für eine Genotypisierung von Nachkommen der ersten (A) und dritten Generation (B).** Die Nachkommen der gekreuzten Mäuse wurden mittels PCR genotypisiert. Die Auswertung erfolgte nach Separation der PCR-Produkte im Agarose-Gel. Als Kontrolle diente DNA einer WT-, einer homozygoten und einer heterozygoten Maus. \*=Homozygote CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse.

Die **Abb. 5.3.1** zeigt ein typisches Muster der Genotypisierung von Nachkommen der 1. (F1) und 3. (F3) Generation. Die Präsenz zweier distinkter Banden zeigt die Heterozygotie der Tiere an. Die PCR liefert durch die Interkalation der  $\Delta$ intra-Version ein größeres PCR-Produkt als das der WT-Tiere. Die angewandte PCR eignet sich demnach zur Genotypisierung der Mäuse und wurde routinemäßig als Kontrolle bei allen Nachkommen durchgeführt.

### 5.3.2 Phänotyp der CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Maus

Die erste Beurteilung der CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse erfolgte nach ihrem phänotypischen Aussehen. Die mutierte Maus ist homozygot lebensfähig, zeigt einen normalen Körperwuchs und wies generell keine äußerlichen Veränderungen (Fellbeschaffenheit) oder Verhaltensweisen (Aktivität) auf. Auch ihr Körpergewicht ist vergleichbar mit dem der WT-Tiere. Bisher scheint es, als ob die untersuchten 6-8 Monate alten WT-Mäuse (n=4) etwas schwerer sind als die gleichaltrigen CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse (n=5) (**Abb. 5.3.2A**). In der Wurfgröße der homozygoten Tiere konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen WT- und homozygoten Tieren festgestellt werden (**Abb. 5.3.2B**). Bisher kann keine Aussage über die Lebenserwartung der mutierten Mäuse gemacht werden, da die ältesten homozygoten Tiere zurzeit 8 Monate alt sind. Diese Mäuse zeigen allerdings bisher keine Auffälligkeiten.

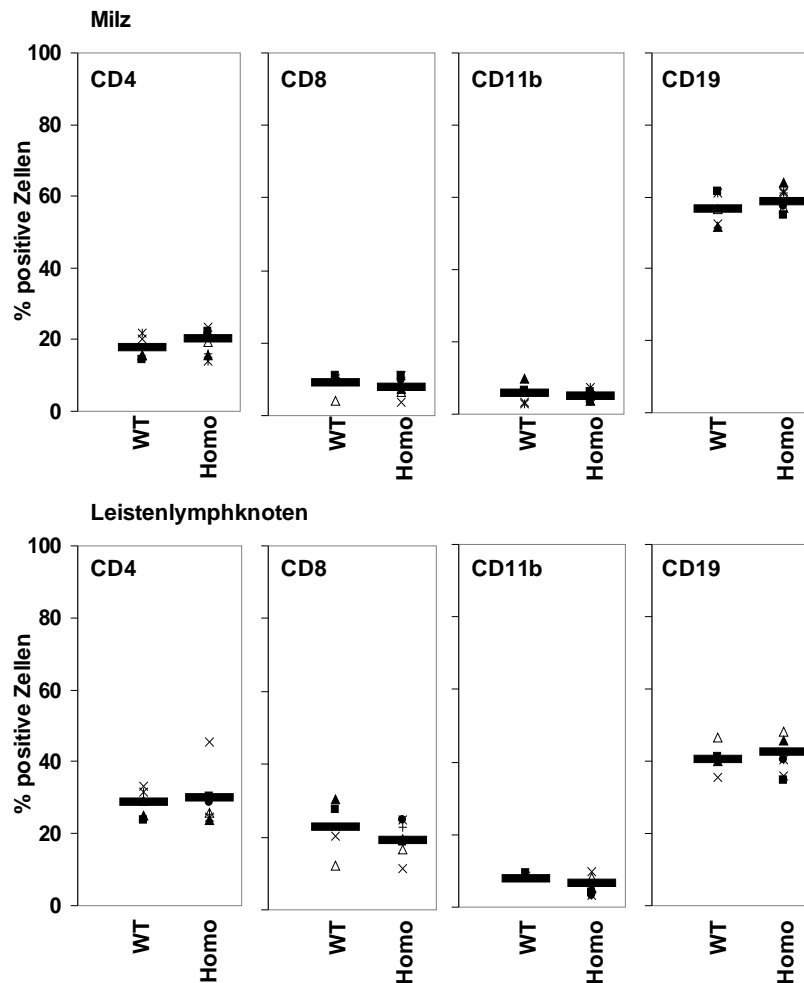


**Abb. 5.3.2: Körpergewicht und Wurfgröße von WT- und CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen.** (A) 6-8 Monate alte Wildtyp (WT)- und CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.(Homo)-Mäuse wurden gewogen (WT: n=4; Homo: n=5) und das Körpergewicht in [g] im Diagramm dargestellt. Der horizontale Balken stellt den Mittelwert dar. (B) Anzahl der WT- und CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Nachkommen.

### 5.3.3 Analyse der Zellzusammensetzung in verschiedenen Organen

Das CD95/CD95L-System wurde in der Literatur mit der Aktivierung, Reifung und Differenzierung von Zellen in Verbindung gebracht. Denkbar wäre daher ein Einfluss auf die Entwicklung unterschiedlicher Zellpopulationen. Es stellte sich daher die Frage, ob die intrazelluläre Deletion des CD95L die Zusammensetzung des Leukozytenkompartiments verändert. CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.- und WT-Mäusen wurden Milz, Leistenlymphknoten, Darmlymphknoten und Thymus entnommen. Makroskopisch waren auch hier keine Unterschiede der Organe feststellbar. Die Zellsuspension der Organe wurde mittels spezifischer Fluorochrom-markierter Antikörper gegen CD4 (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen), CD8 (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen), CD3 (T-Zellen), CD19 (B-Zellen) und CD11b (Monozyten) gefärbt und die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Beispielhaft ist die Zusammensetzung der Milz und der Leistenlymphknoten gezeigt (WT: n=5; Homo: n=7) (**Abb. 5.3.3**). Möglicherweise weisen homozygote Tiere prozentual etwas mehr CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und B-Lymphozyten auf als die WT-Mäuse. Der Effekt ist jedoch marginal, sodass eine weitaus größere Anzahl Tiere untersucht werden müsste, um signifikante Veränderungen in der Zusammensetzung feststellen zu können.



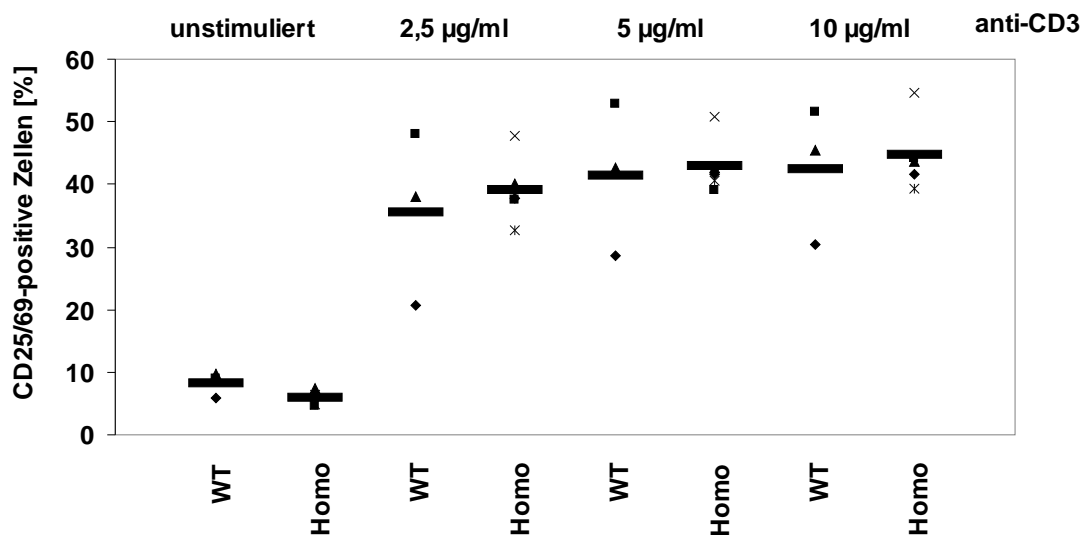


**Abb. 5.3.3: Zellzusammensetzung in Milz und Leistenlymphknoten von WT- und CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen.** Von 6-8 Monate alten Mäusen wurden die Milz und die Leistenlymphknoten entnommen. Die Zellzusammensetzung der Organe wurde mit FITC- und PE-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD11b und CD19 durchflußzytometrisch bestimmt. Der horizontale Balken stellt den Mittelwert aller untersuchten Mäuse dar. (WT: n=5; Homo: n=7)

### 5.3.4 Untersuchung der Splenozytenaktivierung nach TZR/CD3-Ligation

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen Effekte der retrograden Signaltransduktion durch CD95L auf humanen CD3/CD28-aktivierten Zellen vermuten. Da CD95L auch im murinen System die T-Zellproliferation beeinflusst (131;134), wurde im Folgenden überprüft, ob frisch isolierte Splenozyten von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen vergleichbar aktiviert werden können wie Splenozyten von WT-Mäusen. Die Stimulation der Milzzellen erfolgte in Zellkulturplatten mit immobilisierten anti-CD3 mAK (2C11) in einer Konzentration von 2,5-10  $\mu$ g/ml. Nach eintägiger Inkubation wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 zur Beurteilung der Zellaktivierung herangezogen. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil CD25/CD69-doppelt-positiver Zellen.

Zunächst konnte auf diese Weise festgestellt werden, dass Splenozyten mutierter Mäuse *in vitro* stimuliert werden können. Die Mittelwerte der CD25/CD69-positiven Splenozyten zeigen an, dass die mutierten Mäuse eine geringfügig höhere Anzahl doppelt-positiver Zellen aufweisen (**Abb. 5.3.4**). Schlussfolgernd können diese Zellen möglicherweise etwas effektiver auf anti-CD3 mAK reagieren. Es sei jedoch angemerkt, dass bisher nur 5 homozygote und 3 WT-Tiere analysiert wurden.



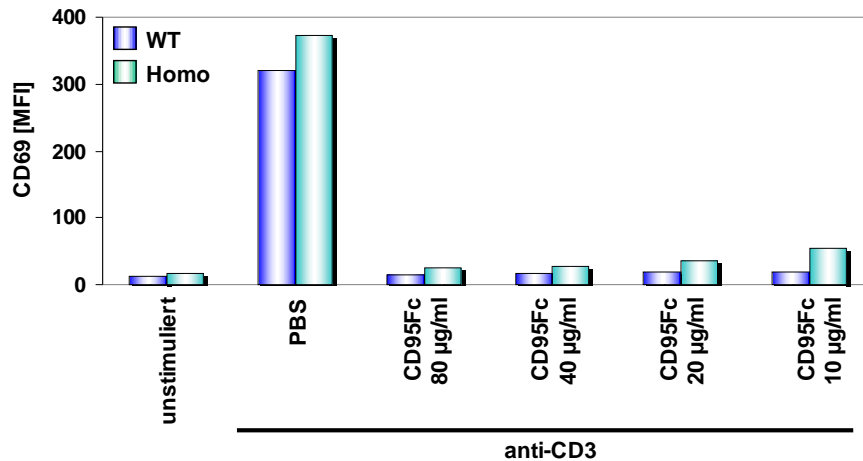
**Abb. 5.3.4: Induktion der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 nach CD3-Stimulation in WT- und CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen.** Frisch isolierte Splenozyten wurden auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, auf anti-CD3 mAK (2C11)-beschichtete Platten steigender Konzentration (0-10  $\mu$ g/ml) gegeben und über Nacht inkubiert. Die Beurteilung der T-Zellaktivierung erfolgte durch Analyse der Oberflächenexpression von CD25 und CD69. (WT: n=3; Homo: n=5)

### 5.3.5 Überprüfung der CD95L-Signalgebung in CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen

Der humane und der murine CD95 Ligand weisen eine Sequenzidentität von 76,9% auf und sind funktionell analog. Es konnte gezeigt werden, dass humane CD95L-Fc-Fusionsproteine Zelltod im murinen System induzieren können (103). Weiterhin wurde auch CD95Fc zur Untersuchung der retrograden Signaltransduktion in Maus-T-Zellen verwendet (159). Demnach scheinen die humanen Fusionsproteine auch im murinen System zur Charakterisierung der Signalkaskade eingesetzt werden zu können.

Der anti-CD3 mAK 2C11 führte zur Aktivierung von Milz-T-Zellen. Im Folgenden sollte durch Einsatz von immobilisiertem CD95Fc geklärt werden, ob Splenozyten von WT-Tieren in ihrer CD3-induzierten T-Zellaktivierung beeinträchtigt werden. Im Vergleich wurden Splenozyten von CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäusen identisch behandelt. Die Oberflächenexpression von CD69 an Tag 1 wurde als Maß für den Aktivierungsstatus

herangezogen. CD3-Stimulation resultierte im aktivierungs-induzierten Erscheinen von CD69 auf der Zelloberfläche. Es zeigte sich, dass CD95Fc die Induktion der CD69-Expression verhindern konnte. Demnach scheint die retrograde Signaltransduktion in der Maus auch mit humanen Liganden untersucht werden zu können.



**Abb. 5.3.5: CD95Fc inhibiert die CD69-Expression auf CD3-stimulierten WT- und CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Splenozyten.** Milzzellen wurden mit immobilisierten anti-CD3 mAK 2C11 (2,5 µg/ml) +/- CD95Fc in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 analysiert. WT=Wildtyp; Homo=homozygote CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.

Überraschenderweise stellte sich allerdings eindeutig heraus, dass auch die entsprechenden Milz-T-Zellen der CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse auf CD95Fc reagieren. Auch in diesem Fall war eine massive und mit den WT-Zellen vergleichbare Blockierung der CD69-Oberflächenexpression zu verzeichnen (**Abb. 5.3.5**). Bestätigt wurde dies auch mit den Liganden CD95-TNC-Fc und anti-CD95L pAK (nicht gezeigt). Schlussfolgernd deuten diese Daten darauf hin, dass die Effekte der CD95L-Liganden möglicherweise tatsächlich auf einer Blockierung des CD95L beruhen und nicht auf einer direkten retrograden Signalübertragung durch CD95L. Einhergehend mit dieser Annahme kann folglich anhand der Resultate postuliert werden, dass für die optimale Aktivierung von T-Zellen die Anwesenheit eines CD95-Signals erforderlich ist.

## 6. Diskussion

Das CD95/CD95L-System ist dafür bekannt, durch Initiation des apoptotischen Programms Zelltod auszulösen. Dies ist beispielsweise wichtig für die Termination einer Immunantwort oder die Beseitigung virusinfizierter Zellen. Der zugrunde liegende Mechanismus der Apoptoseinduktion durch die Interaktion des CD95L mit dem Todesrezeptor CD95 ist auf molekularer Ebene gut charakterisiert. Inzwischen häufen sich jedoch auch Hinweise auf nicht-apoptotische Funktionen des CD95/CD95L-Systems in verschiedenen zellulären Systemen. Interessanterweise wurden in dem Zusammenhang sowohl CD95 als auch CD95L als potenzielle Signalrezeptoren beschrieben. Die Regulation der pro- oder anti-apoptotischen Funktion ist allerdings nach wie vor nicht verstanden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Aktivierung und Proliferation primärer humaner T-Lymphozyten zu analysieren. Dabei wurde sowohl die Funktion des Rezeptors CD95 als auch eine potenzielle retrograde Signaltransduktion durch CD95L auf molekularer Ebene untersucht.

### 6.1. CD95L als Modulator der T-Zellaktivierung

Viele Mitglieder der TNF-Familie wie OX-40L, CD27L, CD30L, LIGHT und 4-1BBL wurden mit bi-direktionaler Signalübertragung in Verbindung gebracht (160). Auch für CD95L wurde eine duale Funktion beschrieben. Studien an *gld*- (CD95L-Mutation) und *lpr*- (CD95-Mutation) Mäusen deckten nicht nur die Relevanz des CD95/CD95L-System bei der Apoptoseinduktion auf, sondern deuteten auch auf eine Modulation der T-Zellaktivierung durch CD95L hin. Die ersten Beobachtungen zur retrograden Signaltransduktion waren im murinen System jedoch widersprüchlich. Während Desbarats et al. (134) nach CD95L-Koligation eine Inhibition der CD4<sup>+</sup>- nicht aber der CD8<sup>+</sup>-T-Zellproliferation beobachteten, beschrieben Suzuki und Fink (131) CD95L im selben Jahr als Verstärker der zytotoxischen und proliferativen Kapazität von zytotoxischen T-Zellen (ZTL). So war die Zellzyklusprogression von CD8<sup>+</sup>-T-Zelllinien aus *gld*-Mäusen nach antigener Stimulation im Vergleich zu CD8<sup>+</sup>-T-Zelllinien aus Wildtyp-Mäusen deutlich reduziert (131). Der kostimulatorische Effekt von CD95L auf ZTL wurde auch *in vivo* beobachtet (133), da keine antigenspezifische Aktivierung und Akkumulation von WT-ZTL nach adoptivem Transfer in CD95-defiziente *lpr*-Mäuse nachzuweisen war. Die Expression von CD95 im Wirt schien demnach für die positive Kostimulation der ZTL erforderlich. Die Gruppe um Desbarats

konnte im Gegensatz dazu eine Expansion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von WT-, *lpr*- und *gld*-Mäusen nach Superantigenstimulation *in vivo* nachweisen, die durch zusätzliche Gabe von CD95Fc in WT- oder *lpr*-, nicht aber in *gld*-Mäusen blockiert wurde (134). *In vitro* wurde zusätzlich demonstriert, dass frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von WT- und *lpr*-Mäusen nach Stimulation mit suboptimalen Konzentrationen anti-CD3 mAK in Anwesenheit von CD95Fc eine verringerte T-Zellaktivierung aufwies, während keine erkennbare Proliferationsinhibition der CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation von *gld*-Mäusen beobachtet wurde. Suzuki und Fink (131) wiesen darauf hin, dass die Diskrepanzen möglicherweise dadurch zu erklären seien, dass die Untersuchungen von Desbarats et al. mit CD95-„sensitiveren“ CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gemacht wurden, und dass parallel zur Kostimulation Zelltod auftritt und so eine Inhibition vorgetäuscht werden könnte. Folgearbeiten von Suzuki und Fink (132) verglichen den CD95L-vermittelten kostimulatorischen Effekt auf beiden T-Zellsubpopulationen und bestätigten den starken positiven Einfluss auf die Aktivierung der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, den sie für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in einer vergleichbaren Ausprägung so nicht verzeichnen konnten. Allerdings konnten sie die negativ regulatorische Funktion in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, wie von Desbarats et al. beschrieben, nicht bestätigen. Neuere Arbeiten der Gruppe um Pamela Fink analysierten den molekularen Mechanismus der positiven CD95L-Kostimulation auf murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Wie in der Einleitung dargestellt, waren zahlreiche TZR-assoziierte Signalwege nach Koligation von CD95L amplifiziert (135;136).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine potenzielle reverse CD95L-Signaltransduktion im humanen System untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob CD95L als kostimulatorischer Signalrezeptor auf frisch isolierten humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen fungiert und ob CD95L differentielle Effekte auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hat. Abschließend war ein Ziel dieser Arbeit die Analyse der durch CD95L beeinflussten TZR-Signalkaskaden.

### 6.1.1 CD95L inhibiert die T-Zellaktivierung

CD95L erscheint im Laufe der T-Zellaktivierung auf der Zelloberfläche. Entgegen früherer Aussagen scheint CD95L jedoch in geringer Menge bereits auf naiven T-Zellen vorhanden zu sein. Initial wurde daher zunächst mittels durchflußzytometrischer Analysen demonstriert, dass CD95L auf der Zelloberfläche frisch isolierter T-Zellen nachweisbar ist (**Abb. 5.1.3A**). Wie aus der Literatur bekannt, konnte die Expression von CD95L auf diesen Zellen nach CD3/CD28-Stimulation gesteigert werden (**Abb. 5.1.3B**).

Die Untersuchungen zur potenziellen Rolle des CD95L bei der Modulation der T-Zellaktivierung ergaben einen klaren inhibitorischen Effekt unabhängig vom analysierten T-Zellphänotyp. Demnach waren sowohl für PBMZ (nicht gezeigt), aktivierte PHA-Blasten (**Abb. 5.1.20**) als auch für CD4<sup>+</sup>- (**Abb. 5.1.6, 5.1.7A, 5.1.8**) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (**Abb. 5.1.19**) unterschiedlicher Spender verminderte Zellteilungsraten nach TZR-Stimulation nachweisbar. In diesem Zusammenhang spielte es keine Rolle, ob die T-Zellen nur mit anti-CD3 mAK oder zusätzlich mit anti-CD28 mAK stimuliert wurden (nicht gezeigt). Eine Immobilisierung der CD95L-Agonisten auf Zellkulturplatten war notwendig, um den inhibitorischen Effekt zu detektieren (**Abb. 5.1.5**). Lösliche Fusionsproteine oder Antikörper hatten keinen Einfluss auf die CD3/CD28-vermittelte Proliferation, was die Notwendigkeit der Rezeptor-Kreuzvernetzung anzeigt.

Die CD95L-Agonisten hatten per se keinen Effekt auf die Aktivierung oder die Proliferation der T-Zellen (**Abb. 5.1.4, 5.1.8, 5.1.19**). Somit hat CD95L eindeutig ein ausschließlich kostimulatorisches Potenzial in Bezug auf die T-Zellaktivierung. Dies wurde auch bereits von Suzuki und Fink (131) vorgeschlagen. In ihrer Arbeit konnte demonstriert werden, dass die TZR-Signalwege per se in *gld*-Mäusen nicht beeinträchtigt waren. So reagierten ZTL dieser Mäuse ebenso stark auf optimale anti-CD3-Stimulation wie T-Zellen von WT-Tieren. Sie schlossen daraus, dass CD95L keine Rolle bei der optimalen T-Zellaktivierung spielt und die beobachteten CD95L-Effekte rein kostimulatorisch sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind zum großen Teil kompatibel mit den Befunden von Desbarats et al. (134) mit murinen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. So konnte auch hier durch Verwendung CD3-stimulierter, frisch isolierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ein durch CD95Fc induzierter Zellzyklusarrest beobachtet werden. Auch hatte lösliches CD95Fc keinen Einfluss auf die CD3-vermittelte Aktivierung. Während die Proliferationsblockade im murinen System durch den Zusatz von exogenem IL-2 aufgehoben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit mit primären humanen T-Zellen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von IL-2 stets eine Inhibition der T-Zellaktivierung verzeichnet werden (**Abb. 5.1.17**). Das Unvermögen der T-Zellen, auf exogenes IL-2 zu reagieren, zeigt an, dass der Inhibition ein anderer Mechanismus zugrunde liegt als der von bekannten inhibitorischen Kostimulatoren wie CTLA-4. Diese komplette Blockade der TZR-Aktivierung durch CD95L war in dieser Form bisher nicht gezeigt worden. Vielmehr wurde, wie erwähnt, die reverse Signalgebung des CD95L in aktivierten murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit gesteigerter Proliferation in Verbindung gebracht

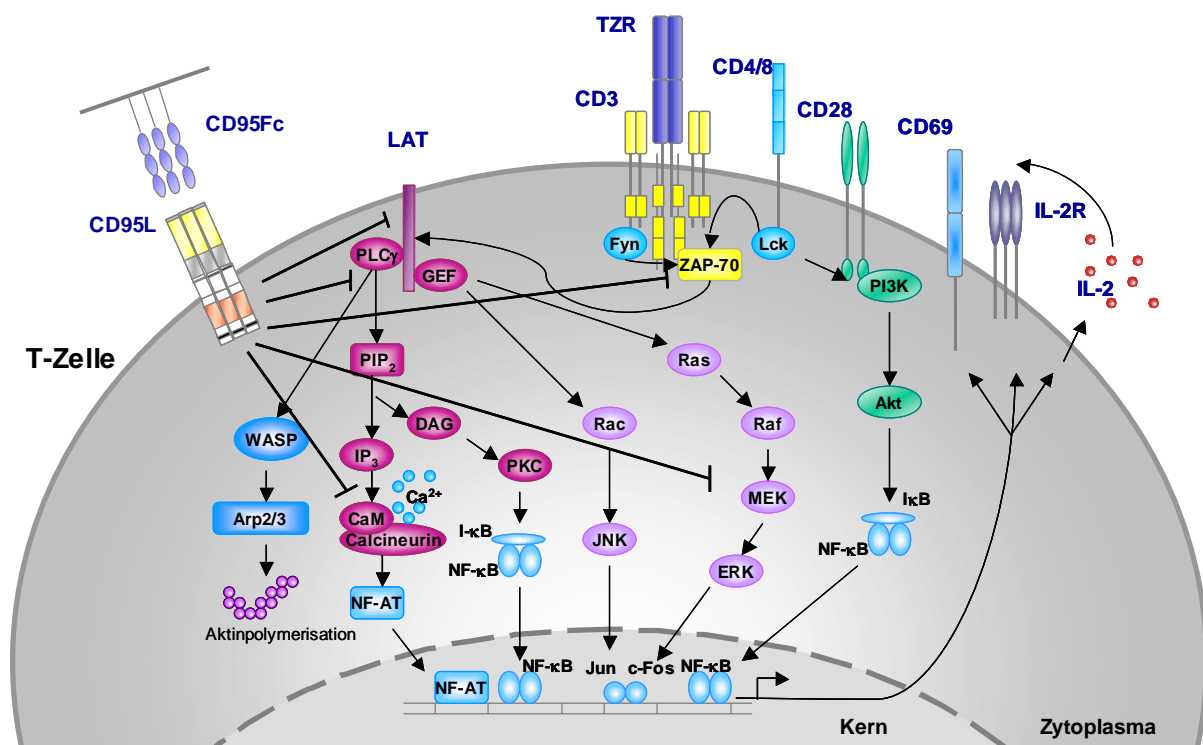
(131;135). Es stellte sich daher die Frage, ob die Diskrepanzen auf methodischen Unterschieden oder möglicherweise Spezies-spezifischen Effekten beruhen. Um den Einfluss unterschiedlicher kostimulatorischer Bedingungen auszuschließen, wurden die zuvor durchgeführten Experimente mit einem effizienter immobilisierten CD95Fc-Fusionsprotein wiederholt. Zu diesem Zweck wurde CD95Fc mit anti-huIgGFc stärker kreuzvernetzt (**Abb. 5.1.18A,B**). Alternativ wurden die Zellen mit CD95-TNC-Fc, einem vermutlich per se hexameren Fusionsprotein, kostimuliert (**Abb. 5.1.18D**). Unter ansonsten identischen Stimulationsbedingungen wurde auch in diesen Fällen eine vollständige Blockierung der T-Zellproliferation beobachtet.

### 6.1.2 Molekularer Mechanismus des CD95L/TZR-„Cross-talks“

Nachdem für alle untersuchten Spender und Zellpopulationen ein negativer Einfluss auf die CD3/CD28-induzierte Zellproliferation nachgewiesen werden konnte, bestand der nächste Schritt in der genauen Analyse der Inhibition des TZR-Signals. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges über ERK1/2 ist essentiell für die T-Zellaktivierung. Die Kostimulation CD3/CD28-stimulierter Zellen mit CD95Fc machte deutlich, dass die Phosphorylierung dieses wichtigen Signalmoleküls im Einklang mit der blockierten Zellzyklusprogression reduziert war (**Abb. 5.1.11**). Allerdings konnten Zellen, die mit dem Calciumionophor Ionomycin und dem PKC-Aktivator PMA stimuliert wurden, durch CD95Fc nicht blockiert werden. Diese Daten lassen vermuten, dass CD95L das TZR-Signal oberhalb der PKC-Aktivierung und der Calcium-Freisetzung modifiziert (**Abb. 5.1.10**).

Die TZR-Ligation resultiert in der Rekrutierung und Aktivierung von Tyrosinkinase der Src-Familie, was zur Phosphorylierung der ITAMs in den CD3- und  $\zeta$ -Ketten des TZR/CD3-Komplexes führt. Die phosphorylierten ITAMs fungieren als Bindungsstellen für die Tyrosinkinase ZAP-70, die ihrerseits phosphoryliert wird und weitere Signalmoleküle wie LAT aktiviert. An LAT binden wiederum zahlreiche Adapter- und Signalproteine, zu denen unter anderem die PLC $\gamma$  zählt. Da die bisherige Datenlage vermuten lässt, dass CD95L das proximale TZR-Signal modulieren könnte, wurden die genannten Moleküle auf ihren Aktivierungsstatus hin überprüft. Erneut konnte eine klare Reduktion der Phosphorylierungen von ZAP-70, LAT und PLC $\gamma$  durch retrograde CD95L-Signaltransduktion in T-Zellen verzeichnet werden (**Abb. 5.1.12, 5.1.13**). Weiterhin zeigten durchflußzytometrische Untersuchungen, dass bereits die Internalisierung des TZR nach dessen Ligation durch die

CD95L-Kostimulation gestört war (Abb. 5.1.15) und auch die TZR-vermittelte Calcium-Freisetzung schien innerhalb weniger Sekunden beeinträchtigt (Abb. 5.1.14). Da sowohl die Aktivierung früher Signalmoleküle als auch die Calcium-Mobilisierung aus dem ER sowie die TZR-Internalisierung blockiert wurden, scheint CD95L das TZR-Signal zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu modulieren (Abb. 6.1.1). Basierend auf den Ergebnissen wird postuliert, dass CD95L bereits die initiale Bildung des TZR/CD3-abhängigen Aktivierungskomplexes inhibiert. Es bleibt zu klären über welche Adapter- oder Signalmoleküle CD95L das TZR-Signal beeinflussen kann.



**Abb. 6.1.1: Zusammenfassung der durch CD95Fc beeinflussten TZR-Signalwege.** Die Inhibition der T-Zellaktivierung CD3/CD28-stimulierter Zellen durch Kolligation mit CD95Fc geht mit der Blockierung der ERK1/2, PLCγ, LAT und ZAP-70-Signalgebung einher.

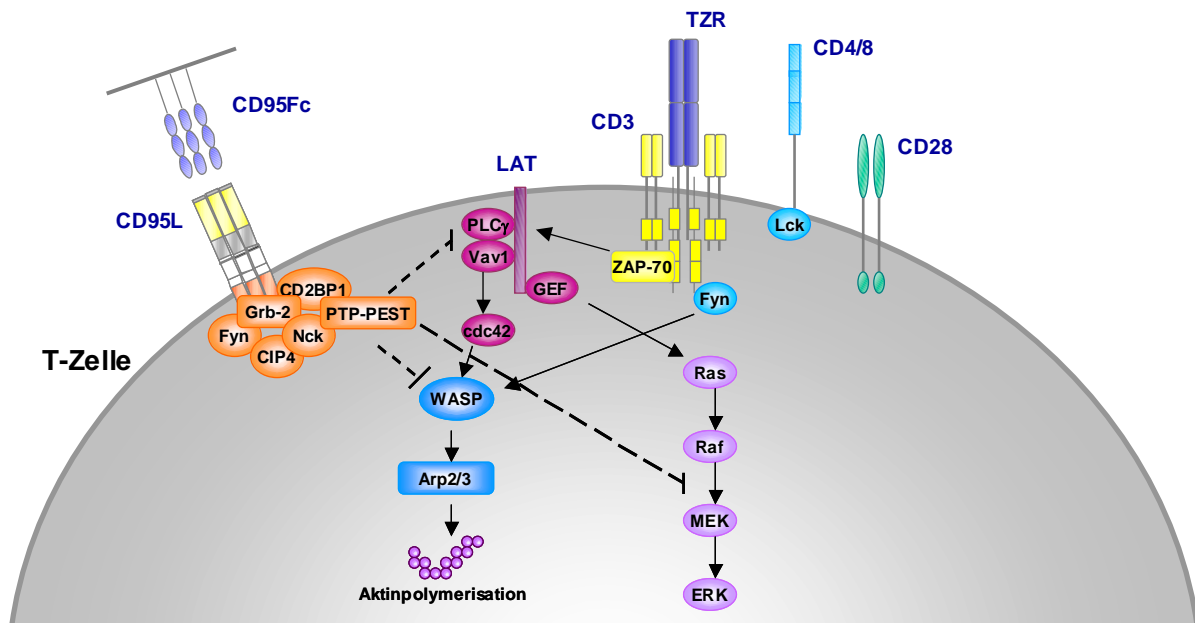
In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten zahlreiche CD95L-interagierende Proteine identifiziert werden. Diese Proteine binden an die für den CD95L einzigartige prolinreiche Domäne (PRD) im intrazellulären Teil. Zu den Interaktionspartnern von CD95L zählen die Src-Kinase Fyn, das Adapterprotein Grb-2, die p85 Untereinheit der PI3-Kinase, Nck und Mitglieder der PCH-Familie wie CIP4, die PACSINe1-3 oder CD2BP1. Viele dieser Interaktoren sind entweder wichtig für die Rekrutierung von CD95L zur immunologischen Synapse (123), für die Sortierung von CD95L zu intrazellulären Vesikeln (122;127) oder scheinen Dynamin-abhängig die exozytotische Vesikelabschnürung zu regulieren (161). Sie sind somit überwiegend für den Transport und die Speicherung des CD95L verantwortlich.



Fyn, Grb-2 und die p85 Untereinheit der PI3-Kinase wurden auch in Arbeiten von Fink et al. in murinen TZR-stimulierten Wildtyp-Zellen nach CD95Fc-Koligation kopräzipitiert (135). Im Gegensatz dazu konnten diese Signalmoleküle bei *gld*-Mäusen nicht als Interaktionspartner des CD95L nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass CD95L in *lipid-rafts* transloziert und alleine die PRD des CD95L die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, JNK und CD95L selbst vermittelt. In einer murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zelllinie kommt es nachfolgend zur gesteigerten Zellzyklusprogression, die neben der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-AT, auch die Produktion von IFN $\gamma$  erhöht (135). Diese Befunde sind im klaren Gegensatz zu denen der vorliegenden Arbeit im humanen System, da hier sowohl in CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine deutliche Inhibition der T-Zellaktivierung verzeichnet werden konnte (**Abb. 5.1.7, 5.1.19**).

Einige der CD95L-Interaktionspartner könnten jedoch auch den hier detektierten inhibitorischen Mechanismus erklären. CD2BP1 spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zellaktivierung. Es bindet an den intrazellulären Teil von CD2 oder an das CD2-interagierende Adapterprotein (CD2AP). Möglicherweise führt die Bindung von CD2 an seine Liganden CD58/48 auf APZ zur Rekrutierung des WASP/Arp2/3-Komplexes und der Maschinerie der Aktinreorganisation zum Ort des Zell-Zellkontaktes. Auf diese Weise scheint CD2BP1 die Bildung der immunologischen Synapse und folglich die optimale Aktivierung der T-Zellen zu ermöglichen (162). CD2BP1 interagiert ebenfalls mit der Phosphatase PTP-PEST (*proteine tyrosine phosphatase-PEST*). In einem Komplex aus CD95L/CD2BP1/PTP-PEST kann PTP-PEST möglicherweise die Phosphorylierung von CD95L und CD2BP1 beeinflussen (121). PTP-PEST wurde weiterhin als negativer Modulator von PLC $\gamma$ , p38 MAPK und ERK1/2 im Rahmen der T-Zellaktivierung beschrieben (163). Es wurde daher auf Grundlage der bisherigen Daten vorgeschlagen, dass die CD95L-vermittelte Blockierung der TZR-Aktivierung auf einer Inhibition durch den CD95L/CD2BP1/PTP-PEST-Komplex beruhen könnte (**Abb. 6.1.2**).

Obwohl die Ergebnisse zusammenfassend darauf hindeuten, dass CD95L die Aktivierung primärer humaner T-Zellen vollständig hemmt, konnte eine indirekte Inhibition durch Blockierung einer CD95-Signalgebung nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde ebenfalls CD95 als kostimulatorischer Rezeptor untersucht.



**Abb. 6.1.2: Hypothese einer potenziellen retrograden CD95L-Signaltransduktion.** An die intrazelluläre PRD des CD95L bindet unter anderem das CD2-bindende Protein-1 (CD2BP1), welches mit der Phosphatase PTP-PEST interagieren kann. Der CD2BP1/PTP-PEST-Komplex wurde beschrieben als Inhibitor von WASP, PLC $\gamma$  und der MAPK ERK1/2 und könnte die CD95L-vermittelte Blockierung der T-Zellaktivierung initiieren.

## 6.2. CD95 als anti-apoptotischer Rezeptor auf T-Zellen

CD95 wurde 1989 ursprünglich als prototypischer Todesrezeptor innerhalb und außerhalb des Immunsystems entdeckt (164;165). Lange Zeit wurde CD95 auf T-Zellen ausschließlich mit Induktion von AICD zur Aufrechterhaltung der Immunzellhomöostase in Verbindung gebracht. CD95-defiziente *lpr*-Mäuse entwickeln ein lymphoproliferatives Syndrom, sodass vermutet wurde, dass CD95 und AICD strikt miteinander verknüpft sind. Die Wichtigkeit der CD95/CD95L-Interaktion im Rahmen des AICD wurde in zahlreichen *in vitro*- (166;167) und auch *in vivo*-Experimenten (168-170) untermauert. *In vivo* ist die Rolle von CD95 beim Zelltod aktivierter T-Zellen allerdings inzwischen umstritten. Es wurde entdeckt, dass das pro-apoptische Bcl-2-Familienmitglied Bim am AICD beteiligt ist und dass es hier ein synergistisches Zusammenspiel zwischen CD95 und Bim gibt (30). Da Mäuse mit CD95-defizienten T- oder B-Zellen außerdem kein ausgeprägtes *lpr*-ähnliches Syndrom zeigten (45;171), wurde spekuliert, ob CD95 auf T-Lymphozyten primär eine andere Funktion hat als ursprünglich angenommen.

Kürzlich zeichnete sich ab, dass CD95 als dualer Rezeptor fungiert, der abhängig von seiner Mikroumgebung sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signale induzieren kann. So konnte eine nicht-apoptotische Rolle von CD95 bei der Regeneration der Leber nach Hepatektomie (86), bei der Proliferation von Fibroblasten in Mangelsituationen (84) oder der funktionellen Wiederherstellung geschädigter Nervenzellen (81) beschrieben werden. Weiterhin wurde CD95 als essentieller Mediator der Erythropoese (172) und der DZ-Aktivierung identifiziert (85). Auch in T-Zellen wurde CD95 mit proliferativen Prozessen in Verbindung gebracht und scheint hier als kostimulatorischer Rezeptor zu fungieren. Allerdings sind die Befunde widersprüchlich, da CD95 sowohl als Aktivator (92;93;143;144) als auch als Inhibitor der T-Zellaktivierung (53;160;173) beschrieben wurde. Der Grund dieser kostimulatorischen Unterschiede wurde bisher nicht näher untersucht.

Die Ausweitung der Analysen in der vorliegenden Arbeit auf die Effekte von CD95 ergab sich, nachdem nicht eindeutig belegt werden konnte, dass CD95Fc eine direkte reverse CD95L-Signalgebung induziert. Da T-Zellen sowohl CD95 als auch CD95L auf ihrer Oberfläche tragen (**Abb. 5.1.2, 5.2.3**), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass CD95Fc CD95L auf den T-Zellen blockiert und eine Interaktion mit CD95 auf der Zelloberfläche verhindert. Unter der Annahme eines in der Literatur diskutierten kostimulatorischen Einflusses von CD95 auf die T-Zellproliferation (92;143;144) hätte dies indirekt einen inhibitorischen Effekt auf die T-Zellen. Aus diesem Grund kam bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe CD95LFc zum Einsatz, der jedoch ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der CD3/CD28-vermittelten Zellprogression führte. Damit war weiterhin nicht geklärt, ob die Funktion der Fusionsproteine auf einer Blockade der CD95/CD95L-Interaktion beruhte. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen unter Verwendung eines agonistischen anti-CD95 mAK (7C11) stellte sich heraus, dass dieser Kostimulus im Gegensatz zu CD95LFc die T-Zellaktivierung vehement steigern konnte. Dies konnte durch zahlreiche Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit u.a. auf der Ebene der Zellteilung (**Abb. 5.2.10**) sowie der Expression von Aktivierungsmarkern (**Abb. 5.2.12**) bestätigt werden. Stets waren die Effekte auf die T-Zellproliferation nicht mit einer vermehrten Induktion von Apoptose assoziiert (**Abb. 5.2.11**), obwohl die CD95-Agonisten funktionell aktiv waren und Zelltod in aktivierten PHA-Blasten auslösen konnten (**Abb. 5.2.2A**). Es schien daher eindeutig, dass CD95 eine kostimulatorische Signalkapazität in primären T-Zellen hat. Die Ursache für die unterschiedlichen Effekte der CD95-Koligation mit den verschiedenen CD95-Agonisten war jedoch nicht verstanden und bildete den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

### 6.2.1 Naive humane T-Zellen sind resistent gegen CD95-induzierten Zelltod

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von naiven ( $CD45RA^+$ ) zu Gedächtnis-T-Zellen ( $CD45RO^+$ ) der Gesamt- $CD4^+$ -T-Zellpopulation darüber entscheidet, ob CD95-Koligation (besonders bei hohen Konzentrationen von CD95-Agonisten) in einem Teil der Zellen parallel zur Proliferationsinhibition auch Apoptose auslöst (**Abb. 5.2.16**). In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass naive  $CD45RA^+$ -T-Zellen für die Kostimulationsexperimente besser geeignet sind, da aufgrund der nachgewiesenen Apoptose-Resistenz keine Verfälschung der Ergebnisse durch Zelltod auftreten. Jedoch wiesen auch CD95-Agonisten auf  $CD45RO^+$ -Gedächtnis-T-Zellen eine klare dosisabhängige nicht-apoptotische kostimulatorische Kapazität auf, sodass geschlussfolgert wurde, dass auch Gesamt- $CD4^+$ -T-Zellen für die Analysen geeignet sind (**Abb. 5.2.16**). Im Einklang mit dieser Beobachtung konnte ferner gezeigt werden, dass Apoptose-resistente  $CD45RA^+$ -T-Zellen viel weniger membranständigen CD95 exprimieren als  $CD45RO^+$ -T-Zellen (**Abb. 5.2.6**). Unterstützt wird dieser Befund von zwei unabhängigen Berichten (174;175), die ebenfalls CD95 auf Gedächtniszellen, nicht aber auf naiven T-Zellen verstärkt nachweisen konnten. In diesem Zusammenhang scheint es augenscheinlich Spezies-spezifische Unterschiede zu geben, da kein Unterschied der CD95-Expression auf diesen murinen Zellpopulationen festgestellt werden konnte (176). Interessanterweise hatte die geringe CD95-Expression auf den humanen  $CD45RA^+$ -T-Zellen keine Auswirkung auf das kostimulatorische Potenzial der TZR/CD3-stimulierten T-Zellen. Demnach genügen scheinbar geringe Mengen CD95, um anti-apoptotische CD95-Signalgebung zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass die CD95-Expressionsdichte auf der Zelloberfläche darüber entscheiden könnte, ob Zelltod oder Überleben vermittelt wird.

Die Tatsache, dass naive  $CD4^+$ -T-Zellen aus einem Teil  $CD45RA^+$ - und  $CD45RO^+$ -T-Zellen bestehen war ebenso bekannt (1;177), wie die bereits erwähnte erhöhte CD95-Expression auf Gedächtniszellen (174;175). Die meisten Studien, die sich mit  $CD45RA^+$ - und  $CD45RO^+$ -T-Zellen beschäftigten, untersuchten die Zellpopulationen im Hinblick auf ihre Proliferations- oder Aktivierungsfähigkeit (178-181) oder analysierten die Bedeutung des  $CD45RA^+/RO^+$ -Verhältnisses in verschiedenen pathophysiologischen Zusammenhängen (182-186). Die sporadischen Daten zur Suszeptibilität gegenüber CD95-vermitteltem Zelltod sind widersprüchlich, da insbesondere unterschiedliche Befunde im murinen und humanen System erhalten wurden (53;174;176;187;188). Neuere Arbeiten mit aufgereinigten humanen

naiven CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen unterstützen jedoch die Daten der vorliegenden Arbeit und beschreiben CD45RA<sup>+</sup>-T-Zellen als resistenter gegenüber CD95-induziertem Zelltod im Vergleich zu Gesamt-T-Zellen (53) oder CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen (188).

### 6.2.2 CD95 als Modulator der T-Zellproliferation

Die Analyse der CD95-vermittelten Kostimulation ergab, dass auch die CD95-Agonisten nur in immobilisierter Form Effekte auf die CD3-induzierte Aktivierung zeigten (**Abb. 5.2.13**). Dies unterstützen Befunde von Alderson et al., die bereits 1993 beobachteten, dass löslicher anti-CD95 mAK die CD3-vermittelte T-Zellaktivierung nicht beeinflussen konnte, während der anti-CD95 mAK in plattengebundener Form eine gesteigerte Proliferation zur Folge hatte (92). Es wurde daher zunächst vermutet, dass der Grad der Kreuzvernetzung von CD95 die unterschiedlichen Signale (CD95LFC oder anti-CD95 mAK) reguliert. Daher wurde im Vergleich zu dem agonistischen anti-CD95 mAK anti-APO-1 sowie den Fusionsproteinen CD95LFC und CD95L-ST-Fc zusätzlich der Leucin-Zipper LZ-CD95L als weiterer CD95-Agonist eingesetzt, da beschrieben wurde, dass dieser den membranständigen trimerisierenden Liganden imitiert (150;152).

Die Titration der CD95-Agonisten ergab überraschenderweise, dass die T-Zellaktivierung durch CD95-Koligation dosisabhängig reguliert wird. Während hohe Konzentrationen von CD95-Agonisten zu einer kompletten Inhibition der CD3/CD28-induzierten Aktivierung führten, resultierte die Kostimulation mit geringer Dosis von Agonisten in einer gesteigerten T-Zellaktivierung und -proliferation. Dies konnte sowohl auf Ebene der Expression von Aktivierungsmarkern (**Abb. 5.2.14, 5.2.16**) als auch im Rahmen der Proliferationsexperimente (CFSE-Analyse, Zellzyklus, ATP-Detektionsassay) demonstriert werden (**Abb. 5.2.15, 5.2.18, 5.2.34**). Interessanterweise führte die schwache Kostimulation von CD95 im Vergleich zu CD28 zu einem vermehrten Eintritt der T-Zellen in die S- und G2/M-Phase des Zellzyklus (**Abb. 5.2.34**). Demnach scheint CD95 ein sehr viel größeres kostimulatorisches Potenzial zu besitzen als der klassische kostimulatorische Rezeptor CD28. Dies konnte in Arbeiten von Kennedy et al. (143) oder Kataoka et al. (96) in dieser deutlichen Form nicht gezeigt werden, jedoch war auch hier der kostimulatorische Effekt von CD95 mindestens so stark wie der von CD28. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Zusammenhang gefunden, dass die schwache CD95-Koligation CD3-stimulierter T-Zellen sowohl einen positiven Einfluss auf den Restriktionspunkt des

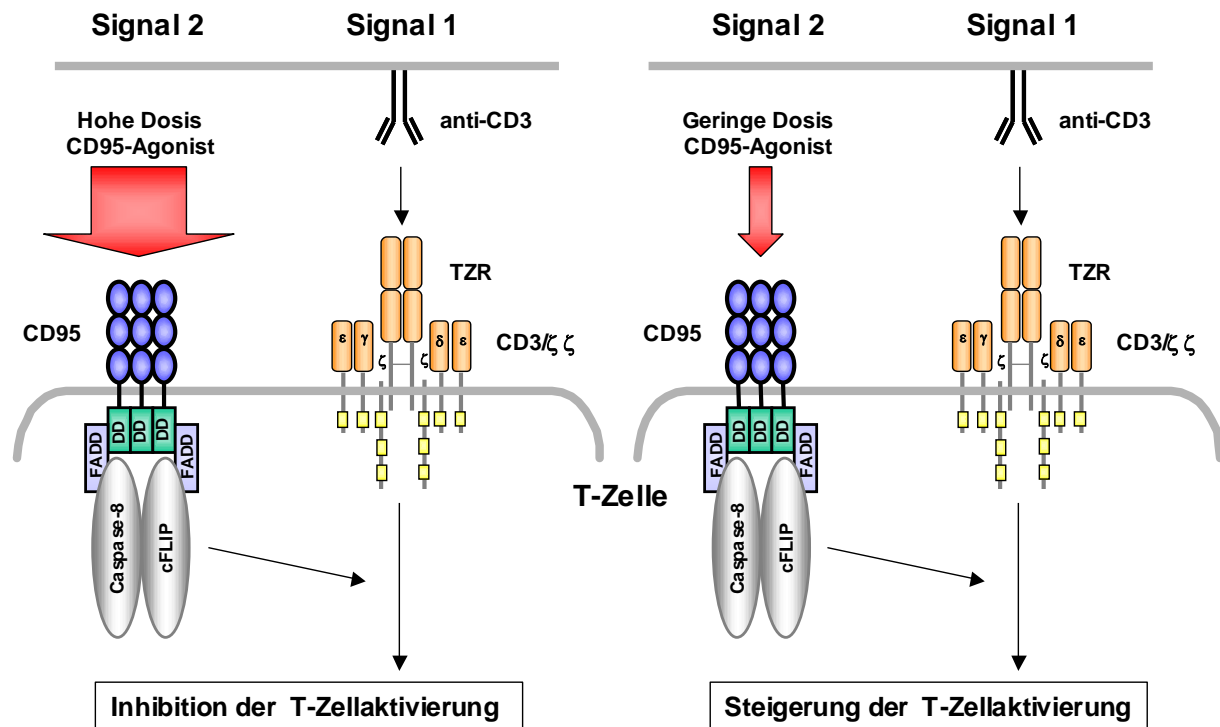
Zellzyklus (Rb-Phosphorylierung) als auch auf das Expressionsmuster von Cyclin D1/2 und CDK4 (G1-Phaseneintritt), Cyclin E und CDK2 (G1/S *checkpoint*) sowie Cyclin B1 und CDK1 (G2/M *checkpoint*) hatte (**Abb. 5.2.34**).

Wie bereits durch Alderson (92) und später durch Kennedy (143) gezeigt, war stets ein initiales TZR-Signal (z.B. durch anti-CD3 mAK in suboptimaler Konzentration) erforderlich, um einen Effekt durch CD95 auf die T-Zellaktivierung detektieren zu können. CD95 stellt somit einen echten Kostimulus dar und ist auf Grundlage der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten auf der einen Seite ein Aktivator und nach Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes ebenfalls ein effektiver Inhibitor in T-Zellen. Diese Resultate könnten die bisher in Vorarbeiten oder in der Literatur gefundenen widersprüchlichen Befunde zur Rolle von CD95 bei der T-Zellaktivierung (53;92;143;144) erklären.

Vergleiche hinsichtlich eingesetzter Konzentrationen von CD95-Agonisten sind in den verschiedenen Studien nur schwer möglich. Grundsätzlich wurde in den Berichten (53;92) und in der vorliegenden Arbeit mit immobilisierten stimulierenden Agenzien gearbeitet. Die tatsächlich gebundene Menge an Agonisten ist neben der eingesetzten Konzentration zum Beladen der Platten abhängig von der Dauer der Inkubation und der Gesamtmenge der in PBS angesetzten Agenzien. Da in der Literatur in der Regel nur die Konzentrationen angegeben wurden, spiegelt dies nicht die tatsächlich Menge der Agonisten auf der Zellkulturplatte wider und ein Vergleich zwischen den verschiedenen Arbeiten ist nur schwer möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde stets eine dreistündige Inkubation bei 37°C durchgeführt und mit 50 µl Gesamtmenge für eine Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten und mit 250 µl bei 24 Kavitäten gearbeitet, um Ergebnisse innerhalb der Arbeit vergleichen zu können.

Strauss et al. untersuchten den Effekt von CD95L-transfizierten APZ auf primäre humane T-Lymphozyten (53;160). Die Transfektion resultiert in einer ebenfalls nicht definierbaren Menge CD95L auf der Oberfläche der APZ, was den Vergleich mit den Ansätzen der vorliegenden Arbeit erschwert. Die in dem Bericht dargestellten durchflußzytometrischen Analysen weisen jedoch darauf hin, dass CD95L in großen Mengen auf den APZ vorhanden war. Auf Grundlage der gefundenen Dosisabhängigkeit der CD95-Kostimulation scheint der blockierende Einfluss auf die T-Zellaktivierung somit dadurch erklärt, dass die APZ extrem viel CD95L auf ihrer Oberfläche exprimierten. Es wäre hier von Interesse, die Aktivierung von T-Zellen durch APZ zu untersuchen, die unterschiedliche

Mengen CD95L tragen. In diesem Zusammenhang wurde von Chen et al. der Einfluss von CD95L-tragenden K562/B7-1-Zellen untersucht. Prominentester Effekt war abermals die durch CD95L induzierte Blockierung der T-Zellproliferation. Ein positiv kostimulatorischer Effekt konnte auch in dieser Veröffentlichung nicht nachgewiesen werden (173).



**Abb. 6.2.1: Dosisabhängige Modulation der CD3-induzierten T-Zellaktivierung durch CD95.** Die T-Zellaktivierung und -proliferation nach CD3-Stimulation wird durch die Koligation von CD95 mit verschiedenen Agonisten dosisabhängig beeinflusst. Hohe Dosis der CD95-Agonisten blockiert (A) und geringe Dosis steigert (B) die Aktivierung der Zellen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Apoptoseinduktion zwei funktionelle CD95-Allele benötigt, während für proliferative Signaltransduktion nur ein funktionelles Allel vorhanden sein muss (189). So wurde bereits 2004 von Legembre et al. eine dosisabhängige Signalübertragung durch CD95 in Lymphozyten vorgeschlagen. Eine solche Dosisabhängigkeit für die CD95-Ligation konnte in CD95-sensitiven SKW6.4-Zellen beobachtet werden (190). Auch in dieser Arbeit mündete die CD95-Stimulation unterhalb eines definierten Schwellenwertes in der Aktivierung von Überlebenssignalen, während die Überschreitung durch hohe Konzentrationen von CD95-Agonisten die Induktion von Zelltod auslöste. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schlagen einen vergleichbaren Schwellenwert-Mechanismus für primäre humane T-Zellen vor. Im Gegensatz zu SKW6.4-Zellen sind frisch isolierte humane T-Zellen jedoch auch in Anwesenheit hoher CD95L-Konzentrationen überwiegend resistent gegen CD95-vermittelten Zelltod (abhängig vom

Verhältnis CD45RA<sup>+</sup>- zu CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen (**Abb. 5.2.16**)). Als Folge davon werden primäre T-Zellen bei Kostimulation mit hohen Mengen von CD95-Agonisten in ihrer Aktivierung gehemmt (ohne Induktion von Apoptose), während geringe Mengen zahlreiche TZR-induzierte Aktivierungsparameter amplifizieren.

### **6.2.3 Einfluss der CD95-Koligation auf TZR-assoziierte Signalwege**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD95-Koligation die MAPK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die Rezeptorinternalisierung, die Expression anti-apoptotischer Proteine und die Zellzyklusprogression beeinflusst. Besonders prominent war der positiv kostimulatorische Effekt von CD95 auf die MAPK-Aktivierung, der sich in einer verstärkten und anhaltenden Phosphorylierung von ERK1/2 äußerte (**Abb. 5.2.24A**). Es wurde daher vermutet, dass ERK1/2 ein essentielles Signalmolekül der schwachen CD95-Koligation darstellt und die anhaltende Aktivierung der MAPK die verstärkte Proliferation, die Expression der zahlreichen Aktivierungsmarker und die Zellzyklusprogression unterstützt. Möglicherweise spielt CD95 auf diese Weise *in vivo* eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der T-Zellantwort und im Überleben der Zellen.

Auch Lavrik et al. demonstrierten nach Stimulation des CD95-Rezeptors auf SKW6.4-Zellen mit CD95L-Konzentrationen unterhalb eines definierten Schwellenwertes die Aktivierung der MAPK ERK1/2 und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (190). Auch hier wurden folglich Signalkaskaden aktiviert, die primär für Überleben und nicht für Apoptose zuständig sind. In der Literatur wurde zudem beschrieben, dass CD95 die Aktivierung der MAPK ERK1/2 in Fibroblasten (84), Neuriten (81) und Gliomzellen (191) induzieren kann. Shinohara et al. konnten hierbei auch eine gesteigerte CD95-vermittelte Zellzyklusprogression beobachten, die nicht mit der Induktion von Apoptose einherging (191). In CD95-resistenten Tumorzellen konnte eine CD95-induzierte Aktivierung von ERK1/2, NF- $\kappa$ B und Caspase-8 festgestellt werden, welche die Invasivität und Motilität der Zellen erhöhte (78). Auch in CD3-stimulierten primären murinen T-Lymphozyten konnten in Anwesenheit von rekombinantem CD95L die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und die ERK-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 im Luciferase Assay demonstriert werden (96).



Neuere Arbeiten von Strauss et al. zeigten im Gegensatz dazu, dass die ERK1/2-Phosphorylierung durch Stimulation mit CD95L-tragenden APZ verhindert wurde (53). Parallel war in diesen Zellen wie erwähnt jedoch auch eine CD95-vermittelte Blockierung der TZR-Aktivierung gefunden worden. In der vorliegenden Arbeit resultierte eine solche Blockierung nach CD95-Koligation mit hoher Dosis der CD95-Agonisten ebenfalls bereits nach 10-minütiger Kostimulation in einer verminderten Phosphorylierung von ERK1/2 (**Abb. 5.2.24B**). Die Daten geben daher Grund zur Annahme, dass ein starkes kostimulatorisches CD95-Signal durch hochbeladene CD95L-tragende APZ ursächlich ist für diesen inhibitorischen Effekt auch auf der Ebene der MAPK-Aktivierung.

Bei der alternativen Stimulation von T-Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA und dem Calciumionophor Ionomycin zeigte sich keine Veränderung der CFSE-Profile bei gleichzeitiger CD95-Ligation. Zudem verblieben die Zellen in einem inaktiven Zustand, wenn zusätzlich zur CD95-Stimulation nur Phorbol ester oder Calciumionophor angeboten wurde (**Abb. 5.2.26**). Demnach hat CD95 keinen Einfluss auf die PMA/Ionomycin-induzierte Proliferation und ist zudem nicht in der Lage, die Rolle der aktivierten PKC oder des Calciums bei der TZR-Signaltransduktion zu ersetzen. Es wird daher vermutet, dass CD95 entweder oberhalb der PKC-Aktivierung und der Calcium-Mobilisierung agiert oder andere Signaltransduktionswege der TZR-Signalkaskade ansteuert.

Als intrazellulärer Interaktionspartner des kostimulatorischen Rezeptors CD28 wurde die PI3-Kinase ursprünglich als Verstärker der T-Zellaktivierung beschrieben (4). Unter Verwendung von Wortmannin, einem spezifischen Inhibitor der PI3-Kinase, wurde gefunden, dass anti-CD3/CD28 stimulierte T-Zellen komplett inhibiert wurden. Im Vergleich dazu war weiterhin eine abgeschwächte, aber deutlich sichtbare Proliferation CD95-kostimulierter Zellen nachweisbar (**Abb. 5.2.27**). Somit scheint der Mechanismus der CD95-Kostimulation in T-Zellen nicht (wie für CD28 vorgeschlagen) auf einer Aktivierung der PI3-Kinase zu beruhen. Obwohl der Signalweg der CD95-induzierten Migration scheinbar über die Aktivierung der PI3-Kinase läuft (192) und auch pro-apoptotische CD95-Stimulation die Kinase aktivieren kann (193), wurde die nicht-apoptotische CD95-Ligation bisher nicht in Verbindung mit PI3-Kinase-Aktivität gebracht.

#### 6.2.4 Die Rolle der Rezeptorinternalisierung für Signaltransduktionsprozesse

Die Anzahl an TZR-Molekülen auf der Zelloberfläche entscheidet über die Stärke der TZR-Antwort nach antigener Stimulation. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der T-Zelle bei geringer TZR-Expression deutlich beeinträchtigt ist (194;195). Nach Stimulation mit TZR-Agonisten wurde beobachtet, dass die Expression des TZR auf der Oberfläche der Zellen innerhalb von fünf Stunden um 90% reduziert wird (194;196). Die Internalisierung resultiert in der Degradation in lysosomalen Kompartimenten oder dem Recycling des TZR (197;198). Andere Daten belegten, dass die Internalisierung des TZR nicht nur für den Abbau des Rezeptors, sondern auch für die Signalweiterleitung essentiell ist (199). So wurde demonstriert, dass frühe Endosomen Signalmoleküle bereitstellen und die Translokation des TZR zu den Endosomen zur Bildung von intrazellulären Signalplattformen führt (200;201). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Abnahme der TZR-Oberflächenexpression nach CD3-Stimulation nachgewiesen werden (**Abb. 5.2.28**). Interessanterweise führte die Koligation von CD95 mit geringer Dosis von CD95-Agonisten noch zu einer gesteigerten Internalisierung. Im klaren Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit hoher Konzentration des CD95-Agonisten CD95LFC die TZR-Endozytose blockierte (**Abb. 5.2.28C**). Dies deutet darauf hin, dass CD95 dosisabhängig auch die Internalisierung des TZR beeinflussen kann und so möglicherweise darüber entscheidet, ob eine TZR/CD3-stimulierte T-Zelle aktiviert oder supprimiert wird. Bisher ist nicht bekannt wie CD95 die Internalisierung modulieren könnte. Einzig für den kostimulatorischen Rezeptor CD28 wurde ein Effekt auf die Oberflächenexpression des TZR diskutiert (157). Da die TZR-Internalisierung auf der Phosphorylierung der schweren Kette von Clathrin durch die Src-Kinase Lck beruht (202), wäre es denkbar, dass CD95 die Aktivität der Kinase positiv moduliert und auf diesem Weg die Clathrin-abhängige Internalisierung verstärkt.

Im Kontext der Kostimulation über CD95 wurde in der vorliegenden Arbeit auch die endozytotische Aufnahme des CD95-Rezeptors untersucht. Bisher deuten die Daten aus der Literatur darauf hin, dass CD95 im Zuge der Apoptose internalisiert wird und dieser Prozess zwingend für die Induktion von Zelltod erforderlich ist (18). Dies würde möglicherweise die Unterschiede der Apoptoseinduktion durch LZ-CD95L in löslicher (evtl. internalisierbarer) oder plattengebundener (evtl. nicht internalisierbarer) Form in PHA-Blasten erklären (**Abb. 5.2.2B**). Zusätzlich wurde postuliert, dass die Internalisierungsfähigkeit von CD95 die pro- und anti-apoptische CD95-Signaltransduktion steuert. Nicht-internalisierbarer CD95-

Rezeptor wurde als Induktor anti-apoptotischer Signalgebung vorgeschlagen (18). In der vorliegenden Arbeit wurde indes auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen nach CD95-Stimulation in primären T-Zellen eine Abnahme von CD95 auf der Zelloberfläche nachgewiesen (**Abb. 5.2.29**). Der Zusatz von zwei verschiedenen Inhibitoren der Aktinpolymerisation konnte den Effekt deutlich reduzieren (**Abb. 5.2.30**). Es wird daher vermutet, dass CD95 auch ohne Induktion von Zelltod in einem Aktin-abhängigen Prozess internalisiert wird. Andere pharmakologische Inhibitoren gegen Matrix-Metalloproteasenaktivität, Clathrin-vermittelte Endozytose oder die Polymerisation der Mikrotubuli hatten keinen Einfluss auf die Abnahme von CD95. CD95 scheint demnach Clathrin-unabhängig internalisiert zu werden. Interessanterweise sind diese Befunde im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie von Chakrabandhu et al. (203), die einen Clathrin-unabhängigen, Ezrin-abhängigen Internalisierungsprozess für anti-apoptotische CD95-Signaltransduktion nachweisen konnten, was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter überprüft wurde.

### **6.2.5 CD95-Kostimulation induziert eine T<sub>H</sub>1-Antwort**

Der beobachtete CD95-vermittelte kostimulatorische Effekt auf TZR/CD3-stimulierte Zellen ging einher mit einem charakteristischen Zytokinmuster. Während geringe Mengen der CD95-Agonisten die TZR-induzierte Produktion der Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  weiter steigern konnte, war die Sekretion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  bei starkem CD95-Kostimulus deutlich reduziert (**Abb. 5.2.19, 5.2.21**). Interessanterweise war der Unterschied in der IL-4-Produktion zwischen T-Zellen, die mit anti-CD3/CD28 oder zusätzlich mit geringer Dosis von CD95-Agonisten kostimuliert wurden, marginal. Die Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  gewährleisten die Differenzierung von T<sub>H</sub>0-Zellen in T<sub>H</sub>1-Zellen, während IL-4 ein zentraler Mediator der T<sub>H</sub>2-Zelldifferenzierung ist (204). Es wird daher vermutet, dass CD95 die Differenzierung von naiven T-Zellen in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Antwort lenken kann. Dies wird unterstützt durch Western Blot Analysen stimulierter T-Zellen, die eine verstärkte Phosphorylierung der für T<sub>H</sub>1-Zellen charakteristischen STAT Proteine -1 und -4 zeigten. Die prominente Expression des T<sub>H</sub>1-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet (**Abb. 5.2.21D**) und die Induktion großer Mengen CD95L in CD95-kostimulierten Zellen untermauern diese Vermutung (**Abb. 5.2.22, 5.2.23**).

In der Literatur ist beschrieben, dass hauptsächlich das lokale Zytokinmilieu über die Differenzierung von  $T_H0$ -Zellen in  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zellen entscheidet. Das von Makrophagen sezernierte IL-12, sowie IL-18, IL-27 und  $IFN\gamma$  induzieren eine  $T_H1$ -Antwort, während IL-4 den Hauptmediator einer  $T_H2$ -Differenzierung darstellt. Es gibt Hinweise darauf, dass auch die Affinität des TZR zum korrespondierenden MHC-präsentierten Antigen über die Differenzierung der T-Zellen entscheidet. Auch scheinen kostimulatorische Rezeptoren entweder bevorzugt  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Differenzierungen zu unterstützen. Während ICOS und OX-40 präferentiell eine  $T_H2$ -Differenzierung induzieren, scheinen LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) und ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*) die Entwicklung von  $T_H2$ -Zellen zu inhibieren (2). In der Literatur finden sich bisher allerdings keine Untersuchungen zur Rolle von CD95 in der Differenzierung von T-Helfer-Zellen.

### **6.2.6 Anti-apoptotische Bedeutung von Caspasen in T-Zellen**

Ein zentraler Mechanismus der CD95-vermittelten Apoptose ist die Aktivierung einer Caspase-Signalkaskade (205). Diese mündet in der Spaltung lebenswichtiger Substrate der Zelle und induziert nachfolgend apoptotischen Zelltod. In den letzten Jahren wurde die Aktivierung von Caspasen auch mit anti-apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht (206). Die Aktivierung der Caspasen-3 (207), -8 und -9 (172) scheint beispielsweise für die Erythropoese im Knochenmark erforderlich zu sein. Der Caspase-9 wurde zudem eine Funktion bei der Differenzierung von Muskelzellen zugesprochen (208), und Caspase-3 scheint nicht-apoptotische Funktionen im Nervensystem (209;210) zu unterstützen. Besonders wichtig ist die Caspase-8 in nicht-apoptotischen Prozessen. So wurde sie als essentiell bei der Embryonalentwicklung, der Monozytendifferenzierung (211;212) und der Differenzierung und Proliferation von B- und NK-Zellen beschrieben (36). Auch in T-Zellen ist insbesondere die Caspase-8 notwendig für Proliferation nach antigenspezifischer Aktivierung (95;143;206;213). Patienten mit Mutationen im Caspase-8-Gen leiden folglich an einer herabgesetzten T-Zellproliferation (36). Inzwischen wurde der molekulare Hintergrund genauer analysiert und eine Caspase-8-abhängige Aktivierung des proliferativen NF- $\kappa$ B-Signalweges beobachtet (206).

Es wurde vorgeschlagen, dass CD95 über FADD möglicherweise in Abhängigkeit der Caspase-8-Aktivierung die T-Zellproliferation unterstützt (143;146). Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die gesteigerte Zellproliferation durch Kostimulation mit geringen Mengen der CD95-Agonisten mit verstärkter Spaltung der Caspasen-3 und -8 assoziiert war. Wie die Kinetik in **Abb. 5.2.31A** zeigt, konnte die Prozessierung der Caspase-3 bei CD95-Koligation wesentlich früher nachgewiesen werden als nach alleiniger CD3-Stimulation. Nach drei Tagen konnte in CD3/CD95-stimulierten Zellen die Proform der Caspase-3 nicht mehr nachgewiesen werden, während das p20-Spaltfragment deutlich detektierbar war. Im Einklang mit der fehlenden Apoptose der primären humanen Zellen nach CD95-Ligation wurde in diesen Ansätzen keine Spaltung der bekannten Caspase-3-Substrate PLC $\gamma$  und PARP (**Abb. 5.2.31B**) gefunden. Daraus wurde geschlossen, dass Caspase-Aktivierung wichtig ist für Zellproliferation und sich diese nicht-apoptotische Aktivierung qualitativ von der in apoptotischen Zellen unterscheidet (95). Die Korrelation von Proliferation und Caspase-Aktivierung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass starke CD95-Koligation in CD3-stimulierten T-Zellen nicht nur die T-Zellaktivierung sondern auch die Prozessierung der Caspasen verhindern konnte (**Abb. 5.2.31C**). Das Spaltmuster der Effektorcaspase-3 weist wie erwähnt nur ein Spaltfragment von 20 kDa auf. Die p17- und p19-Fragmente, die in apoptotischen Zellen auftreten, konnten nicht nachgewiesen werden. In einer eigenen kürzlich veröffentlichten Arbeit stellte sich heraus, dass die fortwährende Interaktion des p20-Fragments der Caspase-3 mit dem Inhibitor XIAP für die inkomplette Spaltung verantwortlich ist und deren volle Aktivierung blockiert (214). Es bleibt zu klären, ob die prozessierte Caspase-3 (p20) in proliferierenden Zellen *in vivo* enzymatisch aktiv und funktionell ist oder ein differentielles Substratrepertoire aufweist.

Es ist nach wie vor unklar, wie CD95 die Aktivität der Caspasen in proliferierenden Zellen erhöht. Eine Möglichkeit wäre die direkte Rekrutierung, Spaltung und Aktivierung der Caspasen über FADD unter Bildung eines DISC-ähnlichen Komplexes (143;146). Während in früheren Studien keine DISC-Bildung nachgewiesen werden konnte (215), beobachteten Kataoka et al. in humanen CD3-stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von kreuzvernetzendem CD95L einen Todesrezeptor-assoziierten DISC-ähnlichen Komplex aus CD95, FADD, Caspase-8 sowie prozessierter Caspase-8 (p43) und cFLIP (p43) (96). Auf diese Weise würde CD95 ein zweites Set an Caspasen für die Proliferation liefern. Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass CD95 die bereits nach TZR/CD3-Stimulation induzierte Caspase-Aktivierung verstärkt. In diesem Zusammenhang wurde gefunden, dass nach TZR-Stimulation ein

Komplex aus Bcl-10, MALT-1 und CARMA-1 gebildet wird (216), der mit der Aktivierung von Caspasen in proliferativen Prozessen assoziiert ist (98). Es bleibt zu klären, welche Möglichkeiten der Todesrezeptor CD95 hat, den nicht-apoptotischen TZR-Signalweg zu beeinflussen und welche Rolle die DISC-Komponenten und der CARMA-1/Bcl-10/MALT-1-Komplex in diesem Szenario spielen.

Einige Befunde geben Grund zu der Annahme, dass nur die DISC-Komponenten und nicht die Todesrezeptoren selbst für anti-apoptotische Signaltransduktion wichtig sind. Anders als Todesrezeptor-defiziente Mäuse sterben Mäuse interessanterweise bereits *in utero*, wenn ihnen Gene für FADD, Caspase-8 oder cFLIP fehlen. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass diese Komponenten essentiell für die Entwicklung sind und hier möglicherweise kollaborieren. Unabhängig von einer Stimulation über Todesrezeptoren wurden Caspase-8 und FADD auch als wichtige Signalmoleküle bei der Zytokin- und Antigen-induzierten Proliferation identifiziert. Es wurde daher spekuliert, ob es in diesem Zusammenhang sogar einen noch nicht identifizierten Todesrezeptor-unabhängigen DISC-ähnlichen Komplex gibt (217).

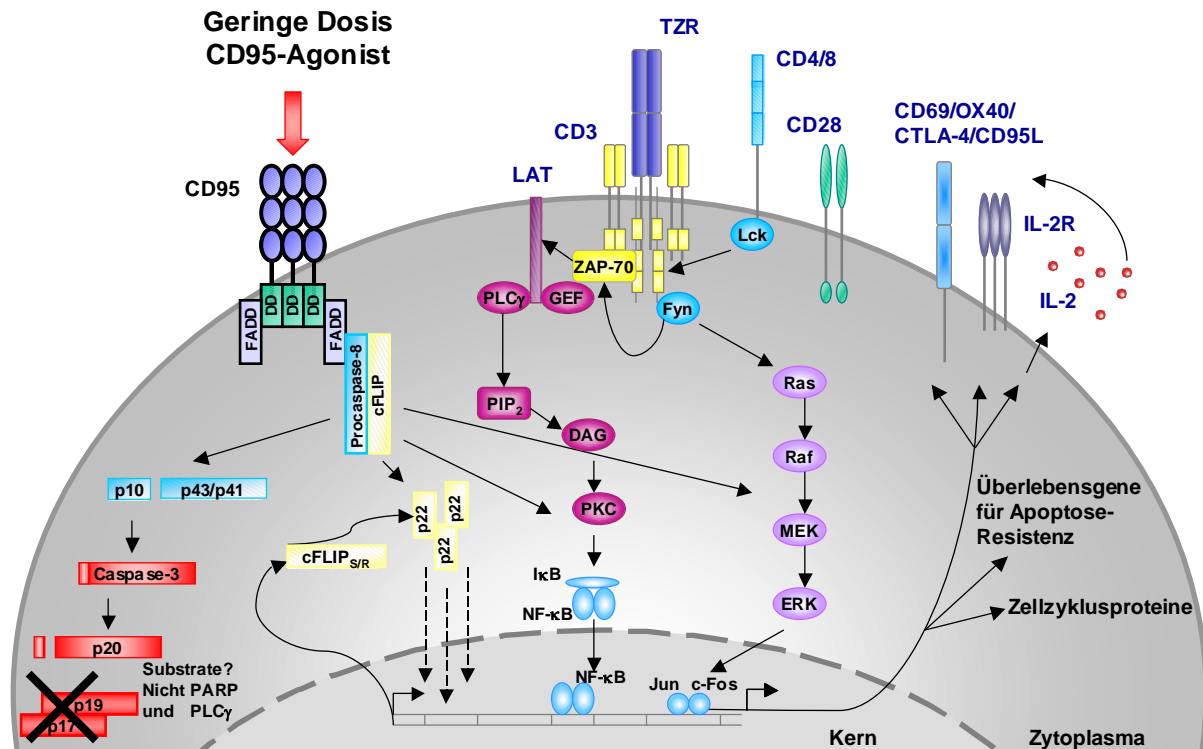
### 6.2.7 cFLIP und Bcl-X als Vermittler von Apoptose-Resistenz

Das Molekül cFLIP wurde als ein zentraler Faktor bei der Regulation pro- und anti-apoptotischer CD95-Signaltransduktion beschrieben (23;98), obwohl es hinsichtlich der Funktionen der verschiedenen Splicevarianten widersprüchliche Befunde gibt (23). In primären humanen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die anti-apoptotischen Isoformen cFLIP<sub>R</sub> und cFLIP<sub>S</sub> nach Restimulation induziert werden (99) und diese möglicherweise für die AICD-Resistenz verantwortlich sind (29).

In CD3/CD95-koligierten proliferierenden T-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit die anti-apoptotischen Isoformen cFLIP<sub>R</sub> und cFLIP<sub>S</sub> vermehrt nachgewiesen. Auch das kürzlich entdeckte Spaltprodukt p22-FLIP konnte als zusätzliche Bande im Western Blot detektiert werden. Für p22-FLIP wurde wie bereits für p43-FLIP vorgeschlagen, dass es anti-apoptotische NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion unterstützt (100). In Übereinstimmung mit diesen Daten war die inhibitorische Untereinheit des IKK-Komplexes I $\kappa$ B $\alpha$  stärker phosphoryliert und auch die Bande von I $\kappa$ B $\alpha$  im Western Blot erschien als Folge der phosphorylierungsabhängigen Degradation geringer abundant (**Abb. 5.2.32A**). Da bekannt ist,

dass die Dissoziation von I $\kappa$ B $\alpha$  in der Translokation von NF- $\kappa$ B resultiert, wird postuliert, dass CD95-Kostimulation mit geringer Konzentration von CD95-Agonisten die nachfolgende Aktivierung NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene induziert. Folglich war die mRNA-Expression des NF- $\kappa$ B-Zielgens GM-CSF deutlich erhöht (**Abb. 5.2.32B**). NF- $\kappa$ B wird zudem als Induktor zahlreicher anti-apoptotischer Gene beschrieben (29;218). Demnach konnte das anti-apoptotische Protein Bcl-X im Einklang mit der erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung ebenfalls verstärkt in CD95-kostimulierten Zellen gefunden werden (**Abb. 5.2.32A**). Bcl-X übermittelt Überlebenssignale, ist essentieller Faktor für Zellaktivierung und -proliferation und schützt so restimulierte primäre T-Zellen vor AICD (23;29).

Somit können sowohl Bcl-X als auch cFLIP Apoptose inhibieren. Während cFLIP die Aktivierung von Caspasen am DISC verhindert, kann Bcl-X pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie kompensieren und Zelltod über die Mitochondrien blockieren. Da CD95-Ligation in CD3-stimulierten Zellen diese Proteine induzierte, wurde vermutet, dass diese Zellen eine Resistenz gegen Zelltodinduktion aufweisen. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass Mistellektin und auch  $\gamma$ -Bestrahlung in CD95-kostimulierten Zellen signifikant weniger Apoptose auslöste als in CD3-stimulierten T-Lymphozyten (**Abb. 5.2.33**). Da für beide Zelltodinduktoren nicht geklärt ist, ob primär der intrinsische mitochondriale oder der Todesrezeptor-abhängige Signalweg die Auslösung der Apoptose bedingt (219-223), konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob in diesem Szenario primär Bcl-X oder cFLIP die Apoptose-Resistenz vermittelt. Es wird jedoch vermutet, dass die reduzierte Apoptose-Sensitivität auf einer Kooperation der anti-apoptotischen Proteine beruht. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass auch die AICD-Induktion auf einem synergistischen Zusammenspiel zwischen dem Bcl-2 Familienmitglied Bim und CD95 beruht (224). Im Einklang mit unseren Befunden konnte in DZ-aktivierten CD95-kostimulierten T-Zellen eine partielle CD95-vermittelte Apoptose-Resistenz beobachtet werden (144). Auch hier war die Expression der anti-apoptotischen Proteine cFLIP, Bcl-X und auch Bcl-2 erhöht.



**Abb. 6.2.2: Effekte geringer Dosis von CD95-Agonisten auf die T-Zellaktivierung.** Die Kostimulation CD3-stimulierter Zellen mit geringer Konzentration der CD95-Agonisten verstärkt die Aktivierung von ERK1/2 und NF- $\kappa$ B, die Prozessierung der Caspasen-3 und -8, die Produktion von IL-2 sowie die Expression von Aktivierungsmarkern und die Zellzyklusprogression. Die gesteigerte Expression anti-apoptotischer Proteine (cFLIP und Bcl-X) resultiert in einer partiellen Apoptose-Resistenz der CD95-kolierten Zellen.

## 6.2.8 Potenzielle Rolle von CD95 auf T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmals, dass CD95-Ligation im Kontext der TZR/CD3/CD28-Stimulation auf frisch isolierten primären T-Zellen zum einen eine Inhibition der Proliferation und zum anderen eine gesteigerte Zellzyklusprogression induzieren kann. In diesem Szenario scheint CD95 sogar ein potenterer Kostimulus zu sein als CD28. Die Interaktion zwischen CD95 und CD95L auf APZ oder Endothelzellen könnte über den Effekt nach TZR-Ligation bestimmen. Es ist anzunehmen, dass das lokale und zelluläre Mikromilieu über Blockierung oder Verstärkung der T-Zellproliferation nach CD95-Stimulation entscheidet.

Ursprünglich wurde vorgeschlagen, dass CD95L auf APZ für die antigenspezifische Deletion aktivierter peripherer T-Zellen verantwortlich ist (225-227). Dies deutete auf einen Mechanismus für die Induktion von T-Zelltoleranz und Immunsuppression hin. So wurde von Min et al. demonstriert, dass CD95L-transfizierte Spender-DZ die Abstoßung von allogenen Herztransplantat verlangsamten (228). Eine Suppression der zellulären Immunantwort auf Fremd- und Alloantigene konnte auch von Zhang et al. durch CD95L-transfizierte „Killer“-



Makrophagen beobachtet werden (229). Überraschenderweise zeigte eine Studie mit CD95L-transfizierten DZ jedoch keinen Schutz vor der Abstoßung eines allogenen Hauttransplantats. Die genauere Untersuchung ergab, dass Zelltod *in vitro* in nur 30% der T-Zellen CD95-vermittelt auftrat, während die Proliferation naiver alloreaktiver T-Zellen ebenfalls CD95-induziert inhibiert wurde (230).

Kürzlich erschienene Daten untermauern einen nicht-apoptotischen inhibitorischen Effekt von CD95 auf T-Lymphozyten. Statt in der Induktion von apoptotischem Zelltod resultierte die Stimulation mit CD95L-exprimierenden APZ in einer Inhibition der T-Zellproliferation (53). Dies steht im Einklang mit Arbeiten von Chen et al., die durch die Verwendung von CD95L-tragenden K562/B7-1-Zellen ebenfalls eine Inhibition der T-Zellproliferation detektierten, die nur zum Teil durch Apoptoseinduktion bedingt war (173). Obwohl in dieser Studie K562-Zellen eingesetzt wurden, die mit unterschiedlichen Mengen von B7-1 und CD95L beladen waren, war der augenscheinlichste Effekt eine dosisabhängige Blockierung der Proliferation, die nicht mit Zelltod einherging. Auch gering CD95L-exprimierende K562-Zellen hatten nie einen positiv kostimulatorischen Effekt auf die Zellzyklusprogression der T-Zellen. Im Gegensatz dazu demonstrierten Daten von Maksimow et al., dass die Aktivierung von T-Zellen durch Antigen-beladene DZ bei gleichzeitiger CD95-Ligation in nur ca. 50% der naiven murinen T-Zellen Zelltod auslöste. Die überlebenden T-Zellen hingegen proliferierten deutlich verstärkt, produzierten erhöhte Mengen von IFN $\gamma$  und entwickelten einen Aktivierungs-assoziierten Phänotyp (144).

Der Effekt der CD95-Ligation auf T-Zellen ist augenscheinlich abhängig vom Aktivierungszustand der T-Zellpopulation. Die Infektion mit *Cryptococcus neoformans* resultiert im TLR-4-vermittelten Erscheinen von CD95L auf der Oberfläche von humanen Makrophagen (231). In Folge dessen wurde apoptotischer Zelltod in aktivierten T-Lymphozyten beobachtet, während die Apoptoseinduktion in naiven T-Zellen deutlich reduziert war. Auch CD95L-exprimierende DZ lösten apoptotischen Zelltod in voraktivierten humanen T-Zellen, nicht aber in ruhenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus (232). Im Rahmen einer Infektion könnte die Expression von CD95L auf APZ einen Kontrollmechanismus darstellen, der in der ersten Phase der Immunantwort die T-Zellexpansion erlaubt und verstärkt. In der zweiten Phase nach Elimination des Pathogens könnte die Beendigung der Immunantwort ebenfalls CD95L-vermittelt induziert werden.

Außerhalb des Thymus ist CD95L auf B-Zellen (233) und APZ wie Makrophagen, DZ und Langerhanszellen exprimiert (234-236). Im Rahmen der Immunantwort wird CD95L auf bisher nicht verstandene Weise parallel zur Antigenprozessierung und -präsentation auf diesen Zellen induziert (234;235). Es wurde vorgeschlagen, dass HIV-infizierte Makrophagen (53;237) und T-Zellen (238;239) den CD95L verstärkt exprimieren und dieser für die Depletion nicht-infizierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausschlaggebend ist. Obwohl es auch über die Induktion von CD95L auf HIV-infizierten Zellen widersprüchliche Befunde gibt (240), schlagen die Arbeiten von Strauss et al. einen weiteren Mechanismus der Proliferationsinhibition durch HIV-induzierte Erhöhung von CD95L auf APZ zur Reduktion der Anzahl von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ohne Zelltodinduktion vor.

Unter pathophysiologischen Bedingungen könnte die initiale T-Zellexpansion durch induzierte CD95L-Expression verhindert werden. Für die Infektion mit HIV (53), CMV (Cytomegalie-Virus) (241), EBV (Eppstein-Barr-Virus) (242) und HSV (Herpes Simplex Virus) (243) wurde ein solcher Mechanismus beschrieben. Beispielsweise beobachteten Raftery et al. neben der verminderten Expression von MHC-Molekülen auch ein vermehrtes Erscheinen von CD95L auf der Oberfläche CMV-infizierter DZ. Während in aktivierten T-Zellen nachfolgend Apoptose ausgelöst wurde, wurde eine nicht-apoptotische Suppression der überlebenden T-Lymphozyten verzeichnet.

T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche sowohl CD95 als auch CD95L, die im Rahmen der Proliferation und Expansion vermehrt auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen erscheinen. Neben den APZ oder anderen umliegenden Zellen könnten auch T-Zellen untereinander CD95/CD95L-Interaktionen vermitteln. Die T-Zell/T-Zell-Wechselwirkung wurde in diesem Zusammenhang von Puliaeva et al. untersucht. An einem *in vivo* Mausmodell wurde demonstriert, dass die Expression von CD95 auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ein wichtiges Signal für die Expansion von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen ist. Auch eine optimale zytotoxische Aktivität von ZTL scheint abhängig von CD95-exprimierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu sein, während B-Zell-Antworten unabhängig vom CD95-Expressionsniveau auf diesen Zellen ablaufen (244).

Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten wird zusammenfassend postuliert, dass geringe Mengen CD95L auf APZ zunächst die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen massiv verstärken. Im Verlauf der Immunreaktion erscheinen große Mengen CD95L auf der Oberfläche der Immunzellen. Während voraktivierte T-Zellen spezifisch über die Induktion von Apoptose eliminiert werden, wird die Aktivierung naiver T-Zellen parallel inhibiert. Unter pathophysiologischen Gesichtspunkten könnte das CD95L-Expressionsniveau in Richtung einer verstärkten Expression von CD95L gelenkt werden und für das Pathogen einen Mechanismus der Immunevasion darstellen.

### **6.2.9 CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Maus: Analyse zur Rolle des CD95/CD95L-Systems**

Zusammenfassend deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass sowohl CD95L als auch CD95 kostimulatorische Funktionen aufweisen. Für beide Moleküle können entsprechende Berichte in der Literatur gefunden werden, die den jeweiligen Mechanismus unterstützen. Wie jedoch bereits erwähnt, konnte nicht eindeutig belegt werden, dass CD95Fc direkt über die Bindung an CD95L Signale initiiert oder CD95L blockiert. Aus diesem Grund sollten CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i.-Mäuse untersucht werden. Diese Mäuse tragen einen CD95L, der nur aus der Transmembran- und der extrazellulären Domäne des CD95L besteht. Folglich kann keine PRD-vermittelte Interaktion mit potenziellen Signalproteinen für eine von uns postulierte PRD-abhängige reverse Signalgebung stattfinden. Bisher wurden nur vorläufige und zum Teil nicht verifizierte Daten erhalten. Neben der möglicherweise leicht verstärkten Aktivierung der Splenozyten nach CD3-Ligation konnte festgestellt werden, dass CD95Fc auch die Proliferation CD3-stimulierter Splenozyten mutierter Mäuse inhibierte (**Abb. 5.3.4, 5.3.5**). Da diese Mäuse einen CD95L exprimieren, der keinen für die Signalweiterleitung entscheidenden, intrazellulären Teil aufweist, wird vermutet, dass CD95Fc CD95L nicht direkt stimulieren und folglich keine retrograde Signalübertragung induzieren kann. Die beobachtete Inhibition scheint demnach ein sekundärer Effekt zu sein, der auf einem fehlenden CD95-vermittelten kostimulatorischen Signal beruht. Folglich scheint nicht CD95L, sondern sein Rezeptor CD95 die essentiellen kostimulatorischen Signale in Rahmen der T-Zellaktivierung und -proliferation zu liefern.

Die Proliferationsfähigkeit von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach CD3-Stimulation konnte auch für komplett CD95L-defiziente (245), *gld*- und *lpr*-Mäuse gezeigt werden (134). Demnach war die deutliche Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD3-stimulierten CD95LΔintra k.o./k.i.-T-Zellen nicht unerwartet (**Abb. 5.3.4**). Im Einklang mit unseren Beobachtungen konnten auch Desbarats et al. durch die gleichzeitige Stimulation von CD95L mit CD95Fc eine dosisabhängige Abnahme der T-Zellaktivierung von WT- (und *lpr*-) Mäusen demonstrieren. Der Zusatz von CD95Fc hatte bei CD3-stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von *gld*-Mäusen allerdings keinen Effekt (134). Dies führte zu der Annahme, dass murine T-Zellen über CD95L negativ kostimuliert werden können. Da die CD95LΔintra k.o./k.i.-Splenozyten in der vorliegenden Arbeit unter vergleichbaren Bedingungen inhibiert wurden, erlauben unsere vorläufigen Ergebnisse keine Aussage über eine potenzielle reverse Signaltransduktion von CD95L in T-Zellen. Allerdings finden sich in der Literatur auch komplett widersprüchliche Befunde, da von Suzuki und Fink eine CD95Fc-vermittelte kostimulatorische Proliferationssteigerung CD3-stimulierter ZTL beschrieben wurde (131). Allerdings wurde in diesem Bericht mit aktivierten ZTL aus Mäusen gearbeitet, während bei Desbarats et al. und in der vorliegenden Arbeit frisch isolierte T-Zellen bzw. Splenozyten verwendet wurden.

In Anbetracht einer essentiellen Rolle von CD95 bei der Aktivierung von T-Zellen stellte sich eingangs die Frage, wieso T-Zellen von komplett CD95L-defizienten, *gld*- oder *lpr*-Mäusen trotz der Mutationen im CD95/CD95L-System nach optimaler CD3-Stimulation ungehindert proliferierten (134;245). Zudem war in komplett CD95-defizienten Mäusen nach Injektion von bakteriellem Superantigen *in vivo* eine Aktivierung und Proliferation von T-Zellen zu verzeichnen (168). Eine weiterer Bericht beschrieb anhand von CD95-defizienten Mäusen, dass CD95 nicht nur AICD regulieren kann, sondern auch einen Effekt auf naive T-Zellen hat (43). Zusätzlich gaben Untersuchungen von Hao et al. Grund zu der Annahme, dass CD95-Expression für Überleben, Proliferation und/oder Aktivierung wichtig sein könnte (79), da eine Cre-loxP-vermittelte Deletion der Todesdomäne von CD95 zur Lymphopenie führte (45). Auch bei vollständiger Deletion von CD95L in T-Zellen (T-CD95L<sup>-/-</sup>) waren deutlich weniger CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (in geringem Ausmaß auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) in den Lymphknoten dieser Mäuse nachweisbar (245). Überraschenderweise wiesen T-Zellen, denen entweder der gesamte CD95L (245) oder der komplette CD95-Rezeptor (45) per se einen aktivierten Phänotyp (CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>) auf. Der Aktivierungsstatus von T-CD95L<sup>-/-</sup>-T-Zellen nach CD3-Stimulation war jedoch mit WT-T-Zellen vergleichbar. Unverstanden ist in diesem

Zusammenhang die deutlich verstärkte T-Zellproliferation bei Mäusen, deren CD95L in allen Zellen vollständig deletiert war (245).

Die bisherige Datenlage der Literatur wirft nach wie vor Fragen zur Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Aktivierung von T-Zellen auf. Auch die Befunde der vorliegenden Arbeit liefern noch weitere Anknüpfungspunkte für zukünftige Studien auf diesem Gebiet. Es konnte in dieser Arbeit aber gezeigt werden, dass CD95 einen kostimulatorischen Rezeptor im Rahmen der Aktivierung, Proliferation und Expansion primärer T-Zellen darstellt. Erstmals wurde in diesem Zusammenhang demonstriert, dass CD95 in Abhängigkeit von der Stärke der Kostimulation die T-Zellaktivierung effizient steigern oder blockieren kann. Da in der Literatur widersprüchliche Befunde zum Effekt der CD95-Kostimulation auf T-Zellen gefunden wurden, konnte auf diese Weise eine Lücke im Verständnis der CD95-Koligation geschlossen werden. Allerdings deuten die Daten auch darauf hin, dass die CD95/CD95L-Interaktion nicht notwendig und auch retrograde CD95L-Signaltransduktion möglicherweise ohne Bedeutung für die primäre Aktivierung der T-Zellen ist. CD95 ist demnach in diesem Szenario ein echter kostimulatorischer Rezeptor, der dosisabhängig zwei unterschiedliche anti-apoptotische Signale übertragen und so möglicherweise die Feinabstimmung der T-Zellaktivierung regulieren kann.

## 7. Zusammenfassung

Der Todesfaktor CD95L ist bekannt für seine Fähigkeit apoptotischen Zelltod in CD95-sensitiven Zellen zu induzieren. Es häufen sich jedoch seit einiger Zeit Hinweise auf zusätzliche anti-apoptotische Funktionen des CD95/CD95L-Systems in verschiedenen Zellsystemen. Genaue molekulare Mechanismen der retrograden Signalgebung über CD95L wie auch der anti-apoptotischen Aktivität von CD95 sind dabei jedoch weitgehend unbekannt, insbesondere im Kontext der Aktivierung ruhender humaner T-Lymphozyten.

Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung des Todesfaktors CD95L als kostimulatorischer bzw. inhibitorischer Rezeptor im Rahmen der TZR/CD3/CD28-induzierten Aktivierung primärer humaner T-Zellen. Hier konnten wir eine Blockade der T-Zellproliferation bei gleichzeitiger Stimulation über CD3/CD28 und CD95L mit immobilisierten, nicht aber mit löslichen Fusionsproteinen und Antikörpern nachweisen. Bereits frühe Phasen der Signalinduktion waren betroffen. Neben dem Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Signaltransduktionsweg waren auch Schlüssel moleküle der proximalen TZR-Signalgebung wie PLC $\gamma$ , LAT und ZAP-70 inhibiert. Die Untersuchungen zu diesem Themenbereich wurden Anfang 2009 publiziert (142).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit der Todesrezeptor CD95 als potenziell kostimulatorischer Rezeptor untersucht. Interessanterweise konnte für CD95 ein dosisabhängiger Einfluss auf die TZR/CD3/CD28-Signalgebung in T-Zellen nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass eine hohe Konzentration der CD95-Agonisten in einer kompletten Blockade der T-Zell-Signalwege resultiert. Diese Befunde decken sich in allen untersuchten Parametern mit den Mitte 2009 publizierten Daten der Arbeitsgruppe um Gudrun Strauß (53). Im Gegensatz dazu führten geringere Konzentrationen zu einer deutlich gesteigerten Proliferation. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Effekt erstmals für eine Reihe unterschiedlicher CD95-Agonisten (Fusionsproteine und mAK) dokumentiert. Die gesteigerte Zellteilungsrate ging einher mit verstärkter Expression von Aktivierungsmarkern, erhöhter IL-2-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Produktion, verstärkter MAPK-Aktivierung und der Hochregulation von Zellzyklusproteinen. Weiterhin zeigten die Zellen eine erhöhte Apoptose-Resistenz, die mit dem Auftreten von p22-FLIP, cFLIP<sub>R/S</sub> und NF- $\kappa$ B-Zielgenen wie Bcl-X korrelierte. Im Einklang mit der inzwischen auch in der Literatur

dokumentierten Notwendigkeit der Caspase-Aktivierung im Rahmen der Proliferation, war die Prozessierung der Caspasen-3 und -8 unter diesen Bedingungen ebenfalls gesteigert.

Erste Untersuchungen an mutierten Mäusen, deren CD95L nur aus der Transmembran- und extrazellulären Domäne besteht, unterstützen nicht die Annahme, dass CD95L als retrograder Signalgeber fungieren kann. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Frage abschließend zu klären. Das kostimulatorische Potenzial von CD95 bei der Aktivierung ruhender T-Zellen wurde allerdings auch bei der Verwendung von murinen Milzzellen und humanen Agonisten untermauert.

Zusammenfassend hat das CD95/CD95L-System eindeutig eine modulatorische Funktion im Rahmen der Aktivierung primärer T-Lymphozyten. Unsere Befunde und die diskutierten Daten anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen gering exprimiertem CD95L auf APZ und CD95 auf T-Zellen im Zuge einer Immunantwort zunächst zur verstärkten Aktivierung, Proliferation und Expansion der T-Zellen führt. Im weiteren Verlauf der Immunreaktion wird CD95L auf APZ oder benachbarten T-Zellen vermehrt exprimiert und trägt durch Inhibition der Aktivierung weiterer T-Zellen zur Beendigung der Immunantwort bei. Aktivierte T-Zellen werden über denselben Rezeptor durch die Induktion von Apoptose eliminiert, während primäre T-Zellen durch Blockade des Signals 1 inhibiert werden. In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass Pathogene wie HIV über die Induktion von CD95L auf T-Zellen und APZ die gegen virusinfizierte Zellen gerichtete Immunantwort supprimieren.

## 8. Summary

The death factor CD95L is best known for its capacity to induce apoptotic cell death in CD95-sensitive cells. Recently however, emerging evidence pointed at additional anti-apoptotic functions of the CD95/CD95L-system in various cellular systems. The exact molecular mechanisms regulating CD95L reverse signaling or the anti-apoptotic activity of CD95 in the context of primary human T cell activation had not been elucidated.

One aspect of the present work addresses the investigation of CD95L as a costimulatory receptor for TCR/CD3/CD28-induced activation of primary human T lymphocytes. Here we detected a complete block of T cell proliferation by simultaneous stimulation via CD3/CD28 and CD95L with immobilized, but not soluble fusion proteins or antibodies. Most early T cell signaling events that we tested were negatively affected. Specifically, besides the Ras/Raf/MEK/ERK1/2 signal transduction pathway and calcium flux, key molecules of proximal TCR-signaling including LAT, ZAP-70 and PLC $\gamma$  were inhibited. Our results on the putative retrograde signaling through CD95L were recently published in the journal "*International Immunology*".

Moreover, we analyzed the role of the death receptor CD95 as a potential costimulatory molecule. We could demonstrate that CD95 influences the TCR/CD3/CD28-induced activation and signaling of primary T cells in a dose- or threshold-dependent manner. In agreement with recent data by others, high doses of CD95-agonists resulted in a complete block of T cell activation. In our hands, however, the same agonists used at low concentrations drastically augmented T cell proliferation. We confirmed the dose-dependency for a number of different CD95 agonists (i.e. various fusion proteins and monoclonal antibodies). CD95 costimulation was associated with non-apoptotic processing of caspase-3 and -8, enhanced MAPK activation and with higher levels of cell-cycle regulator proteins, anti-apoptotic proteins including p22-FLIP, cFLIP<sub>R/S</sub> and the NF- $\kappa$ B target gene Bcl-X. The alterations led to a massive proliferation of the whole population with a uniform upregulation of activation markers and the enhanced production of IL-2, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ . Moreover, the cells displayed increased apoptosis resistance.



To address the contribution of the intracellular region of CD95L in this context, we used mutated mice devoid of this domain (available through Martin Zörnig, Frankfurt). However, the initial experiments did not support the idea of a CD95L retrograde signaling capacity whereas the costimulatory potential of CD95 was also supported in this scenario.

In summary, we show that the CD95/CD95L system may direct the activation of primary human T lymphocytes. From our results, in conjunction with recent observations reported by others, one can hypothesize that the interaction of CD95 with low level CD95L (as for instance present on antigen presenting cells (APC)) augments primary T cell activation and expansion at the onset of an immune response. If activated APC upregulate CD95L, based on the threshold level, the same set of molecules will elicit the termination of the immune response by the induction of cell death in activated T cells and by inhibiting the activation of resting T cells. Concerning retrograde CD95L signaling and its impact on T cell function, further experiments and more detailed analyses of immune parameters are required using the different mutant mice that are meanwhile available.

## Literaturverzeichnis

- 1 Beverley, P. C., Daser, A., Michie, C. A., and Wallace, D. L. 1992. Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem.Soc.Trans.* 20:184-187.
- 2 Wan, Y. Y. and Flavell, R. A. 2009. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J.Mol.Cell Biol.* 1:20-36.
- 3 Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
- 4 Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., and Jordan, M. S. 2009. T cell activation. *Annu.Rev Immunol* 27:591-619.
- 5 Sharpe, A. H. 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229:5-11.
- 6 Nurieva, R. I., Chuvpilo, S., Wieder, E. D., Elkon, K. B., Locksley, R., Serfling, E., and Dong, C. 2007. A costimulation-initiated signaling pathway regulates NFATc1 transcription in T lymphocytes. *J.Immunol* 179:1096-1103.
- 7 Burmeister, Y., Lischke, T., Dahler, A. C., Mages, H. W., Lam, K. P., Coyle, A. J., Kroczeck, R. A., and Hutloff, A. 2008. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J.Immunol* 180:774-782.
- 8 Nurieva, R. I., Liu, X., and Dong, C. 2009. Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 229:88-100.
- 9 Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu.Rev.Immunol.* 23:23-68.
- 10 Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., and Cheng, G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:193-209.
- 11 Riley, J. L. 2009. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 229:114-125.
- 12 Tyson, J. J. and Novak, B. 2008. Temporal organization of the cell cycle. *Curr.Biol.* 18:R759-R768.
- 13 Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234.
- 14 Chang, J. T., Palanivel, V. R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A. M., Banerjee, A., Longworth, S. A., Vinup, K. E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J. S., Russell, S. M., Weninger, W., and Reiner, S. L. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315:1687-1691.
- 15 Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., and Swanson, P. E. 2009. Cell death. *N.Engl.J.Med.* 361:1570-1583.
- 16 Krueger, A., Fas, S. C., Baumann, S., and Krammer, P. H. 2003. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 193:58-69.
- 17 Kabelitz, D. and Janssen, O. 1997. Antigen-induced death of T-Lymphocytes. *Front Biosci.* 2:d61-d77.
- 18 Schutze, S. and Schneider-Brachert, W. 2009. Impact of TNF-R1 and CD95 Internalization on Apoptotic and Antiapoptotic Signaling. *Results Probl.Cell Differ.*
- 19 Guicciardi, M. E. and Gores, G. J. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23:1625-1637.
- 20 Schutze, S., Tchikov, V., and Schneider-Brachert, W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol.Cell Biol.* 9:655-662.
- 21 Green, D. R. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121:671-674.
- 22 Martinez-Caballero, S., Dejean, L. M., Kinnally, M. S., Oh, K. J., Mannella, C. A., and Kinnally, K. W. 2009. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J.Biol.Chem.* 284:12235-12245.
- 23 Krammer, P. H., Arnold, R., and Lavrik, I. N. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7:532-542.

- 24 Klas, C., Debatin, K. M., Jonker, R. R., and Krammer, P. H. 1993. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int.Immunol* 5:625-630.
- 25 O' Reilly, L. A., Tai, L., Lee, L., Kruse, E. A., Grabow, S., Fairlie, W. D., Haynes, N. M., Tarlinton, D. M., Zhang, J. G., Belz, G. T., Smyth, M. J., Bouillet, P., Robb, L., and Strasser, A. 2009. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 461:659-663.
- 26 Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T., and Nagata, S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76:969-976.
- 27 Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
- 28 Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., and Fischer, A. 2003. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death.Differ.* 10:124-133.
- 29 Brenner, D., Krammer, P. H., and Arnold, R. 2008. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol.Hematol.* 66:52-64.
- 30 Green, D. R. 2008. Fas Bim boom! *Immunity* 28:141-143.
- 31 Lettau, M., Paulsen, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. 2008. Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells. *Curr.Med.Chem.* 15:1684-1696.
- 32 Igney, F. H. and Krammer, P. H. 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc.Biol.* 71:907-920.
- 33 Sneller, M. C., Dale, J. K., and Straus, S. E. 2003. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr.Opin.Rheumatol.* 15:417-421.
- 34 Holzelova, E., Vonarbourg, C., Stolzenberg, M. C., Arkwright, P. D., Selz, F., Prieur, A. M., Blanche, S., Bartunkova, J., Vilmér, E., Fischer, A., Le Deist, F., and Rieux-Laucat, F. 2004. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N.Engl.J.Med.* 351:1409-1418.
- 35 Chun, H. J. and Lenardo, M. J. 2001. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: types I, II and beyond. *Adv.Exp.Med.Biol.* 490:49-57.
- 36 Chun, H. J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C. K., Siegel, R. M., Dale, J. K., Puck, J., Davis, J., Hall, C. G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T. P., Straus, S. E., and Lenardo, M. J. 2002. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419:395-399.
- 37 Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E., and Lenardo, M. J. 1999. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98:47-58.
- 38 Oliveira, J. B., Bidere, N., Niemela, J. E., Zheng, L., Sakai, K., Nix, C. P., Danner, R. L., Barb, J., Munson, P. J., Puck, J. M., Dale, J., Straus, S. E., Fleisher, T. A., and Lenardo, M. J. 2007. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:8953-8958.
- 39 Nagata, S. and Suda, T. 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16:39-43.
- 40 Karray, S., Kress, C., Cuvellier, S., Hue-Beauvais, C., Damotte, D., Babinet, C., and Levi-Strauss, M. 2004. Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J.Immunol.* 172:2118-2125.
- 41 Fukuyama, H., Adachi, M., Suematsu, S., Miwa, K., Suda, T., Yoshida, N., and Nagata, S. 1998. Transgenic expression of Fas in T cells blocks lymphoproliferation but not autoimmune disease in MRL-lpr mice. *J.Immunol* 160:3805-3811.
- 42 Wu, J., Zhou, T., Zhang, J., He, J., Gause, W. C., and Mountz, J. D. 1994. Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:2344-2348.

- 43 Senju, S., Negishi, I., Motoyama, N., Wang, F., Nakayama, K., Nakayama, K., Lucas, P. J., Hatakeyama, S., Zhang, Q., Yonehara, S., and Loh, D. Y. 1996. Functional significance of the Fas molecule in naive lymphocytes. *Int.Immunol* 8:423-431.
- 44 Shlomchik, M. J., Madaio, M. P., Ni, D., Trounstein, M., and Huszar, D. 1994. The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *J.Exp.Med.* 180:1295-1306.
- 45 Hao, Z., Hampel, B., Yagita, H., and Rajewsky, K. 2004. T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J.Exp.Med.* 199:1355-1365.
- 46 Hattori, K., Hirano, T., Miyajima, H., Yamakawa, N., Tateno, M., Oshimi, K., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. 1998. Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 91:4051-4055.
- 47 Kagi, D., Odermatt, B., Seiler, P., Zinkernagel, R. M., Mak, T. W., and Hengartner, H. 1997. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* 186:989-997.
- 48 Chervonsky, A. V., Wang, Y., Wong, F. S., Visintin, I., Flavell, R. A., Janeway, C. A., Jr., and Matis, L. A. 1997. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 89:17-24.
- 49 Pope, R. M. 2002. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2:527-535.
- 50 Kim, W. U., Kwok, S. K., Hong, K. H., Yoo, S. A., Kong, J. S., Choe, J., and Cho, C. S. 2007. Soluble Fas ligand inhibits angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 9:R42.
- 51 Hasunuma, T., Kayagaki, N., Asahara, H., Motokawa, S., Kobata, T., Yagita, H., Aono, H., Sumida, T., Okumura, K., and Nishioka, K. 1997. Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40:80-86.
- 52 Dockrell, D. H. 2003. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clin.Microbiol.Infect.* 9:766-779.
- 53 Strauss, G., Lindquist, J. A., Arhel, N., Felder, E., Karl, S., Haas, T. L., Fulda, S., Walczak, H., Kirchhoff, F., and Debatin, K. M. 2009. CD95 co-stimulation blocks activation of naive T cells by inhibiting T cell receptor signaling. *J.Exp.Med.* 206:1379-1393.
- 54 Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. C. 1995. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268:411-415.
- 55 Rochat-Steiner, V., Becker, K., Micheau, O., Schneider, P., Burns, K., and Tschopp, J. 2000. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J.Exp.Med.* 192:1165-1174.
- 56 Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. 1995. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81:513-523.
- 57 Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., and Baltimore, D. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89:1067-1076.
- 58 Lambert, C., Landau, A. M., and Desbarats, J. 2003. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis.* 8:551-562.
- 59 Strand, S., Vollmer, P., van den, A. L., Gottfried, D., Alla, V., Heid, H., Kuball, J., Theobald, M., Galle, P. R., and Strand, D. 2004. Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene* 23:3732-3736.
- 60 Midis, G. P., Shen, Y., and Owen-Schaub, L. B. 1996. Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer Res.* 56:3870-3874.
- 61 Peshes-Yaloz, N., Rosen, D., Sondel, P. M., Krammer, P. H., and Berke, G. 2007. Up-regulation of Fas (CD95) expression in tumour cells in vivo. *Immunology* 120:502-511.
- 62 Ivanov, V. N. and Ronai, Z. 2000. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene* 19:3003-3012.

- 63 Chan, H., Bartos, D. P., and Owen-Schaub, L. B. 1999. Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol. Cell Biol.* 19:2098-2108.
- 64 Zheng, Y., Ouaz, F., Bruzzo, P., Singh, V., Gerondakis, S., and Beg, A. A. 2001. NF-kappa B RelA (p65) is essential for TNF-alpha-induced fas expression but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J. Immunol* 166:4949-4957.
- 65 Ivanov, V. N., Bhoumik, A., Krasilnikov, M., Raz, R., Owen-Schaub, L. B., Levy, D., Horvath, C. M., and Ronai, Z. 2001. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol. Cell* 7:517-528.
- 66 Dorrie, J., Sapala, K., and Zunino, S. J. 2002. Interferon-gamma increases the expression of glycosylated CD95 in B-leukemic cells: an inducible model to study the role of glycosylation in CD95-signalling and trafficking. *Cytokine* 18:98-107.
- 67 Eberle, A., Reinehr, R., Becker, S., Keitel, V., and Haussinger, D. 2007. CD95 tyrosine phosphorylation is required for CD95 oligomerization. *Apoptosis*. 12:719-729.
- 68 Ivanov, V. N., Ronai, Z., and Hei, T. K. 2006. Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281:1840-1852.
- 69 Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., and Baltimore, D. 1998. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281:1860-1863.
- 70 Salomoni, P. and Khelifi, A. F. 2006. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol.* 16:97-104.
- 71 Chu, K., Niu, X., and Williams, L. T. 1995. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92:11894-11898.
- 72 Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C. F., Chang, H. M., and Yeh, E. T. 1996. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J. Immunol* 157:4277-4281.
- 73 Becker, K., Schneider, P., Hofmann, K., Mattmann, C., and Tschopp, J. 1997. Interaction of Fas(Apo-1/CD95) with proteins implicated in the ubiquitination pathway. *FEBS Lett.* 412:102-106.
- 74 Kretz-Remy, C. and Tanguay, R. M. 1999. SUMO/sentrin: protein modifiers regulating important cellular functions. *Biochem. Cell Biol.* 77:299-309.
- 75 Ryu, S. W., Chae, S. K., and Kim, E. 2000. Interaction of Daxx, a Fas binding protein, with sentrin and Ubc9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:6-10.
- 76 Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. 2003. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:53-66.
- 77 Strasser, A., Jost, P. J., and Nagata, S. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30:180-192.
- 78 Barnhart, B. C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G., and Peter, M. E. 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.* 23:3175-3185.
- 79 Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A. O., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Wiltrout, R. H., Zornig, M., and Lynch, D. H. 2007. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129:447-450.
- 80 Reich, A., Spering, C., and Schulz, J. B. 2008. Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity? *Trends Neurosci.* 31:478-486.
- 81 Desbarats, J., Birge, R. B., Mimouni-Rongy, M., Weinstein, D. E., Palerme, J. S., and Newell, M. K. 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol.* 5:118-125.
- 82 Tamm, C., Robertson, J. D., Sleeper, E., Enoksson, M., Emgard, M., Orrenius, S., and Ceccatelli, S. 2004. Differential regulation of the mitochondrial and death receptor pathways in neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 19:2613-2621.

- 83 Zuliani, C., Kleber, S., Klussmann, S., Wenger, T., Kenzelmann, M., Schreglmann, N., Martinez, A., del Rio, J. A., Soriano, E., Vodrazka, P., Kuner, R., Groene, H. J., Herr, I., Krammer, P. H., and Martin-Villalba, A. 2006. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death.Differ.* 13:31-40.
- 84 Ahn, J. H., Park, S. M., Cho, H. S., Lee, M. S., Yoon, J. B., Vilcek, J., and Lee, T. H. 2001. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J.Biol.Chem.* 276:47100-47106.
- 85 Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. 2000. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J.Exp.Med.* 192:1661-1668.
- 86 Desbarats, J. and Newell, M. K. 2000. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med.* 6:920-923.
- 87 Reinehr, R., Sommerfeld, A., and Haussinger, D. 2008. CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 134:1494-1506.
- 88 Tzung, S. P., Fausto, N., and Hockenbery, D. M. 1997. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am.J.Pathol.* 150:1985-1995.
- 89 Ben Moshe, T., Barash, H., Kang, T. B., Kim, J. C., Kovalenko, A., Gross, E., Schuchmann, M., Abramovitch, R., Galun, E., and Wallach, D. 2007. Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice. *Hepatology* 45:1014-1024.
- 90 Drappa, J., Brot, N., and Elkon, K. B. 1993. The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:10340-10344.
- 91 Boursalian, T. E. and Fink, P. J. 2003. Mutation in fas ligand impairs maturation of thymocytes bearing moderate affinity T cell receptors. *J.Exp.Med.* 198:349-360.
- 92 Alderson, M. R., Armitage, R. J., Maraskovsky, E., Tough, T. W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. 1993. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 178:2231-2235.
- 93 Maksimow, M., Soderstrom, T. S., Jalkanen, S., Eriksson, J. E., and Hanninen, A. 2006. Fas costimulation of naive CD4 T cells is controlled by NF-kappaB signaling and caspase activity. *J.Leukoc.Biol.* 79:369-377.
- 94 Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S., and Sekaly, R. P. 1999. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J.Exp.Med.* 190:1879-1890.
- 95 Falk, M., Ussat, S., Reiling, N., Wesch, D., Kabelitz, D., and Adam-Klages, S. 2004. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J.Immunol.* 173:5077-5085.
- 96 Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., and Tschopp, J. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr.Biol.* 10:640-648.
- 97 Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr.Opin.Immunol* 10:552-558.
- 98 Budd, R. C., Yeh, W. C., and Tschopp, J. 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 6:196-204.
- 99 Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 280:14507-14513.
- 100 Golks, A., Brenner, D., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. 2006. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J.Exp.Med.* 203:1295-1305.
- 101 Orlinick, J. R., Elkon, K. B., and Chao, M. V. 1997. Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *J.Biol.Chem.* 272:32221-32229.

- 102 Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci.* 27:19-26.
- 103 Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.
- 104 Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Maretzky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., de Strooper, B., Janssen, O., and Saffig, P. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death.Differ.* 14:1040-1049.
- 105 Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W. S., Martoglio, B., Hueber, A. O., and Zornig, M. 2007. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death.Differ.* 14:1678-1687.
- 106 Voss, M., Lettau, M., Paulsen, M., and Janssen, O. 2008. Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun.Signal.* 6:11.
- 107 Janssen, O., Qian, J., Linkermann, A., and Kabelitz, D. 2003. CD95 ligand - death factor and costimulatory molecule? *Cell Death.Differ.* 10:1215-1225.
- 108 Wenzel, J., Sanzenbacher, R., Ghadimi, M., Lewitzky, M., Zhou, Q., Kaplan, D. R., Kabelitz, D., Feller, S. M., and 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.
- 109 Ghadimi, M. P., Sanzenbacher, R., Thiede, B., Wenzel, J., Jing, Q., Plomann, M., Borkhardt, A., Kabelitz, D., and Janssen, O. 2002. Identification of interaction partners of the cytosolic polyproline region of CD95 ligand (CD178). *FEBS Lett.* 519:50-58.
- 110 Zuccato, E., Blott, E. J., Holt, O., Sigismund, S., Shaw, M., Bossi, G., and Griffiths, G. M. 2007. Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *J.Cell Sci.* 120:191-199.
- 111 Watts, A. D., Hunt, N. H., Wanigasekara, Y., Bloomfield, G., Wallach, D., Roufogalis, B. D., and 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.
- 112 Oberg, H. H., Lengel-Janssen, B., Kabelitz, D., and Janssen, O. 1997. Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. *Cell Immunol.* 181:93-100.
- 113 Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., and 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.
- 114 Blott, E. J. and Griffiths, G. M. 2002. Secretory lysosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3:122-131.
- 115 Schmidt, H., Gelhaus, C., Nebendahl, M., Lettau, M., Watzl, C., Kabelitz, D., Leippe, M., and Janssen, O. 2008. 2-D DIGE analyses of enriched secretory lysosomes reveal heterogeneous profiles of functionally relevant proteins in leukemic and activated human NK cells. *Proteomics.* 8:2911-2925.
- 116 Schmidt, H., Gelhaus, C., Lucius, R., Nebendahl, M., Leippe, M., and Janssen, O. 2009. Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC.Immunol* 10:41.
- 117 Bossi, G. and 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.
- 118 Lettau, M., Schmidt, H., Kabelitz, D., and Janssen, O. 2006. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol.Lett.* 108:10-19.
- 119 Li-Weber, M. and Krammer, P. H. 2003. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin.Immunol* 15:145-157.
- 120 Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., and 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.
- 121 Baum, W., Kirkin, V., Fernandez, S. B., Pick, R., Lettau, M., Janssen, O., and 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.

- 122 Qian, J., Chen, W., Lettau, M., Podda, G., Zornig, M., Kabelitz, D., and 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.
- 123 Lettau, M., Qian, J., Kabelitz, D., and Janssen, O. 2004. Activation-dependent FasL expression in T lymphocytes and Natural Killer cells. *Signal.Transduction.* 4:206-211.
- 124 Lettau, M., Qian, J., Linkermann, A., Latreille, M., Larose, L., Kabelitz, D., and 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.
- 125 Cahuzac, N., Baum, W., Kirkin, V., Conchonaud, F., Wawrezinieck, L., Marguet, D., Janssen, O., Zornig, M., and Hueber, A. O. 2006. Fas ligand is localized to membrane rafts, where it displays increased cell death-inducing activity. *Blood* 107:2384-2391.
- 126 Aspenstrom, P., Fransson, A., and Richnau, N. 2006. Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton. *Trends Biochem.Sci.*
- 127 Chitu, V. and Stanley, E. R. 2007. Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions. *Trends Cell Biol.* 17:145-156.
- 128 Linkermann, A., Gelhaus, C., Lettau, M., Qian, J., Kabelitz, D., and Janssen, O. 2009. Identification of interaction partners for individual SH3 domains of Fas ligand associated members of the PCH protein family in T lymphocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1794:168-176.
- 129 Higuchi, M., Nagasawa, K., Horiuchi, T., Oike, M., Ito, Y., Yasukawa, M., and 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.
- 130 Sun, M. and Fink, P. J. 2007. A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. *J.Immunol.* 179:4307-4312.
- 131 Suzuki, I. and Fink, P. J. 1998. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp.Med.* 187:123-128.
- 132 Suzuki, I. and Fink, P. J. 2000. The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8+ and CD4+ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:1707-1712.
- 133 Suzuki, I., Martin, S., Boursalian, T. E., Beers, C., and Fink, P. J. 2000. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 165:5537-5543.
- 134 Desbarats, J., Duke, R. C., and Newell, M. K. 1998. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells. *Nat.Med.* 4:1377-1382.
- 135 Sun, M., Ames, K. T., Suzuki, I., and Fink, P. J. 2006. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J.Immunol.* 177:1481-1491.
- 136 Sun, M., Lee, S., Karray, S., Levi-Strauss, M., Ames, K. T., and Fink, P. J. 2007. Cutting edge: two distinct motifs within the Fas ligand tail regulate Fas ligand-mediated costimulation. *J.Immunol.* 179:5639-5643.
- 137 Oh-hora, M. and Rao, A. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol* 20:250-258.
- 138 van der Merwe, P. A. 2001. The TCR triggering puzzle. *Immunity* 14:665-668.
- 139 Holler, N., Tardivel, A., Kovacovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., and Tschopp, J. 2003. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol.Cell Biol.* 23:1428-1440.
- 140 Wyzgol, A., Muller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G. U., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. 2009. Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J.Immunol* 183:1851-1861.
- 141 Watermann, I., Gerspach, J., Lehne, M., Seufert, J., Schneider, B., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. 2007. Activation of CD95L fusion protein prodrugs by tumor-associated proteases. *Cell Death.Differ.* 14:765-774.



- 142 Paulsen, M., Mathew, B., Qian, J., Lettau, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. 2009. FasL cross-linking inhibits activation of human peripheral T cells. *Int.Immunol* 21:587-598.
- 143 Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J., and Budd, R. C. 1999. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J.Exp.Med.* 190:1891-1896.
- 144 Maksimow, M., Santanen, M., Jalkanen, S., and Hanninen, A. 2003. Responding naive T cells differ in their sensitivity to Fas engagement: early death of many T cells is compensated by costimulation of surviving T cells. *Blood* 101:4022-4028.
- 145 O'Reilly, L. A., Divisekera, U., Newton, K., Scalzo, K., Kataoka, T., Puthalakath, H., Ito, M., Huang, D. C., and Strasser, A. 2004. Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ.*
- 146 Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G., and Strasser, A. 1998. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 17:706-718.
- 147 Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. 1998. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392:296-300.
- 148 Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., and Alber, T. 1993. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262:1401-1407.
- 149 Fanslow, W. C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M. G., Spriggs, M. K., and Armitage, R. J. 1994. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin.Immunol* 6:267-278.
- 150 Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Rauch, C. T. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16:5386-5397.
- 151 Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T., and Nagata, S. 1994. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int.Immunol* 6:1567-1574.
- 152 Barnhart, B. C., Alappat, E. C., and Peter, M. E. 2003. The CD95 type I/type II model. *Semin.Immunol* 15:185-193.
- 153 Lu, Y., Phillips, C. A., and Trevillyan, J. M. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is not essential for CD28 costimulatory activity in Jurkat T cells: studies with a selective inhibitor, wortmannin. *Eur.J.Immunol* 25:533-537.
- 154 Pages, F., Ragueneau, M., Rottapel, R., Truneh, A., Nunes, J., Imbert, J., and Olive, D. 1994. Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* 369:327-329.
- 155 Crooks, M. E., Littman, D. R., Carter, R. H., Fearon, D. T., Weiss, A., and Stein, P. H. 1995. CD28-mediated costimulation in the absence of phosphatidylinositol 3-kinase association and activation. *Mol.Cell Biol.* 15:6820-6828.
- 156 Harada, Y., Tanabe, E., Watanabe, R., Weiss, B. D., Matsumoto, A., Ariga, H., Koizumi, O., Fukui, Y., Kubo, M., June, C. H., and Abe, R. 2001. Novel role of phosphatidylinositol 3-kinase in CD28-mediated costimulation. *J.Biol.Chem.* 276:9003-9008.
- 157 Schrum, A. G., Wells, A. D., and Turka, L. A. 2000. Enhanced surface TCR replenishment mediated by CD28 leads to greater TCR engagement during primary stimulation. *Int.Immunol* 12:833-842.
- 158 Lücknerath, K., Kirkin, V., and Zörnig, M. Analysis of knockout/knockin mice that express a mutant FasL lacking the intracellular domain. 20098 *Cell Communication and Signaling.* 7:A82.
- 159 Baum W.2004. Die Rolle der intrazellulären Domäne des CD95 Liganden bei der reversen Signalübertragung. Dissertation.
- 160 Strauss, G., Osen, W., Knape, I., Jacobsen, E. M., Müller, S. M., and Debatin, K. M. 2007. Membrane-bound CD95 ligand expressed on human antigen-presenting cells prevents alloantigen-specific T cell response without impairment of viral and third-party T cell immunity. *Cell Death.Differ.* 14:480-488.
- 161 Lettau, M. 2007. Regulation der Expression und Freisetzung des Fas-Liganden. Dissertation.

- 162 Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M. K., Rampersad, V., Hardy, L. A., Field, D., and Siminovitch, K. A. 2003. 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.
- 163 Yang, H. and Reinherz, E. L. 2006. CD2BP1 modulates CD2-dependent T cell activation via linkage to protein tyrosine phosphatase (PTP)-PEST. *J.Immunol.* 176:5898-5907.
- 164 Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-305.
- 165 Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 169:1747-1756.
- 166 Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 181:71-77.
- 167 Mixter, P. F., Russell, J. Q., and Budd, R. C. 1994. Delayed kinetics of T lymphocyte anergy and deletion in lpr mice. *J.Autoimmun.* 7:697-710.
- 168 Adachi, M., Suematsu, S., Suda, T., Watanabe, D., Fukuyama, H., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., and Nagata, S. 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2131-2136.
- 169 Singer, G. G. and Abbas, A. K. 1994. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity*. 1:365-371.
- 170 Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., el Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z., and Marshak-Rothstein, A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature* 373:444-448.
- 171 Chen, M., Wang, Y. H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y. J., and Wang, J. 2006. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311:1160-1164.
- 172 Carlile, G., Smith, D. H., and Wiedmann, M. 2009. A non-apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis. *FEBS Lett.*
- 173 Chen, A., Zheng, G., and Tykocinski, M. L. 2003. Quantitative interplay between activating and pro-apoptotic signals dictates T cell responses. *Cell Immunol* 221:128-137.
- 174 Aggarwal, S. and Gupta, S. 1998. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J.Immunol* 160:1627-1637.
- 175 Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R., Tsuji, T., Yachie, A., Yonehara, S., and Taniguchi, N. 1992. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J.Immunol* 149:3753-3758.
- 176 Desbarats, J., Wade, T., Wade, W. F., and Newell, M. K. 1999. Dichotomy between naive and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:8104-8109.
- 177 Sanders, M. E., Makgoba, M. W., and Shaw, S. 1988. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* 9:195-199.
- 178 Lahdenpohja, N. and Hurme, M. 1998. CD28-mediated activation in CD45RA+ and CD45RO+ T cells: enhanced levels of reactive oxygen intermediates and c-Rel nuclear translocation in CD45RA+ cells. *J.Leukoc.Biol.* 63:775-780.
- 179 Altin, J. G. and Sloan, E. K. 1997. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* 75:430-445.
- 180 Robinson, A. T., Miller, N., and Alexander, D. R. 1993. CD3 antigen-mediated calcium signals and protein kinase C activation are higher in CD45RO+ than in CD45RA+ human T lymphocyte subsets. *Eur.J.Immunol* 23:61-68.
- 181 Patel, H. R., Renz, H., Terada, N., and Gelfand, E. W. 1994. Differential activation of p21ras in CD45RA+ and CD45RO+ human T lymphocytes. *J.Immunol* 152:2830-2836.

- 182 Pinto, L., Covas, M. J., and Victorino, R. M. 1991. Loss of CD45RA and gain of CD45RO after in vitro activation of lymphocytes from HIV-infected patients. *Immunology* 73:147-150.
- 183 Summers, K. L., O'Donnell, J. L., and Hart, D. N. 1994. Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. *Clin.Exp.Immunol* 97:39-44.
- 184 Crockard, A. D., Treacy, M. T., Droogan, A. G., and Hawkins, S. A. 1996. CD4 subsets (CD45RA/RO) exhibit differences in proliferative responses, IL-2 and gamma-interferon production during intravenous methylprednisolone treatment of multiple sclerosis. *J.Neurol.* 243:475-481.
- 185 Mahalingam, M., Pozniak, A., McManus, T. J., Senaldi, G., Vergani, D., and Peakman, M. 1996. Abnormalities of CD45 isoform expression in HIV infection. *Clin.Immunol Immunopathol.* 81:210-214.
- 186 Falcao, R. P. and Garcia, A. B. 1993. Expression of CD45RA (naive) and CD45RO (memory) antigens in T-acute lymphoblastic leukaemia. *Br.J.Haematol.* 85:483-486.
- 187 Gupta, S. and Gollapudi, S. 2007. Susceptibility of naive and subsets of memory T cells to apoptosis via multiple signaling pathways. *Autoimmun.Rev* 6:476-481.
- 188 Cruz, A. C., Ramaswamy, M., and Siegel, R. M. 2009. Human CD4+ memory T cells are pre-sensitized to Fas-mediated apoptosis due to increased receptor localization to lipid raft microdomains. *J. Immunol* 182.
- 189 Legembre, P., Barnhart, B. C., Zheng, L., Vijayan, S., Straus, S. E., Puck, J., Dale, J. K., Lenardo, M., and Peter, M. E. 2004. Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep.* 5:1084-1089.
- 190 Lavrik, I. N., Golks, A., Riess, D., Bentele, M., Eils, R., and Krammer, P. H. 2007. Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling. *J.Biol.Chem.* 282:13664-13671.
- 191 Shinohara, H., Yagita, H., Ikawa, Y., and Oyaizu, N. 2000. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 60:1766-1772.
- 192 Kleber, S., Sancho-Martinez, I., Wiestler, B., Beisel, A., Gieffers, C., Hill, O., Thiemann, M., Mueller, W., Sykora, J., Kuhn, A., Schreglmann, N., Letellier, E., Zuliani, C., Klussmann, S., Teodorczyk, M., Grone, H. J., Ganten, T. M., Sultmann, H., Tuppenberg, J., von Deimling, A., Regnier-Vigouroux, A., Herold-Mende, C., and Martin-Villalba, A. 2008. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 13:235-248.
- 193 Gulbins, E., Brenner, B., Koppenhoefer, U., Linderkamp, O., and Lang, F. 1998. Fas or ceramide induce apoptosis by Ras-regulated phosphoinositide-3-kinase activation. *J.Leukoc.Biol.* 63:253-263.
- 194 Viola, A. and Lanzavecchia, A. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104-106.
- 195 Blichfeldt, E., Munthe, L. A., Rotnes, J. S., and Bogen, B. 1996. Dual T cell receptor T cells have a decreased sensitivity to physiological ligands due to reduced density of each T cell receptor. *Eur.J.Immunol* 26:2876-2884.
- 196 Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.
- 197 von Essen, M., Bonefeld, C. M., Siersma, V., Rasmussen, A. B., Lauritsen, J. P., Nielsen, B. L., and Geisler, C. 2004. Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J.Immunol* 173:384-393.
- 198 Valitutti, S., Muller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A. 1997. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J.Exp.Med.* 185:1859-1864.
- 199 Utny, C., Coombs, D., Muller, S., and Valitutti, S. 2006. Analysis of peptide/MHC-induced TCR downregulation: deciphering the triggering kinetics. *Cell Biochem.Biophys.* 46:101-111.
- 200 Luton, F., Legendre, V., Gorvel, J. P., Schmitt-Verhulst, A. M., and Boyer, C. 1997. Tyrosine and serine protein kinase activities associated with ligand-induced internalized TCR/CD3 complexes. *J.Immunol* 158:3140-3147.
- 201 Ghittoni, R., Patrussi, L., Pirozzi, K., Pellegrini, M., Lazzarini, P. E., Capocchi, P. L., Pasini, F. L., and Baldari, C. T. 2005. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. *FASEB J.* 19:605-607.

- 202 Crotzer, V. L., Mabardy, A. S., Weiss, A., and Brodsky, F. M. 2004. T cell receptor engagement leads to phosphorylation of clathrin heavy chain during receptor internalization. *J.Exp.Med.* 199:981-991.
- 203 Chakrabandhu, K., Huault, S., Garmy, N., Fantini, J., Stebe, E., Mailfert, S., Marguet, D., and Hueber, A. O. 2008. The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. *Cell Death.Differ.* 15:1824-1837.
- 204 Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.
- 205 Kumar, S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death.Differ.* 14:32-43.
- 206 Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death.Differ.* 14:44-55.
- 207 Carlile, G. W., Smith, D. H., and Wiedmann, M. 2004. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* 103:4310-4316.
- 208 Murray, T. V., McMahon, J. M., Howley, B. A., Stanley, A., Ritter, T., Mohr, A., Zwacka, R., and Fearnhead, H. O. 2008. A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *J.Cell Sci.* 121:3786-3793.
- 209 Gulyaeva, N. V. 2003. Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue. *Biochemistry (Mosc.)* 68:1171-1180.
- 210 Yan, X. X., Najbauer, J., Woo, C. C., Dashtipour, K., Ribak, C. E., and Leon, M. 2001. Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J.Comp Neurol.* 433:4-22.
- 211 Maelfait, J. and Beyaert, R. 2008. Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochem.Pharmacol.* 76:1365-1373.
- 212 Kang, T. B., Ben Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogeve, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., Ramakrishnan, P., Lapidot, T., and Wallach, D. 2004. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J.Immunol* 173:2976-2984.
- 213 Newton, K. and Strasser, A. 2003. Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes Dev.* 17:819-825.
- 214 Paulsen, M., Ussat, S., Jakob, M., Scherer, G., Lepenies, I., Schutze, S., Kabelitz, D., and Adam-Klages, S. 2008. Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes. *Eur.J.Immunol* 38:1979-1987.
- 215 Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J.Biol.Chem.* 274:22532-22538.
- 216 Thome, M. 2004. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol* 4:348-359.
- 217 Park, S. M., Schickel, R., and Peter, M. E. 2005. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17:610-616.
- 218 Mora, A. L., Corn, R. A., Stanic, A. K., Goenka, S., Aronica, M., Stanley, S., Ballard, D. W., Joyce, S., and Boothby, M. 2003. Antiapoptotic function of NF-kappaB in T lymphocytes is influenced by their differentiation status: roles of Fas, c-FLIP, and Bcl-xL. *Cell Death.Differ.* 10:1032-1044.
- 219 Verbrugge, I., de Vries, E., Tait, S. W., Wissink, E. H., Walczak, H., Verheij, M., and Borst, J. 2008. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing bypass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 27:574-584.
- 220 Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. 1999. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59:2083-2090.
- 221 Lyu, S. Y., Choi, S. H., and Park, W. B. 2002. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch.Pharm.Res.* 25:93-101.

- 222 Khil, L. Y., Kim, W., Lyu, S., Park, W. B., Yoon, J. W., and Jun, H. S. 2007. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J.Gastroenterol.* 13:2811-2818.
- 223 Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., and Cory, S. 1994. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79:329-339.
- 224 Bouillet, P. and O'Reilly, L. A. 2009. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 9:514-519.
- 225 Zhang, H. G., Liu, D., Heike, Y., Yang, P., Wang, Z., Wang, X., Curiel, D. T., Zhou, T., and Mountz, J. D. 1998. Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen presenting cells. *Nat Biotechnol.* 16:1045-1049.
- 226 Cancedda, C., LeMaoult, J., Harris, P. E., Suciú-Foca, N., and Cortesini, R. 2001. Specific T-cell deletion by transfected human monocytes expressing Fas ligand and antigen. *Transplant.Proc.* 33:165-166.
- 227 Min, W., Huang, X., Gorczynski, R., and Catral, M. 2001. Fas ligand-transfected dendritic cells induce apoptosis of antigen-specific T cells. *Transplant.Proc.* 33:234.
- 228 Min, W. P., Gorczynski, R., Huang, X. Y., Kushida, M., Kim, P., Obataki, M., Lei, J., Suri, R. M., and Catral, M. S. 2000. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J.Immunol* 164:161-167.
- 229 Zhang, H. G., Su, X., Liu, D., Liu, W., Yang, P., Wang, Z., Edwards, C. K., Bluethmann, H., Mountz, J. D., and Zhou, T. 1999. Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells. *J.Immunol* 162:1423-1430.
- 230 Kusuhara, M. and Matsue, H. 2005. Limitations of CD95 ligand-transduced killer dendritic cells to prevent graft rejections. *Exp.Dermatol.* 14:273-280.
- 231 Monari, C., Pericolini, E., Bistoni, G., Casadevall, A., Kozel, T. R., and Vecchiarelli, A. 2005. Cryptococcus neoformans capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *J.Immunol* 174:3461-3468.
- 232 Hoves, S., Krause, S. W., Herfarth, H., Halbritter, D., Zhang, H. G., Mountz, J. D., Scholmerich, J., and Fleck, M. 2004. Elimination of activated but not resting primary human CD4+ and CD8+ T cells by Fas ligand (FasL/CD95L)-expressing Killer-dendritic cells. *Immunobiology* 208:463-475.
- 233 Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H. R., and Tschopp, J. 1996. Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur.J.Immunol* 26:721-724.
- 234 Suss, G. and Shortman, K. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* 183:1789-1796.
- 235 Lu, L., Qian, S., Hershberger, P. A., Rudert, W. A., Lynch, D. H., and Thomson, A. W. 1997. Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J.Immunol* 158:5676-5684.
- 236 De Panfilis, G., Venturini, M., Lavazza, A., Mommaas, M. A., Semenza, D., Torresani, C., and Pasolini, G. 2003. The tolerogenic molecule CD95-L is expressed on the plasma membrane of human activated, but not resting, Langerhans' cells. *Exp.Dermatol.* 12:692-699.
- 237 Badley, A. D., McElhinny, J. A., Leibson, P. J., Lynch, D. H., Alderson, M. R., and Paya, C. V. 1996. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J.Virol.* 70:199-206.
- 238 Zauli, G., Gibellini, D., Secchiero, P., Dutartre, H., Olive, D., Capitani, S., and Collette, Y. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood* 93:1000-1010.
- 239 Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375:497-500.
- 240 Sieg, S., Smith, D., Yildirim, Z., and Kaplan, D. 1997. Fas ligand deficiency in HIV disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:5860-5865.

- 241 Raftery, M. J., Schwab, M., Eibert, S. M., Samstag, Y., Walczak, H., and Schonrich, G. 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* 15:997-1009.
- 242 Tanner, J. E. and Alfieri, C. 1999. Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood* 94:3439-3447.
- 243 Hoves, S., Niller, H. H., Krause, S. W., Straub, R., Gluck, T., Mountz, J. D., Scholmerich, J., and Fleck, M. 2001. Decreased T cell stimulatory capacity of monocyte-derived human macrophages following herpes simplex virus type 1 infection. *Scand.J.Immunol* 54:93-99.
- 244 Puliaeva, I., Puliaev, R., Shustov, A., Haas, M., and Via, C. S. 2008. Fas expression on antigen-specific T cells has costimulatory, helper, and down-regulatory functions in vivo for cytotoxic T cell responses but not for T cell-dependent B cell responses. *J.Immunol* 181:5912-5929.
- 245 Mabrouk, I., Buart, S., Hasmim, M., Michiels, C., Connault, E., Opolon, P., Chiocchia, G., Levi-Strauss, M., Chouaib, S., and Karray, S. 2008. Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells. *Immunity* 29:922-933.

## 10. Anhang

### Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die mir am Institut für Immunologie geboten wurden, habe ich sehr geschätzt.

Herrn Professor Dr. Ottmar Janssen möchte ich herzlichst für die Bereitstellung und Überlassung des interessanten und spannenden Themas dieser Arbeit und das Korrekturlesen danken. Seine permanente Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit und das dabei entgegengebrachte Vertrauen haben mich in vielerlei Hinsicht gefördert und geprägt und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dank seiner engagierten Betreuung wurde mir die Möglichkeit gegeben meine wissenschaftlichen Daten auf Kongressen einem Fachpublikum zu präsentieren und zu diskutieren.

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Professor Dr. Stefan Rose-John für die freundliche Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Herrn Professor Dr. Dr. Thomas Bosch gebührt mein Dank für die Übernahme des Korreferates und die damit verbundenen Mühen.

Ein ganz großes Dankeschön an Signe Valentin für die stete gute Hilfe im Labor und für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit. Auch Marcus, Hendrik, Alyn und Melanie aus der AG Janssen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Vermittlung eines netten Arbeitsklimas. Meinen Doktorandenkollegen Lothar, Tim, Jule, Pit, Pumpi, Bärbel, Mario und Anja möchte ich für die Hilfsbereitschaft bei alltäglichen Problemen, die lehrreichen und unterhaltsamen Diskussionen und die hervorragende Kollegialität danken. Marcus, Hendrik, Jule und Tim danke ich zusätzlich besonders für das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit, die Diskussionsbereitschaften und ihre Hilfe beim Kampf mit dem PC.

Ferner danke ich Dr. Martin Zörnig für die Überlassung der CD95L $\Delta$ intra k.o./k.i-Mäuse. Bei Professor Dr. Peter H. Krammer und Dr. Inna Lavrik bedanke ich mich dafür, dass mir Antikörper und der Leucin-Zipper zur Verfügung gestellt wurden. Auch ein Dankeschön an Uwe Bertsch für das CD95L-ST-Fc-Konstrukt.

Für das Ertragen meiner Launen und Tiefpunkte während der minder erfolgreichen Phase meiner Forschungsarbeit sowie der Schreib- und Lernphase, für alle aufmunternden Worte, die freundschaftliche Aufnahme und die Hilfestellungen jeglicher Art danke ich von Herzen allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie, einschließlich jener der hier nicht Genannten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre weit über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung und Förderung. Sie haben mich auf meinem Weg bestärkt, mir so jederzeit Sicherheit gegeben und immer an mich geglaubt.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Markus von Herzen für die mentale Unterstützung und das geduldige Zuhören bei ganz kleinen und riesengroßen Problemen danken. Danke für die vielen Ratschläge und die Bestärkung darin, dass ich das schaffen werde!

## Curriculum vitae

**Maren Paulsen**  
Diplom-Biochemikerin  
Alte Landstr. 22, D-24354 Kosel

### ZUR PERSON

---

<b>Geburtsdatum:</b>	31.08.1977	<b>Geburtsort:</b>	Kiel
<b>Familienstand:</b>	ledig	<b>Staatsangehörigkeit:</b>	deutsch

### PROMOTION

---

**Seit 05/2006**      **Doktorandin/Wissenschaftliche Angestellte am UK-SH Kiel**  
*Die Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Aktivierung primärer humaner T Lymphozyten*  
Institut für Immunologie, AG Prof. Janßen, UK-SH Campus Kiel

### AUSLANDSAUFENTHALTE

---

**2/2006**              **Forschungspraktikum in den USA**  
University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA

**10/2005 – 12/2005**      **Englischkurs an einer internationalen Sprachschule**  
Aspect Internationale Sprachschule GmbH, Boston, USA

### HOCHSCHULSTUDIUM

---

**8/2005**              **Studienabschluss : Diplom-Biochemikerin**

**11/2004 – 8/2005**      **Diplomarbeit:**  
*Lokalisation aktiver Caspasen in humanen proliferierenden T-Zellen*  
Institut für Immunologie, AG Prof. S. Adam, UK S-H Campus Kiel

**10/2000 – 8/2005**      **Studium der Biochemie und Molekularbiologie**  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### BERUFSAUSBILDUNG

---

**9/2000**              **Ausbildungsabschluss zur staatlich geprüften  
Medizinisch technischen Laboratoriumsassistentin (MTA)**

**9/1997 – 9/2000**      **Schulische Ausbildung zur MTA**  
Institut für Hygiene und Umweltmedizin  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### SCHULBILDUNG

---

**6/1997**              **Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife**

**1990 – 1997**              **Gymnasium**  
“Duborg-Skolen”, Flensburg



**PUBLIKATIONSLISTE**

---

**Originalarbeiten**

**Lüschen S., Falk M., Scherer G., Ussat S., Paulsen M., and Adam-Klages S.**  
*The FADD/ Caspase-8/ c-FLIP Signaling Pathway is Involved in TNF-Induced Activation of Erk.*  
**Exp Cell Res. 2005 Oct 15; 310(1):33-42**

**Paulsen M., Ussat S., Jakob M., Scherer G., Lepenies I., Schütze A., Kabelitz D., Adam-Klages S.**  
*Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes.*  
**Eur J Immunol. 2008 Jul;38(7):1979-87.**

**Paulsen M., Mathew B., Qian J., Lettau M., Kabelitz D. and Janssen O.**  
*FasL crosslinking inhibits activation of human peripheral T cells*  
**Int Immunol. 2009, May;21(5):587-98.**

**Paulsen M., Mathew B., Valentin S., Adam-Klages S., Bertsch U., Lavrik I., Krammer P.H., Kabelitz D., and Janssen O.**  
*Dose-dependent modulation of T cell activation by CD95 co-stimulation*  
**eingereicht (Cell Death Differ. 2009, Nov.)**

**Übersichtsartikel**

**Falk M., Paulsen M. and Adam-Klages S.**  
*Caspases and proliferation.*  
**Signal Transduction 2005; 6, 350-355 (review)**

**Lettau M., Paulsen M., Kabelitz D., and Janssen O.**  
*Storage, expression and function of fas ligand, the key death factor of immune cells.*  
**Curr Med Chem. 2008;15(17):1684-96 (review)**

**Lettau M.\*, Paulsen M.\*, Kabelitz D. and Janssen O.**  
*FasL expression and reverse signalling*  
**Kalthoff H (Ed.) Death factor signalling, 2009, Springer Press (Buchbeitrag)**  
\* gleichberechtigte Erstautoren

**Voss M., Lettau M., Paulsen M. and Janssen O.**  
*Posttranslational regulation of Fas ligand function*  
**Cell Communication and Signaling 2008, 6:11 (review)**

**Veröffentlichte Tagungsbeiträge**

**Paulsen M. and Adam-Klages S.**  
*Localization of active caspases during T-cell proliferation*  
**Immunobiology 2005 Sep 15; 210(6-8):361-638 (abstract)**

**Lüschen S., Falk M., Scherer G., Ussat S., Paulsen M., and Adam-Klages S.**  
*The FADD/ Caspase-8/ c-FLIP Signaling Pathway is Involved in TNF-Induced Activation of Erk.*  
**Immunobiology 2005 Sep 15; 210(6-8):361-638 (abstract)**

**Paulsen M., Mathew B., Qian J., Beyer A., Naumann U., Schmidt H. and Janssen O.**  
*The role of FasL and Fas in primary T cell activation*  
**Signal Transduction 2006 (abstract)**

**Paulsen M., Mathew B., Naumann U. and Janssen O.**  
*FasL and Fas: Inhibition and costimulation during primary T cell activation*  
**Signal Transduction 2007 (abstract)**

**Paulsen M., Valentin S. and Janssen O.**  
*T cell activation controlled by the Fas/FasL-system*  
**Wiener klinische Wochenschrift 2008 ; 120, Heft 15-16 : 86 (abstract)**

**Paulsen M., Valentin S. and Janssen O.**  
*Reverse signaling by FasL inhibits primary human T cell activation*  
**Signal Transduction 2008 (abstract)**

**Paulsen M., Valentin S. and Janssen O.**  
*CD95 as a negative or positive costimulatory receptor for primary human T cell activation*  
**Signal Transduction 2008 (abstract)**

**Paulsen M., Valentin S. and Janssen O.**  
*FasL crosslinking inhibits activation of human peripheral T cells*  
**Eur J Immunol. 2009 Sep;39 No S1: 156. (abstract)**

**Paulsen M., Valentin S., Bertsch U., Krammer P.H., Lavrik I. and Janssen O.**  
*Dose-dependent modulation of CD4 T cell responses by Fas costimulation*  
**Eur J Immunol. 2009 Sep;39 No S1: 175. (abstract)**

---

## VORTRÄGE

**29. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen**  
*FasL and Fas in primary T cell activation*  
**Nov. 17, 2006, Borstel, Deutschland**

**30. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen**  
*FasL and Fas: Inhibition and costimulation during primary T cell activation*  
**Nov. 16, 2007, Borstel, Deutschland**

**4<sup>th</sup> Spring School on Immunology**  
*A role of Fas and FasL in primary activation of human T cells*  
**March 2-7, 2008, Ettal, Deutschland**

**12<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS)**  
*Reverse signalling by FasL inhibits primary human T cell activation*  
**Oct. 29-31, 2008, Weimar, Deutschland**

---

## PREISE

**R&D AWARD for the Best Presentation**  
*FasL and Fas: Inhibition and costimulation during primary T cell activation*  
**Nov. 16, 2007, Borstel, Deutschland**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 12. Mai 2009, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Ottmar Janssen selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die Abhandlung ist nach Form und Inhalt, abgesehen von der Beratung durch Prof. Janssen, die eigene Arbeit.

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 der Deutschen Forschungsgemeinschaft.. Auszüge der Dissertation wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. eingereicht.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Kiel noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Kiel, den

---

Maren Paulsen