

**Die Rolle der intrazellulären
Domäne des CD95 Liganden bei der
reversen Signalübertragung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Wiebke Baum
aus Marburg

Frankfurt im März 2004
(DF1)

vom Fachbereich 14 (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Schwalbe

Betreuer der Arbeit: Dr. M. Zörnig

Gutachter: Prof. Dr. R. Tampé und Prof. Dr. B. Groner

Datum der Disputation:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1 Apoptose	1
1.1.1 Apoptose im Modellorganismus <i>C.elegans</i>	1
1.1.2 Caspasen als ausführende Enzyme der apoptotischen Maschinerie.....	3
1.1.3 Die Bcl-2 Familie.....	5
1.1.4 Signalwege der Apoptose.....	6
1.2 Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie.....	9
1.2.1 Die Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie.....	10
1.2.2 Die Todesrezeptor vermittelte Apoptose am Beispiel des CD95-Rezeptors	11
1.2.3 Apoptoseunabhängige Funktionen der Todesrezeptoren.....	12
1.2.4 Die reverse Signalübertragung durch TNF-Liganden („Reverse signalling“)	14
1.3 T-Zellrezeptor-Aktivierung und Co-Stimulation	15
1.3.1 Apoptose im Immunsystem.....	19
1.4 Der CD95 Ligand.....	21
1.4.1 Die Bedeutung des CD95L im Immunsystem und für bestimmte Krankheitsbilder.....	25
1.4.2 Die Kontrolle der CD95L-Expression.....	27
1.4.3 Die Lokalisation des CD95 Liganden.....	28
1.4.4 „Reverse signalling“ über den CD95 Liganden.....	29
1.5 Ziel der Arbeit.....	31
2. Material und Methoden	32
Geräte.....	32
Chemikalien und Materialien.....	33
Häufig verwendete Lösungen.....	35

Medien.....	39
Bakterienstämme/ Hefestamm.....	40
Enzyme.....	41
Vektoren.....	41
Plasmidkarten.....	43
Oligonukleotid-Primer.....	46
Zellkultur.....	47
Methoden.....	48
2.1 Kultivierung von Bakterien.....	48
2.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	48
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	49
2.2.1. Transformation von chemokompetenten E. coli (DH5 α).....	49
2.2.2. Transformation von elektrokompenten E.coli (KC8 + DH5 α).....	49
2.2.3. Berechnung der Transformationseffizienz.....	49
2.2.4. Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse in kleinem Maßstab.....	50
2.2.5. Quantitative Plasmidisolierung in größerem Maßstab.....	50
2.2.6. Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion.....	50
2.2.7. Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	51
2.2.8. Analyse von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese.....	51
2.2.9. Elution der DNA aus dem Agarosegel.....	52
2.2.10. Restriktionsverdau	52
2.2.11. Dephosphorylierung von 5´Enden.....	52
2.2.12. Ligation von DNA-Fragmenten.....	52
2.2.13. PCR (Polymerase Chain Reaktion).....	53
2.2.14. RT-(Reverse Transkription)-PCR.....	54
2.2.15. Sequenz-Analyse	54
2.3 Das Hefe-2-Hybrid-System.....	54
2.3.1. "small scale"-Transformation von Hefe	55
2.3.2. Transformation der cDNA-Bibliothek ("Screen").....	55
2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S.cerevisiae</i>	56

2.3.4. Re-transformation	57
2.3.5 β -Galaktosidase-Filterassay	57
2.4 Proteinbiochemische Methoden	57
2.4.1. Herstellung von Hefe-Proteinextrakten	57
2.4.2. Proteinextraktion aus Säugerzellen	58
2.4.3. Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	58
2.4.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	59
2.4.5. Protein Transfer auf Nylon-Membranen ("Western Blot")	59
2.4.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen	60
2.4.7. Detektion von Proteinen mit dem ECL-Verfahren: Lumineszenz-Assay	63
2.4.8. <i>in vitro</i> Transkription und Translation (IVT)	63
2.4.9. Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	63
2.4.10. GST-Pulldown-Assay	64
2.4.11. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	65
2.4.12. Analyse der PSTPIP-Tyrosinphosphorylierung	65
2.5 Zellbiologische Methoden	66
2.5.1. Kultivierung von Zellen	66
2.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	66
2.5.3. Transfektion von Zellen	66
2.5.4. Immunfluoreszenzanalyse	68
2.6 FACS („fluorescence activated cell sorter“)-Messungen	69
2.6.1. Färbung von Oberflächenmarkern	68
2.6.2. Zellzyklusanalyse	69
2.6.3. CFSE-Färbung	70
2.6.4. Co-Kultivierung von adhärennten und Suspensionszellen zur Induktion von CD95-vermittelter Apoptose	70
2.6.5. Detektion phosphorylierter MAP-Kinasen (p42/p44)	70
2.6.6. Behandlung von 293T Zellen mit Cholesterol-depletierenden Substanzen	71
2.7 Aufreinigung primärer Maus-T-Zellen	71

2.7.1. Annexin V/ PI-Färbung.....	71
2.7.2. Proliferationsmessung mit [³ H]-Thymidin.....	72
2.7.3. Proliferationsmessung mit BrdU.....	72
3. Ergebnisse	73
3.1 Der Hefe -2- Hybrid Screen.....	75
3.2 Detaillierte Beschreibung einiger potentieller Interaktionspartner.....	82
3.3 Verifikation der Interaktionen <i>in vitro</i> durch GST-Pulldown-Experimente	85
3.4 Verifikation der CD95L/PSTPIP-Interaktion durch <i>in vivo</i> Co-Immuno- präzipitations-Experimente.....	92
3.5 Untersuchung der Interaktion von endogenem PSTPIP mit CD95L.....	96
3.6 Lokalisationsstudien mit dem konfokalen Mikroskop.....	102
3.7 Co-Stimulation über CD95L in primären Maus T-Zellen.....	105
3.8 Proliferationsbestimmung über die Messung von BrdU-Einbau.....	110
3.9 Oberflächenexpression von CD95L in Abhängigkeit von PSTPIP.....	113
3.10 Quantifizierung von Apoptose in CD95-positiven Targetzellen nach Co- Kultivierung mit CD95L exprimierenden Effektorzellen.....	115
3.11 Aktivierung des MAPK-Signalweges durch reverse Signalübertragung über CD95L.....	118
3.12 Interaktion von PSTPIP mit der PTP-PEST Phosphatase.....	120
3.13 Lokalisation von CD95L in Lipid Rafts.....	123
4. Diskussion	126
4.1 Isolierung von Proteinen, die mit dem intrazellulären Anteil des CD95L interagieren	126
4.2 Verifikation der Interaktionen im <i>in vitro</i> GST-Pulldown.....	133
4.3 Verifikation der Interaktionen <i>in vivo</i>	134
4.4 Überlegungen zur Rolle der Interaktion von CD95L und PSTPIP.....	136
4.5 Studien zur Rolle des CD95L als signalübertragender Rezeptor.....	140

4.6	Die duale Rolle des CD95L im Immunsystem.....	146
4.7	Die Lokalisierung von CD95L in Lipid Rafts.....	148
5.	Literaturverzeichnis.....	150
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	170
7.	Anhang.....	173

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Als Apoptose bezeichnet man eine Sonderform des programmierten Zelltodes, der durch spezifische morphologische Veränderungen der Zelle charakterisiert ist. Einige dieser Veränderungen sind lichtmikroskopisch erkennbar und veranlassten Kerr, Wyllie und Curie zur Beschreibung dieses Phänomens und zur Wahl des Begriffes „apoptosis“, der von dem griechischen Wort „ἀποπτωσις ὄψις“ abstammt und das Fallen der Blätter von den Bäumen beschreibt. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und so genannte apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“) werden von der Zelloberfläche abgeschnürt („membrane blebbing“) (Kerr *et al.*, 1972). Diese membranumschlossenen Vesikel verursachen keine entzündliche Reaktion, sondern werden von phagozytierenden Zellen, z.B. Makrophagen, aber auch von umliegenden, nicht professionell phagozytierenden Zellen vernichtet (Devitt *et al.*, 1998). Des Weiteren ist der apoptotische Zelltod durch die Inversion der Membranasymmetrie mit Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche und DNA-Fragmentierung gekennzeichnet (Wyllie *et al.*, 1980). Apoptose dient in Mehrzellern der Beseitigung überflüssiger oder gefährlicher Zellen und spielt eine wichtige Rolle während der Entwicklung (Vaux *et al.*, 1999), bei der Gewebshomöostase (Krammer, 1999) und bei der Immunabwehr (Steller *et al.*, 1995). So werden z.B. die Zellen des Interdigitalraumes durch Apoptose entfernt, wodurch Finger und Zehen freigelegt werden.

Eine andere Art des Zelltodes ist die Nekrose, ein passiver Prozess, bei dem die Zelle anschwillt, die Membran zerrissen wird und zytoplasmatische Bestandteile austreten (Wyllie *et al.*, 1997). Dies führt zur Aktivierung des Immunsystems und zu einer lokalen Entzündungsreaktion.

1.1.1 Apoptose im Modellorganismus *C.elegans*

Als ein für den Organismus essentieller Prozess wurde diese spezielle Art des programmierten Zelltodes ausführlich im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Während der Entwicklung des Nematoden werden 1093 somatische Zellen gebildet, von

denen wiederum 131 Zellen durch Apoptose absterben. Darüber hinaus konnten in *C. elegans* auch die molekularen Grundlagen dieses Prozesses identifiziert und verstanden werden (Hengartner und Horvitz, 1994). So bilden mindestens vier Proteine das Grundgerüst der apoptotischen Maschinerie. Die beiden pro-apoptotischen Moleküle Ced-4 („cell death abnormal“) und Ced-3 bilden einen apoptoseauslösenden Komplex, der durch ein inhibitorisches Molekül, Ced-9, blockiert werden kann. Normalerweise liegt Ced-9 komplexiert mit Ced-3 und Ced-4 an der Mitochondrienmembran vor, wodurch Ced-3 inaktiv gehalten wird. Apoptotische Stimuli bewirken die Dissoziation von Ced-9 und somit die Aktivierung des apoptotischen Programmes. In sterbenden Zellen transloziert Ced-4 zur Kernmembran (Chen *et al.*, 2000). Ein weiteres wichtiges pro-apoptotisches Molekül ist Egl-1, welches Ced-9 bindet und das Molekül vom Ced-3/Ced-4-Komplex entfernt (Conradt und Horvitz, 1998) (s. Abb.1.1). Obwohl dieser Vorgang in höheren Organismen viel komplexer ist, gibt es dennoch Parallelen. Ced-4 ist ein Homolog von Apaf-1, Ced-3 gehört zur Proteasefamilie der Caspasen und Ced-9 und Egl-1 repräsentieren Mitglieder der Bcl-2 Familie (Salvesen und Dixit, 1997; Zou *et al.*, 1997; Yang und Korsmeyer, 1996).

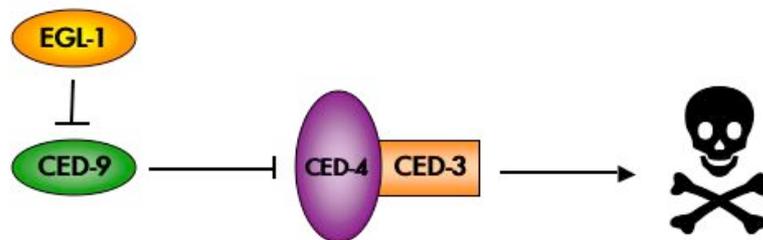


Abb.1.1: Das Grundgerüst der apoptotischen Maschinerie im Fadenwurm *C.elegans*

Der apoptoseinduzierende Komplex aus Ced-3 und Ced-4 wird durch Bindung von Ced-9 inhibiert. Egl-1 wiederum bindet und inhibiert Ced-9 und wirkt auf diese Weise pro-apoptotisch. Der programmierte Zelltod von 131 somatischen Zellen ist für die korrekte Entwicklung von *C.elegans* essentiell.

(Abb. nach: „nature insight apoptosis“; Meier *et al.*, 2000)

1.1.2 Caspasen als ausführende Enzyme der apoptotischen Maschinerie

Apoptose kann durch sehr unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden, wie z.B. UV- oder γ -Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika sowie durch Aktivierung so genannter „Todesrezeptoren“ („death receptors“). Obwohl diese verschiedenen Stimuli zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führen, werden zur Ausführung der Apoptose die Mitglieder einer speziellen Enzymfamilie benötigt, die so genannten Caspasen (Alnemri *et al.*, 1996).

Als Caspasen werden Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen bezeichnet, die für die Ausführung der Apoptose essentiell sind (Thornberry und Lazebnik, 1998). Mindestens 11 Mitglieder dieser Familie wurden im Menschen identifiziert, die in weitere Untergruppen eingeteilt werden können. So unterscheidet man inflammatorische (Caspase-1, -5, -11) und zytotoxische Caspasen, wobei letztere in Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) unterteilt werden. Die inflammatorische Caspase-1 prozessiert die Proformen von IL-1 β und IL-18 zu den aktiven Enzymen und wurde daher zuerst „IL-1 β processing enzyme“ (ICE) genannt (Cerretti *et al.*, 1994; Siegmund *et al.*, 2001).

Organisiert sind die Caspasen in einer Kaskade, die durch Aktivierung einer Initiatorcaspase beginnt und zur Spaltung der Effektorcaspasen führt. Caspasen werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, die aus einer N-terminalen Prodomäne und einer C-terminalen Proteasedomäne bestehen, die wiederum in eine kleine und eine große Untereinheit aufgeteilt werden kann. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen der großen und kleinen Untereinheit und durch Abspaltung der Prodomäne. Die Prodomäne der Effektorcaspasen ist kurz (10-40 AS), wohingegen die Prodomänen der Initiatorcaspasen länger sind und spezielle Domänen besitzen. Die Initiatorcaspasen-8 und -10 z.B. sind durch eine so genannte Todeseffektordomäne (engl.: **death effector domain**, DED) gekennzeichnet, die homophile Interaktionen mit DED-haltigen Adaptorproteinen wie FADD (engl.: **Fas associated protein with a death domain**) vermittelt (Muzio *et al.*, 1996). Die Prodomänen von Caspase-9 und Ced-3 besitzen eine CARD-Domäne (engl.: **caspase recruitment domain**), die auch in anderen Proteinen, wie z.B. Apaf-1, vorkommt. Nach der Spaltung formen zwei große und zwei kleine Untereinheiten der Caspasen einen heterotetrameren Komplex und stellen das aktive Enzym dar (Nicholson, 1999). Für

Caspase-8 wurde jedoch kürzlich gezeigt, dass auch die Proenzyme als Dimere proteolytisch aktiv sind und andere Procaspase-8 Moleküle in die beiden Untereinheit spalten können. Dies führt zu einer Konformationsänderung, die den Bereich zwischen großer Untereinheit und Prodomäne zur Spaltung freigibt. Die nun „reife“ aktive Caspase-8 dissoziiert vom DISC und spaltet Effektorcaspasen (Chang *et al.*, 2003b). Auch für Procaspase-9 wurde ein ähnlicher Mechanismus beschrieben (Boatright *et al.*, 2003).

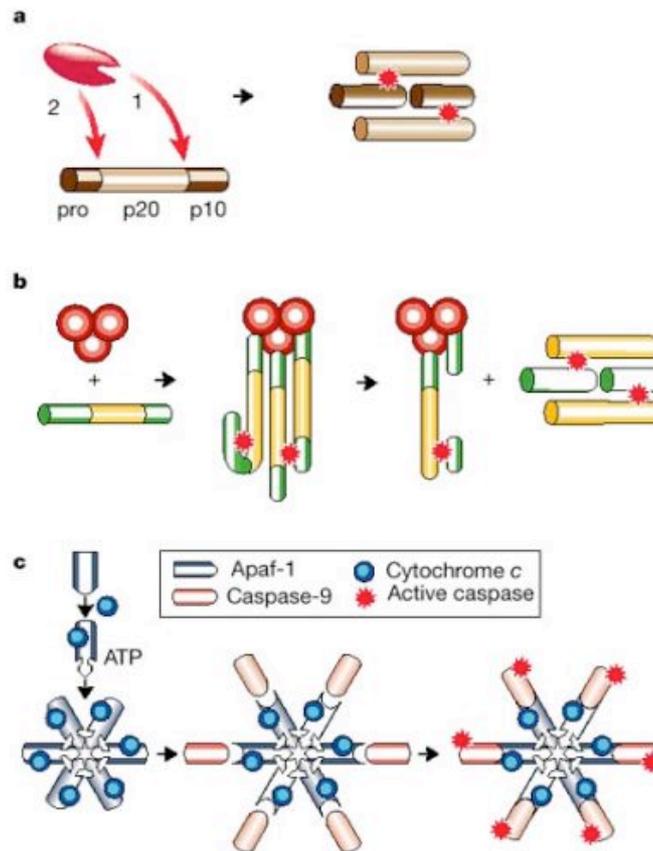


Abb.1.2: Bekannte Mechanismen der Caspaseaktivierung

A: Proteolytische Spaltung durch eine andere Caspase. Nach Abspaltung der Prodomäne bilden zwei große p20 und zwei kleine p10 Untereinheiten das aktive Enzym. **B:** Autokatalytische Aktivierung durch Homooligomerisierung am Beispiel von Caspase-8, welches über das Adapterprotein FADD an den trimerisierten Rezeptor, wie z.B. CD95, rekrutiert wird („induced proximity“). **C:** die Bildung eines Holoenzym, wie z.B. die Formation des Apoptosoms, wobei Caspase-9 die katalytische Untereinheit darstellt und Apaf-1 den allosterischen Regulator. Die Aktivierung von Caspasen an höhermolekularen Proteinkomplexen, d.h. DISC oder Apoptosom, ist ein generelles Prinzip. (Abb. aus: „nature insight apoptosis“; Hengartner, 2000)

Nach einem apoptoseinduzierenden Stimulus aktivieren die Initiatorcaspasen Caspasen des gleichen Typs („autokatalytische Aktivierung“), aber auch Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung, welche wiederum zelluläre Substrate spalten und so zu den morphologischen Veränderungen und zum Tod der Zelle führen. Zu den Substraten gehören

sowohl Strukturproteine wie Aktin, Plektrin oder Fodrin als auch Signalproteine wie Akt-1 und PKC δ , aber auch andere Proteine wie ICAD (engl.: inhibitor of caspase activated DNase) (Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998) oder PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase). Mehr als 280 Caspase Substrate wurden bisher identifiziert (Fischer *et al.*, 2003), wobei die Spezifität der Caspasen abhängig von der Sequenz ihrer Spaltungsmotive ist (Degterev *et al.*, 2003).

Neben ihrer essentiellen Funktion in der Auslösung der Apoptose, scheinen Caspasen auch eine Rolle in der Proliferation bestimmter Zelltypen zu spielen (Los *et al.*, 2001; Schwerk *et al.*, 2003), wie z.B. Caspase-8, welche wichtig für die Proliferation von T-Zellen ist (Chun *et al.*, 2002; Salmena *et al.*, 2003).

1.1.3 Die Bcl-2 Familie

Die zur Apoptose führende Signalkaskade ist genauestens reguliert, so können an verschiedenen Stellen inhibitorische aber auch aktivierende Moleküle eingreifen, wie z.B. die Mitglieder der Bcl-2 Familie (Zörnig *et al.*, 2001). Diese Familie besteht aus anti- (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1) sowie aus pro- (z.B. Bax, Bad, Bak, Bid, Bim) apoptotischen Proteinen (Cory *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2003), wobei die pro-apoptotischen Mitglieder wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden (s.u.). Die Mitglieder dieser Familie besitzen mindestens eine von vier konservierten Domänen, die als BH1-BH4 (engl.: Bcl-2 homology domain) Domänen bezeichnet werden. Die BH3-Domäne ist essentiell für die zytotoxische Aktivität der pro-apoptotischen Familienmitglieder und ist die einzige homologe Domäne in einer der beiden Untergruppen der pro-apoptotischen Familienmitglieder, die daher BH3- (engl.: BH3 only) Familie genannt wird (Huang und Strasser, 2000; Kelekar *et al.*, 1998). Die Aktivierung dieser BH3-Familienmitglieder erfolgt auf unterschiedliche Weisen: Bad z.B. wird als Antwort auf die Stimulation mit IL-3 oder anderen Wachstumsfaktoren phosphoryliert, vom 14-3-3 \square Protein gebunden und so im Zytoplasma inaktiviert (Franke *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Bid, einem anderen BH3-Protein, erfolgt durch proteolytische Spaltung durch Caspase-8 oder Granzyme B (Li *et al.*, 1998; Heilbein *et al.*, 2000). Die apoptoseauslösende Funktion der BH3-Familienmitglieder ist jedoch von weiteren pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern, wie z.B. Bax abhängig, welches in gesunden Zellen im Zytosol lokalisiert und als Monomer schwach mit den Mitochondrien assoziiert ist. Nach

Induktion der Apoptose transloziert Bax zu den Mitochondrien und integriert in die mitochondriale Membran (Korsmeyer *et al.*, 2000). Die Oligomerisierung und die Integration in die Membran kann durch Bcl-2 verhindert werden (Antonsson *et al.*, 2001). Die Funktionen von Bax und dem homologen Protein Bak sind redundant, da sich knock-out Mäuse, bei denen nur eines der beiden Gene deletiert wurde, normal entwickeln, *bax*^{-/-} *bak*^{-/-} Mäuse jedoch schwere Entwicklungsstörungen aufweisen (Lindsten *et al.*, 2000).

Die anti-apoptotischen Familienmitglieder Bcl-2 oder Bcl-x_L inhibieren Apoptose durch Bindung und Inaktivierung der pro-apoptotischen Familienmitglieder (Zörnig *et al.*, 2001).

1.1.4 Signalwege der Apoptose

Ein wichtiges Organell für die Ausführung der Apoptose ist das Mitochondrium. Die Aktivierung und Insertion pro-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder führt zur Freisetzung verschiedener Moleküle aus den Mitochondrien, wie z.B. Cytochrom c, einem Hauptbestandteil der mitochondrialen Atmungskette, welcher Elektronen von der Cytochrom c-Reduktase auf die Cytochrom c-Oxidase überträgt. Dieses Protein befindet sich in gesunden Zellen im Intermembranspalt (assoziiert mit der inneren Mitochondrienmembran) und wird im Verlauf der Apoptose ins Zytosol entlassen. Verschiedene Modelle der Cytochrom c Freisetzung wurden bisher beschrieben. Eines ist die Öffnung eines Kanals, des so genannten PTP (engl.: permeability transition pore), der aus den zwei Untereinheiten ANT (engl.: adenine nucleotide translocator) in der inneren Mitochondrienmembran und VDAC (engl.: voltage dependent anion channel) in der äußeren Mitochondrienmembran (Szabo *et al.*, 1993; Petronilli *et al.*, 2001) besteht. In einem anderen Modell formen pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder wie Bax oder Bak Poren in der Mitochondrienmembran, die die Cytochrom c Freisetzung erlauben (Korsmeyer *et al.*, 2000).

Das in das Zytoplasma freigesetzte Cytochrom c bindet an spezielle Bindungsmotive im Apaf-1-Molekül und induziert eine Konformationsänderung, und unter Verbrauch von ATP oder dATP assoziiert danach Procaspase-9 an Apaf-1 über die an beiden Molekülen vorhandenen Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD) (Li *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1999). Es entsteht das so genannte Apoptosom, ein oligomerer Komplex, in dem insgesamt sieben Apaf-1- und mehrere Procaspase-9-Moleküle aggregieren. Die Erhöhung der lokalen

Konzentration von Procaspase-9 im Apoptosom führt zu dessen Homodimerisierung und autoproteolytischer Aktivierung (Srinivasula *et al.*, 1998), was die Aktivierung weiterer Caspasen, wie z. B. Caspase-3 bewirkt (Zou *et al.*, 1999). Das Apoptosom wurde als Holoenzym beschrieben, wobei Caspase-9 die katalytische Untereinheit darstellt und Apaf-1 den allosterischen Regulator (Rodriguez and Lazebnik, 1999).

Auch andere pro-apoptotische Moleküle werden nach einem apoptoseinduzierenden Stimulus von den Mitochondrien freigesetzt, wie z.B. AIF (engl.: apoptosis inducing factor) (Susin *et al.*, 1999), Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) oder die Serin-Protease Omi/HtrA2 (Yang *et al.*, 2003) (s.Abb.1.4).

Abgesehen von den anti-apoptotischen Bcl2-Familienmitgliedern gibt es noch andere Moleküle, die Apoptose negativ regulieren können. Dies sind zum Beispiel IAPs („inhibitor of apoptosis proteins“) (Verhagen *et al.*, 2001) oder FLIPs (engl.: FLICE-like inhibitory protein) (Tschopp *et al.*, 1998). IAPs sind durch ein spezielles Motiv, der BIR- (engl.: baculovirus IAP repeats) Domäne, gekennzeichnet und inhibieren Apoptose durch direkte Bindung an aktive Caspasen oder deren Proformen, vor allem Caspase-9 und Caspase-3. Bei Auslösung der Apoptose können diese inhibitorischen Moleküle ihrerseits inaktiviert werden, wie zum Beispiel durch die Bindung von Smac/DIABLO oder Omi/HtrA2 (Vaux und Silke, 2003).

Im Gegensatz zu den meisten anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern, die Apoptose auf dem Level der Mitochondrien inhibieren, blockiert FLIP den programmierten Zelltod auf dem Level des DISC (Irmeler *et al.*, 1997). Von c-FLIP existieren zwei Spleißvarianten, c-FLIP_S und c-FLIP_L. Die lange Form c-FLIP_L ist strukturell mit Caspase-8 verwandt, enthält aber ein enzymatisch inaktives Zentrum und interferiert mit der Bildung aktiver Caspase-8 Untereinheiten am Rezeptor, wohingegen die kurze Form (c-FLIP_S) nur zwei DEDs enthält (Scaffidi *et al.*, 1999b). Kürzlich wurde die lange Form des FLIP-Moleküls auch als pro-apoptotisches Protein beschrieben, welches Caspase-8 aktivieren kann (Micheau *et al.*, 2002). FLIPs dagegen wirkt ausschließlich anti-apoptotisch (Schmitz *et al.*, 2004).

Beim intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion, z.B. durch Aktivierung von p53 durch Schädigung der DNA, sind die Mitochondrien und die daraus freigesetzten Moleküle von essentieller Bedeutung. Der so genannte extrinsische Weg, also die rezeptorvermittelte Apoptose, basiert auf der Aktivierung der so genannten Todesrezeptoren („death receptors“) aus der Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie (TNF-Familie) (Thorburn, 2004;

s.Abschnitt 1.2.1). Unter physiologischen Bedingungen werden diese Rezeptoren durch die Bindung des zugehörigen Liganden aktiviert und führen in manchen Zellen zur Auslösung der Apoptose ohne essentielle Beteiligung der Mitochondrien (Scaffidi *et al.*, 1998; Abschnitt 1.2.2).

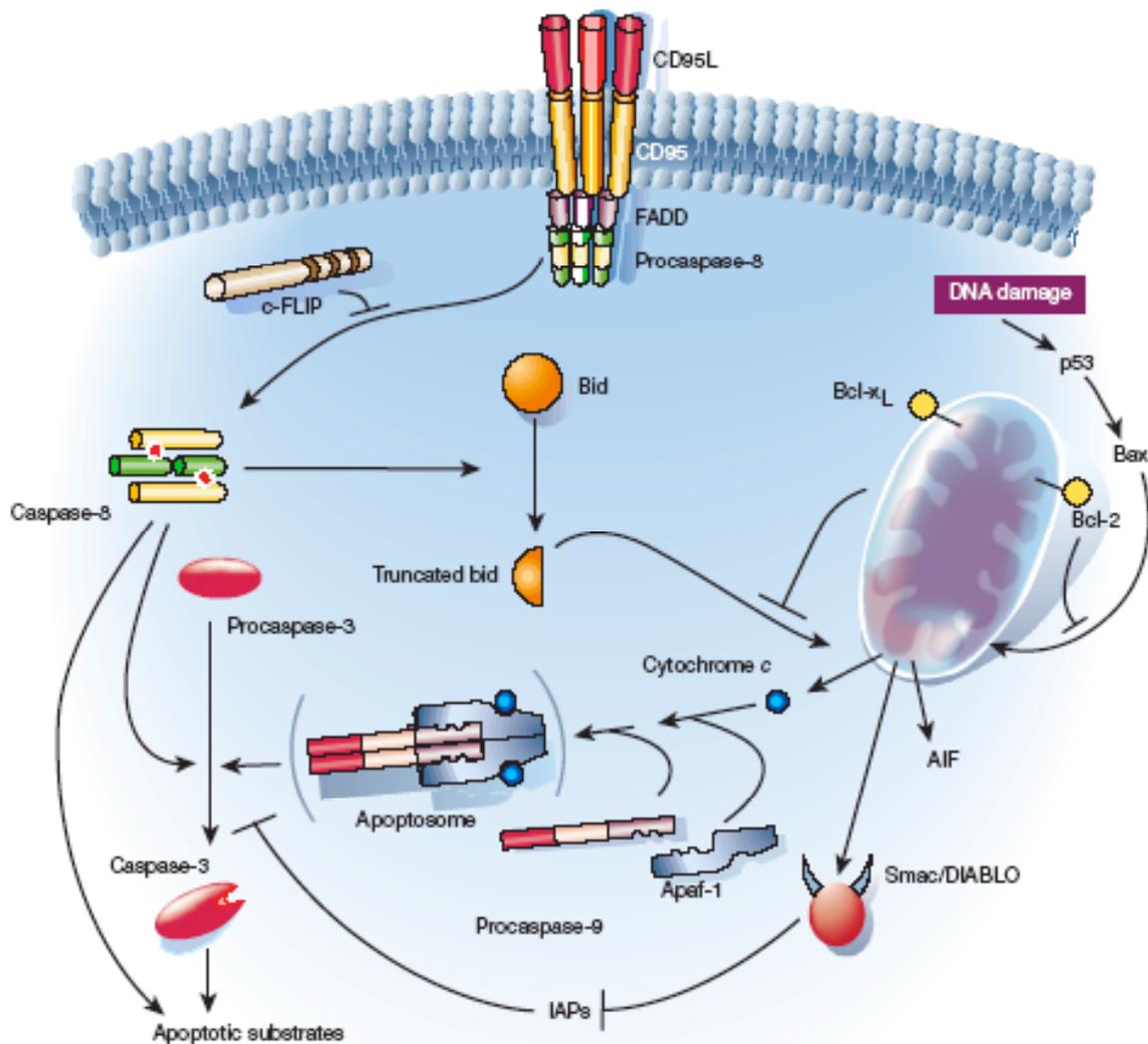


Abb.1.3: Signalübertragungswege der Apoptose

Die Bindung des trimerisierten CD95L an den CD95-Rezeptor führt zur Ausbildung des so genannten „death inducing signalling complex“ (DISC) und zur Aktivierung von Procaspase-8. In Typ I Zellen prozessiert und aktiviert Caspase-8 direkt Caspase-3, welche ihrerseits weitere zelluläre Substrate spaltet. In Typ II Zellen geschieht die Aktivierung von Caspase-3 über den mitochondrialen Weg, d.h. Caspase-8 spaltet Bid, welches als tBid zu den Mitochondrien transloziert und mit Hilfe von Bax oder Bak zur Cytochrom c Freisetzung führt. Apaf-1, Cytochrom c und Procaspase-9 bilden mit ATP oder dATP das Apoptosom, wodurch Caspase-9 aktiviert und dadurch die Spaltung von Caspase-3 initiiert wird. Aus den Mitochondrien werden auch andere Proteine, wie AIF („apoptosis inducing factor“) oder Smac/DIABLO freigesetzt, letztere inhibieren ihrerseits die anti-apoptotischen IAPs („inhibitor of apoptosis proteins“).

Der so genannte intrinsische Weg führt zur Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien und zur anschließend Aktivierung der Caspasen-Kaskade. (Abb. aus: „nature insight apoptosis“; Hengartner, 2000)

1.2 Die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie

Die Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-Superfamilie besteht aus zumeist membranständigen Rezeptoren und den dazugehörigen Liganden, welche so unterschiedliche zelluläre Funktionen wie Aktivierung, Proliferation, Differenzierung, Zelltod und Überleben von Immunzellen vermitteln (Beletsky *et al.*, 2002). Die Rezeptoren dieser Familie sind Typ I-Transmembranproteine mit zwei bis sechs charakteristischen cysteinreichen Bereichen (engl.: cysteine-repeat rich domains, CRDs) in ihren extrazellulären Liganden-bindungsdomänen (Golstein *et al.*, 1997). Im extrazellulären Bereich befindet sich auch die so genannte PLAD-Domäne (engl.: pre-ligand-binding assembly domain), die homophile Interaktionen von drei Rezeptormolekülen -unabhängig von der Ligandenbindung- vermittelt (Chan *et al.*, 2000). Die Signalübertragung wird daher entweder über eine Konformationsänderung trimerisierter Todesrezeptoren oder durch Bildung eines multimeren Komplexes nach Ligandenbindung herbeigeführt. Zusätzlich zu den membranständigen Rezeptoren gibt es auch Familienmitglieder, die in löslicher Form vorkommen, wie z.B. den DecoyRezeptor 3 (DcR3) (Pitti *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2000).

Rezeptor	Ligand	Beteiligung des Liganden an:
TNF-RI (p55), TNF-RII (p75)	TNF α , LT α	Entzündung Apoptose, Überlebenssignalen
CD95	CD95L	Apoptose, Proliferation
TRAIL-R1-2 (DR4-5), OPG	TRAIL	Apoptose
OPG, RANK	TRANCE (RANKL)	Überleben von dendritischen Zellen
LT α -R	LT α , LIGHT	Th1-T-Zellantwort
HVEM	LIGHT	T-Zell-Aktivierung, Thymozytenreifung
CD40	CD40L	Überleben und Differenzierung von B-Zellen
CD30	CD30L	TZR-Co-Stimulation
4-1BB (CD137)	4-1BLL	TZR-Co-Stimulation
OX-40 (CD134)	OX40L	TZR-Co-Stimulation
DcR3 (TR6)	CD95L, LIGHT	reverse Signalübertragung TZR-Co-Stimulation
DcR1-2	TRAIL	Nicht bekannt
BCMA/ TACI	BAFF (BLyS)	Überleben und Reifung von B-Zellen

Tabelle 1.1: Mitglieder der TNF-R/TNF-Superfamilie (nach Mackay und Kalled, 2002)

Mit Ausnahme von LT α sind die Liganden der TNF-Superfamilie Typ II-Transmembranproteine bzw. homotrimere lösliche Moleküle, die strukturell verwandte extrazelluläre Bereiche besitzen. Diese Bereiche werden auch „TNF homology domains (THD)“ genannt und binden an die cysteinreichen Domänen ihrer spezifischen Rezeptoren.

Die meisten Familienmitglieder funktionieren hauptsächlich in membranständiger Form, so dass direkter Zell-Zell-Kontakt für die Signalübertragung nötig ist. Die Signalübertragung scheint bei einigen Familienmitgliedern aber nicht nur in der klassischen Rezeptor-Liganden-Richtung abzulaufen, da auch der Ligand als Rezeptor funktionieren und Signalkaskaden in der Liganden tragenden Zelle aktivieren kann. Auf dieses Phänomen der retrograden Signalübertragung („reverse signalling“) wird später genauer eingegangen (s. Abschnitt 1.2.4).

1.2.1 Die Todesrezeptoren der TNF-Superfamilie

Eine Unterfamilie der TNF-R-Superfamilie sind die so genannten Todesrezeptoren, („death receptors“) die intrazellulär eine spezielle, etwa 80 Aminosäuren lange Domäne, die „death domain“ (DD), also „Todesdomäne“, aufweisen. Mitglieder dieser Todesrezeptorfamilie sind TNF-R1, CD95 (Fas/APO-1), DR3 (APO-3/TRAMP), TRAIL-R1 (APO-2/DR4) und TRAIL-R2 (DR5/KILLER) (Peter *et al.*, 1999; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998)(s. Abb.1.4). Die DD ist verantwortlich für die Vermittlung des apoptotischen Signals durch die Interaktionen mit anderen DD-haltigen Proteinen. Durch Bindung des Liganden oder agonistischer anti-Rezeptor-Antikörper wird eine Caspasen-Kaskade induziert, die zur Apoptose dieser Zelle führt. Die „Todesdomäne“ leitet das apoptotische Signal weiter, indem sie Adaptormoleküle wie FADD (Boldin *et al.*, 1995) oder „TNF-Receptor associated protein with a death domain“ TRADD (Park und Baichwal, 1996) über eine Wechselwirkung mit deren DDs rekrutiert. FADD stellt dann über eine weitere homophile Interaktionsdomäne, der „Todeseffektordomäne“ (engl.: death effector domain, DED), die Verbindung zwischen diesen Rezeptoren und der apoptotischen Caspasen-Kaskade her.

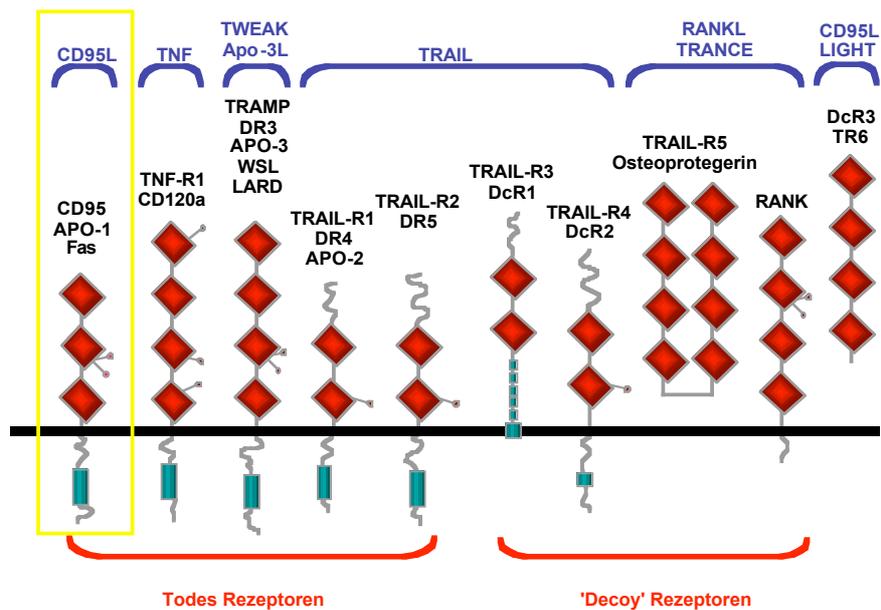


Abb.1.4: Mitglieder der TNF-Todesrezeptorfamilie

Die Todesrezeptoren CD95, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 vermitteln hauptsächlich apoptotische Signale nach Bindung des Liganden durch die Rekrutierung DD-haltiger Adaptorproteine über die DD (■) in ihren intrazellulären Bereichen. Die Decoy Rezeptoren DcR1, DcR2, TRAIL-R5 (OPG), RANK und DcR3 besitzen entweder keine oder eine nicht funktionelle intrazelluläre Domäne, so dass sie keine Signale in das Zellinnere übertragen können. (Abb. nach O.Janssen)

1.2.2 Die Todesrezeptor vermittelte Apoptose am Beispiel des CD95-Rezeptors

Der Prototyp dieser Rezeptorklasse ist CD95 (Fas/Apo-1). Er besteht aus einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären „death domain“. Die durch Bindung des Liganden an den Rezeptor rekrutierten Proteine bilden einen Multiproteinkomplex, den so genannten DISC (engl.: death inducing signalling complex). Über das an CD95 bindende Adaptormolekül FADD wird Procaspase-8 rekrutiert, die im DISC autokatalytisch in ihre beiden Untereinheiten gespalten wird und von denen je zwei p10 und zwei p18 Untereinheiten das aktive Enzym bilden (Medema *et al.*, 1997). Die aktive Caspase-8 dissoziiert vom DISC und setzt die Caspasen-Kaskade in Gang.

Bei der apoptotischen Signalübertragung des CD95L wurden zwei verschiedene Zelltypen identifiziert, die als Typ I und Typ II Zellen bezeichnet werden (Scaffidi *et al.*, 1998). Der Typ II Signalweg ist abhängig von der apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien (Gross *et al.*, 1999), was sich im Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) mit nachfolgender Cytochrom c-Freisetzung äußert. In Typ I Zellen ist die Induktion der Apoptose von der Aktivierung großer Mengen an Caspase-8 am DISC begleitet, was zu einer raschen Spaltung von Caspase-3, noch vor dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, führt, während in Typ II Zellen die DISC-Bildung schwächer und langsamer ist und Caspasenaktivierung erst nach Verlust des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet wird (Scaffidi *et al.*, 1998). Die Aktivierung der Mitochondrien wird in Typ II Zellen durch das pro-apoptische Bcl-2-Familienmitglied Bid vermittelt (Huang und Strasser, 2000). Bid ist ein Caspase-8-Substrat und die geringe Menge an aktiver Caspase-8 im DISC von Typ II Zellen reicht aus, um Bid zu spalten, aber nicht für eine effektive Spaltung von Procaspase-3. Das verkürzte Spaltprodukt tBid (engl.: „truncated Bid“) transloziert zu den Mitochondrien und führt mit Hilfe von anderen pro-apoptischen Bcl-2 Familienmitgliedern wie Bax oder Bak zum Verlust an $\Delta\psi_m$ und zur Cytochrom c-Freisetzung (Gross *et al.*, 1999). Der genaue Reaktionsmechanismus hierfür ist noch immer unbekannt. Sowohl in Typ I als auch in Typ II Zellen werden die Mitochondrien nach CD95L-Stimulation aktiviert. In Typ II Zellen kann Bcl-2 die apoptogene Aktivierung der Mitochondrien und die Caspase-3 Aktivierung -und damit Apoptose- hemmen, wohingegen in Typ I Zellen Caspase-3 direkt durch Caspase-8 aktiviert wird, was nicht durch anti-apoptische Bcl-2 Familienmitglieder blockierbar ist. Auch in diesen Zellen kann Bcl-2 die Cytochrom c-Freisetzung verhindern, was jedoch für die Ausführung der Apoptose entbehrlich ist.

1.2.3 Apoptoseunabhängige Funktionen der Todesrezeptoren

Für die meisten Todesrezeptoren wurden zusätzlich zu ihren apoptoseauslösenden Funktionen auch apoptoseunabhängige Funktionen beschrieben. So führt die Signalübertragung des TNF-RI entweder zu Apoptose oder zur Transduktion von Überlebenssignalen (Chen and Goeddel, 2002). Kürzlich wurde berichtet, dass nach TNF-RI

Stimulation zuerst ein membrangebundener Komplex gebildet wird, der aus dem Adaptorprotein TRADD, der Kinase RIP (engl.: receptor interacting protein) und TRAF2 (engl.: TNF-R associated factor) besteht. Dieser Komplex aktiviert NF- κ B und übermittelt so Überlebenssignale. In einem zweiten Schritt dissoziiert der zytoplasmatische Anteil dieses Komplexes, bestehend aus TRADD, TRAF2 und RIP, vom Rezeptor ab und bildet mit FADD und Caspase-8 einen zytoplasmatischen, apoptoseinduzierenden Komplex II. Ist jedoch NF- κ B aktiv, wird c-FLIP hochreguliert, bindet an Caspase-8 und inhibiert so Apoptose (Micheau *et al.*, 2003). Andere Studien deuten auch auf eine Rolle der Todesrezeptoren in der Regulation von Proliferation hin. TNF α und anti-CD95-Antikörper z.B. sind in der Lage, in subletalen Dosen Proliferation humaner Fibroblasten zu induzieren (Aggarwal *et al.*, 1995). Außerdem wurde beschrieben, dass die Aktivierung von CD95 durch spezifische Antikörper bei anti-CD3-induzierter T-Zellproliferation eine co-stimulatorische Rolle spielt (Alderson *et al.*, 1993; Wajant *et al.*, 2003) und die Regeneration von Mäuselebern nach teilweiser Hepatektomie nach CD95-Stimulation beschleunigt wird (Desbarats und Newell, 2000). Auch die Regeneration von peripheren Neuronen *in vivo* ist vom co-stimulatorischen Potential von CD95 abhängig (Desbarats *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde in verschiedenen transgenen- und knockout-Mausmodellen gefunden, dass eine Inaktivierung des für die Signalübertragung durch Todesrezeptoren wichtigen Adaptorproteins FADD mit der Inhibition von Proliferation einhergeht (Newton *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1998; Hueber *et al.*, 2000; Zörnig *et al.*, 1998.) Beobachtet wurde dies unter anderem in den T-Zellen *lck-FADD-DN* transgener Mäuse, bei denen die CD95-induzierte Apoptose erwartungsgemäß blockiert ist und deren T-Zellproliferation *in vivo* und nach Aktivierung *in vitro* inhibiert ist. Dabei ist die beobachtete Inhibierung der Proliferation durch FADD-DN nicht T-Zell-spezifisch, da auch in FADD-DN-Fibroblasten ein verringertes Proliferationspotential nach mitogenem Stimulus beobachtet wurde (Hueber *et al.*, 2000). Auch andere Untersuchungen lassen auf eine mögliche Verbindung zwischen FADD und dem Zellzyklus schließen, wie z.B. die Interaktion von phosphoryliertem FADD mit einer zellzyklusregulierenden Kinase (Scaffidi *et al.*, 2000). In FADD-defizienten Jurkat Zellen konnte gezeigt werden, dass FADD über Aktivierung von NF- κ B die Induktion von Genen, die für das Überleben der Zelle wichtig sind regulieren kann (Wajant *et al.*, 2000).

1.2.4 Die reverse Signalübertragung durch TNF-Liganden („Reverse signalling“)

Einige Mitglieder der TNF-Liganden-Familie sind in der Lage, Signale in die Liganden tragende Zelle zu übermitteln. *In vivo* Evidenzen für diese Signalübertragung gibt es z.B. für CD40L (CD154) (Cayabyab *et al.*, 1994; Blair *et al.*, 2000; van Essen *et al.*, 1995), aber auch für andere Liganden wie OX40L (Stuber *et al.*, 1995), CD70 (Lens *et al.*, 1999), CD153 (Wiley *et al.*, 1996; Cerutti *et al.*, 2000), 4-1BB-L (Langstein *et al.*, 1998), TRANCE (Chen *et al.*, 2001), LIGHT (Shaikh *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2002) sowie mTNF (Harashima *et al.*, 2001; Eissner *et al.*, 2000), TRAIL (Chou *et al.*, 2001) und CD95L (Suzuki und Fink, 2000) wurde eine rückwärtige Signalübertragung beschrieben.

Die membranständige Form von TNF α (mTNF) überträgt nach Stimulation mit anti-TNF α -Antikörpern bzw. nach Inkubation mit TNF-R1 exprimierenden Zellen Signale in die Zelle. Dies führt zur Ca²⁺-Mobilisierung (Watts *et al.*, 1999), zu vermehrter IL-2 und IFN- γ Sekretion (Higuchi *et al.*, 1997) und zur Expression von E-Selectin (CD62E) auf aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten (Harashima *et al.*, 2001).

In mehreren Berichten wurde LIGHT als co-stimulatorisches Molekül in Maus- und humanen T-Zellen nach TZR-Stimulation beschrieben. Der an LIGHT und CD95L bindende Decoy-Rezeptor DcR3-Fc induziert eine vermehrte Proliferation in anti-CD3- oder PHA- stimulierten T-Zellen, welche über LIGHT vermittelt wird (Shi *et al.*, 2002). Auch die Stimulation von membrangebundenem TRAIL durch DR4-Fc zusätzlich zu suboptimalen Konzentrationen von anti-CD3-Antikörpern induziert Proliferation (Chou *et al.*, 2001).

Mit großer Wahrscheinlichkeit spielt die Casein Kinase I (CKI) Phosphorylierungsstelle eine Rolle in der reversen Signalübertragung, da die 6 der 16 TNF-Ligandenfamilienmitglieder, die dieses Motiv besitzen (CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, TNF- α und CD95L), alle als signalübertragende Moleküle beschrieben wurden. Bisher wurde jedoch eine CKI-abhängige Serin-Phosphorylierung nach Rezeptoraktivierung nur für mTNF α publiziert (Watts *et al.*, 1999).

Das Phänomen der reversen Signalübertragung wird aber auch für Rezeptor/Liganden-Paare beschrieben, die nicht zur TNF-Familie gehören. Interessant ist z.B. die ephrinB Signalübertragung. Die Interaktionen des auf Endothelzellen exprimierten ephrin-B2

Liganden und der Rezeptor-Tyrosin-Kinase EphB4 übermitteln bidirektionale Signale, die wichtig für die Angiogenese sowie Migration und Zelladhäsion sind (Hamada *et al.*, 2003). Nach Bindung des EphB Rezeptors an seinen Liganden ephrinB werden dieser Ligand sowie die Kinase Src in Lipid Rafts konzentriert, woraufhin Src zum intrazellulären Anteil von ephrinB rekrutiert wird und diesen phosphoryliert. SH2-domänenhaltige Adaptorproteine, wie z.B. Grb4, binden an den nun tyrosinphosphorylierten Anteil und führen zur Induktion einer Signalkaskade. Zeitlich versetzt zur Src-Rekrutierung bindet die Phosphatase PTP-BL an den zytoplasmatischen Anteil von ephrinB und dephosphoryliert nicht nur ephrinB, sondern auch Src und inaktiviert so die Phosphotyrosin-abhängige Signaltransduktion. Zusätzlich führt die Bindung der Phosphatase auch zu einer Signalübertragung. Man unterscheidet *also* zwei hintereinander geschaltete, unterschiedliche Signalwege: einen ersten, von der ephrinB-Tyrosinphosphorylierung abhängigen und einen zweiten, von der Dephosphorylierung abhängigen Signalübertragungsweg (Palmer *et al.*, 2002).

1.3 T-Zellrezeptor-Aktivierung und Co-Stimulation

Der T-Zell-Rezeptor (TZR) besteht aus zwei Untereinheiten, den transmembranen α und β Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Diese beiden Ketten assoziieren an der Zelloberfläche mit dem invarianten CD3 Komplex (CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD3 ζ), der nach Aktivierung des TZRs durch Antigenbindung Signale in die Zelle transduziert (Punt *et al.*, 1994). Vom TZR werden nur antigene Peptide erkannt, die auf MHC- (engl.: major histocompatibility complex) Molekülen anderer Zellen präsentiert werden. MHC Klasse I Moleküle präsentieren Peptide intrazellulärer Antigene, wie z.B. virale Proteine; MHC Klasse II Moleküle hingegen Peptide extrazellulärer Antigene, die internalisiert und in vesikulären Kompartimenten degradiert wurden (Davis *et al.*, 1988; Werlen *et al.*, 2003). Eine der ersten biochemischen Konsequenzen der TZR/Antigen-Bindung ist die Aktivierung von Lck, einer Protein Tyrosin Kinase (PTK) der Src Familie. Diese Kinase phosphoryliert spezielle Signalmotive des zytoplasmatischen Anteils der β -Untereinheit des TZR/CD3-Komplexes. Die Phosphorylierung dieser so genannten Immunorezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotive (ITAMs) führt zur Bindung und Aktivierung von Molekülen einer zweiten Klasse von Protein-Tyrosin-Kinasen, der ZAP-

70/syc Familie (Eischen *et al.*, 1997) über deren SH2-Domäne (engl.: Src homology domain 2). ZAP-70 wiederum phosphoryliert das Linkerprotein LAT (engl.: linker of activated T-cells; Zhang *et al.*, 1998a), welches seinerseits verschiedene Adaptorproteine wie Grb-2 oder Gads rekrutiert. Gads bindet an SLP-76, welches über den GDP/GTP-Austauschfaktor Vav die Neuorganisation des Zytoskeletts reguliert und Transkriptionsfaktoren wie NFAT aktiviert (Kane *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von ZAP-70 führt außerdem zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC)- β 1 (Siegel *et al.*, 1991) und Phosphatidylinositol 3'-OH Kinase (PI3-K)/GDP-Rac (Cantrell *et al.*, 1998). Die Aktivierung der PLC- β 1 resultiert in der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Protein-Kinase-C (PKC)-Aktivierung (Villalba *et al.*, 1999). Diese sind verantwortlich für die Aktivierung der Kalzium- und Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin, die ihrerseits Calcineurin-abhängige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFAT (engl.: nuclear factor of activated T-cells) bzw. indirekt Egr2 und Egr3, aktiviert (Latinis *et al.*, 1997a; Rengarajan *et al.*, 2000). Die Aktivierung von T-Zellen durch TZR/CD3-Stimulation führt über LAT/Grb2/SOS zur Induktion einer Ras-aktivierten Kaskade von Kinasen, wie z.B. Raf, MEK (MAPK-Kinase), ERK (extracellular signal related kinase) und p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Pastor *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1999).

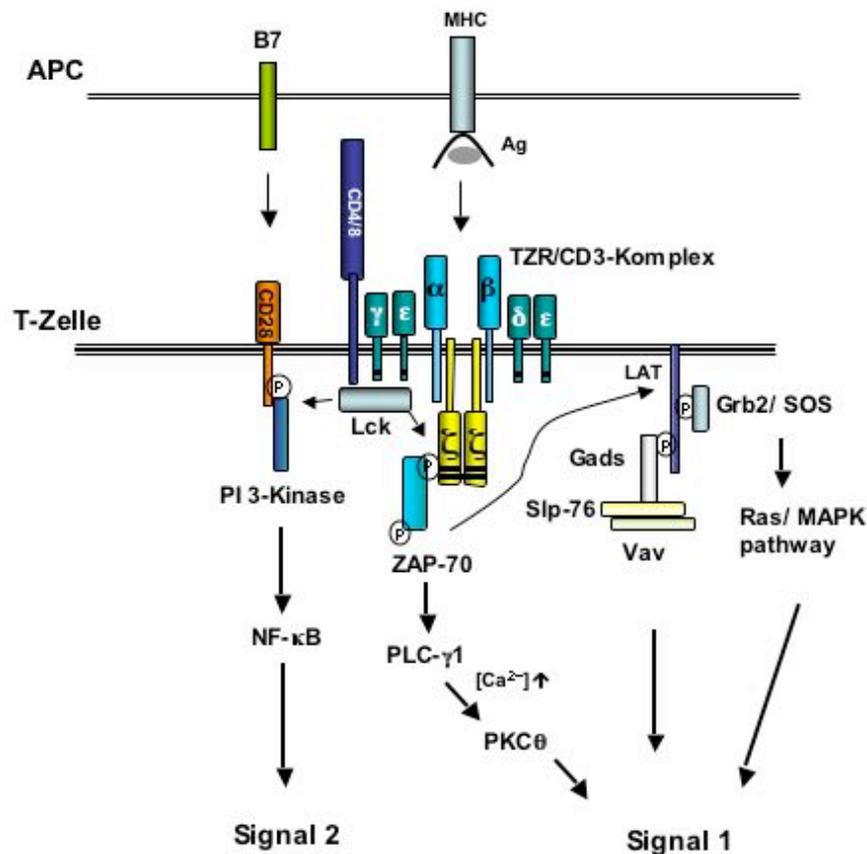


Abb.1.5: Die durch MHC/Antigen vermittelte Signalübertragung des T-Zell-Rezeptors

Die Aktivierung des TZR durch Bindung von mit Antigen beladenen MHC-Molekülen führt zur Rekrutierung der Kinase Lck, zur Phosphorylierung der zytosolischen ζ -Kette und zu verschiedenen Signalkaskaden, die das so genannte Signal 1 repräsentieren. Zur vollständigen T-Zellaktivierung werden co-stimulatorische Signale, z.B. über Bindung der B7 Liganden (CD80/CD86) an den CD28 Rezeptor, benötigt (Signal 2). Dieses Signal führt über PI3-Kinase zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

(Abb. modifiziert nach Singer und Koretzky; Science, 2002)

Um eine vollständige Immunantwort auszulösen, wird zusätzlich zur Antigenerkennung (Signal 1) noch ein zweites, co-stimulatorisches Signal benötigt (Signal 2). Das wichtigste co-stimulatorische Molekül ist der CD28 Rezeptor, dessen zugehörige Liganden, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), auf antigenpräsentierenden Zellen (engl.: antigen presenting cells, APC) wie aktivierten B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Die CD28-vermittelte T-Zellaktivierung geht einher mit erhöhter IL-2 Sekretion, Inhibition von Apoptose und der Differenzierung von T-Zellen zu Effektorzellen (Boise *et al.*, 1995). Fehlt das durch CD28 induzierte co-stimulatorische Signal, wird die Zelle nicht vollständig aktiviert (Chung *et al.*, 2003).

Ein weiterer zu CD28 homologer Rezeptor, der hochaffin an B7.1 und B7.2 binden kann, ist CTLA-4 (engl.: cytotoxic t-lymphocyte associated antigen). Dieser Rezeptor wird wenige Tage nach T-Zellaktivierung hochreguliert und inhibiert die T-Zellaktivierung über Rekrutierung der inhibitorischen Phosphatase SHIP (Grohmann *et al.*, 2003).

Andere co-stimulatorische Moleküle sind ICOS, 4-1BB, OX-40, CD27 und CD28 aber auch CD95 bzw. CD95L (Watts *et al.*, 1999). Abgesehen von 4-1BB besitzen diese Moleküle jedoch nicht das gleiche co-stimulatorische Potential wie CD28 zur Aktivierung nativer T-Zellen (DeBenedette *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2000).

Unter experimentellen Bedingungen lässt sich die durch Antigen/MHC-induzierte TZR-Aktivierung mit anti-CD3-Antikörpern erreichen. Zur vollständigen Aktivierung sind auch hier co-stimulatorische Signale notwendig, die z.B. durch anti-CD28-Antikörper induziert werden können.

Eine wichtige Rolle für die Aktivierung von T-Lymphozyten spielen spezielle glycolipid- und cholesterolreiche Mikrodomänen der Zellmembran, die als „Lipid rafts“ bezeichnet werden. Lipid Rafts oder GEMs (engl.: glycolipid-enriched membranes) sind bei 37°C in niedrigen Konzentrationen nicht-ionischer Detergentien unlöslich (Brown und Rose, 1992; Sargiacomo *et al.*, 1993; Madore *et al.*, 1999; Drevot *et al.*, 2002). Acylierte und Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-gekoppelte Proteine konzentrieren sich in diesen Membrandomänen. Nach TZR-Aktivierung verlagern sich einige nicht mit Lipiden modifizierte („non-lipid-modified“) Signalmoleküle wie der phosphorylierte Anteil der ζ -Kette in diese Bereiche und werden dort angereichert. Diese Rekrutierung bringt das an der phosphorylierten ζ -Kette assoziierte ZAP-70 in die Nähe seiner Substrate, wie z.B. LAT, welches palmitoyliert vorliegt und konstitutiv in Rafts lokalisiert (Zhang *et al.*, 1998b). In anderen Untersuchungen wird die Rekrutierung des gesamten TZR-Komplexes in Lipid Rafts beobachtet (Drevot *et al.*, 2002; Montixi *et al.*, 1998). Eine Konzentration von Lipid Rafts findet man im Bereich der immunologischen Synapse (Hiltbold *et al.*, 2003), der Kontaktstelle von T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle, die durch die Anhäufung von TZR-Molekülen, die von einem Ring aus Adhensionsmolekülen umgeben sind, charakterisiert ist (Monks *et al.*, 1998; Werlen und Palmer, 2002). Darüber hinaus scheinen Lipid Rafts in T-Zellen auch eine Verbindung zwischen dem TZR und dem Zytoskelett herzustellen. Es konnte

gezeigt werden, dass die Assoziierung der β -Kette mit dem Zytoskelett von intakten Lipid Rafts abhängig ist (Moran *et al.*, 1998).

Auch für viele andere transmembrane Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie nach Ligandenaktivierung in Rafts angereichert werden. Der CD95 Rezeptor ist konstitutiv in Rafts lokalisiert; nach Aktivierung durch den Liganden oder agonistische Antikörper aggregieren jedoch mehrere CD95-Moleküle und es kommt zur Rekrutierung von FADD und Caspase-8 (Grassme *et al.*, 2001; Hueber *et al.*, 2002; Scheel-Toellner *et al.*, 2002). Die Lokalisierung in Rafts ist essentiell für die CD95-induzierte Apoptose, da chemische Substanzen, die Cholesterol depletieren und so die Rafts zerstören, CD95-induzierte Apoptose hemmen (Hueber *et al.*, 2002).

1.3.1 Apoptose im Immunsystem

Die Deregulation von Apoptose spielt in verschiedenen Krankheiten eine wichtige Rolle. Dabei gibt es Situationen, in denen zuviel Apoptose Ursache für das Krankheitsbild ist - wie bei Alzheimer (Barr *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1995) oder AIDS - oder aber es wird zuwenig Apoptose induziert, wie z.B. bei Krebs oder verschiedenen Autoimmunkrankheiten (Strasser *et al.*, 1990; Suda *et al.*, 1997d).

Auch im Immunsystem hat der programmierte Zelltod einen wichtigen Stellenwert. Bei der Immunabwehr werden Pathogene oder infizierte Zellen von Immunzellen erkannt und durch Antikörper oder T-Zellen vernichtet. Wenn eine zytotoxische T-Zelle (engl.: cytotoxic T-lymphocytes, CTL) unerwünschte, verletzte oder infizierte Zellen erkennt, sekretiert sie Proteine wie Perforin oder Granzym B, die Apoptose in der Zielzelle auslösen. Zusätzlich exprimieren zytotoxische T-Zellen nach Stimulation den CD95 Liganden auf ihrer Oberfläche und sind so in der Lage, über den CD95 Rezeptor Apoptose in Zielzellen zu induzieren. Native, d.h. noch nicht aktivierte T-Lymphozyten, werden nach Stimulation des T-Zellrezeptors durch Bindung MHC-gebundener antigener Peptide aktiviert, was eine spezifische Immunantwort auslöst. Die Zellen sekretieren Zytokine wie IL-2 und beginnen zu proliferieren. Im Gegensatz dazu wird in zuvor aktivierten T-Zellen auf dasselbe Signal hin („Re-Stimulation“) aktivierungsinduzierter Zelltod (engl.: activation induced cell death, AICD) ausgelöst (Dhein *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1990). Durch AICD werden reaktive T-Zellen entfernt und so die Immunantwort beendet. Die Auslösung der Apoptose geschieht jedoch

erst einige Zeit nach Beginn der Aktivierung; frisch aktivierte T-Zellen sind gegenüber Apoptose resistent (Green *et al.*, 1992). Die später auftretende Sensitivität gegenüber AICD steht im Zusammenhang mit der ansteigenden Expression von CD95 und CD95L sowie mit dem Abfall des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP innerhalb der ersten drei Tage nach antigener Stimulation (Janssen *et al.*, 2000; Refaeli *et al.*, 1998). Es können drei Phasen unterschieden werden, in der sich die Sensitivität der T-Lymphozyten gegenüber CD95L-induzierter Apoptose ändert. Auf die klonalen Expansions- und Effektor-Phasen nach Antigenerkennung, in denen die IL-2 abhängige Proliferation und die Beseitigung des Pathogens stattfinden, folgt die Deletions-Phase, in der die Zellen sensitiv gegenüber AICD sind. Nur wenige Zellen bleiben gegenüber dem AICD resistent und differenzieren zu CD95-unempfindlichen Gedächtniszellen (s. Abb1.6).

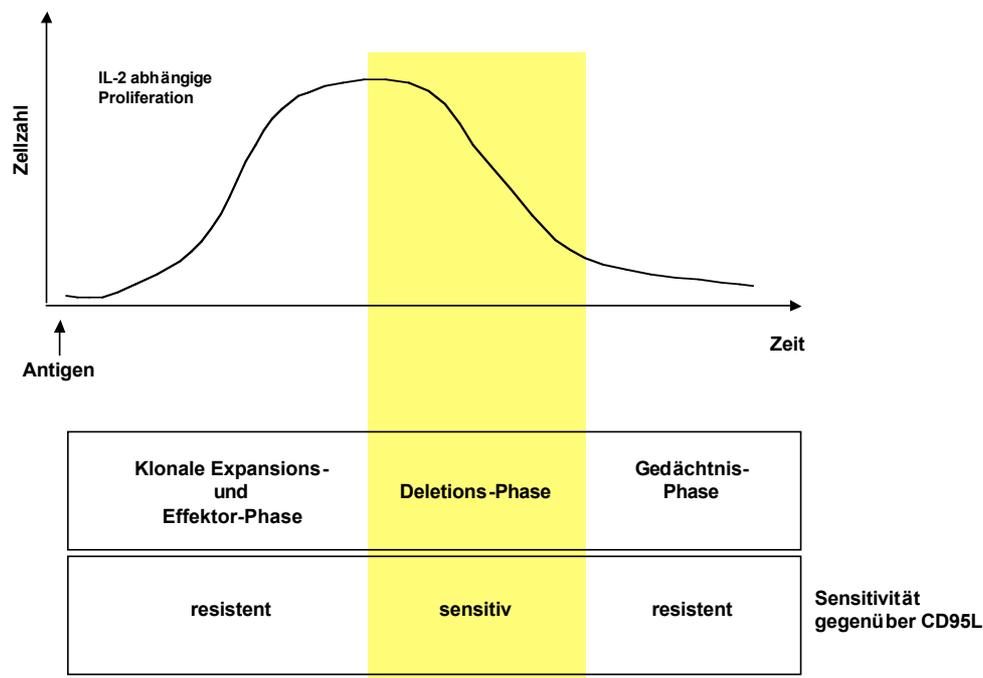


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der T-Zell-Immunantwort

Nach Erkennen des Antigens proliferieren antigenspezifische T-Zellen und differenzieren zu Effektorzellen. Nach Beseitigung des Antigens sterben die T-Zellen über einen Mechanismus, den man aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) nennt. In dieser Deletionsphase sind T-Zellen sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Nur wenige Zellen bleiben resistent gegenüber AICD und differenzieren zu Gedächtniszellen.

(Abb. nach: „nature insight apoptosis“; Krammer, 2000)

Der Hauptweg des AICDs erfolgt über das CD95/CD95L-System, da der Zelltod verhindert werden kann, wenn die CD95/CD95L-Interaktion blockiert wird (Alderson *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995). *In vitro* beobachtet man bei Reaktivierung von T-Zellen die Expression von CD95L, was den Zellen ermöglicht, benachbarte CD95-positive Zellen zu eliminieren (Janssen *et al.*, 2000).

Tumorzellen sind durch unkontrollierte Proliferation und eine erhöhte Apoptoseresistenz gekennzeichnet. Erfolgreiche Strategien für eine Tumorthherapie basieren daher darauf, die Proliferation zu stoppen und die Blockade des zellulären Selbstmordprogramms aufzulösen. Umstritten ist die Beobachtung, dass manche Tumorzellen CD95L exprimieren und so in der Lage sein könnten, Apoptose in angreifenden Immunzellen zu induzieren. Dadurch würden sie dem Angriff des Immunsystems entkommen. Diese Deletion von tumor-reaktiven T-Lymphozyten wird als „tumor counterattack“ Hypothese bezeichnet (Bennett *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1998). Allerdings wurden auch dieser Hypothese widersprechende Daten publiziert. So wurde über eine starke Entzündungsreaktion mit Neutrophileninfiltration, induziert durch CD95L-positive Tumoren, berichtet, da sCD95L ein chemischer Lockstoff für Neutrophile zu sein scheint (Otonello *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 1997s). Injektion von CD95L-positiven Tumorzellen in Mäuse führte nicht zur Entwicklung von Tumoren (Igney *et al.*, 2000), sondern zu einer starken neutrophilenvermittelten Immunantwort gegenüber den transplantierten Zellen (Seino *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Sogar die Induktion von CD95L auf bereits existierenden Tumoren im Mausmodell führt zur deren Abstoßung (Igney *et al.*, 2003).

1.4 Der CD95 Ligand

Der CD95 Ligand (FasL/Apo-1L/TNFSF6/CD178) bindet und aktiviert den CD95 Rezeptor (Fas/Apo-1), wodurch in der Regel Apoptose induziert wird. Sowohl der Rezeptor, als auch der Ligand liegen in dieser Bindung als Trimer vor (s.Abb.1.7). In der Abbildung sind die Ligandenmonomere in blau mit jeweils drei glycosylierten Asparaginen (rosa) dargestellt und die CD95 Rezeptormoleküle in grün.

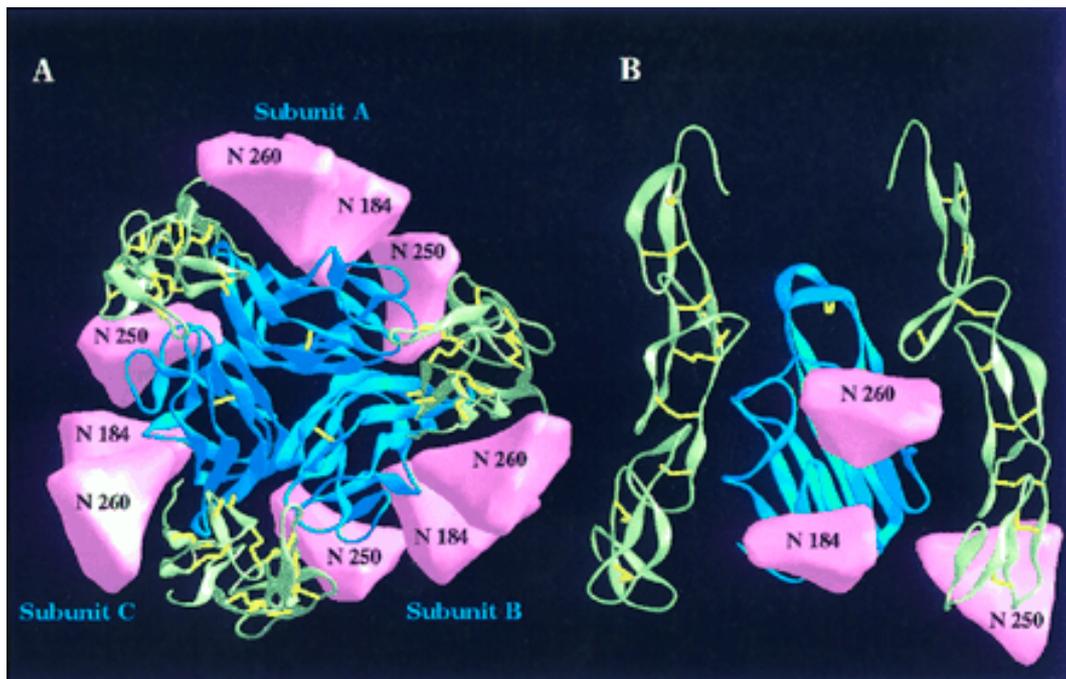


Abb.1.7: Modell der CD95/CD95L-Interaktion

Schematische Darstellung des hexameren CD95/CD95L-Komplex. Die Ligandenmonomere sind **blau** dargestellt, die Rezeptormoleküle **grün** und Disulfid-Brücken **gelb**. In **rosa** werden die N-verlinkten Glycane dargestellt (N=Asparagin).

A: Aufsicht; **B:** Seitenansicht

(Abb. aus Schneider *et al.*, JBC, 1997)

Der CD95 Ligand wurde 1993 als ein aus 281 Aminosäuren bestehendes Typ II Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa identifiziert (Suda *et al.*, 1993). Hauptsächlich wird dieses Protein auf Lymphozyten, NK-Zellen und im immunprivilegierten Gewebe (Griffith *et al.*, 1995; Bellgrau *et al.*, 1995; Hunt *et al.*, 1997; Suda *et al.*, 1995) sowie konstitutiv in verschiedenen Tumoren exprimiert (Hahne *et al.*, 1996; Niehans *et al.*, 1997). Immunprivilegierte Gewebe, wie z.B. Auge, Ovar, Plazenta oder Hoden, sind von der normalen Immunantwort ausgenommen (Barker and Billingham, 1977). In diesen Geweben werden CD95-positive infiltrierende Lymphozyten durch Apoptose beseitigt, da die Epithelzellen dieser Gewebe den CD95L exprimieren (Griffith *et al.*, 1995, 1997).

CD95L kommt auch als lösliches, trimeres Protein (3x26 kDa) vor, welches als weniger effizient in der Induktion von Apoptose beschrieben wurde (Krammer, 1998; Tanaka *et al.*, 1995) oder sogar CD95L vermittelte Apoptose inhibieren soll (Schneider *et al.*, 1998; Suda

et al., 1997). Die lösliche Form des CD95 Liganden wird durch Abspaltung des extrazellulären Anteils durch eine Metalloproteinase generiert. Das humane membranständige Protein wird von einer ADAM (engl.: α -disintegrin-and- α -metallopeptidase) Metalloproteinase zwischen Serin 126 und Leucin 127 (Schneider *et al.*, 1998), das murine Protein durch Matrilysin (Matrixmetalloproteinase 7) zwischen Lysin 129 und Glutamin 130 gespalten (Tanaka *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1999). Werden mehrere lösliche CD95L Moleküle miteinander verknüpft, induzieren sie effizient Apoptose, und es wurde gezeigt, dass dafür mindestens eine hexamere Struktur, bestehend aus zwei Trimeren, notwendig ist (Holler *et al.*, 2003).

Manche Zellen, wie z.B. aktivierte humane T-Zellen oder Melanomzellen, sekretieren außerdem CD95L exprimierende Microvesikel, die in der Lage sind, Apoptose in CD95 tragenden Zellen auszulösen (Martinez-Lorenzo *et al.*, 1999; Monleon *et al.*, 2001; Andreola *et al.*, 2002).

Das humane Gen für CD95L liegt auf Chromosom 1q23, besteht aus vier Exons und ist 8kb groß. Murines und humanes Gen besitzen eine Homologie von 76,9% (Takahashi *et al.*, 1994). Wie in der Abbildung 1.8 gezeigt wird, repräsentiert der C-Terminus des transmembranen CD95L-Proteins die extrazelluläre Region, die homolog zu anderen TNF-Familienmitgliedern ist und nach Proteasespaltung als lösliche Form des CD95L (sCD95L) auftritt. In dieser extrazellulären Region befinden sich auch die Trimerisierungsdomäne (Aminosäure 137-183) sowie drei potentielle N-Glycosylierungsstellen (Asn 184, 250, 260). Verantwortlich für die Rezeptorbindung ist das äußere C-terminale Ende des Liganden (Orlinick *et al.*, 1997).

Der 80 Aminosäuren lange zytoplasmatische N-Terminus des CD95L ist reich an Prolinen (Aminosäuren 37-70) und enthält mehrere potentielle SH3-Bindungsdomänen (Hane *et al.*, 1995). Bei keinem anderen Mitglied der TNF-Superfamilie wird eine solche prolinreiche Region (engl.: proline rich domain, PRD) gefunden. Des Weiteren weist der intrazelluläre Anteil die Konsensussequenz einer Casein Kinase I Phosphorylierungsstelle (-SXXS-) (Watts *et al.*, 1999) und eine putative Kernlokalisierungssequenz (engl.: nuclear localization sequence; NLS) (V. Kirkin, nicht veröffentlicht) auf. TNF α besitzt ebenfalls eine Casein Kinase I Phosphorylierungssequenz sowie eine funktionale NLS, die dafür verantwortlich ist,

dass der nach Abspaltung des extrazellulären Bereiches verbleibende intrazelluläre und transmembrane Anteil von TNF α im Kern lokalisiert ist (Domonkos *et al*, 2001).

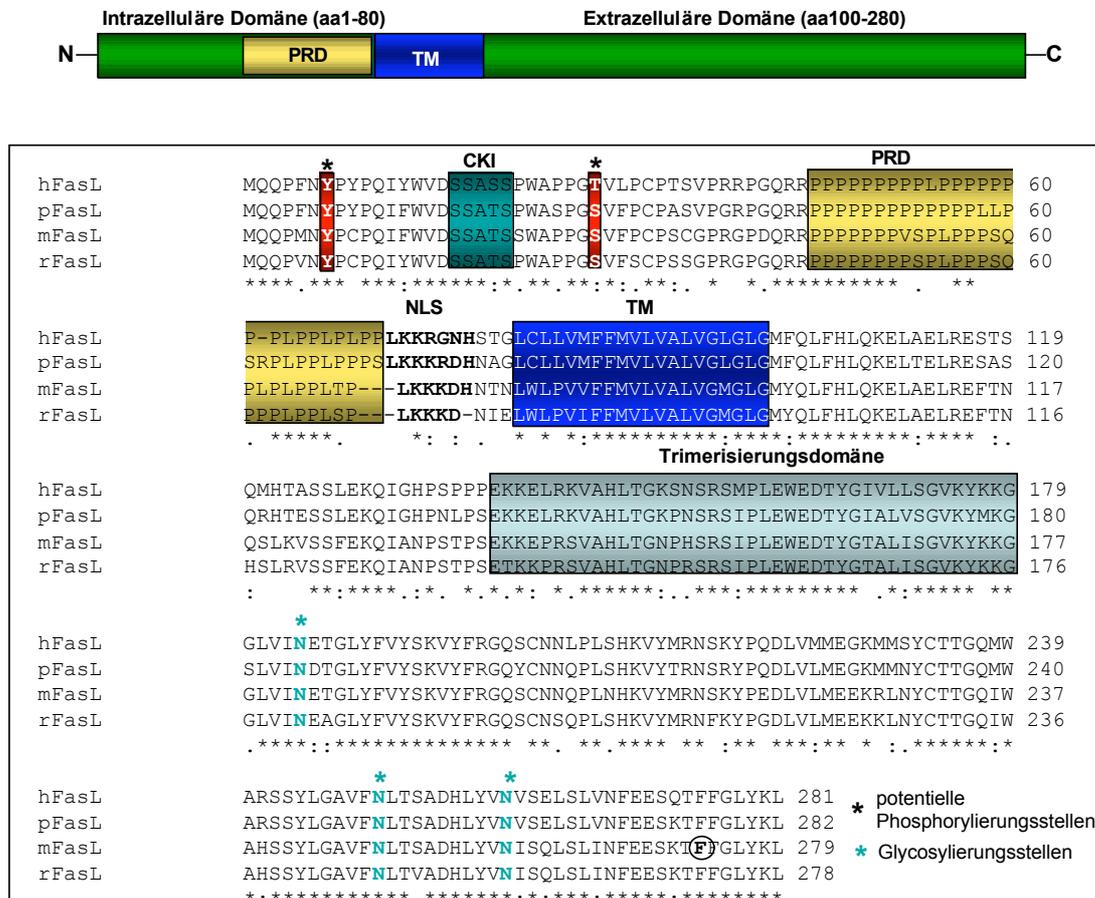


Abb. 1.8: Domänenstruktur und Aminosäuresequenz des CD95 Liganden

CD95L ist ein Typ II Transmembranprotein mit einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembran- (TM) und einer C-terminalen extrazellulären Domäne. In der zytoplasmatischen Domäne befindet sich eine Casein Kinase Phosphorylierungsstelle (CKI), eine prolinreiche Region (PRD) und eine potentielle Kernlokalisationsdomäne (NLS). Im extrazellulären Bereich findet man die Trimerisierungsdomäne und mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen. Für die Rezeptorbindung ist der äußere C-Terminus verantwortlich. Die inaktivierende Punktmutation, die man in *gld*-Mäusen findet, ist durch einen Kreis gekennzeichnet (F \square L) (Takahashi *et al.*, 1994).

Der CD95 Ligand von Mensch (h), Maus (m), Ratte (r) und Schwein (p) ist stark konserviert.

Die Bindung des CD95 Liganden an den CD95 Rezeptors führt zur Rekrutierung von FADD und Procaspase-8 an den zytoplasmatischen CD95-Anteil und zur Bildung des DISC. Dabei wird Procaspase-8 aktiviert und spaltet wiederum andere Caspase-8 Moleküle und auch Effektorcaspasen wie Caspase-3. In den sogenannten Typ II Zellen führt die Aktivierung von Caspase-8 zur Spaltung von Bid (s. Abschnitt 1.2.2).

Ein zweiter Rezeptor, der CD95L binden kann, ist DcR3 (Decoy receptor 3) (Pitti *et al.*, 1998). Dieser lösliche Rezeptor hat keine aktivierende Funktion, sondern inhibiert durch seine Anwesenheit CD95L vermittelte Apoptose. Das DcR3-Gen ist in 50% aller primären Lungen- und Kolontumoren und sogar in 71% aller Pankreastumorzelllinien amplifiziert (Tsuji *et al.*, 2003). Viele Tumoren sind resistent gegenüber CD95L, auch wenn sie CD95 auf der Zelloberfläche exprimieren, was z.T. an der gleichzeitigen Sekretion von DcR3, aber auch an der vermehrten Expression inhibitorischer Moleküle liegt.

1.4.1 Die Bedeutung des CD95L im Immunsystem und für bestimmte Krankheitsbilder

Der so genannte aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) in peripheren T-Zellen wird hauptsächlich über das CD95/CD95L-System gesteuert (Alderson *et al.*, 1995). Dabei wird in T-Zellen, die nach Antigenstimulation beginnen klonal zu expandieren, nach einer gewissen Zeit Apoptose induziert. Dadurch werden überzählige T-Zellen nach erfolgter Immunantwort eliminiert. Zusätzlich ist dieses System mit verantwortlich für den CTL-vermittelten Tod von virusinfizierten oder transformierten Zellen.

Mäuse, die Mutationen in den Genen von CD95 („*lpr*“) oder CD95L („*gld*“) aufweisen, die dazu führen, dass über das CD95/CD95L-System keine Apoptose mehr induziert werden kann, leiden an lymphoproliferativen Erkrankungen (Takahashi *et al.*, 1994; Nagata und Suda, 1995). Ein Gendefekt, der zum *lpr* („lymphoproliferation“)- Phänotyp führt, ist die Rekombination eines Retrotransposon in das Intron 2 des CD95-Gens, was zu einem veränderten Gentranskript mit verringerter Stabilität führt. Dies hat eine verringerte Expression des Rezeptors zur Folge, so dass es zu einer deutlich verminderten Apoptose von aktivierten T-Zellen bei diesen Mäusen kommt (Adach *et al.*, 1993, Mariani *et al.*, 1994). Eine andere Mutation im CD95-Gen führt zu ähnlichen Symptomen (*lpr^{cg}*). Die Oberflächenexpression des CD95-Rezeptors ist in *lpr^{cg}*-Mäusen nicht verändert, aber es liegt eine inaktivierende Punktmutation im Bereich der DD vor, die dazu führt, dass die Bindung von CD95L an CD95 keine Apoptose auslöst (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). In *gld* („generalized lymphoproliferative disease“) Mäusen hingegen ist der CD95 Ligand nicht mehr in der Lage, an den CD95 Rezeptor zu binden. Grund hierfür ist eine

Punktmutation, die eine Aminosäureveränderung im extrazellulären Bereich von CD95L verursacht (Phe₂₇₃ zu Leu₂₇₃) (Lynch *et al.*, 1994; Ramsdell *et al.*, 1994). Diese Region in der Bindestelle des CD95L ist innerhalb der TNF-Liganden-Familie hoch konserviert und generell für die Rezeptorbindung verantwortlich (Hahne *et al.*, 1995). In *lpr*- und *gld*-Mäusen akkumulieren doppelt negative CD4⁺CD8⁺B220⁺CD3⁺-T-Zellen, die von aktivierten T-Zellen abstammen, welche nach erfolgter Immunabwehr in diesen Tieren nicht mehr effektiv eliminiert werden. Phänotypisch sind die Mäuse durch Lymphadenopathy, Splenomegalie sowie hohe Titer von Auto-Antikörpern gekennzeichnet (Nagata und Suda, 1995). Kürzlich wurde auch eine CD95L-knock-out-Maus beschrieben, die (wie erwartet) einen ähnlichen, jedoch stärker ausgeprägten Phänotyp als in *gld*-Mäusen beobachtet, besitzt (Karray *et al.*, 2004).

Im Menschen wurde bisher keine Autoimmunkrankheit identifiziert, die ausschließlich auf Mutationen im CD95L-Gen beruht. Bei Patienten, die am Autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) leiden, findet man Mutationen in Genen, die an der CD95-induzierte Apoptose beteiligt sind, wie *CD95*, *caspase-8* und *caspase-10*, jedoch nicht im CD95L-Gen (Rieux-Laucat *et al.*, 2003). ALPS-Patienten besitzen einen ähnlichen Phänotyp wie *gld/lpr*-Mäuse, da man auch hier vermehrt Tumorbildung (Splenomegalie und Lymphadenopathy), Produktion von Autoantikörpern sowie eine Akkumulation von CD4⁺CD8⁺TZR⁺ doppelt negativen T-Lymphozyten findet. Ein ähnliches Krankheitsbild kennzeichnet SLE-(engl.: systemic lupus erythematosus) Patienten, die vermehrt Auto-Antikörpern produzieren, wobei auch anti-CD95L-Antikörpern nachgewiesen werden können. Die Anwesenheit dieser Antikörper sowie von löslichem CD95L im Serum dieser Patienten blockiert die CD95-vermittelte Apoptose in Lymphozyten (Mountz *et al.*, 1994; Mihara *et al.*, 2002). In einem von 75 SLE-Patienten wurde eine Deletion im Exon 4 des CD95L-Gens gefunden (Wu *et al.*, 1996). In Hashimoto-Thyroiditis-Patienten exprimieren die Thyrozyten neben funktionalem CD95L auch CD95 auf ihrer Oberfläche, was den apoptotischen Zelltod dieser Zellen zur Folge hat (Giordano *et al.*, 1997). Dies führt zur Zerstörung der Schilddrüse dieser Patienten. Auch bei Alzheimer scheint das CD95/CD95L-System eine wichtige Rolle zu spielen, da in Neuronen von *gld*-Mäusen, im Gegensatz zu Neuronen von Wildtyp-Mäusen, mit Aβ (Amyloid β) keine Apoptose induziert werden kann (Ethell *et al.*, 2002).

1.4.3 Die Lokalisation des CD95 Liganden

Der CD95L findet sich je nach Zelltyp in unterschiedlichen Zellkompartimenten. Im Allgemeinen erscheint der Ligand auf der Plasmamembran, er kommt jedoch auch intrazellulär in Monozyten (Kiener *et al.*, 1997) und Mastzellen (Wagelie-Steffen *et al.*, 1998) und in sekretorischen Vesikeln von CTLs sowie NK-Zellen (Bossi und Griffiths, 1999) vor. In reifen T-Zellen wird CD95L unterschiedlich auf den verschiedenen T-Zell-Subtypen exprimiert; auf CD4⁺-T-Zellen erscheint CD95L als ein membranständiges Protein hauptsächlich auf Th1- (T-helper 1) und auf manchen Th2-Zellen nach TZR-Stimulation (Ramsdell *et al.*, 1994). In CD8⁺ CTLs bzw. NK Zellen wird CD95L nach primärer Stimulation *de novo* synthetisiert und dann in sekretorischen Vesikeln/Lysosomen gelagert, welche auch Perforine und Granzyme speichern (Blott *et al.*, 2001). Nach Kontakt der Zelle z.B. mit einer virusinfizierten Ziel-Zelle führt das TZR-vermittelte Signal zu einer Neuorganisation des Zytoskeletts, welches zur Verschmelzung der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran führt. Dabei werden die zytotoxischen Moleküle in die immunologische Synapse entlassen und CD95L wird auf der Zelloberfläche präsentiert (Blott *et al.*, 2001; Bossi *et al.*, 1999). Durch den Transport des CD95L in die sekretorischen Vesikel und der dortigen Lagerung wird gewährleistet, dass der Ligand nur dann auf der Zelloberfläche erscheint, wenn eine Zielzelle über CD95-Rezeptoraktivierung getötet werden soll. Da CD95L nur an der Stelle des Kontaktes mit der Zielzelle erscheint, wird verhindert, dass andere CD95 positive Nachbarzellen unbeabsichtigt abgetötet werden (Clark und Griffiths, 2003). Blott und Kollegen konnten zeigen, dass die prolinreiche Region im intrazellulären Anteil des CD95L für den Transport zu und die Lokalisation des Proteins in den sekretorischen Vesikeln verantwortlich ist, wobei die für diesen Transport verantwortlichen Proteine noch nicht identifiziert wurden. Fehlt diese Domäne, wird CD95L nach Modifikation im Golgi-Apparat direkt an die Zelloberfläche transportiert (Abb.1.10). In allen anderen Zellen, die diesen speziellen Typ von sekretorischen Lysosomen nicht besitzen, wird CD95L konstitutiv an der Zelloberfläche exprimiert (Blott *et al.*, 2001; Bossi *et al.*, 2000).

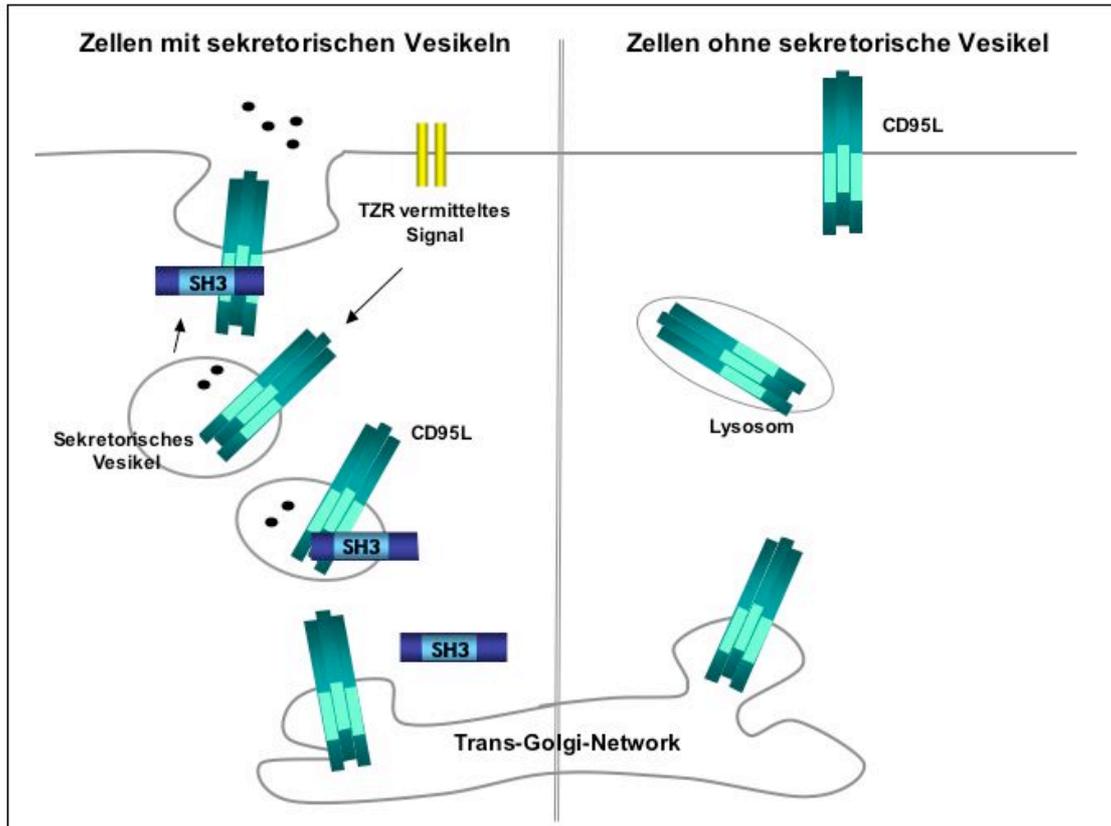


Abb.1.10.: Transport des CD95L zur Zelloberfläche in Zellen mit bzw. ohne sekretorische Vesikel

In Zellen mit sekretorischen Vesikeln, wie CTLs und NK-Zellen, wird CD95L synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und in sekretorischen Vesikeln gespeichert. Nach einem TZR-vermitteltem Signal werden die sekretorischen Vesikel mit dem CD95L zur Zelloberfläche transportiert. Laut Blott und Kollegen ist die prolinreiche Region des CD95L und ein unbekannter Bindungspartner, der vermutlich eine SH3-Domäne aufweist, für diesen Transport verantwortlich. In Zellen, die keine sekretorischen Vesikel besitzen, wird der Ligand konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert.

(Abb. nach Blott *et al.*, 2001)

1.4.4 „Reverse signalling“ über den CD95 Liganden

Während die meisten Arbeiten über CD95L sich auf die apoptoseauslösende Funktion des Liganden über die Rezeptoraktivierung konzentriert haben, wurden kürzlich in mehreren Publikationen Evidenzen für eine reverse Signalübertragung über CD95L präsentiert: Suzuki und Kollegen beschrieben einen positiven Einfluss der Signalübertragung des CD95 Liganden auf die Proliferation CD8-positiver T-Zellen (Suzuki und Fink, 1998). Sie beobachteten, dass CTL-Zelllinien von *gld* Mäusen nach antigener Stimulation (Kokultivierung von CTLs mit APCs) im geringeren Ausmaß als Wildtypzellen wuchsen und schlossen daraus, dass eine optimale Proliferationsrate abhängig von funktionalem CD95L

zu sein scheint, da nach optimaler CD3-Stimulation *in vitro gld* CTLs genauso stark proliferierten wie Wildtyp CTLs. Daher konnte ein genereller Defekt in der TZR-Signalübertragung dieser Mäuse ausgeschlossen werden. Die Stimulation mit Fas-Fc (ein dimeres Molekül, welches aus dem extrazellulären Bereich von CD95 (Fas), kovalent gebunden an den konstanten Fc-Teil des humanen IgG, besteht) zusätzlich zu suboptimaler CD3-Aktivierung zeigte den gleichen positiven Einfluss auf die Proliferation CD8-positiver T-Zellen. Um der Situation des membranständigen CD95 Rezeptors möglichst nahe zu kommen, wurde Fas-Fc nicht in löslicher Form verwendet, sondern auf dem Boden der Zellkulturschale immobilisiert. Auch *in vivo* wurde ein co-stimulatorische Effekt des CD95L beobachtet (Suzuki *et al.*, 2000). In einem anderen Report wird über die Induktion von Zellzyklusarrest und die Inhibition der IL-2 Expression in CD4-positiven T-Zellen durch CD95L-Aktivierung berichtet (Desbarats *et al.*, 1998). Hier wurden Wildtyp und *lpr* CD4⁺-T-Zellen mit suboptimalen Konzentrationen von anti-CD3-Antikörpern plus Fas-Fc inkubiert und es wurde eine verringerte T-Zellaktivierung, erkennbar an der Inhibition der Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. CD69 und CD25 und Proliferationsinhibition beobachtet. Dieses Phänomen wurde in CD95L-defizienten *gld*-CD4⁺-T-Zellen nicht gesehen. Suzuki und Kollegen wiesen jedoch darauf hin, dass die von Desbarats *et al.* gemachten Beobachtungen auch damit zusammenhängen könnten, dass CD4⁺-T-Lymphozyten sensitiver gegenüber CD95L-induzierter Apoptose sind als die weitgehend resistenten CD8⁺-T-Lymphozyten und dieser Zelltod parallel zur Co-Stimulation auftritt. In ihren Experimenten wurde *in vitro* eine Co-Stimulation auch in CD4⁺-T-Zellen beobachtet. Die Arbeiten legen nahe, dass die reverse Signalübertragung über den CD95 Liganden Einfluss auf das zelluläre Proliferationsverhalten von T-Lymphozyten haben kann.

Die Expression von CD95L spielt nicht nur in haematopoietischen Zellen, sondern auch in immunprivilegierten Geweben, wie z.B. im Hoden, eine wichtige Rolle. Die Maus Sertoli-Zelllinie TM4 exprimiert CD95L konstitutiv auf der Oberfläche und „Crosslinking“ durch anti-mCD95L-Antikörper führt zur Phosphorylierung von Erk1 (p44-MAPK) und Erk2 (p42-MAPK) und zur cPLA₂ (Phospholipase A₂)-Aktivierung (Ulisse *et al.*, 2000). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die rückwärtige Signalübertragung über den Liganden nicht nur in T-Zellen stattfindet.

1.5 Ziel der Arbeit

Da nicht nur die extrazelluläre Domäne des CD95L wichtige Funktionen, wie die Auslösung von Apoptose durch Bindung an CD95, vermittelt, sondern auch der intrazelluläre Anteil Signale transduziert und für die Lokalisierung des CD95L verantwortlich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach zytoplasmatischen CD95L-Interaktionspartnern gesucht. Neben den funktionellen Evidenzen für eine rückwärtige Signalübertragung deuten auch die starke Konservierung der intrazellulären Domäne des CD95L und das Vorhandensein einer prolinreichen Proteininteraktionsdomäne auf noch nicht identifizierte Interaktionspartner hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hefe-2-Hybrid Screen mit der intrazellulären CD95L-Domäne durchgeführt, um interagierende Proteine zu finden, die an diesen zytoplasmatischen Anteil des CD95L binden. Die im Hefesystem gefundenen Interaktionen sollten anschließend *in vitro* und in Säugerzellen verifiziert und –soweit möglich– einer Funktion zugeordnet werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der CD95 Ligand genau wie der CD95 Rezeptor auf der Zelloberfläche in so genannten Lipid Rafts lokalisiert, was eine weitere Ebene der Regulation verschiedener CD95L-Funktion darstellen würde.

- UV-Schirm Modell Transluminator mit Videokamera, Bildschirm und Videoprinter (Fa.UVP Inc./San Gabriel, USA)
- Gelrockner Modell 483 (Fa.BioRad/München)
- Speed Vac Univapo 150 H (Fa.Kraupa/Martinsried)
- UV/Vis Diode Array Spectrophotometer (Fa.WPA/Cambridge, England)
- UV-Quarzküvetten 6030/40 (Fa.Zeiss/Jena)
- Stickstofftank Typ Chronos Biosafe (Fa.Messer-Griesheim/Düsseldorf)
- Sicherheitswerkbank Typ HA 2448 (Fa.Heraeus/Hanau)
- Laminar Air Flow Gelaire Class 100 (Fa.Gelman/Mailand)
- Milli-Q Water System (Fa.Millipore/Eschborn)
- Kühlschrank (4 °C) + Gefrierschrank (-20 °C) "Glassline" (Fa.Liebherr/Ochsenhausen)
- Gefrierschrank CFC Free (-80 °C) (Fa.Sanyo/Wiesloch)
- Wasserbäder (Fa.GFL/Burgwedel)
- Vortex Genie2 (Fa.Bender & Hobein AG/Zürich, Schweiz)
- Magnetrührer Modell IKA-Combimag RCH (Fa.IKA Labortechnik/Staufen)
- pH-Meter Modell PHM 83 autocal (Fa.Radiometer/Kopenhagen, Dänemark)
- Mikrowelle Privileg 7533P (Fa.Quelle/Fürth)
- Waage Modell 1219 MP und Feinwaage Modell H10T (Fa. Satorius/Göttingen)
- Drehrad für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa.Gerlinde Kister/Mühlhausen)
- Elektroporationsanlage/-küvetten BioRad Gene-Pulser (Fa.BioRad/München)
- Pipetten (Fa.Abimed/Düsseldorf)
- Pipetus-akku für Glaspipetten (Fa.Hirschmann/Neckartenzlingen)
- Hypercassette (Fa Amersham/Buckinghamshire, England)
- Bunsenbrenner Usbeck Typ 1230/1

Chemikalien und Materialien

□-Mercaptoethanol	Sigma, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis Grade)	LifeTech., USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat) 10% in H ₂ O	Sigma, Steinheim
3-AT (3-Amino-1, 2, 4-triazol)	Sigma, Steinheim
Borsäure	Sigma, Steinheim
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (CH)
DNA-Marker (1kb Leiter)	New England Biolab,

DOPA (drop out agar, für Hefe)	Schwalbach
CSM/SD (synthetic minimal medium, für Hefe)	BIO 101/ CA, USA
DMF (N, N-Dimethylformamid)	BIO 101/ CA, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxid)	Sigma, Steinheim
DTT (Dithiothreitol)	Merck, Darmstadt
ECL-Lösung	Sigma, Steinheim
EDTA(Ethylen Diamin Tetra Acetat)	AmershamPharmacia
Elektroporationsküvetten	Sigma, Steinheim
EtOH (Ethanol)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glaskügelchen	Sigma, Steinheim
Glutathion-Agarose	Sigma, Steinheim
H ₂ O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
IPTG (Isopropylthio-beta-D-galactoside)	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Calbiochem
KCl (Kaliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
LiAc (Lithium Acetat)	Sigma, Steinheim
MgCl (Magnesiumchlorid)	Fluka, Buchs (CH)
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe
NaOH (Natronlauge)	AppliChem, Darmstadt
Na ₃ VO ₄ (Natriumvanadat)	Sigma, Steinheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
PAA (Polyacrylamid)	
(30% Acrylamid / 1%Bisacrylamid-Lösung)	Roth, Karlsruhe
PEG 4000 (Polyethylenglykol)	AppliChem, Darmstadt
Protein-Molekulargewichtsstandard	GibcoBRL, Karlsruhe
Protease-Inhibitor Mix (COMPLETE)	Roche, Mannheim
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate)	Sigma, Steinheim
Ponceau-Lösung	Fluka, Buchs (CH)
RNasin	Promega, Heidelberg
SDS (Sodium-Dodecyl-Phosphat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N, N, N', N`-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X 100	Fluka, Buchs (CH)
Tween 20	PharmaciaBiotech, Schweden

II. Material und Methoden

Whatman-Rundfilter	Merck, Darmstadt
YPD (Vollmedium für Hefe)	BIO 101/ CA, USA
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma, Steinheim

Radioaktive Reagenzien

[³⁵ S]Methionin (>1000 Ci/mmol; 10mCi/ml)	AmershamPharmacia Biotech
---	---------------------------

Häufig verwendete Lösungen

- 10 x TE (Tris-EDTA) 0,1 M Tris-HCl
 10 mM EDTA
 pH 7,5 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 1 M Tris pH 7,5 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,6 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)
- 0,75 M Tris-HCl pH 6,8 (mit konz. HCl einstellen, steril filtrieren)

- 10 x Li-Ac 1 M Li-Ac
 pH 7,5 (mit Eisessig einstellen, steril filtrieren)
- 50 % (w/v) PEG (steril filtrieren)
- 10 M NaOH
- 1 M 3-AT (steril filtrieren)
- 0,5 M EDTA pH 8,0 (mit konz. NaOH einstellen)

- 5 M KOAc 147,2 g KAc in 300 ml H₂O
 57,5 ml Eisessig
 142,5 ml H₂O
 pH 7,5 (mit Eisessig einstellen, steril filtrieren)
- 3 M NaOAc pH 5,2 (mit Eisessig einstellen)

II. Material und Methoden

- 10 mg/ml Herring Sperm. Carrier DNA (Fa. BIO 101, USA)
- 20 mg/ml X-Gal-Lösung in DMF
- Phenol: Chloroform: Isoamyl-Alkohol (25:24:1, Fa.Sigma)
- 1 x PEG/ LiAc/ TE 40% PEG 4000
 (für Hefe-Trans- 1 x TE
 formation) 1 x LiAc
- Hefe-Lysispuffer 2% Triton-X-100
 (für Hefe- 1% SDS
 Proteinextrakte) 100 mM NaCl
 10 mM Tris (pH 8,0)
 1 mM EDTA
- STET Puffer 8 % (w/v) Saccharose
 (für Hefe- 50 mM EDTA
 Plasmidisolation) 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 5% (v/v) Triton X-100
- GTE 50 mM Glucose
 (für Bakterien- 10 mM EDTA
 Plasmidisolation) 25 mM Tris
 pH 8,0 (steril filtrieren)
- Bakterien-Lysispuffer 0,2 N NaOH
 (für Plasmidisolation) 1 % SDS
- LysS Puffer 50 mM Tris-HCl pH 7,8
 (für Bakterien-Lyse, 0,4 M NaCl
 Proteinextrakte) 0,1% NP-40
 0,6 mM EDTA
- IP-Lysispuffer 150mM NaCl,
 20mM Tris-Hcl pH 6,8
 1% Triton X-100
- 6 x Auftragepuffer 50% (w/v) Glycerin
 (für DNA-Agarose- 1 mM EDTA

II. Material und Methoden

Gelelektrophorese)	0,4% (w/v)	Bromphenolblau
	0,4% (w/v)	Xylenecyanol
- 10 x TBE (Tris-Borat-EDTA) (für Agarose- Gelelektrophorese)	108 g 55 g 40 ml	Tris-Base Borsäure 0,5 M EDTA (pH 8.0) □ 1 l H ₂ O
- Coomassielösung (für SDS-PAGE)	0,08% 8% 20 %	Coomassie G250 in 1,6% Phosphorsäure Ammoniumsulfat Methanol
- Coomassie- Entfärbelösung	100 ml 100 ml	Methanol Eisessig auf 1 l H ₂ O
- "Gel Dry Solution"	10 % 40 %	Essigsäure Methanol
- Sammelgelpuffer (für SDS-PAGE)	500 mM pH 6,8 (mit konz. HCl einstellen)	Tris-HCl
- Trenngelpuffer (für SDS-PAGE)	1,5 M pH 8,8 (mit konz. HCl einstellen)	Tris-HCl
- 10 x SDS Laufpuffer	0,25 M 1,92 M 1%	Tris-Base Glycin SDS
- 2 x SDS Proteinauftrage- puffer	190 mM 5 % (v/v) 6 % (w/v) 40 % (w/v) 1 % (w/v)	Tris/HCl pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin Bromphenolblau/ Xylenecyanol
- PBS (phosphate buffered saline)	6,5 mM 1,5 mM 2,5 mM 140 mM	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl NaCl

II. Material und Methoden

pH 7,25 (mit konz. HCl einstellen, autoklavieren)

- 1 x Transferpuffer (für Western Blot)
 - 3,02 g Tris
 - 14,42 g Glycin
 - 200 ml Methanol
 - auf 1 l H₂O

- Z-Puffer (für β -Galactosidase-Assay)
 - 10,7 g/l Na₂HPO₄·2H₂O
 - 5,5 g/l NaH₂PO₄·H₂O
 - 0,75 g/l KCl
 - 0,246 g/l MgSO₄·7H₂O
 - pH 7,0 (autoklavieren)

- Z-Puffer/X-Gal Mix (für β -Galactosidase-Assay)
 - 100 ml Z-Puffer
 - 0.27 ml β -Mercaptoethanol
 - 1.67 ml X-Gal-Lösung

- Bindungspuffer PPI (für GST-Pulldown)
 - 20 mM Tris pH 7,9
 - 100 mM NaCl
 - 1 mM EDTA
 - 4 mM MgCl₂
 - 0,02 % NP-40
 - 10 % Glycerin

- Stripping Puffer
 - 62,5mM Tris pH 7,9
 - 2 % (w/v) SDS
 - 100mM β -Mercaptoethanol

- Puffer für FACS-Nachweis apopt. Zellen
 - 38 mM NaCitrat, pH 7,4
 - 50 μ g/ml Propidiumiodid (2,5mg/ml H₂O)
 - 5 μ g/ml RNaseA (Stocklösung: 10mg/ml)

- Antibiotika
 - Amp, Ampicillin (Fa. Roth/Karlsruhe)
 - Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert mit Einmalfilter (0,2 μ m Membran, Fa. Schleicher & Schuell/Dassel), Lagerung bei -20°C

 - Cm, Chloramphenicol (Fa. Boehringer/Mannheim)

Stammlösung: 34 mg/ml in EtOH, sterilfiltriert mit Einmalfilter (0,2 µm Membran, Fa. Schleicher & Schuell/Dassel), Lagerung bei -20°C

Kan, Kanamycin (Fa. Sigma/Taufkirchen)

Stammlösung: 50mg/ml in H₂O, sterilfiltriert mit Einmalfilter (0,2 µm Membran, Fa. Schleicher & Schuell/Dassel), Lagerung bei -20°C

Medien

Bakterien:

- SOC-Medium
 - 0,5 % Yeast Extract
 - 2 % Tryptone
 - 10 mM NaCl
 - 2,5 mM KCl
 - 10 mM MgCl₂
 - 10 mM MgSO₄
 - 20 mM Glucose

- M9-Medium
 - 18 g Select Agar
 - 0,69 g SD -Leu
 - 10 g M9 Trockenpulver
 - 20 ml 1M Glucose
 - + 1 ml Ampicillin (50 mg/ml)
 - + 1 ml 1 M Thiamin
 - auf 1 l H₂O

- LB-Medium (Luria Broth)
 - 1% (w/v) Bacto-Trypton (Fa. Difco/Detroit, USA)
 - 0,5% (w/v) Hefeextrakt (Fa. Difco/Detroit, USA)
 - 172 mM NaCl
 - pH 7,5

- LB-Agar
 - LB-Medium
 - 1% (w/v) Bacto-Agar (Fa. Difco/ Detroit, USA)

Hefen:

- YPD Broth Flüssigvollmedium (Hefe)
 20 g/l Difco peptone
 10 g/l Yeast extract

- DOBA Agarmedium (Hefe)

- SD -Trp,
 SD -Trp/ -Leu,
 SD -Trp/ -Leu/ -His Hefe-Minimalmedien zusammengesetzt aus:
 1,7g YNB (Yeast Nitrogen Base)
 5 g (NH₄)₂SO₄
 0,59 g CSM

Alle Medien wurden mit Millipore-Wasser angesetzt und autoklaviert (121°C, 15 Min.). Den Agarmedien wurde nach Abkühlung auf mindestens 50°C sterilfiltriertes 3-AT (für Hefepplatten ohne Histidin, Endkonzentration = 15 mM) bzw. Antibiotika (für Bakterien) zugegeben und in Petrischalen (Fa. Greiner/ Nürtlingen) gegossen. Die Agarplatten wurden bis zu 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Zum LB-Medium wurden die Antibiotika erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt.

Bakterienstämme/ Hefestamm

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden sowohl der *E.coli*-Stamm DH5 α als auch der *E.coli*-Stamm KC8 verwendet. Der Bakterienstamm BL21 wurde zur Expression von GST-Fusionsproteinen genutzt.

Bakterienstamm: DH5 α (Fa. Clontech)

Genotyp: *supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17*
 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

KC8 (end A⁺) (Fa. Clontech)

Genotyp: *hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463,*
 lac α X74, strA, galU,K

BL21 (codon⁺) (Fa. Stratgene)

Genotyp: *dcm, ompT, hsdS (rB- mB-), gal α (DE3), [pLysS*
 Camr]

Hefestamm: Y190 (Fa. Clontech)

Genotyp: *His3, lacZ, trp1, leu2, cyh r2*

Enzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) verwendet. Nähere Informationen finden sich im Internet in der REBASE-Datenbank (<http://www.neb.com/rebase/rebase.html>).

Polymerasen:

- Taq (*Thermus aquaticus* YT1, Fa.Roche/Mannheim)
- Pfx (*Pyrococcus* sp., Fa.GibcoBRL/Karlsruhe)
- T7-RNA-Polymerase (Fa.Promega/Heidelberg)
- SP6-RNA-Polymerase (Fa.Promega/Heidelberg)

Sonstige Enzyme:

- T4-Ligase (Fa.NewEnglandBioLabs/Schwalbach)
- CIP (Calf Intestine Phosphatase, Fa.Roche/Mannheim)
- RT (Reverse Transkriptase aus Moloney Murine Leukemia Virus, Fa.MBI fermentas)
- RNaseA (Fa.Roche/Mannheim)
- Lysozym (Fa.Roth/Karlsruhe)
- RNasin (RNase-Inhibitor, Fa.Promega)

- Fas-Fc = extrazelluläre Domäne des humanen Fas fusioniert an den Fc Teil des humanen IgG1 (Fa. BD Pharmingen, Kat.Nr.:556578)

- Protein A (Calbiochem, Kat.Nr.:539203)

Vektoren

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pACT	Hefeexpressionsvektor für murine Thymoma-cDNA-Bank	MatchmakerSystem/ Fa. Clontech
pAS2.1	Hefeexpressionsvektor für Klonierung des Köderproteins	MatchmakerSystem/ Fa. Clontech
pGEX2TK	GST-Fusionsvektor	Fa. Amersham
pGEXAHK	GST-Fusionsvektor	Fa. Amersham
pGEM 7-Zf	Vektor für IVT	Fa. Promega
pcDNA3.1(+)	eukaryontischer Expressionsvektor	Fa. Invitrogen
pcDNA3.1(-)	eukaryontischer Expressionsvektor	Fa. Invitrogen
pCR33	eukaryontischer Expressionsvektor	H.Eibel (Freiburg)
pCMV-Tag3B	eukaryontischer Expressionsvektor mit N-terminalem myc-Fusionstag	AG Groner (GSH, Frankfurt)

Name/ Insert	Vektor	Resistenz	Kontrollverdau	Fragmente
mCD95L f.l.	pAS2.1	Amp	Eco RI/Bam HI	8390+950
mCD95L intra	pAS2.1	Amp	Eco RI/Bam HI	8390+240
hCD95L FLAG	pCR33	Amp/Neo	Hind III/ Xba I	5500+1000
hCD95L Δ1-39 FLAG	pCR33	Amp/Neo	Hind III/ Xba I	5500+880
hCD95L Δ40-80 FLAG	pCR33	Amp/Neo	Hind III/ Xba I	5500+880
hCD95L Δ128-280 FLAG	pCR33	Amp/Neo	Hind III/ Xba I	5500+600
TNF α FLAG	pCR33	Amp	Hind III/ Xba I	5500+690
huTARPP-myc	pcDNA3.1 (+)zeo	Amp	Hind III/ Bam HI	5015+1900
mCD95L	pGEM-7 Zf	Amp	Bam HI/ Xba I	3000+840
mCD95L	pBabe	Amp Hygromycin		5170+840
mCD95L	pcDNA3.1 (+)zeo	Amp Zeocin		5015+840
FBP 11-WW	pGEX 2TK	Amp	Eco RI/Bam HI	4900+200
mCD95L f.l.	pGEX AHK	Amp	Eco RI/ Sal I	4900+840
mCD95L intra	pGEX AHK	Amp	Eco RI/ Sal I	4900+234
mPSTPIP	pGEX AHK	Amp	BamHI/ HindIII	4900+1270
mPSTPIP	pRk tk.neo	Kan	Bam HI/ Sal I	5900+1270
mPSTPIP-FLAG	pRk tk.neo	Kan	Bam HI/ Sal I	5900+1270
Lef-1	pEVR-FL9B		Bam HI/ Nhe I	3000+1500
PTP-PEST	pcDNA3.1 (-)	Amp Zeocin	NotI/Bam HI	5015+2700
PTP-PEST	pBabe	Amp Puromycin	BstUI/ Nsil	5170+2700
CD2BP1-SH3-myc	pCMV-Tag3B	Kan Neomycin	Bam HI/Eco RI	4300+170
CD2BP1-ΔSH3-myc	pCMV-Tag3B	Kan Neomycin	Bam HI/Eco RI	4300+1040
CD2BP1-V5	pcDNA3.1	Amp	Eco RI/Bam HI	5015+1240

Verschiedene Plasmide wurden von anderen Arbeitsgruppen erhalten:

pCR33 CD95L: H.Eibel (Med. Univ.-Klinikum, Freiburg)

pRcCMV TLK1: H.Silljé (MPI for Biochemistry, Martinsried)

pGEX 2TK FBP11: M.Bedford (MD Anderson Cancer Center, Texas, USA)

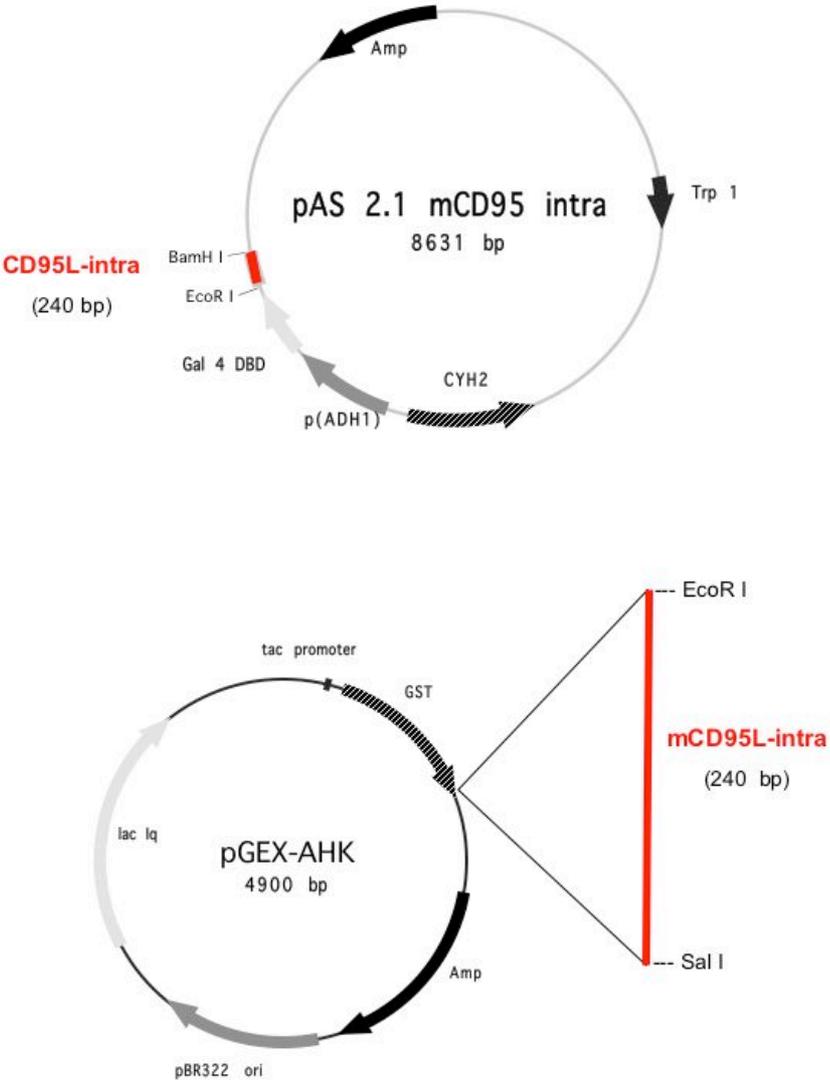
pRK PSTPIP: S.Spencer (Genentech, San Francisco, USA)

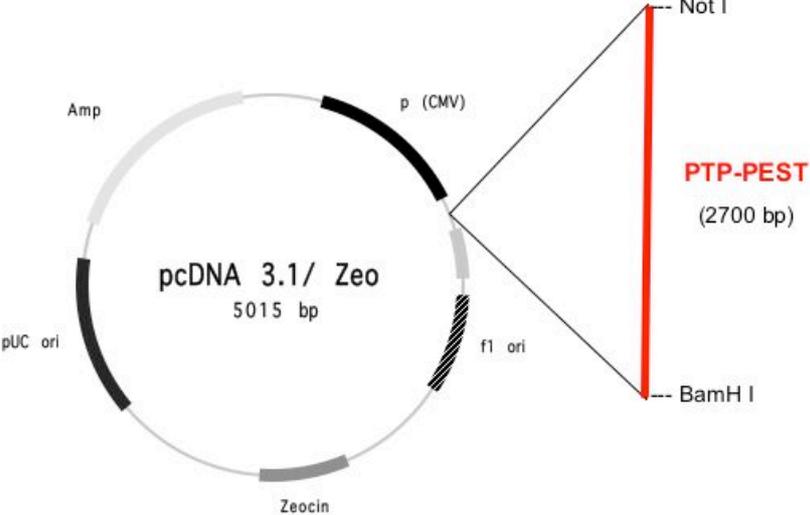
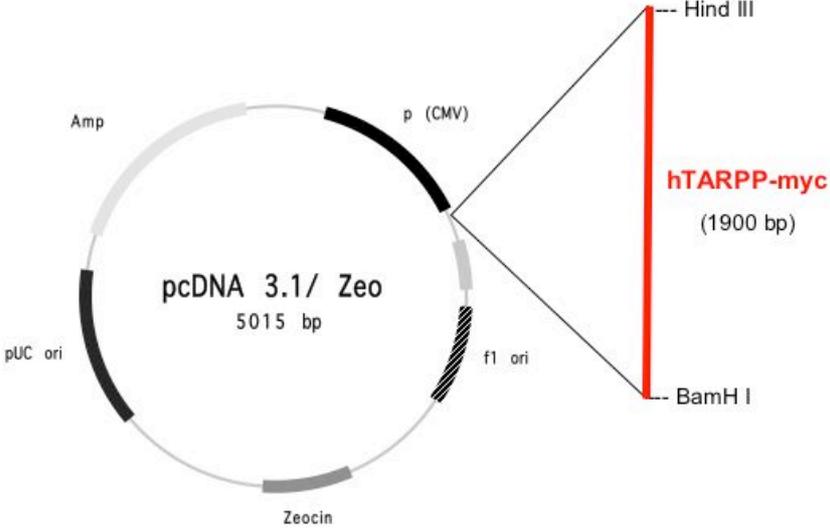
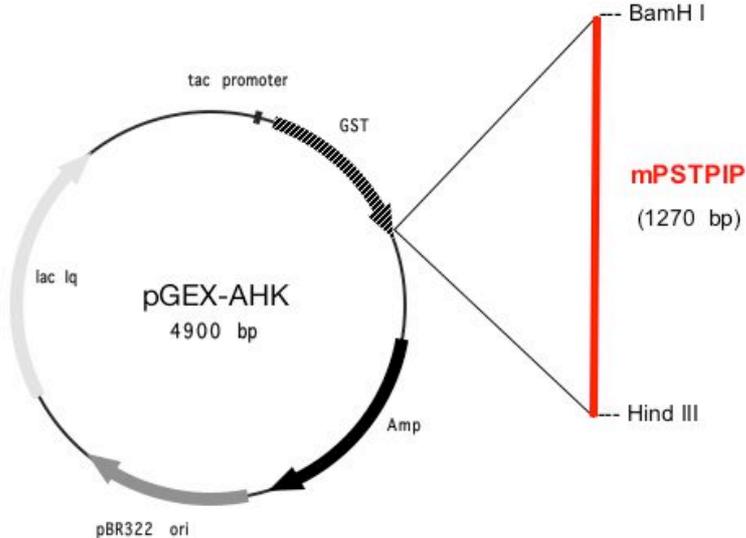
pcDNA3.1 CD2BP1 (hPSTPIP): C.Wise (TSR-Hospital, Texas, USA)

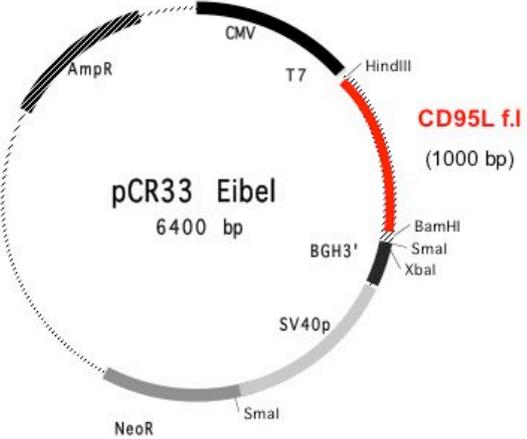
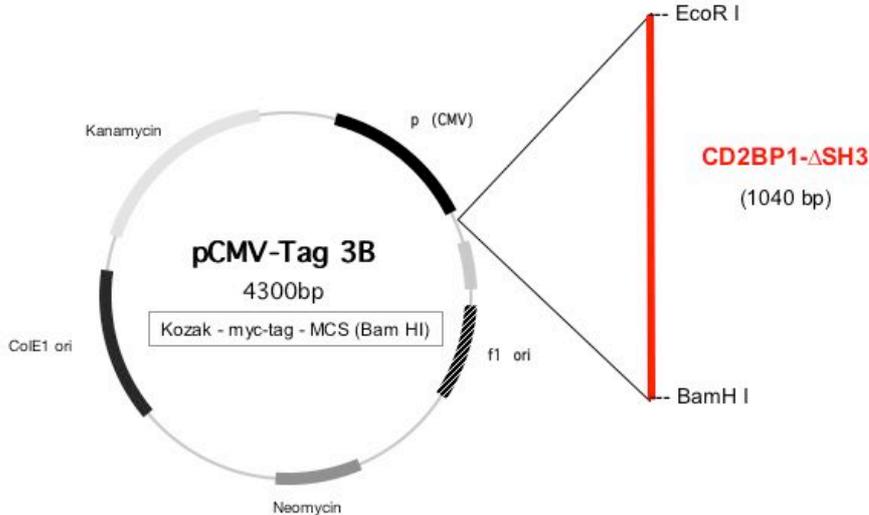
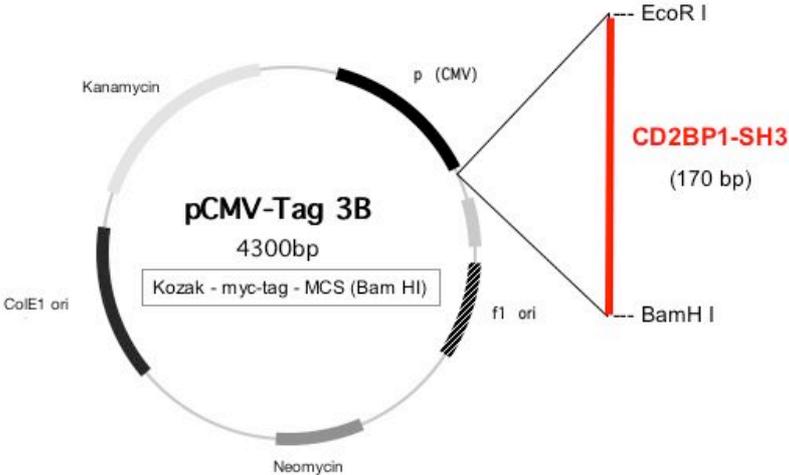
pEVR-FL98 Lef-1: M.Waterman (College of medicine, Univ. California, USA)

pBabe-puro PTP-PEST: N.Tonks (Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA)

Plasmidkarten







Oligonukleotid-Primer

Sequenzierprimer

Name	Sequenz (5' - 3')
GAL 4 AD 5'	CTATTCGATGATGAA
GAL 4 AD 3'	ACTTGCGGGGTTTTTCAGTAT
T7 5'	TGTAATACGACTCACTATAGGGCGA
SP6 3'	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
pBabe 5'	GGACCCAGTGTGGTT
pBabe 3'	GTCGACCACTGTCTGGCGA
pCR33 3'	CATTCTCGGTGCCTGTAACAA
FLAG	ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATC

Primer für PCR und RT-PCR

Name	Sequenz (5' - 3')
GAL 4 AD 5'	CTATTCGATGATGAA
GAL 4 AD 3'	ACTTGCGGGGTTTTTCAGTAT
FasL 5'end	ATGCAGCAGCCCATGAATTAC
FasL 5'150bp	GGTCTCCTTTGGTCCGGCCCT
FasL 3' 200bp	TGAGGAACTCTAAGTATCCTG
FasL 3'end	TTAAAGCTTATAACAAGCCGAA
CD2BP1-5'-BamHI	ATCGGATCCATGATGCCCCAGCTGCAG
CD2BP1-3'-EcoRI	ATCGAATTCCCTTCTCAAAGCTTCTC
CD2SH3-5'-BamHI	ATCGGATCCATGGCCCAGGAGTACCGG
CDSH3-3'-EcoRI	ATCGAATTCTCACGCCCGGTACTCCTGGGC
PIP-5'-BamHI (pGEX)	ATCGGATCCGCCAGCTGCAGTTCCGAGATGCC
PIP-3'-HindIII (pGEX)	ATCAAGCTTCTACTTCTCCAAGTACGACCCAGG
cDNA-5' -Bam (hTARPP, pGEX)	ATCGGATCCGACAGGATGATACTTTTGAAAATGG
cDNA-3' -Hind (hTARPP, pGEX)	ATCAAGCTTCTAGAATTTGACCTGCCAACCAGC

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Biospring/ Frankfurt a.M. durchgeführt.

Zellkultur

Verwendete Zelllinien

Name	Medium	Beschreibung	Herkunft
BW 5147	DMEM, 5-10% FCS	AKR/ J Maus-T-Zelllymphoma Zelllinie	Anne-Odile Hueber, Inserm, Nizza, Frankreich
L12.10	DMEM, 5-10% FCS	lymphozytäre Mausleukämie- Zelllinie	A. Hueber, Inserm, Nizza, Frankreich
293T	DMEM, 10% FCS	humane embryonale Nierenzellen, die mit dem E1A- Genprodukt transformiert wurden und das SV40 „large T“ Antigen exprimieren	ATCC („american type cell culture collection“)
293-005 cloneB12	DMEM:nut mix (F12, Life technologies), 2% FCS	hCD95L stabil transfizierte 293- Zellen	Jürg Tschopp Institut de Biochimie, Lausanne, Schweiz
Jurkat wt	RPMI, 10% FCS	humane T-Zell-Leukämie Zelllinie Suspensionszellen Es wurden verschiedene Klone verwendet: JA3 J16 JH6.2	J.Blenis, Harvard, Boston, USA K. Schulze-Osthoff, Institut of Molecular medicine, Düsseldorf A. Hueber, Inserm, Nizza, Frankreich
Jurkat Caspase8- (JC8-)	DMEM, 5% FCS	Caspase-8-defiziente JA3-Jurkat Zellen	J.Blenis, Harvard, Boston, USA
L12.10 Fas	DMEM, 5% FCS (2mg/ml G418)	mCD95 stabil exprimierende L12.10 Zellen	A. Hueber, Inserm, Nizza, Frankreich
L12.10 mFasL	DMEM, 5% FCS (2mg/ml G418)	mCD95L stabil exprimierende L12.10 Zellen	eigene Herstellung
293 FasL C#2	DMEM, 10% FCS	hCD95L stabil exprimierende 293 Zellen	Vladimir Kirkin, GSH, Frankfurt

Zellkulturmedien und -lösungen

DMEM:	"Dulbeccos modified eagle medium", 4,5g/l Glucose (Fa.Boehringer/Ingelheim)
RPMI:	"Roswell Park Memorial Institute" (Fa.Boehringer/Ingelheim)
OptiMEM:	serumreduziertes Medium (Fa.GibcoBRL/Eggenstein)
FCS:	"Fetal calf serum" (Fa.GibcoBRL/Eggenstein)

L-Glutamine:	200mM Lösung (Fa.Boehringer/Ingelheim)
Pen/Strep:	10.000 U Penicillin, 10.000µg/ml Streptomycin (Fa.Cambrex/Verviers/Belgien)
Hepes-Puffer:	1 M Lösung (Fa.GibcoBRL/Eggenstein)
Trypsin-EDTA:	0,02% Trypsin, 0,05% EDTA (Fa.Seromed/Berlin)
DMSO:	Dimethylsulfoxid mit höchstem Reinheitsgrad (Fa.Merck/Darmstadt)
DMEM/ F12 Nut.mix:	(Fa.GibcoBRL/Eggenstein)

Zusätze

G418-Sulfate:	(Fa. Calbiochem/Merck/Schwalbach)
Hygromycin B:	500U/ml (Fa. Calbiochem/Merck/Schwalbach)

Methoden

Gängige Methoden sowie die Rezepte für Puffer wurden entweder aus "Molecular Cloning" (Sambrook *et al.*, 1989, CSHL Press) oder aus "Current Protocols in Molecular Biology" (Wiley Verlag, 2001) entnommen. Etwaige Modifikationen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Lagerung und Vermehrung von *E.coli* erfolgte stets in sterilen Glas- oder Plastikgefäßen. Für eine Langzeitlagerung wurden 5 ml einer Kultur exponentiell wachsender *E.coli* für 10 Min. bei 3.000 UpM abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 1ml LB-Medium mit 40% (v/v) sterilem Glycerin resuspendiert und in 1,5ml -Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren.

2.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

a) chemokompetent (DH5 α *E.coli*)

Eine Behandlung mit eiskalten Magnesium- und Calciumchloridlösungen befähigt die Bakterien zur spontanen Aufnahme von Fremd-DNA (Transformation). Die Bakterien wurden wie folgt behandelt: 5ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie DH5 α angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. 300ml LB-Medium wurden mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (logarithmische Wachstumsphase) kultiviert.

Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 4°C und 2.000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 25ml eiskalter, steriler 0,1M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert und die Pellets in insgesamt 12ml eiskalter, steriler 0,1M CaCl₂-Lösung resuspendiert und vereinigt. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 2 Stunden auf Eis wurden 4ml Glycerin (steril) hinzugegeben, die Bakterien aliquotiert und bei -80°C gelagert.

b) elektrokompotent (KC8 und DH5 *E.coli*)

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde über Nacht in 5ml LB-Medium angezogen und am nächsten Tag in 500ml LB bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend für 10-15 Min. auf Eis gekühlt und 20 Min. bei 2.000x g und 2 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen. Zur Lagerung wurden die Bakterien mit 10% Glycerol versetzt, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die durchschnittliche Transformationseffizienz dieser Zellen betrug $\geq 10^9$ pro μ g DNA.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Transformation von chemokompetenten *E. coli* (DH5 \square)

Aliquots transformationskompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Circa 20ng des Plasmid-DNA-Ansatzes wurde mit 50 μ l Bakteriensuspension gemischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 90s auf 42 °C erwärmt ("Hitzeschock") und gleich danach für 2 Min. auf Eis abgekühlt. Nachfolgend wurden 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und die Bakterien für 30-60 Min. im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2. Transformation von elektrokompotenten *E.coli* (KC8 + DH5 \square)

Die Transformation durch Elektroporation führt im Vergleich zur Hitzeschock-Methode mit chemokompetenten Bakterien im Allgemeinen zu einer besseren Transformationseffizienz. Dieses Prinzip der Aufnahme von DNA basiert auf Elektroschock-vermittelter transienter Perforation der Bakterienmembran.

Die Elektroporations-Apparatur wurde auf eine Spannung von 2,5 kV, eine Feldstärke von 25 μ F und einen Widerstand von 200 Ω eingestellt. Es wurden 5 μ l der Hefe-Plasmid-Präparation zu 45 μ l eisgekühlten elektrokompotenten Zellen gegeben und für 1 Min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroküvetten gegeben und wie oben beschrieben elektroporiert. Die Bakterien wurden in 1ml SOC-Medium aufgenommen, 30-60 Min. bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert, erneut in 80 μ l SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Amp Platten (DH5 \square) oder auf M9 Platten (+Amp/ -Leu; KC8) ausplattiert. (Literatur siehe Dower *et al.*, 1988)

2.2.3. Berechnung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz bestimmen zu können, wurde eine zusätzliche Transformation mit 1-10pg Kontroll-Plasmid (pUC19) durchgeführt. Die Bakterien, die das Kontroll-Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten, konnten auf LB-Amp Platten wachsen. Die Transformationseffizienz wird in Kolonien pro μ g eingesetzter DNA angegeben. (Literatur siehe Hanahan, 1983)

2.2.4. Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse in kleinem Maßstab

Das Prinzip der Plasmidisolierung basiert auf der Entfernung eines Großteils der bakteriellen Proteine, Membranen und des bakteriellen Genoms, da die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe, Struktur und Verankerung gemeinsam mit den Zellresten abzentrifugiert wird, während die kleineren und Plasmid-Moleküle ungebunden im Überstand bleiben.

Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 3ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 Min. bei 12.000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100µl GTE resuspendiert. Die endgültige Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200µl NaOH/SDS, mehrfaches Invertieren des Ansatzes und 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden zum Fällern von Proteinen und genomischer DNA 150µl 5M KOAc zupipettiert und der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach 10 Min. auf Eis wurde für 20 Min. bei 12.000x g zentrifugiert, und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 900µl EtOH gefällt und durch 30 minütige Zentrifugation bei 12.000x g pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes bei RT getrocknet. Nachdem das getrocknete Pellet in 23µl H₂O (+20µg/ml RNase A) resuspendiert worden war, wurden 5µl dieses Ansatzes durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C. (Literatur siehe Shapiro *et al.*, 1981; Birnboim, 1983)

2.2.5. Quantitative Plasmidisolierung in größerem Maßstab

Größere Mengen an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-bzw. Maxi-Kit (Fa. Qiagen/Hilden) isoliert. Dazu wurde tagsüber zunächst eine Vorkultur angelegt, d.h. eine Bakterienkolonie wurde in 4ml ampicillinhaltigem LB-Medium angeimpft und ca. 8h im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Diese Vorkultur wurde in 300-500ml LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Bakteriensuspension mit 2.200x g (5.000UpM) bei 4°C abzentrifugiert. Die Plasmidisolierung aus dem Bakterienpellet wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Anionenaustauschersäulen. Nach Aufnahme der DNA-Pellets in H₂O oder sterilem 10mM Tris-Cl pH7,5 wurde die Konzentration photometrisch bestimmt, die DNA-Qualität durch Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese überprüft und gegebenenfalls sequenziert (s. 2.2.8/ 2.2.10).

2.2.6. Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Mini-Präp-Plasmid-DNA erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion. Zu 200µl DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform zupipettiert, gemischt und eine Minute lang bei 12.000x g zentrifugiert. Die DNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase. Bei diesem Prozess werden die zu entfernenden Proteine größtenteils denaturiert und sind deshalb in der unteren Phenolphase

gelöst. Nicht vollständig denaturierte Proteine, die ihre Löslichkeit in der wässrigen Phase teilweise noch behalten haben, befinden sich in der sogenannten Interphase zwischen wässriger und Phenol/Chloroform-Phase.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Zur Fällung der DNA wurden 1/10 Volumen 3M NaOAc pH5,2 plus 2 Volumen 100% EtOH zugegeben. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz für mindestens 30 Minuten bei -20°C gelagert. Die restlichen Schritte - das Waschen mit 70% EtOH und das Trocknen des DNA-Pellets - entsprechen dem normalen Plasmidisolierungsprotokoll (s. 2.2.4).

2.2.7. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte entweder über Abschätzung im Agarosegel (Vergleich zum standardisierten DNA-Marker) oder mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers. Dabei wurde die Konzentration von Plasmid-DNA durch Messung der Extinktion in Quarzküvetten bei 260nm bestimmt. Diese Wellenlänge wird von den delokalisierten π -Elektronen der Pyrimidin- bzw Purinringsysteme der einzelnen Nukleotide absorbiert. Eine OD_{260} (OD = optische Dichte) von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Die Formel zur Umrechnung der Extinktion in die DNA Konzentration lautet:

$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Der Quotient E_{260}/E_{280} dient als Index für die Reinheit der DNA-Lösung und sollte optimalerweise bei 1,8 oder höher liegen. (Literatur siehe Wilfinger *et al.*, 1997)

2.2.8. Analyse von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung restriktionsverdauter Plasmid-DNA bzw. von PCR-Produkten wurden horizontale 1%-ige Agarosegele (Auftrennungsbereich: 0,5–6kb) mit 0,5x TBE und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese wurde in 0,5x TBE-Puffer durchgeführt. Die Proben und 0,5 μg Größenmarker (1kb-DNA Ladder, Fa. Gibco-BRL/Eggenstein) wurden mit 1/5 ihres Volumens an 6x Probenpuffer versetzt und bei 10 V/cm aufgetrennt. Da die DNA-Moleküle ein negativ geladenes Phosphatrückgrat besitzen, wandern sie bei einem von außen angelegten elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente erfolgte über die quervernetzten Agarosepolymere. Die zurückgelegte Entfernung der DNA-Fragmente verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der jeweiligen Basenpaaranzahl. Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht ($\lambda=366\text{nm}$) sichtbar gemacht und mittels einer CCD-Kamera photographisch dokumentiert werden. (Literatur siehe Helling *et al.*, 1974)

2.2.9. Elution der DNA aus dem Agarosegel

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Agarose-Gelelektrophorese werden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Qiaex Gel Extraction Kit, laut Angaben des Herstellers (Fa.Qiagen, Hilden), aus der Agarose eluiert. Das Prinzip beruht auf der Freisetzung von DNA aus geschmolzener Agarose und ihrer Bindung an positiv geladene Glaspartikel. (Literatur siehe Vogelstein and Gillespie, 1979)

2.2.10. Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau wurden mit Enzymen und Reaktionspuffern der Firmen GibcoBRL und Boehringer-Mannheim durchgeführt. Die Wahl des geeigneten Reaktionspuffers erfolgte laut Angabe des Herstellers. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2–1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes hängt von der Menge der eingesetzten DNA und der eingesetzten Enzyme ab. Bei einem Mehrfachverdau muß auf die Verträglichkeit ihrer Reaktionspuffer geachtet werden. Wichtig für einen quantitativen Restriktionsverdau ist, dass die Summe des Volumens der eingesetzten Enzyme nicht 10% des Gesamtvolumens überschreitet, da darauf geachtet werden muss, dass die Konzentration an Glycerin, das in der Enzymlösung enthalten ist, nicht zu hoch wird und die Reaktion inhibieren könnte. Die Inkubationszeit betrug 1-2 Stunden bei einer Temperatur, die dem Temperaturoptimum der bakteriellen Enzyme entspricht (meistens 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 6x DNA-Ladepuffer abgestoppt. (Literatur siehe Roberts and Macelis, 1996)

2.2.11. Dephosphorylierung von 5' Enden

Im Anschluß an den Restriktionsverdau von Plasmiden, die als Vektoren zum Klonieren verwendet wurden, mußte die Selbstligation durch Zugabe von Alkalischer Phosphatase verhindert werden. Dieses Enzym entfernt 5' Phosphatgruppen, so dass keine Re-ligation sondern nur noch eine Ligation mit dem "Insert" (z.B. PCR amplifiziert, siehe folgende Kapitel) erfolgen kann. Die DNA wurde gefällt und im 1x CIP-Puffer mit 1-2 U (engl.: units) Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIP, Fa.NewEnglandBioLabs) inkubiert. Alternativ wurde die CIP zum Verdau-Ansatz gegeben. Anschließend wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.12. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Masse an für die Ligation (kovalente Vereinigung zwischen Insert- und Vektor-DNA) eingesetztem Insert und dephosphoryliertem Vektor wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Masse (Insert) [ng]} = \frac{\text{Masse (Vektor) [ng]} \cdot \text{Länge (Insert) [bp]}}{\text{Länge (Vektor) [bp]}}$$

Die Ligation erfolgte mit 1 µl T4-DNA-Ligase (New England BioLabs: 40 U/ml) in 1xLigase-Puffer in einem 20 µl Gesamtansatz bei 16°C für 4-16h. 5 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend für die Transformation von *E.coli*-Bakterien eingesetzt.

2.2.13.PCR (Polymerase Chain Reaktion)

Spezifische DNA-Segmente wurden mit einem GeneAmp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach folgendem Ansatzschema amplifiziert:

4 μ l	dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP,dCTP,dGTP,dTTP)
2,5 μ l	je Primer (10 pM)
0,3 μ l	Taq-Polymerase (5 U/ μ l, Roche, Mannheim)
5 μ l	10x Taq-Puffer (Roche, Mannheim) :
	0,1 M Tris-HCl, 15 mM MgCl ₂ , 0,5 M KCl, pH 8,3
1-3 μ l	Template-DNA (10pg-200ng)
ad 50 μ l	H ₂ O

Die Reaktion wurde bei folgendem Temperaturzyklus durchgeführt:

60s	94 °C	Denaturierung der doppelsträngigen DNA
30s	50-65 °C	Hybridisierung der Primer an das Template
90s	72 °C	Synthese/ Elongation

Die Primer Annealing Temperatur ist sequenzabhängig und wurde nach folgender empirischer Formel abgeschätzt (Literatur siehe Rychlik *et al.*, 1990):

$$\text{Annealingtemperatur} = (\text{Anzahl an G bzw. C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl an A bzw. T}) \times 2^\circ\text{C}$$

Es erfolgten 35 Zyklen, die durch eine abschließende 10-minütige Synthesephase bei 72 °C abgeschlossen wurden. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und entweder direkt mit Anionenaustauschersäulen aus dem Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt oder zunächst mit dem Qiaex Gel Extraction Kit (Fa.Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert und dann mit Phenol/Chloroform aufgereinigt.

Einige PCR-Reaktionen wurden mit der Pfx-DNA-Polymerase (Fa.GibcoBRL) mit Proof-Reading Aktivität durchgeführt, deren Temperaturoptimum bei 68 °C liegt. Die Amplifizierung erfolgte in folgendem Ansatz:

3 μ l	dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP,dCTP,dGTP,dTTP)
2,5 μ l	je Primer [10 μ M]
1 μ l	MgSO ₄ [50mM]
5 μ l	10 x Pfx-Amplifikationbuffer
1-3 μ l	Template-DNA (10pg-200ng)
0,5 μ l	Pfx-Polymerase (GibcoBrl)
ad 50 μ l	H ₂ O

Erhitzen für 3 Min. auf 94 °C, anschließend

30s	94 °C	Denaturierung der doppelsträngigen DNA
60s	50-65 °C	Hybridisierung der Primer an das Template
60s	68 °C	Synthese/ Elongation

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz, generell gilt pro Kilobasenpaar eine Minute.

Zykluszahl: 35

terminale Elongation: 68 °C, 3Min.

(Literatur siehe Cline *et al.*, 1996)

2.2.14.RT-(Reverse Transkription)-PCR

Bei der RT-PCR wird RNA zunächst in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription), die dann z.B. für die PCR-Amplifikation eines speziellen Genes dienen kann.

Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zuerst wurden 0,5-5 µg der Gesamt-RNA durch reverse Transkription in "first strand cDNA" umgeschrieben. Dazu wurde die RNA zusammen mit 0,2 µg Random-Hexanukleotidprimern (p(dN)₆) für 5 Min. auf 70 °C erhitzt, um eventuell vorhandene RNA-Sekundärstrukturen aufzulösen, die die Reaktion stören könnten. Nach Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 4 µl 5 x RT-Puffer, 2 µl 10 mM dNTP und 0,5 µl 20 U RNase-Inhibitor (RNasin, Fa.Promega) aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 1 µl Reverse Transkriptase (Fa.MBI Fermentas) pipettiert. Nach weiteren 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation bei 42 °C für 60 Minuten und dann für 5 Minuten bei 70 °C. 2 µl der durch Reverse Transkription erhaltene cDNA konnten direkt für eine nachfolgende PCR verwendet und der Rest für einen späteren Einsatz bei -20 °C gelagert werden.

2.2.15.Sequenz-Analyse

Die DNA wurde in einem ABI377-Sequenzierautomaten sequenziert. Dabei wurden in der Regel mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sequenzierprimer eingesetzt ("dye primer chemistry"). Die Sequenzierung wurde durch den Institut-Service und von der Firma TopLab (Martinsried) durchgeführt. Um Homologien zu anderen, bereits in Genbanken deponierten Sequenzen zu ermitteln, wurden die Sequenzen im Internet mit BLASTN (Vergleich der Nucleotidsequenz mit der Nucleotidsequenzdatenbank) und BLASTX (Vergleich der Nucleotidsequenz in allen Leserahmen mit der Proteinsequenzdatenbank) untersucht. (National Center for Biotechnology Information/ NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Informationen über Aminosäuresequenzen, Proteindomänen und deren Sekundär-/Tertiärstrukturen wurden ebenfalls online in Proteindatenbanken abgerufen. (Brookhaven Protein Data Bank/ PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>; SwissProt, <http://www.expasy.ch/sprot/>)

2.3 Das Hefe Two-Hybrid-System

Das Hefe Two-Hybrid-System ist eine Methode, mit der spezifische Protein-Protein Interaktionen *in vivo* detektiert werden können. (Die Theorie wird genauer im Ergebnis-Kapitel 3.1 erklärt, Literatur siehe (Fields and Song, 1989) Das hierbei verwendete MATCHMAKER Two-Hybrid-System2 (Fa.Clontech) ist ein auf GAL-4 basierendes System, mit dem aus einer Maus T-Zelllymphom (C57-Zelllinie; Black Kaplan T-Zell-Lymphoma))cDNA Library (MATCHMAKER, Kat.Nr. #ML4001AE, Fa. Clontech) nach Genen für neue Proteine, die an das mCD95L-Protein binden, "gescreent" werden konnte.

2.3.1. "small scale"-Transformation von Hefe

Die Transformation des „bait“-Plasmids und der Bibliotheksplasmide in den Hefestamm Y190 erfolgte nacheinander, um erstens eine höhere Co-Transformationseffizienz zu erzielen und um die Expression des Baitproteins (mCD95Lintra) nach Transformation in Y190 unter Selektionsdruck (SD -trp) mittels Western Blot vor Transformation der cDNA-Bibliothek (s. 2.3.2) verifizieren zu können. Für eine "small scale"-Transformation wurde folgendes Protokoll der Firma Clontech verwendet:

20ml YPD Medium wurden mit einer Kolonie vom Hefestamm Y190 inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 30 °C kultiviert. Von dieser Kultur wurde eine ausreichende Menge zu 200ml neuem Vollmedium (YPD) gegeben, dass sich eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 einstellte. Nach ca. 3h Inkubation bei 30 °C im Schüttler wurden die Zellen bei 1.100g (2.500 Upm) für 5 Min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit 50ml H₂O gewaschen und in insgesamt 1,5ml 1x LiAc/TE-Mix (frisch angesetzt aus 10x TE (0,1M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7,5) und 10x LiAc (1M Lithiumacetat, pH7,5)) resuspendiert. Zu 100µl Hefesuspension wurden 0,1µg Hering-Sperma-Carrier-DNA und 0,1µg pAS2.1-mCD95L-intra-Plasmid gegeben. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 600µl 1x PEG/LiAc-Mix (frisch angesetzt aus 10x TE, 10x LiAc und 50% PEG4000) versetzt. Darauf folgte eine Inkubation bei 30 °C im Schüttler für 30 Minuten. Bevor die Zellen für 15 Min. einem Hitzeschock von 42 °C im Wasserbad ausgesetzt waren, wurden 70µl DMSO unter vorsichtigem Schwenken zupipettiert. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz bei 13.000 UpM (12.000x g) in einer Eppendorf-Zentrifuge für 1 Minute pelletiert. Das Zellpellet wurde in 0,5ml 1x TE aufgenommen und auf Selektions-Kulturplatten (-Trp) ausplattiert.

Für die Retransformation (s. 2.3.4) wurde im Prinzip nach dem gleichen Protokoll vorgegangen. Hierbei mußten aber zunächst die mit Bait-Plasmid transformierten Hefezellen in SD -trp Selektionsmedium über Nacht angeimpft werden, bevor Vollmedium (YPD) kurzfristig zugegeben werden konnte. Das abschließende Ausplattieren erfolgte auf den Selektionsplatten -leu/-trp und auf -leu/-trp/-his/ + 3-AT. Im Selektionsmedium wurde 15 mM 3-AT benötigt, um eine basale und damit unspezifische Transkription des *his3*-Reportergens zu verhindern. Kolonien, die eine mögliche Wechselwirkung zwischen „Bait“ und „Prey“ anzeigten, erschienen nach ca. 5-10 Tagen Inkubation im 30 °C Brutschrank.

2.3.2. Transformation der cDNA-Bibliothek ("Screen")

Bei einem „Screen“ wird die cDNA Bibliothek (MATCHMAKER 2, Fa. Clontech) amplifiziert und anschließend in „Bait“-exprimierende Hefezellen transformiert (sogenannte sequentielle Transformation). Dieser Vorgang unterscheidet sich von einer „small-scale“-Transformation

nur dadurch, dass der hier gewählte Transformationsansatz größer ist, um sicherstellen zu können, dass sämtliche Klone der cDNA-Bank, die in diesem Fall eine Diversität von 3×10^6 unabhängigen Klonen besaß, mindestens einmal in Hefezellen transformiert werden.

Für diese auch als „large scale“ bezeichnete Transformation wurde folgendes Protokoll der Firma Clontech verwendet:

1 ml Selektionsmedium (SD/-trp) wurde mit einer Kolonie von „Bait“-Plasmid-transformierten - Y190-Hefezellen inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 30°C kultiviert. Mit dieser Kultur wurden wiederum 150ml Selektionsmedium (SD/-trp) angeimpft und erneut über Nacht bis zu der stationären Wachstumsphase ($OD_{600} > 1,5$) wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurde soviel zu 1l Vollmedium (YPD) gegeben, dass sich eine OD_{600} von 0,2-0,3 einstellte. Nach ca. 3h Inkubation bei 30°C und 230Upm im Schüttler wurde die Zellsuspension bei 1.100x g (2.500Upm) 5 Min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit 500ml H₂O gewaschen und in insgesamt 8ml 1x LiAc/TE-Mix (frisch angesetzt aus 10x TE (0,1M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH7,5) und 10x LiAc (1M Lithiumacetat, pH 7,5)) resuspendiert und dann 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zu diesen 8ml Hefesuspension wurden 20mg Carrier-DNA und 500–1000µg cDNA-Bibliothek-Plasmid gegeben. Zum Transformationsansatz wurde 60ml 1x PEG/LiAc-Mix (frisch angesetzt aus 10x TE (7ml), 10 x LiAc (7ml) und 50% PEG 4000 (56ml)) gegeben und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden dazu vorsichtig tropfenweise 7ml DMSO zugegeben, bevor die Zellen für 15 Min. einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt und bei 1.100x g für 5 Min. pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in 10ml 1x TE aufgenommen und auf Selektions-Agarplatten (-leu/-trp/-his/+ 3-AT) ausplattiert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurden je 1µl (= 1:10000 Verdünnung), 10µl (=1:1000 Verdünnung) und 100µl (=1:100 Verdünnung) des Transformationsansatzes auf -trp/-leu Agarmedien ausplattiert.

2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S.cerevisiae*

Um die aus dem Screen hervorgegangenen positiven Klone durch eine Sequenz-Analyse identifizieren zu können, musste die Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert werden. Dazu wurden 1,5ml einer Hefe-Übernachtkultur 10 Sekunden bei 12.000x g (14.000Upm) in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 100µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100µl Glaskügelchen wurde für 5 Minuten gemischt (vortex), wodurch die Zellwände mechanisch aufgebrochen werden. Nach erneuter Zugabe von 100µl STET-Puffer wurde der Ansatz wiederum heftig geschüttelt und dann für 3 Min. bei 100°C gekocht. Nach Abkühlung auf Eis und 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C (12.000x g) wurden 10 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, welches bereits 50µl 7,5 M Ammoniumacetat enthielt. Es folgten 30 Min. Inkubation bei -20°C und 10 Min. Zentrifugation (12.000x g) bei 4°C. 100µl des Überstandes wurden zu 400µl vorgekühltem 100% Ethanol gegeben, gemischt, 5 Min. auf Eis stehen gelassen und anschließend 10 Min. mit 12.000x g zentrifugiert. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde es in 20µl TE gelöst. Zur weiteren Amplifikation der Prey-Plasmide wurden entweder elektrokompetente DH5α oder KC8 *E.coli* Bakterien mit der Hefe-DNA transformiert. Da das Hefe-DNA-Pellet sowohl aus Bait- und Prey-Plasmiden als auch aus genomischer Hefe-DNA bestand, war es vorteilhaft, KC8-Bakterien zu verwenden, denn nur mit Prey-Plasmid transformierte KC8-Bakterien können aufgrund ihres Genotyps auf M9-Selektionsagarplatten (+Amp/ -Leu) wachsen, denn sie sind in der Lage die im pACT-Plasmid verwendeten Hefen-Codons

übersetzen und damit ein funktionelles Protein der Leucin-Biosynthese exprimieren. Zur endgültigen Gewinnung der Plasmid-DNA wurden anschließend mit den transformierten KC8-Bakterien Plasmidpräparationen durchgeführt.

2.3.4. Re-transformation

Die isolierten Prey-Plasmide wurden erneut in Hefe transformiert (s. 2.3.1), um selbst transaktivierende Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Dazu wurden sie sowohl in den mCD95Lintra-Stamm als auch in Y190- bzw. pAS2.1-FADD-Hefestamm transformiert. Hierbei identifizierte revertante Hefen, die das *his3* Reportergen unspezifisch transaktivieren und daher auch bei Abwesenheit von mCD95Lintra wuchsen (hervorgerufen z.B. durch eine Mutation in der GAL-4-Promotorsequenz), wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

2.3.5. β -Galaktosidase-Filterassay

Da der alleinige Nachweis der Aktivierung des Histidin-Reportergens häufig zu falschen positiven Ergebnissen führt, mussten die gewachsenen Hefekolonien auf die Aktivität eines zweiten Reportergens, des *lacZ*-Gens, getestet werden. Dieses geschah in einem β -Galaktosidase Filterassay. Dabei wurden die Hefen durch Auflegen eines Whatman-Rundfilters von den Platten auf die Membran „geliftet“, so dass sich eine Kopie der Kolonie auf dem Filter befand. Die Filter wurden mit nach oben weisender Kolonieseite in flüssigen Stickstoff getaucht und dann bei Raumtemperatur aufgetaut, wodurch die Zellen aufbrachen. Ein weiterer Whatman-Rundfilter wurde mit Z-Puffer/X-Gal-Mix getränkt, worauf dann die Filter mit den Hefekolonien gelegt wurden. Die Umwandlung des Substrates X-Gal in einen blauen Farbstoff diente als Beweis dafür, dass das *lacZ*-Gen angeschaltet wurde bzw. dass das Enzym β -Galactosidase von den Hefezellen synthetisiert wurde. Nach mehreren Zeitpunkten wurde die Blaufärbung kontrolliert. Dabei gab der Zeitpunkt des Auftretens einer ersten Blaufärbung einen ersten groben Hinweis auf die Stärke der Wechselwirkung (30 Minuten = starke, 4h = mittlere und 8h = schwache Interaktion). Die Filter wurden unter dem Abzug getrocknet und markiert, so dass die β -Gal-produzierenden Kolonien identifiziert werden konnten. (Literatur: Essers *et al.*, 1996).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Herstellung von Hefe-Proteinextrakten

Die Proteinextrakte aus Hefe wurden für den Nachweis der Expression des Köderproteins benutzt und wurden laut dem Protokoll der Firma Clontech hergestellt. Die mit dem Bait-Plasmid erfolgreich transformierten Hefe-Klone wurden in 10ml SD -Trp über Nacht

angeimpft. Nach anschließender Kontrolle der OD ($>1,5$ = stationäre Phase) folgte eine Inkubation auf Eis für 5 Minuten und eine Zentrifugation mit $700\times g$ bei 4°C . Das Zellpellet wurde mit kaltem Wasser gewaschen und in $500\ \mu\text{l}$ TE (+1mM PMSF, + 1 Mini-Tablette Complete Protease Inhibitor Mix/10ml, Fa. Roche) resuspendiert. Danach wurden dem Ansatz Glaskügelchen ($40\ \mu\text{l}$) beigelegt und dieser zum Aufschluss der Zellen für 5 Min. gemischt („vortex“). Die lysierten Zellen wurden bei 4°C für 5 Min. mit $700\times g$ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die endgültige Lagerung erfolgte bei -80°C . Die Proteinkonzentration des Ansatzes wurde bestimmt (s. 2.4.3), anschließend wurden $10\ \mu\text{g}$ des Proteinextraktes auf 95°C erhitzt, auf ein 12,5-prozentiges Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinexpression des „mCD95L-Baits“ im Western Blot mit einem Antikörper gegen die Gal4-DNA-Bindedomäne (Fa. Clontech) nachgewiesen (s. 2.4.4-2.4.6).

2.4.2. Proteinextraktion aus Säugerzellen

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen folgendermaßen geerntet: Der Zellüberstand, das zum Waschen benutzte PBS und die in Medium aufgenommenen trypsinisierten Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und bei $800\times g$ abzentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und zur Proteinextraktion verwendet. Das Zellpellet wurde in Lysis-Puffer aufgenommen (z.B. $700\ \mu\text{l}$ Lysispuffer pro Zellpellet einer konfluenten 10cm-Zellkulturschale) und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Lysat wurde 30 Min. auf Eis inkubiert, dreimal 15 Sekunden sonifiziert, 20 Min. bei 4°C und $12.000\times g$ abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Lysis-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5
 150 mM NaCl
 10 % Glycerol
 1 % Triton X-100

kurz vor Gebrauch zugeben:

1 Proteaseinhibitortablette (COMPLETE-Mini Protease Inhibitor Mix/10 ml Lysispuffer, Fa. Roche)

2.4.3. Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit einem kommerziell erhältlichen Nachweissystem (Bio-Rad-Assay, Fa. BioRad, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis beruht auf einer unspezifischen Interaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren. 1 bis $10\ \mu\text{l}$ eines Zellextraktes oder Proteinlösung wurden für einige Minuten bei RT mit $1000\ \mu\text{l}$ des 1:5 in H_2O verdünnten Reagenz inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von $595\ \text{nm}$ bestimmt. Zur Erstellung einer Titrations-Eichkurve wurde ein BSA-Standard verwendet.

2.4.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht werden Proteine u.a. mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit β -Mercaptoethanol reduziert. Durch die Bindung von SDS an hydrophobe Regionen der Proteine werden negative Ladungen eingeführt, welche die Eigenladung des Proteins überdecken. Dadurch hängt die Mobilität der Proteine im Acrylamidgel nicht mehr von ihrem isoelektrischen Punkt, sondern nur noch von ihrer Größe ab. Proteingele bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polyacrylamid, Salzen und pH-Werten. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert, so dass sie gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels ist abhängig von dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Die Sammel- und Trenngellösungen wurden entsprechend der nachfolgenden Tabelle angesetzt (jeweils für zwei Gele):

	Trenngel 12,5 %		Sammelgel 5 %
H ₂ O	3,2 ml	H ₂ O	3,2 ml
30 % PAA-Lsg.	4,2 ml	30 % PAA-Lsg.	0,83 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8)	2,5 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8)	0,83 ml
10% SDS	100 μ l	10% SDS	50 μ l
10% APS	70 μ l	10% APS	70 μ l
TEMED	7 μ l	TEMED	3,3 μ l
Gesamtvolumen	10 ml		5 ml

Es wurden Mini-Gelapparaturen (Fa. Biometra/Göttingen) mit 1 mm dicken Abstandshaltern verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses sofort mit Isopropanol überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstand. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben in 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und 5 Min. bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer, wobei im Sammelgel eine Spannung von 90 Volt und im Trenngel eine Spannung von 140 Volt angelegt wurde. Als Längenstandard diente der "prestained protein marker BENCH MARK™" (Fa. GibcoBRL/Eggenstein).

2.4.5. Protein Transfer auf Nylon-Membranen ("Western Blot")

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF, $\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$, Fa. Millipore/Eschborn) transferiert. Bei diesem Transfer handelt es sich um ein "semi-dry" - Verfahren, bei dem lediglich die zum Aufbau des Western Blots verwendeten Whatman-Filterpapiere und die PVDF-Membran mit Transfer-Puffer angefeuchtet werden. Zum Transfer (Blot) wurde eine "Semi-dry"-Blotapparatur (Fa. Keutz/Reiskirchen) verwendet.

Der Blotaufbau sah folgendermaßen aus: Auf die Anode der Blotapparatur wurden zunächst vier mit 1x Transferpuffer befeuchtete, auf die Größe des Gels zugeschnittene,

Whatman-Filterpapiere gelegt, worauf die ebenfalls in Transferpuffer angefeuchtete PVDF-Membran positioniert wurde. Zuvor wurde die PVDF-Membran für 5 Sekunden in Methanol inkubiert. Das Trenngel (s. 2.4.4) wurde direkt auf die Membran gelegt, und den Abschluß bildeten vier mit 1xTransferpuffer getränkte Papiere. Vor dem Aufsetzen der Kathode der Blotapparatur wurde mit einer Pipette vorsichtig über den Stapel gerollt, um sicherzustellen, dass die einzelnen Schichten luftblasenfrei aufeinander lagen. Der Protein-Transfer dauerte 2 Stunden, die gewählte Stromstärke variiert je nach der Fläche des Gels und wurde anhand folgender empirischer Formel ausgerechnet:

$$\text{Stromstärke [mA]} = 0,8 \times \text{Fläche der Membran [cm}^2\text{]}$$

Die Membran wurde für wenige Sekunden mit Ponceau-Lösung angefärbt und mit Wasser entfärbt, wodurch die auf die Membran transferierten Proteine rötlich gefärbt wurden. Dieses erlaubte eine Überprüfung, ob die Proteinbeladung der Membran gleichmäßig erfolgte. Zusätzlich wurde das SDS-Gel nach dem Blot mit Coomassie-Blau gefärbt und wieder entfärbt, um beurteilen zu können, ob z.B. Luftblasen vorhanden waren, die den Transfer verhindert hatten.

2.4.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran können Proteine durch einen immunologischen Nachweis detektiert werden. Dazu wurde die Membran zunächst für mindestens 30 Min. (bei RT) bzw. über Nacht bei 4°C in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 0.05% Tween auf einem Kippschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Diese Blockierungslösung wurde ebenfalls zur Verdünnung der Antikörper (Ak) verwendet. Der Primärantikörper, der für das interessierende Protein spezifisch ist, wurde 1-2 h bei RT mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran im Laufe von 30 Min. fünfmal mit PBST (PBS+ 0,05% Tween) gewaschen, bevor der mit dem Enzym HRP (engl.:horseradish peroxidase) gekoppelte Sekundärantikörper für 1h hinzugegeben wurde. Abschließend wurden nicht gebundene AK durch gründliches Waschen mit PBST (5 x 5 Min.) entfernt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt durch das ECL-Verfahren (Fa.Amersham, s. 2.4.7). Die Inkubation phosphospezifischer Antikörper erfolgte in TBST (1x TBS, 0,05% Tween), 1% BSA.

Antikörper für Western Blot

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Konzentration
Aktin	Santa Cruz #sc-1615	Aktin, murin und human	Ziege, polyklonal	1:1000
CD2BP1	C.Wise, Texas, USA	m/hPSTPIP	Kaninchen	1:1000
G247-4	PharMingen #65431A	hCD95L	Maus IgG ₁	1:1000
Gal4 DNA-BD	Clontech #5399-1	Gal4 DNA-BD	Maus IgG ₁	1:1000

II. Material und Methoden

mPSTPIP	S.Spencer, Genentech, USA	mPSTPIP	Kaninchen, polyklonal	1µg/ml (1:400)
Myc-tag 9B11	Cell signalling #2276	Myc-tag (EQKLISEEDL)	Maus IgG _{2a}	1:1000
M2	Sigma #F3165	FLAG-tag	Maus IgG ₁	1:1000
p42/44-MAPK-P	Cell signalling #9106	p42/44-MAPK phosphoryliert	Maus IgG ₁	1:1000
p42/44-MAPK	Cell signalling #9102	p42/44-MAPK	Kaninchen, polyklonal	1:1000
PTP-PEST Antiserum	N.Tonks, Cold Spring Harbour, USA	PTP-PEST	Kaninchen, polyklonal	1:1000

Antikörper für FACS

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Konzentration
Alf-2.1a	Ancell (Alexis) #399-020	CD95L, human	Maus IgG ₁	10µg/ml (1:100)
BrdU-FITC	BectonDickinson #340649	BrdU	Maus IgG	(1:100)
CD4-PE	BectonDickinson #553048	CD4, murin	Ratte IgG _{2a}	(1:100)
CD8-FITC	BectonDickinson #01042A	CD8, murin	Ratte IgG _{2a}	(1:100)
CD25-PE	BectonDickinson #553866	CD25, murin	Ratte IgM	(1:100)
MFL3-biotin	BDPharmingen #555292	CD95L, murin	armenian Hamster IgG ₁	<1µg/10 ⁶ cells (1:100)
Nok-1	Pharmingen #65321A	CD95L, human	Maus IgG ₁	1-2µg /10 ⁶ cells
Nok-1-biotin	Pharmingen #65322A	CD95L, human	Maus IgG ₁	1-2µg /10 ⁶ cells

CD3e	BDPharmingen #557306	CD3□ murin	armenian Hamster IgG ₁	1-10µg/ml
CD28	BDPharmingen #557393	CD28 murin	syrian Hamster IgG ₂	10µg/ml

Antikörper für Immunpräzipitation

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Konzentration
Nok-1	Pharmingen #65321A	CD95L human	Maus IgG ₁	1-2µg /10 ⁶ cells
M2	Sigma #F3165	FLAG	Maus IgG ₁	1-10µg/ml
M2-Affinity Gel	Sigma #A1205	FLAG	Maus IgG ₁	10-20µl/ml
H11	Alexis	mCD95L	Ratte IgG _{2a}	1-10µg/ml

II. Material und Methoden

	#804-010-C100			
V5	Invitrogen #46-0705	V5-Tag	Maus IgG	1-10µg/ml

Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Konzentration
PSTPIP	S.Spencer, Genentech, USA	mPSTPIP	Kaninchen, polyklonal	10µg/ml (1:40)
M2	Sigma #F3165	FLAG	Maus IgG ₁	20µg/ml
Nok-1	Pharmingen #65321A	CD95L human	Maus IgG ₁	1-2µg /10 ⁶ cells

Sekundärantikörper für Western Blot

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Konzentration
anti-Kaninchen	Amersham Biosciences	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal	1: 2000
anti-Maus	Amersham Biosciences	Maus IgG	Ziege, polyklonal	1: 2000
anti-Ratte	Amersham Biosciences	Ratte IgG	Ziege, polyklonal	1: 2000

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Name	Firma	Immunogen	Isotyp	Konzentration
Alexa Fluor 488 rabbit	Molecular probes	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal, 488 fluorochrome	1:1000-2000
Alexa Fluor 546 rabbit	Molecular probes	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal 546 fluorochrome	1:1000-2000
Alexa Fluor 594 rabbit	Molecular probes	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal 594 fluorochrome	1:1000-2000
Alexa Fluor 633 rabbit	Molecular probes	Kaninchen IgG	Ziege, polyklonal 633 fluorochrome	1:1000-2000
Alexa Fluor 488 mouse	Molecular probes	Maus IgG	Ziege, polyklonal 488 fluorochrome	1:1000-2000
Alexa Fluor 546 mouse	Molecular probes	Maus IgG	Ziege, polyklonal 546 fluorochrome	1:1000-2000
Alexa Fluor 633 mouse	Molecular probes	Maus IgG	Ziege, polyklonal 633 fluorochrome	1:1000-2000
anti-Maus-FITC	Beckton Dickinson # 555988	Maus IgG	Ziege, polyklonal FITC	1:100
Streptavidin-PE	Beckton Dickinson # 349023			1:25

2.4.7. Detektion von Proteinen mit dem ECL-Verfahren: Lumineszenz-Assay

Die Proteinbanden wurden mit Hilfe des "ECL-detection-Kit" (Fa. Amersham/ Braunschweig) sichtbar gemacht. Der Nachweis beruht auf folgendem Prinzip: Das Enzym HRP, welches an den 2. AK gekoppelt ist, bewirkt eine chemische Reaktion des in der ECL-Lösung vorhandenen Substrates (Luminol), was zu dessen Anregung führt. Als Folge tritt Lumineszenz auf, wobei das emittierte Licht einen Röntgenfilm genau an der Stelle schwärzt, wo der 1. AK spezifisch an ein Protein auf der Membran gebunden hat. Die ECL-Detektion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abhängig von der Stärke der Chemolumineszenz betrug die Expositionszeit der Röntgenfilme BIOMAX MR (Fa. Kodak/ New Haven) wenige Sekunden bis zu mehreren Stunden.

2.4.8. *in vitro* Transkription und Translation (IVT)

Für die zellfreie *in vitro* Translation wurde das „TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System“ von Promega (Heidelberg) verwendet, das alle notwendigen zellulären Komponenten für die mRNA und Proteinsynthese enthält (Literatur siehe (Pelham and Jackson, 1976), (Jackson and Hunt, 1983)). Somit ermöglicht dieses Kit eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation. Um das gewünschte Protein synthetisieren zu können, muss die zu exprimierende cDNA einen funktionellen Promotor enthalten (z.B. PCR-Produkt) oder in einem Expressionsvektor vorliegen. Für die Reaktion wurden 1 µg zirkularisierte Plasmid-DNA oder mittels PCR amplifizierte DNA benötigt. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurde 1 µg Template-DNA in 16 µl RNase-freiem H₂O mit 25 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 2 µl TNT-Reaktionspuffer, 1 µl T7 oder SP6-RNA-Polymerase (10 U/µl), 1 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin (1 mM) und 2 µl [³⁵S]-Methionin (10 µCi/µl, spez. Aktivität >1000 Ci/mmol, Amersham) auf Eis gekühlt und für 90 Min. bei 30 °C inkubiert. 1/10 des Proteinansatzes wurde mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, für 3 Min. bei 95 °C gekocht und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 12,5%igen SDS-Trenngel aufgetrennt. Als Proteinstandard diente der „Prestained SDS Molecular Weight“-Marker (Fa. BibcoBRL). Das Gel wurde für 30 Min. in Fixierlösung ("Gel Dry Solution") und für 15 Minuten in die Färbelösung gelegt. Anschließend wurde 30 Minuten lang nichtgebundener Farbstoff mit Entfärberlösung ("Coomassie-Destain") aus dem Gel entfernt. Zur Reduktion des Hintergrundes wurde das Gel kurz in H₂O gewaschen und auf einem Gelrockner unter Vakuum für 30 Minuten bis 1 Stunde bei 80 °C auf Whatmann-Papier getrocknet. Die Exposition erfolgte auf einseitig beschichteten ³⁵S-sensitiven Kodak BIOMAX MR Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei - 80 °C.

2.4.9. Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden Bakterien des Stammes E.coli BL21 (codon+) verwendet. Dieser Bakterienstamm ist Chloramphenicol (Cm) resistent, da er das pLys-Plasmid trägt, mit dem diese Bakterien zusätzlich in der Lage sind, endogenes Lysozym zu exprimieren. Diese Bakterien wurden mit einem pGEX2TK-Plasmid transformiert, das unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors die Transkription des GST-Fusions-Gens reguliert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wird durch Lactose oder das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Aufreinigung aus den Bakterienlysaten

erfolgte durch Bindung an eine Glutathion-Agarose-Matrix (Sigma, #G4510). 5ml einer Übernachtskultur wurden in 300 ml LB (+Amp/ +Cm) überführt und bei 37°C und 220Upm in einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 wachsen gelassen. Nach Zugabe von 0,5mM IPTG wurden die Bakterien für weitere 3h bei 30°C geschüttelt, durch zehnmütige Zentrifugation bei 2.200x g pelletiert und bei -80°C eingefroren. Die Lyse der Bakterien erfolgte in 20ml LysS-Puffer, wobei 0,2mg/ml Lysozym, 5mM β -Mercaptoethanol, 0,5mM PMSF und eine Tablette Protease Inhibitor Mix Mini pro 10 ml (Complete, Fa.Roche) frisch zugegeben wurden. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Kühlung auf Eis für 15 Min. sollte die Bakteriensuspension viskös werden (alternativ können die Bakterien auch mit Ultraschallbehandlung aufgeschlossen werden). Alle folgenden Schritte werden bei 4°C ausgeführt, um die Enzymaktivität vorhandener Proteasen zusätzlich zu verhindern. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 45.000 Upm in einer Ultrazentrifuge (Fa.Beckmann, Typ L8-M) wurden die Zellrümmen entfernt. Das im Überstand enthaltene rekombinante Protein band im anschließenden Schritt mit seinem GST-Anteil an zugesetzte 2-5 ml Glutathion-Agarose, die zuvor mit dem LysS-Puffer (ohne Lysozym) equilibriert wurden. Nach 1h Inkubation wurden die Glutathion-Agarose-Partikel 3-4 mal mit 0,5x LysS-Puffer (ohne Lysozym und ohne Protease-Inhibitoren) gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter Zugabe von 1mg/ml BSA. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration und der Reinheit der GST-Fusionsproteine wurde eine 12,5% SDS-PAGE durchgeführt. Zuvor jedoch musste die Glutathion-Agarose nach Aufkochen in 2 x SDS-Probenpuffer durch Zentrifugation abgetrennt werden.

2.4.10.GST-Pulldown-Assay

In einem GST-Pulldown wurden die im Hefe-Two-Hybrid-System gefundenen CD95L-bindenden-Proteine *in vitro* auf ihr Bindungsverhalten überprüft. Dabei wurden die mit ³⁵S-markierten, *in vitro* translatierten Proteine (s. 2.4.8) entweder zusammen mit dem Fusionsprotein CD95L-intra-GST oder mit GST alleine als Kontrolle inkubiert und im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen. GST-Fusionsproteine wurden wie beschrieben in *E. coli* exprimiert (s. 2.4.9) und aufgereinigt. Als erstes wurden das CD95L-intra-GST Fusionsprotein bzw. GST alleine im Bindungspuffer PPI gewaschen, resuspendiert und für 20 Minuten im Kühlraum bei 4°C gut durchmischt. 2 bis 20 μ l der *in vitro* translatierten ³⁵S-markierten Proteine wurden mit 1 bis 5 μ g GST-Fusionsprotein-Rohextrakt in insgesamt 100 μ l Bindungspuffer PPI (mit 0,5mM PMSF und 1mg/ml BSA) inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten, wobei alle 5 Minuten gemischt wird. Anschließend wurde die Agarose eine Minute lang pelletiert und dreimal mit Bindungspuffer (ohne BSA) gewaschen. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und das Agarose-Proteinpellet mit 2x SDS-Probenpuffer drei Minuten gekocht. Die Agarose wird abzentrifugiert und der Proteinüberstand auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Zum Vergleich wurden 10% der eingesetzten Menge an ³⁵S-markiertem Protein in 1x Probenpuffer aufgetragen ("Input"). Das Gel wurde nach Elektrophorese 10 Min. mit Coomassie-Blau gefärbt und 30 Minuten lang entfärbt, um die Reinheit und Menge der eingesetzten GST-Fusionsproteine abzuschätzen. Anschließend wurde das Gel für 30 Min. in Fixierlösung ("Gel Dry Solution") gelegt, auf 3MM Whatman Papier 2 Stunden bei 60°C im Vakuumtrockner getrocknet und mit Röntgenfilmen bei -80°C über Nacht exponiert.

2.4.11.Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Bei einer Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysat isoliert werden. Interagiert dieses Protein mit anderen Proteinen, werden auch diese immunpräzipitiert. Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über seinen Fc-Teil an Protein A oder Protein G, welche an einer Sepharosematrix fixiert vorliegen, bindet.

In den meisten Fällen wurden transfizierte 293T Zellen (5×10^7 Zellen pro 10cm Schale) verwendet. Nach Lyse dieser Zellen in 700 μ l Co-IP-Lysispuffer (\rightarrow 150mM NaCl, 20mM Tris-Hcl pH 6,8, 1% Triton X-100) mit anschließender Sonifizierung wurde eine sogenannte "Pre-Clearing" mit Sepharose 4CL-B durchgeführt. So wurde ein erhöhter Hintergrund durch unspezifische Bindung des Proteins an die Agarosematrix verhindert. Zu diesem Zellextrakt wurde meist 1 μ g des spezifischen Antikörpers gegeben, 1h auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von Protein A/G-Agarose weitere 2h oder länger gemischt. Die Beads wurden dreimal mit Co-IP-Lysepuffer ohne Detergenzien gewaschen, die gebundenen Proteine durch Zugabe von SDS-Gelladepuffer eluiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

Zum Teil wurden für die Co-IPs an magnetische Dynal-Beads gekoppeltes Protein A/G verwendet. Diese wurden vor Zugabe zum Zelllysat zweimal mit 0,1M NaPhosphat-Puffer (pH 8,1) gewaschen. Aufgrund ihrer Magnetizität konnten die magnetischen Partikel mittels des DynalMPCs vom Puffer getrennt und so aufgereinigt werden.

- Dynabeads ProteinG (Fa.Dynal Biotech, Hamburg)
- Dynabeads ProteinA (Fa.Dynal Biotech, Hamburg)
- Dynal Magnetic Particle Concentrator (Dynal MPC, Fa.Dynal Biotech, Hamburg)
- 0,1M NaPhosphat-Puffer: 0,1M Na_2HPO_4 , pH 8,1 eingestellt mit 1M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$

2.4.12.Analyse der PSTPIP-Tyrosinphosphorylierung

Die 48h zuvor transfizierten Zellen wurden über Nacht gehungert und 4h vor dem Ernten mit 0,1mM des Phosphataseinhibitor Natriumvanadat (Na_3VO_4) behandelt. Zur Lyse wurde eine 10cm Schale in 500-1000 μ l Lysispuffer (50mM HEPES, pH 7,2; 5mM EDTA; 10% Glycerol; 1% Triton X-100) resuspendiert. 5mM NaF, 1mM Na_3VO_4 und eine Proteaseinhibitortablette (CompleteMini, Fa.Roche; 1 Tablette pro 10ml) wurden jeweils vor der Lyse frisch zugegeben.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1. Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (89% Luftfeuchtigkeit) in BBD-6220 Brutschränken kultiviert. Dem jeweiligen Medium wurden FCS (10% v/v), Glutamin (2% v/v) und Penicillin/Streptomycin (1% v/v) zugesetzt. Je nach Wachstumseigenschaften wurden die Zellen regelmäßig alle 3 bis 5 Tage in 10cm-Kulturschalen (Fa. Nunc/Wiesbaden) im Verhältnis 1:10 passagiert. Zur Passagierung wurde der Zellrasen mit kaltem PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Nachdem sich die Zellen abgerundet hatten, wurden sie durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden anschließend in das entsprechende Wachstumsmedium aufgenommen und in dem angegebenen Verhältnis ausplattiert. Das vorhandene Trypsin wird dabei durch den im Serum vorhandenen Trypsininhibitor inaktiviert. Suspensionszellen wurden vor der Passagierung resuspendiert und 1/10 der Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versetzt.

2.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Sollten Zellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden, wurden sie nach Trypsinbehandlung in Medium aufgenommen und nach Überführung in ein Falcon-Röhrchen 5 min bei 800x g abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 900µl FCS und 100µl DMSO (10%) resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde in 1ml-Einfrierröhrchen (Fa.Nunc/Wiesbaden) überführt, langsam bei -80°C in Styroporbehältern eingefroren und anschließend dauerhaft in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Bei Bedarf wurden die Zellen wieder in Kultur genommen. Im Gegensatz zum Einfrieren erfolgte das Auftauen der Zellen sehr schnell in einem 37°C Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Falcon-Röhrchen mit 5 ml Medium gegeben und 5 Min. bei 800x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10ml Medium resuspendiert und auf einer 10cm Zellkulturschale ausgesät.

2.5.3. Transfektion von Zellen

Säugerzellen können unter bestimmten Bedingungen von außen zugesetzte Fremd-DNA aufnehmen (Transfektion) und die von dieser DNA kodierte Gene exprimieren.

2.5.3.1. Vorbereitung der Zellen zur Transfektion

Die Zellen wurden für eine Transfektion grundsätzlich am Vortag auf Zellkulturschalen ausplattiert (s. 2.9.1). Für eine Konfluenz von 60-70% am Tag der Transfektion wurden 3-4 x 10⁵ Zellen auf 3,5cm-Schalen und 1-2 x 10⁶ 293T Zellen auf 10cm-Schalen ausgesät. Die

Zellzahlen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Zählkammer mit den suspendierten Zellen beladen und die Anzahl der Zellen unter dem Mikroskop ermittelt. Dabei gilt:

$$\text{Anzahl der Zellen / "Großquadrat"}^* \times 10^4 = \text{Anzahl der Zellen / ml}$$

* Ein "Großquadrat" besteht aus 16 kleinen Quadraten

2.5.3.2. Transfektion mit PEI

Eine Methode zur transienten Transfektion von Zellen nutzt das kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI, 25kDa, Fa.SigmaAldrich). Die Menge an eingesetztem PEI kann durch folgende Formel berechnet werden:

Es sind verschiedene N/P-Verhältnisse (N = positiv geladene N-Atome in PEI ; P = negativ geladene Phosphate der DNA) möglich, wobei ein N/P-Verhältnis von 9-12 optimal ist.

1µg DNA= 3nmol Phosphate 1µl 10mM PEI (Monomer) = 10nmol N

Bsp.: 10µg DNA = 30nmol P N/P=9, d.h. 270 nmol N, also 27 µl der 10mM PEI Lsg.
--

Zuerst wurde eine 100mM PEI-Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 45mg 25kDa PEI (Sigma Aldrich) in 8ml dH₂O gelöst, der pH mit HCl auf pH=7 eingestellt, auf 10ml aufgefüllt und steril filtriert. Zur Transfektion wurde die PEI-Stocklösung 1:10 verdünnt.

Vor der Transfektion wurde serumfreies Medium zu den Zellen gegeben. Die DNA (z.B. 10µg pro 10cm Schale) und PEI wurden jeweils in 100µl PBS verdünnt. Nach Mischen der beiden Lösungen und Inkubation für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben.

Lsg.A: 27µl PEI 10mM 100µl PBS	Lsg.B: 10µg DNA 100µl PBS
--	-------------------------------------

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden 6h mit diesem DNA/PEI-Gemisch inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 10% FCS zugegeben.
(Literatur: Boussif *et al.*, 1995)

2.5.3.3. Transfektion mit Fugene

Die DNA (z.B. 5µg pro 10cm Schale) wurde in 100µl serumfreiem Medium verdünnt und mit der dreifachen Menge Fugene6 (je 3µl pro 1µg DNA) gemischt.

Basierend auf den Angaben des Herstellers (Fa. GibcoBRL/Eggenstein) wurde die Transfektionsmethode modifiziert und optimiert. Eine 10cm-Zellkulturschale wurde zum Beispiel folgendermaßen transfiziert:

5µg DNA
100µl serumfreies Medium
15 µl Fugene

Die zuvor gewaschenen Zellen wurden über Nacht mit dieser DNA/ Fugene-Lösung inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das DNA-enthaltende Medium durch das für die jeweilige Zelllinie übliche Wachstumsmedium ersetzt.

2.5.4. Immunfluoreszenzanalyse

Die Analyse der Lokalisation zellulärer Proteine erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläser in einer Zellkulturschale ausgesät, die vorher zur besseren Adhärenz mit Poly-Lysin beschichtet worden waren. Vor der Färbung wurden die Zellen für 10 Min. mit 3%-Formaldehyd bei Raumtemperatur (RT) fixiert und zweimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Zellmembran für die Aufnahme der Antikörper zu permeabilisieren, wurde das Präparat mit 0,1% Triton X-100/PBS 5 Min. inkubiert. Nach erneutem Waschen und nach 1h Blocken (3% BSA in PBS) wurde das PBS abgesaugt, und es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1h bei RT oder bei 4°C über Nacht. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, woraufhin die Zellen für 1h bei RT im Dunkeln mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000) gefärbt wurden. Falls gewünscht, wurde anschließend ein zweites Protein mit einem spezifischen Primärantikörper und einem Sekundärantikörper, der mit einem anderen Fluorochrom markiert war, gefärbt. Voraussetzung dafür ist, dass sich die beiden Primärantikörper in ihrer Spezieszugehörigkeit unterscheiden, damit die Färbung durch den jeweiligen Sekundärantikörper spezifisch ist. Nach erneutem Waschen wurde das Präparat getrocknet und mit Vectashield/DAPI auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung und Fixierung mit Nagellack wurden Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop (Konfokal Laser Scanning Mikroskop, Leica DM IRBE, Fa. Leica, Wetzlar) aufgenommen. (Literatur: Amos, 1988)

- Poly-L-Lysin 0,1% w/v: Fa. SigmaAldrich
- Vectashield mit DAPI: Fa. Vector Laboratories, Burlinghame, USA
- Konfokal-Laserlinien: 458nm, 476nm, 488nm, 514nm, 543nm, 633nm

2.6 FACS („fluorescence activated cell sorter“-Messungen

2.6.1. Färbung von Oberflächenmarkern

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wurde durch Färbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Messung im Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend geerntet. Der Primärantikörper wurde in einem Volumenverhältnis von 1:100 (ung. 10µg/ml) in PBS, 3% FCS verdünnt, die pelletierten Zellen in 100µl PBS-Antikörpermischung resuspendiert und daraufhin 30 Minuten inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper (1:100 in PBS) im Dunkeln inkubiert. Zum Teil wurden auch direkt Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Primärantikörper verwendet. Die Analyse erfolgte nach einem erneuten Waschschrift und Resuspendierung in 500µl PBS. Im FACScan werden die Zellen durch eine Kapillare in das Gerät eingesogen und dort von einem Argonlaser bestrahlt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe (forward scatter, FSC), Granularität (sideward scatter, SSC) oder Fluoreszenz (fluorescence detector, FL) geben. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programmes CellQuest Pro (Becton Dickinson).

2.6.2. Zellzyklusanalyse

Mit Hilfe einer von Nicoletti und Kollegen etablierten Methode lässt sich der unterschiedliche Gehalt an genomischer DNA in apoptotischen und nichtapoptotischen Zellkernen detektieren (Nicoletti *et al.*, 1991). Neben den vitalen diploiden und den sich gerade teilenden tetraploiden Zellen der G2/M-Phase, lassen sich im FACS apoptotische Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt identifizieren. Dabei wird die in apoptotischen Zellen vorhandene, von Nukleasen hydrolysierte DNA aus den fixierten Zellen ausgewaschen, so dass apoptotische Zellen durch einen hyploiden DNA-Gehalt gekennzeichnet sind.

Zur Zellzyklusanalyse wurden die Zellen zuerst unter tropfenweiser Zugabe von 1ml eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden für mehrere Stunden oder länger bei 4°C gelagert.

Zur Analyse wurden die fixierten Zellen in 38mM NaCitrat, pH 7,4 gewaschen und anschließend in der FACS-Färbelösung für 25 Minuten bei 37°C inkubiert.

FACS-Färbelösung: 38mM NaCitrat, pH 7,4
50µg/ml Propidiumiodid (2,5mg/ml Stocklösung, 1:50)
5µg/ml RNase A (10mg/ml Stocklösung, 1:2000)

Die Messung erfolgte im FL-2 Kanal des FACS, und die Daten wurden mit der CellQuest-Pro-Software (Beckton Dickinson) ausgewertet.

2.6.3. CFSE-Färbung

Vor einer so genannten Co-Kultivierung (s. 2.6.4), bei der zwei verschiedene Zelltypen zusammen inkubiert werden, wurde eine der Populationen zur späteren Identifikation im FACS mit einem Fluorochrom markiert. CFSE (carboxy-fluorescein succinimidyl ester; Fa. MolecularProbes) ist ein nicht-toxischer Fluoreszenzfarbstoff, der nach Eindringen in die Zelle durch eine nicht-spezifische Esterase gespalten wird und danach an zytoplasmatische Bestandteile der Zelle kovalent bindet und daher im Zytoplasma der Zelle verbleibt. Zur Markierung wurden die Zellen geerntet, gezählt und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet (2×10^7 Zellen) wurde in 1ml PBS resuspendiert und mit 1ml PBS/1 μ M CFSE gemischt (Endkonzentration: 0,5 μ M CFSE). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal mit PBS/5%FCS gewaschen und anschließend in serumfreiem Zellkulturmedium resuspendiert.

(Literatur: Lyons und Parish, 1994)

2.6.4. Co-Kultivierung von adhärenenten und Suspensionszellen zur Induktion von CD95-vermittelter Apoptose

Werden adhärenente CD95L-exprimierende 293T Zellen (Killer-Zellen) und CD95 positive Jurkat-Zellen (Zielzellen) zusammen inkubiert, wird Apoptose in den Jurkat-Zellen induziert. Um die beiden Populationen für die Apoptosequantifizierung im FACS unterscheiden zu können, wurden die Zielzellen mit CFSE gefärbt (s. 2.6.3), anschließend in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml zu den adhärenenten CD95L-exprimierenden 293T Zellen gegeben und 5-7 Stunden bei 37°C weiter wachsen gelassen. Dabei wurden die Zellen in unterschiedlichen Killer- zu Zielzell-Verhältnissen eingesetzt.

Zur Analyse im FACS wurden die gesamten Zellen mit 70% Ethanol fixiert und bei 4°C gelagert. Vor der FACS-Messung wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt (s. 2.6.2) und es wurde eine Zellzyklusanalyse der CFSE-positiven Zellen durchgeführt.

2.6.5. Detektion phosphorylierter MAP-Kinasen (p42/p44)

Um zu überprüfen, ob die Stimulation des CD95L mit agonistischen Antikörpern zur Phosphorylierung von MAP-Kinasen führt, wurden stabil CD95L-exprimierende 293-005 Zellen in einer Dichte von 1×10^5 /ml pro Loch einer 24-Lochplatte ausplattiert, 24h wachsen gelassen und 17h gehungert (Medium ohne Serum; z.T. mit 1% BSA). Während der letzten Stunde wurde 0,1mM des Phosphataseinhibitors Na_3VO_4 zugegeben. Die Zellen wurden mit Medium geerntet, in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und mit 1 μ g/ml des anti-hFasL Antikörpers Nok-1 für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Dazu wurde Medium plus Antikörper zu den Zellen gegeben. Nach der Stimulation wurden die Zellen abzentrifugiert, in 20 μ l 2xSDS-PAGE Laemmli Puffer aufgenommen und 5 Min. bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugation wurden 10 μ l des Überstandes auf ein SDS-Gel aufgetragen und in einer nachfolgenden Western Blot Analyse untersucht.

Na_3VO_4 wurde in H_2O gelöst, mit HCl der pH eingestellt, 10 Minuten gekocht und anschließend für vier Wochen bei 4°C bzw. für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert.

2.6.6. Behandlung von 293T Zellen mit Cholesterol-depletierenden Substanzen

293T Zellen wurden geerntet, einmal mit DMEM/100mMHepes ohne FCS gewaschen und anschließend in serumfreiem DMEM/Hepes-Medium mit 2U/ml Cholesteroloxidase (A.Hueber, Insem, Nizza, Frankreich) für 2h bei 37°C inkubiert. Bei allen weiteren Schritten mussten die Zellen vorsichtig behandelt werden, da sie aufgrund dieser Behandlung sehr empfindlich sind. Nach 2h wurden die Zellen gewaschen und zusammen mit Jurkatzellen inkubiert (Co-Kultivierung, s. 2.6.4).

2.7 Aufreinigung primärer Maus-T-Zellen

Zur Aufreinigung von Maus T-Zellen wurde den zuvor getöteten Mäusen mit sterilem Präparierbesteck die Milz entnommen und in T-Zellmedium (DMEM/GlutaMax, 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1‰ β -Mercaptoethanol) überführt. Eine Einzelzellsuspension erhält man nach Durchstreichen des Milzgewebes durch engmaschige Gaze (Sefar Nitex, Fa. Sefar GmbH; Wasserburg). Die daraus resultierende Einzelzellsuspension wurde in T-Zellmedium gewaschen. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation der Milzzellen in hypotonischem Erythrozyten Lysis Puffer (144mM NH_4Cl ; 17mM Tris pH 7,6; mit konz. HCl auf pH 7,2 eingestellt), welcher die Erythrozyten durch osmotischen Schock zum Platzen bringt.

Die Aufreinigung von T-Zellen bzw. CD8^+ oder CD4^+ einzelpositiven T-Zellen wurde mit Hilfe von Depletionssäulen der Firma R&D-Systems laut deren Vorgaben durchgeführt. (Mouse T cell enrichment column kit: #MTCC-5/10/25; CD4 -Subset: #MCD4C-1000; CD8 -Subset: #MCD8C-1000). Zur Aufreinigung der einzelpositiven T-Zellen wurden 1×10^8 Zellen in 1ml sterilem "column buffer" resuspendiert und mit 1ml des Antikörper Cocktails vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 10ml "column buffer" gewaschen und in 2ml des gleichen Puffers resuspendiert. Diese 2ml wurden auf die vorher mit "column buffer" equilibrierte Säule gegeben und 10 Minuten inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10 ml Säulenpuffer eluiert, abzentrifugiert und im T-Zellmedium resuspendiert. Anschließend wurden im FACS die Vitalität (s. 2.7.1) und die Reinheit der T-Zellen (Färbung von CD4 - und CD8 -Oberflächenmolekülen) überprüft (s. 2.6.1).

2.7.1. Annexin V/ PI-Färbung

Zur Analyse der Vitalität wurden die nicht fixierten Zellen mit AnnexinV-FITC (BDPharmingen, #556420) und Propidiumiodid (PI) angefärbt. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, einem Membran-Phospholipid, welches in vitalen Zellen nur auf der Membraninnenseite zu finden ist. In apoptotischen Zellen gelangt es allerdings auch auf die Außenseite der Membran, so dass apoptotische Zellen mit AnnexinV-FITC angefärbt werden. Nekrotische bzw. spätapoptotische Zellen verlieren die Fähigkeit, kationische Farbstoffe wie Propidiumiodid, auszuschließen.

1×10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen, bei 1000x g abzentrifugiert und in 1ml AnnexinV-Bindepuffer (10mM Hepes/NaOH, pH 7,4; 140mM NaCl; 2,5mM CaCl_2) resuspendiert. 100 μ l wurden mit 5 μ l AnnexinV-FITC versetzt und 15 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert.

Nach Zugabe von 1µl PI [Stocklösung: 2,5µg/µl] und 400µl Bindungspuffer wurden die Zellen im FACS analysiert, wobei man vitale (AnnexinV- und PI-negativ), früh-apoptotische (AnnexinV-positiv), spät-apoptotische (AnnexinV- und PI-positiv) bzw. nekrotische (PI-positiv) Zellen unterscheiden kann.

Literatur: Raynal *et al.*, 1994

2.7.2. Proliferationsmessung mit [³H]-Thymidin

In der Synthesephase des Zellzyklus erfolgt die Verdopplung der DNA. Der Einbau von Tritium[³H]-markiertem Desoxythymidin in neusynthetisierte DNA ermöglicht daher die Bestimmung des Ausmaßes der Zellproliferation über die Messung der eingebauten Radioaktivität. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden in einem Volumen von 100µl in einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach Abschluss der Inkubationszeit (für Maus-T-Zellen betrug diese 72h) wurden 100µl [³H]Thymidinlösung (1µCi/100µl Medium) für 16-18h zu den Zellen gegeben. Die Platten wurden im CellHarvester (Fa.Packard) geerntet und die Radioaktivität anschließend im TopCount (Fa.Packard) gemessen.

2.7.3. Proliferationsmessung mit BrdU

Eine andere Art der Proliferationsmessung ist der Einbau von Bromodesoxyuridine (BrdU) in DNA und dessen anschließende Quantifizierung. BrdU wird anstelle von Thymidin in der S-Phase in die neusynthetisierte DNA eingebaut. BrdU ist nicht direkt markiert, sondern wird durch Inkubation mit anti-BrdU Antikörpern nachgewiesen. Durch Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgt dieser Nachweis z.B. im FACS. Die Zellen wurden mit 60µM BrdU (Fa.Sigma, Kat.Nr. #B5002) für 1-6 Stunden inkubiert, abzentrifugiert und anschließend mit eiskaltem 70%igem Ethanol für 20 Minuten fixiert (ung. 1×10^6 Zellen pro 100µl). Ein Aliquot von 100µl wurde in FACS-Röhrchen überführt und mit 1ml PBS/0.5% BSA gewaschen. Das Pellet wurde 20 Min. bei RT in Denaturierungslösung (2M HCl, frisch angesetzt; $\text{HCl}_{\text{konz}}=37\% \approx 7\text{M}$) inkubiert, gewaschen und zur Neutralisation von restlicher Säure in 0.5ml 1M Tris pH 8.5 resuspendiert und 2 Min. bei RT inkubiert. Nach einem erneutem Waschschrift wurden die Zellen zur Reduktion unspezifischer Bindungen mit einem anti-Maus CD32/CD16-Antikörper (0,25µg pro 1 Millionen Zellen (Fc-block) und anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-BrdU-Antikörper (Becton Dickinson, #340649, anti-BrdU-FITC) inkubiert. Die Analyse erfolgte im FACS.

3. Ergebnisse

Der CD95 Ligand (CD95L) ist ein Mitglied der TNF-Liganden-Familie und induziert Apoptose oder - unter bestimmten Bedingungen - auch Proliferation über die Bindung seines Rezeptors (CD95) (Lee und Ferguson, 2003). Darüber hinaus kann der CD95L auch seinerseits als Rezeptor fungieren und Signale in die CD95L-tragende Zelle übermitteln. Hierbei spielt der intrazelluläre Anteil des Moleküls eine essentielle Rolle (Suzuki und Fink, 2000; Desbarats *et al.*, 1998).

Um Proteine zu finden, die mit der intrazellulären Domäne des CD95 Liganden (s.Abb.3.1) interagieren und so die Funktionen des CD95L, wie die reverse Signalübertragung, den Transport zur Zelloberfläche oder die Kompetenz zur Induktion von Apoptose, beeinflussen könnten, wurde ein Hefe-2-Hybrid-Screen durchgeführt.

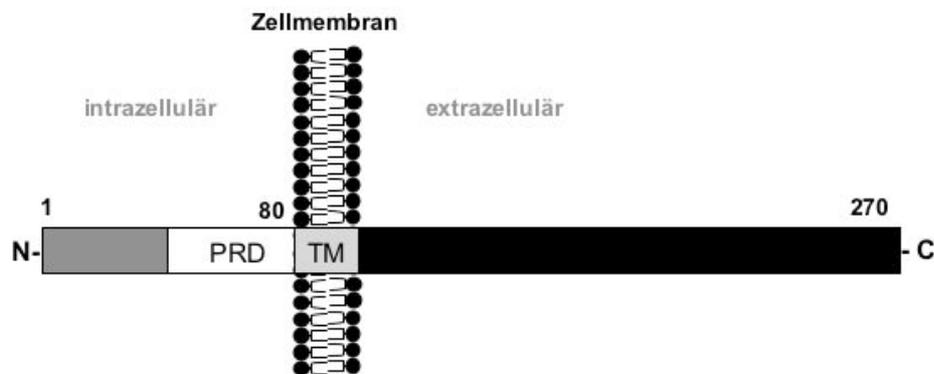


Abb.3.1: Schematische Darstellung des CD95L.

Die N-terminale intrazelluläre Domäne des Typ II Transmembranproteins CD95L besteht aus den Aminosäuren 1-80 und besitzt eine so genannte **prolinreiche Domäne (PRD)** im Bereich der Aminosäuren 40-80. Als Baitkonstrukt für den Hefe-2-Hybrid Screen wurde der zytosolische Bereich des murinen CD95L verwendet.

TM: Transmembranregion

3.1 Der Hefe -2- Hybrid Screen

Mit Hilfe des „Hefe-2-Hybrid Screens“ ist man in der Lage, eine sehr große Anzahl von Proteinen oder Peptiden auf eine Interaktion mit einem bestimmten Protein (in diesem Fall mit dem intrazellulären Anteil des CD95L) in Hefen hin zu untersuchen. Das Prinzip dieses Experiments beruht darauf, dass nur die Hefen sich vermehren können, die zwei miteinander interagierende Fusionsproteine exprimieren (Fields und Song, 1989).

Die intrazelluläre Domäne des murinen CD95 Liganden (mCD95L-intra) wurde mittels PCR amplifiziert und über in den Primern vorhandene Restriktionsschnittstellen in den Vektor pAS2.1 kloniert (pAS2.1-mCD95L-intra). Dieser Vektor gehört zum MatchmakerSystem der Fa.Clontech und fusioniert das so genannte „bait“ (Köder-Protein) C-terminal an die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) des Gal4-Proteins, einem eukaryotischen Transkriptionsfaktor, der aus zwei funktionellen Domänen, einer DNA-Bindungsdomäne und einer Transaktivierungsdomäne, besteht. Zusätzlich enthält dieses Plasmid ein Gen der Tryptophan (trp)-Biosynthese unter Kontrolle eines Hefepromotors, so dass Hefen, die mit diesem Plasmid transformiert wurden, Tryptophan synthetisieren und daher auf Tryptophan defizienten Agaroseplatten („drop out agar“: DOPA-trp) wachsen können. Hefen, die das Plasmid nicht enthalten, können auf diesen Platten nicht wachsen, da Tryptophan eine essentielle Aminosäure ist, die von den Hefen zum Wachstum benötigt, aber nicht selbst synthetisiert werden kann.

Zuerst wurden Hefen des *S.cerevisiae* Stammes Y190 mit dem Vektor pAS2.1-mCD95L-intra transformiert und auf DOPA-trp Platten ausgestrichen. Der Hefestamm Y190 enthält Gal4-induzierbare Reportergene für die Aminosäure Histidin und für das Enzym β -Galaktosidase. Zuerst wurden fünf der durch Wachstum auf DOPA-trp Platten erhaltenen Klone im Western Blot mit einem anti-Gal4-DBD-Antikörper auf die Expression des mCD95L-intra-Gal-DBD-Fusionsproteins untersucht. Zwei dieser Klone zeigten eine positive Expression des mCD95L-intra-Gal-4-DBD Baitkonstruktes (Abb.3.2). Es ist unklar, warum im Western Blot eine Doppelbande zu sehen ist.

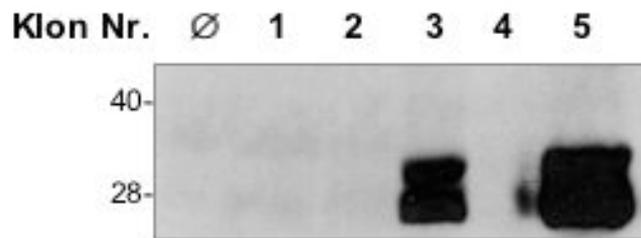


Abb.3.2: Western Blot-Analyse der mit *pAS2.1-mCD95L-intra* transformierten Y190 Hefeklone

Proteinlysate von Hefeklonen, die durch Wachstum auf DOPA-trp Platten auf das Vorhandensein des *pAS.2.1-mCD95L-intra* Bait-Konstruktes selektioniert worden waren, wurden im Western Blot mit einem anti-Gal4-DBD-Antikörper auf die Expression des mCD95L-intra-Gal4-DBD Fusionsproteins untersucht. Die Klone 3 und 5 zeigten eine positive Expression. Die Größe des Fusionsproteins beträgt 31kDa; es ist unklar, warum eine zusätzliche Bande bei ung. 25 kDa auftaucht.

Die beiden durch Wachstum auf DOPA-trp Platten erhaltenen Klone, die im Western Blot eine positive Expression des CD95-Liganden-DBD Fusionsproteins zeigten, wurden auf eine mögliche autonome Expression der beiden im Y190-Hefestamm vorhandenen Reportergene (Histidin und β -Galaktosidase) hin untersucht. Dazu wurden sie auf DOPA-trp, -his Platten ausgestrichen bzw. im X-Gal Test auf die Expression von β -Galaktosidase untersucht. Ein Klon (Nr.5) zeigte eine Blaufärbung im X-Gal Test und wurde daher nicht für den Screen verwendet. Mit dem anderen, nicht autonom aktivierenden mCD95L-intra exprimierenden Klon (Nr.3) wurde eine Maus-T-Zellymphom- (Thymoma-) cDNA-Bibliothek (Fa. Clontech) durchsucht (sequentielle Transformation, s.Abb.3.4). Die cDNA-Fragmente dieser Bibliothek lagen im pACT Vektor vor, der die Bibliothekproteine an den C-Terminus der GAL4-Transaktivierungsdomäne (-AD) fusioniert. Der Vektor besitzt außerdem ein Gen für die Biosynthese der essentiellen Aminosäure Leucin (leu). Die Diversität dieser Maus-Thymoma-Bibliothek wurde mit 3×10^6 angegeben, d.h. dass bei Herstellung dieser Bibliothek 3×10^6 unabhängige Klone erhalten wurden. In einem optimalen Experiment sollten mindestens dreimal so viele Klone gescreent werden, um keine eventuellen Bindungspartner auszulassen. Anhand der Anzahl von Kolonien auf einer DOPA -trp, -leu Platte, die also Bait- und Bibliotheksplasmide enthielten, wurde abgeschätzt, dass insgesamt 6.5×10^6 Klone gescreent wurden.

Interagiert das Köder-Protein mit einem Fusionsprotein aus der Bibliothek, wird aus der DNA-Bindungsdomäne und Transaktivierungsdomäne ein funktioneller Gal4

Transkriptionsfaktor gebildet (s.Abb.3.3), der die Transkription von unterschiedlichen Reporter genen induzieren kann.

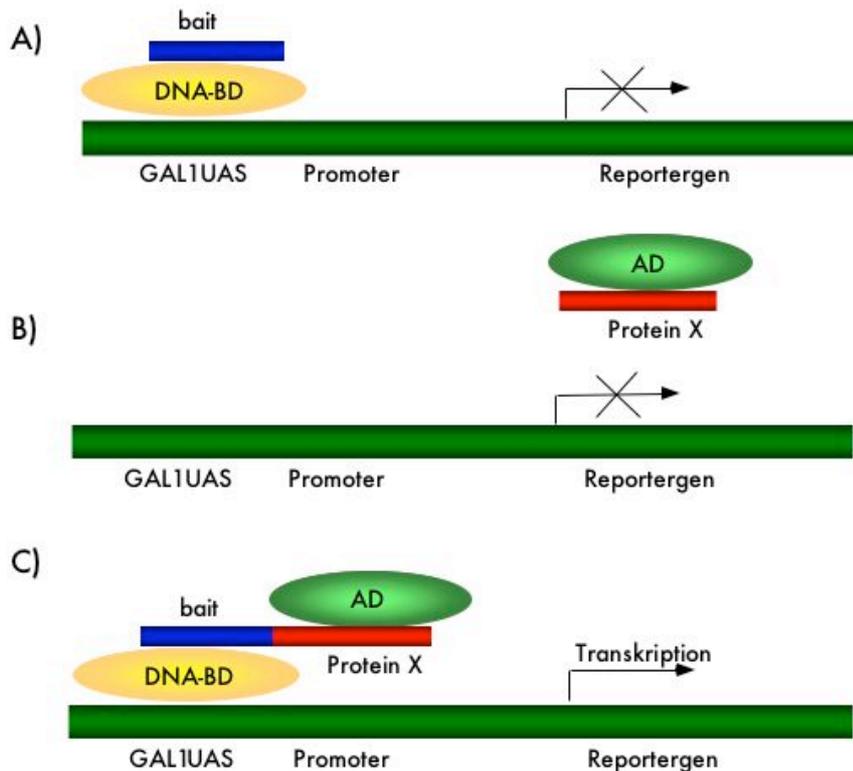


Abb. 3.3: Das Prinzip des Hefe-2-Hybrid Systems

Das „bait“- oder Köder-Protein wird als Fusionsprotein mit der Gal4 DNA-Bindedomäne (DNA-BD) exprimiert (A), das Bibliothek-Protein-X als Fusion mit der Gal4-Transaktivierungsdomäne (AD) (B). Eine Interaktion von Köder und Protein-X führt dazu, dass Gal4-AD und Gal4-DNA-BD einen funktionellen Gal4-Transkriptionsfaktor bilden, der die Transkription von Reporter genen induzieren kann (C). Diese Induktion ist ohne Interaktion nicht möglich (A und B).

Eines der Reporter gene des verwendeten Hefestammes Y190 ist ein Gen für die Biosynthese der ebenfalls essentiellen Aminosäure Histidin, so dass Hefeklonen mit interagierenden Proteinen und daher funktionellem Gal4-Transkriptionsfaktor auf Histidinfreien DOPA-leu, -trp Platten wachsen können (DOPA-leu, -trp, -his). Liegt keine Interaktion vor, wird die Expression von Histidin nicht induziert, und die Hefen, die auf das Vorhandensein dieser Aminosäure im Nährmedium angewiesen sind, können nicht wachsen (Abb. 3.3A/B). Um

die Interaktion in Hefen zu verifizieren, wurde die Aktivierung eines zweiten Gal4-abhängigen Reportergens getestet. Dazu wurden die nach einer Woche erhaltenen Klone (135) erneut auf DOPA-*leu*, -*trp*, -*his* Platten ausgestrichen und anschließend in einem β -Galaktosidase-Test auf die Transkription des zweiten Reportergens hin untersucht. Hefen, die das Enzym β -Galaktosidase exprimieren, wandeln die Substanz X-Gal in einen blauen Farbstoff um.

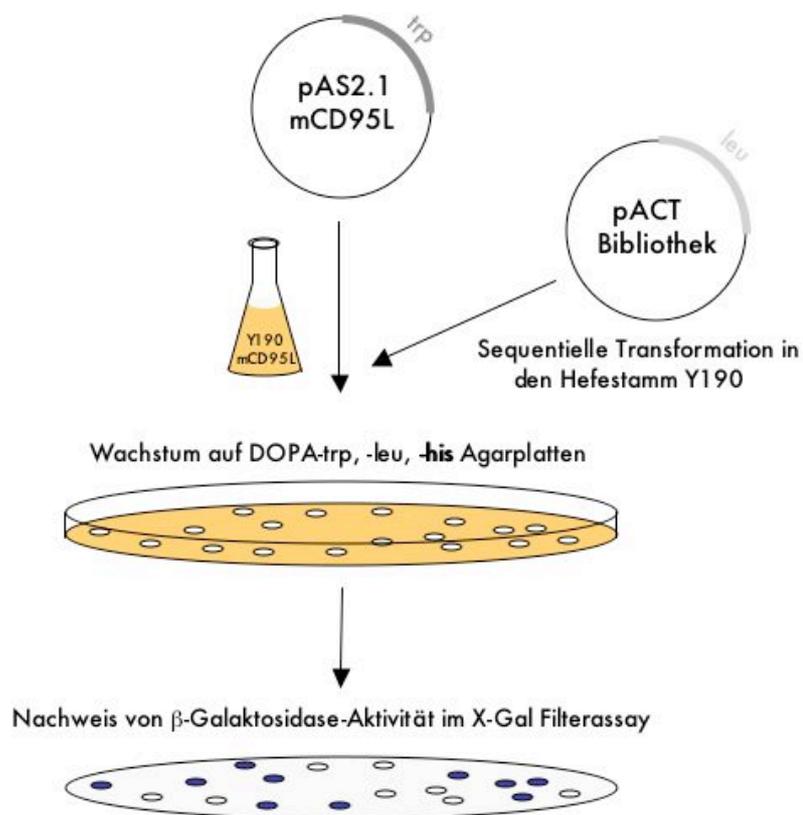


Abb.3.4: Schematische Darstellung der Vorgehensweise während des Hefe-2-Hybrid Screens

Das Baitplasmid und die cDNA-Bibliothek wurden sequentiell transformiert, d.h. dass zuerst ein Hefeklon hergestellt wurde, der das Baitplasmid *pAS2.1-mCD95L-intra* enthielt, in welchen wiederum die Maus-Thymoma-Bibliothek transformiert wurde. Durch das Ausplattieren auf Leucin- und Tryptophan-defizienten Drop-out Agarplatten (DOPA) wurde gewährleistet, dass die Hefen beide Plasmide enthielten. Die Interaktion des mCD95L-intra-Fusionsproteins mit einem Bibliotheks-Protein X führt zur Aktivierung von zwei unterschiedlichen Reportergenen. Positive Interaktionen werden durch Wachstum auf histidinfreien DOPA-*trp*, -*leu*-Platten mit anschließender Blau-Färbung im β -Galaktosidase Test detektiert.

48 Klone wurden nach erneutem Wachstum auf histidinfreien Agaroseplatten und positivem X-Gal-Test (s. Abb 3.5) weiter untersucht. Dazu wurde von jedem dieser Klone die DNA isoliert (genomische Hefe-DNA sowie Gesamt-Plasmid-DNA) und mittels Elektroporation in den Bakterienstamm KC8 transformiert.

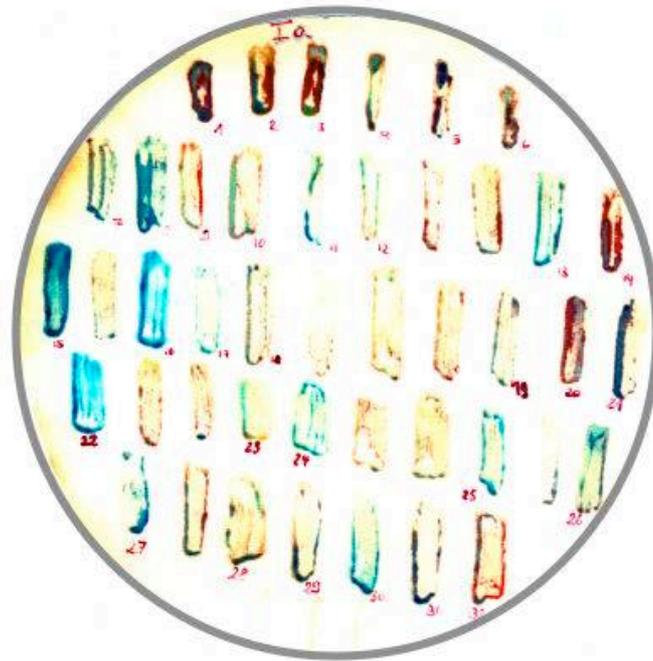


Abb.3.5: X-Gal Filter-assay der im CD95L-intra-Hefe-2-Hybrid Screen gefundenen Klone

Die im Hefe-2-Hybrid-Screen mit der intrazellulären Domäne des murinen CD95L erhaltenen Klone, die erneut auf DOPA-leu,-trp,-his wuchsen, wurden im X-Gal-Test auf die Expression des LacZ-Reportergens untersucht. Dazu wurden die Zellen auf einen Rundfilter replikaplattiert, durch das Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und mit X-Gal-Puffer inkubiert. Zellen, die β -Galaktosidase exprimieren, wandeln X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Trotz der relativ schlechten Qualität dieser Abbildung ist zu erkennen, dass nicht alle Klone in diesem Experiment eine Blaufärbung zeigten. Von den 44 Klonen dieser Platte wurden 32 Klone für die weitere Analyse ausgewählt.

Zur Identifizierung der mit CD95L interagierenden Proteine wurden anschließend aus den KC8-Bakterien die pACT-Plasmide isoliert. Hier wurde die Tatsache genutzt, dass die Bakterien des Stammes KC8 in der Lage sind, die vom pACT-Plasmid verwendeten Hefe-Codons zu übersetzen und somit ein funktionelles Protein der Leucin-Biosynthese zu exprimieren, so dass auf M9 Selektionsagarplatten mit Ampicillin und ohne Leucin auf das Vorhandensein des pACT-Plasmids selektioniert werden konnte. Die isolierten Plasmide

III. Ergebnisse

wurden anschließend einem Kontrollverdau unterzogen. Dieser wurde zuerst mit dem Restriktionsenzym *Xho I* durchgeführt, mit dem das komplette „Insert“ herausgeschnitten werden konnte. Zur genaueren Unterscheidung verschiedener cDNAs wurden die Plasmide zusätzlich mit dem häufig schneidenden Enzym *Alu I* („four base cutter“) verdaut. Nach diesem Kontrollverdau wurden 16 verschiedene cDNAs, die durch unterschiedliche Bandenmuster identifiziert wurden, in Hefen re-transformiert und nach erneuter positiver Interaktion mit dem Köderprotein mCD95L-intra sequenziert.

Als Negativkontrolle wurden die Plasmide auch in Hefen transformiert, die ein anderes Köderprotein, wie z.B. das Adaptorprotein FADD, als Gal4-DBD-Fusionsprotein exprimierten. Keiner der 16 Klone zeigte ein unspezifisches Wachstum unter diesen Bedingungen.

Um mit den erhaltenen DNA-Sequenzen Homologien zu anderen, bereits in Genbanken deponierten Sequenzen zu ermitteln, wurden die Sequenzen im Internet mit BLASTN (Vergleich der Nucleotidsequenz mit der Nucleotidsequenzdatenbank) untersucht (National Center for Biotechnology Information /NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Die Namen und die Genbank-Referenznummern der zu den erhaltenen cDNAs homologen Sequenzen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Name/ Referenz-Nr.	Funktion	Häufigkeit
Cytochrome β -558 #M31775	-Untereinheit der „microbicidal oxidase“ in Phagozyten -interagiert mit SH-3-Domänen	1
Formin binding protein (FBP11) #AF135439/ human FasL associated factor	-homolog zu einem Spleißprotein PrP40 -besitzt zwei WW-Domänen , die mit prolinreichen Domänen interagieren	2
Lef-1 #NM_010703	-HMG-Box Transkriptionsfaktor der Wnt/ β -Catenin- Signalübertragung	1
LIMP II/ CD36 antigen like mRNA #AB008553	-lysosomales Membran-Glycoprotein	1
Oxidase (cyt C) assembly like protein (OXA1) #NM_005015	-ist involviert in die Verknüpfung verschiedener Komponenten der mitochondrialen Atmungskette	2
Patent 3 - SMAD interacting polypeptides #AX002196	-unbekanntes Protein, Smads sind die Effektoren der TGF- β Signaltransduktion - TGF- β induziert die Expression von MMP9	1

Name/ Referenz-Nr.	Funktion	Häufigkeit
Prolyl 4-hydroxylase alpha(I)- subunit/MMU16162 alpha(II) -subunit #MMU16163	-katalysiert die Hydroxylierung von X-Pro-Gly Sequenzen und spielt eine zentrale Rolle bei der Kollagensynthese -besitzt eine bekannte Polyprolin-Bindungsdomäne	8 bzw. 2
PSTPIP (Prolin-Serin- Threonin- phosphatase interacting protein) #U87814	-besitzt eine SH-3 Domäne -verknüpft die intrazelluläre Domäne von CD2 mit der Protein-Thyrosin-Phosphatase PTP-PEST	1
Ran BPM/ B-cell receptor associated antigen #AF306510	-Ran GTPase bindendes , zentrosomales Protein	3
TARPP # AF324451	-Spleißvariante des neuronalen ARPP-21 Proteins -Expression in Thymozyten während der Reifung	8
Tousled like kinase (TLK) #AF162666	-zellzyklusregulierte Serin-/Threonin-Kinase	1
homo sapiens zincfinger protein like mRNA #AF030291	-unbekannte Funktion	3

Tabelle 3.1: Auflistung der Proteine, die im Hefe-2-Hybrid Screen mit der intrazellulären Domäne des mCD95L interagieren

In der Tabelle sind die Namen der identifizierten cDNAs, die Genbank-Referenznummer, eine kurze Beschreibung der Funktion der Proteine, sowie die Häufigkeit, mit der die cDNAs im Screen identifiziert wurden, aufgetragen. Die in blau hervor gehobenen Proteine werden im Text genauer beschrieben.

Außerdem wurden drei unbekannte cDNA-Sequenzen (1: Bereich in der 3' UTR des *Ubiquitin conjugating enzyme (Ubc5)*-Gens #NM_009455; 2: #D63484; 3: #AW556602) gefunden.

Vier der 13 erhaltenen Sequenzen beinhalteten eine bekannte Polyprolin-Bindungsdomäne, was die Relevanz der erhaltenen Interaktionen andeutet, da eine solche prolinreiche Domäne im intrazellulären Bereich des CD95L vorhanden ist. Polyprolin-Bindungsdomänen sind z.B. SH3- oder WW-Domänen (Sudol et al., 1996).

Wie erwartet wurden hauptsächlich C-terminale Fragmente als Bindungspartner identifiziert, da die Bibliothek durch Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit oligo-d(T)-Primern hergestellt wurde. Das bedeutet, dass die PCR-Reaktion am 3'-Ende der mRNA, dem Poly-(A)-Schwanz, beginnt und bei langen mRNAs nicht bis zum Translationsstart reicht.

3.2 Detaillierte Beschreibung einiger potentieller Interaktionspartner

PSTPIP („Proline, Serine, Threonine Phosphatase interacting Protein“) ist ein Adaptormolekül, welches zuerst als Interaktionspartner der Phosphatase PTP-HSCF beschrieben wurde (Spencer *et al.*, 1997). Das humane PSTPIP-Homolog wurde als CD2-bindendes Protein identifiziert und daher als CD2BP1 bezeichnet („CD2 binding protein 1“)(Li *et al.*, 1998). Auch CD2 wurde als co-stimulatorisches Molekül in T-Zellen beschrieben (Bierer *et al.*, 1988). In der vorliegenden Arbeit werden das murine Protein als mPSTPIP und das humane Protein als hPSTPIP bezeichnet. PSTPIP erscheint im Zusammenhang mit CD95L aus verschiedenen Gründen interessant, da es als Protein, welches mit dem Zytoskelett verbunden ist, sowohl für die Signalübertragung als auch für den Transport des Liganden von Bedeutung sein könnte. Die im Hefe-2-Hybrid-Screen gefundene cDNA beinhaltete nicht die gesamte kodierende Sequenz des *pstpip*-Gens sondern nur den Bereich von Aminosäure 130-415. In diesem Bereich befindet sich sowohl die SH3-Domäne als auch ein Teil einer „Coiled-coil“ Region (Abb.3.6; B).

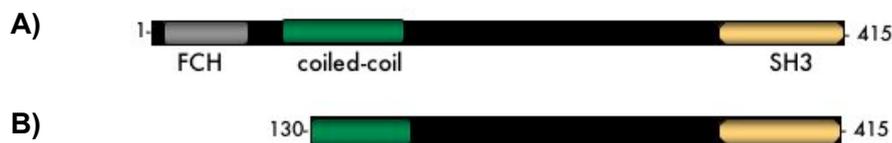


Abb.3.6: Schematische Darstellung des PSTPIP-Proteins

Im N-Terminus des Proteins befindet sich eine FCH-Domäne (Fes/CIP-homology domain) (AS 12-93) sowie eine „Coiled-coil“ Proteininteraktionsdomäne (AS 123-288). Die SH3-Domäne findet man C-terminal (AS 360-415) in dem Bereich, der auch im Hefe-2-Hybrid Screen gefunden wurde (B).

TARPP („thymocyte ARPP“) ist eine Spleißvariante des neuronalen, cAMP-regulierten Phosphoproteins ARPP-21 Proteins und ist vermutlich für die Thymozytenreifung wichtig (Kisielow *et al.*, 2001). Die Expression von TARPP wird in unreifen Thymozyten ab dem frühen CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁺ Stadium beobachtet und wird nach der Neuordnung („rearrangement“) des T-Zellrezeptorlokus herunter reguliert. Abgesehen vom ARPP-21-N-Terminus des Proteins, ist nur eine R3H-Domäne, die Nukleinsäuren bindet, bekannt. Keine

III. Ergebnisse

dieser beiden Domänen ist in dem im Hefe-2-Hybrid Screen gefundenen cDNA-Klon enthalten (Abb.3.7, B).

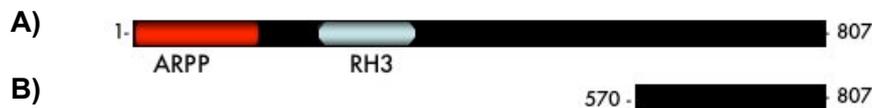


Abb.3.7: Domänenstruktur des murinen Proteins TARPP

Zwei Domänen sind bekannt, zum einen die ARPP-homologe Domäne am N-Terminus und zum anderen eine Nukleinsäuren-bindende Domäne (RH3). Als mit CD95L interagierender Bereich wurde der TARPP C-Terminus (AS 570-807) gefunden (B).

Die Sequenz des murinen Proteins TARPP wurde erst einige Monate nach Beendigung des Screens in die NCBI-Datenbank eingegeben. Die Homologiesuche hatte zunächst nur die unbekannte humane Sequenz cDNA DKFZp566N1(#AL133109) ergeben. Mittlerweile findet sich ein zusätzlicher Eintrag in der Datenbank, der das Protein als „Mus musculus protein phosphatase 1, regulatory (inhibitory) subunit“ (#BC053001) bezeichnet -allerdings ohne weitere Angaben.

Lef-1 (engl.: lymphoid enhancer factor) ist ein „High mobility group (HMG) box“ Transkriptionsfaktor der TCF-Familie (TCF: „T-cell factor“), deren Mitglieder eine wichtige Rolle in der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung spielen (Travis *et al.*, 1991). Lef-1 wird hauptsächlich in Lymphozyten aktiviert und ist wichtig für Proliferation von B-Zellen, da Lef-1⁻ /- B-Zellen einen Proliferationsdefekt und eine erhöhte Apoptosesensitivität aufweisen, welche wiederum von einem Anstieg der CD95 Expression abhängig zu sein scheinen (Reya *et al.*, 2000). Es scheint demnach eine Verbindung von Lef-1 zu CD95 zu geben. Des Weiteren induziert Lef-1 die Transkription von Matrilysin, einer Metalloproteinase, die an der Abspaltung des löslichen CD95L beteiligt ist (Rivat *et al.*, 2003). Der im Screen identifizierte Bereich beinhaltet die HMG-DNA-Bindedomäne.



Abb.3.8: Schematische Darstellung von Lef-1.

Der im Hefe-2-Hybrid Screen gefundene C-Terminus beginnt bei AS 203 des Lef-1 Proteins (B). In diesem Bereich befindet sich die „High mobility group (HMG)“ DNA-bindende Domäne.

LIMP II (Lysosome membrane protein II, CD36 antigen-like 2, LGP85) ist ein lysosomales Membranprotein (Tabuchi *et al.*, 1997) und schien im Kontext dieses Screens interessant, da der CD95L in zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen in so genannten sekretorischen Lysosomen gespeichert wird (Bossi und Griffiths, 1999). LIMP II besitzt jedoch keine bekannte SH3-Bindungsdomäne.

Im Screen wurde der gesamte kodierende Bereich erhalten.

Die „Tousled like kinase“ TLK ist eine zellzyklusregulierte Serin-Threonin Kinase (Silje *et al.*, 1999; Shalom *et al.*, 1999). Der intrazelluläre Anteil des CD95L weist potentielle Phosphorylierungsstellen auf, aber es wurde bisher noch keine Kinase gefunden, die in der Lage ist, CD95L zu phosphorylieren. Aus diesem Grund wurde dieses Protein für weitere Untersuchungen ausgewählt. Im Screen wurden der Bereich der Aminosäuren 281-718 gefunden, der neben zwei Coiled-coil Proteininteraktionsdomänen auch die Kinasedomäne enthält (Abb.3.9B).

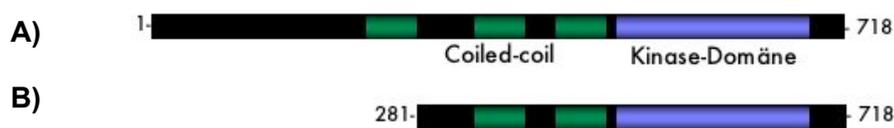


Abb.3.9: Schematische Darstellung der Kinase TLK

Der im Hefe-2-Hybrid Screen gefundene C-Terminus (B) beginnt bei AS 281. In diesem Bereich befinden sich die Kinase-Domäne sowie zwei Coiled-coil Proteininteraktionsdomänen.

Das **Formin Binding Protein 11** (FBP 11) ist ein Protein der so genannten WW-Domänen Familie (Bedford *et al.*, 1998). WW-Domänen sind Poly-Prolin-Interaktionsdomänen, die vor allem in den Forminen und Formin-bindenden Proteinen vorkommen und durch mindestens zwei konservierte Tryptophane (W) gekennzeichnet sind (Chan *et al.*, 1996). FBP11 besitzt zwei dieser WW-Domänen in den Bereichen der AS 440-521 und AS 560-640 und bindet die Konsensussequenz „PPLP“ (Bedford *et al.*, 1997). Diese Sequenz findet sich im intrazellulären Bereich des hCD95L zwischen AS 50 und AS 70 insgesamt dreimal. Ein anderer Datenbankeintrag (#U70667) beschreibt einen Teil des FBP11-Proteins als „human fas-ligand associated factor“ und wurde von einer japanischen Gruppe ohne weitere Angaben in der NCBI-Datenbank veröffentlicht (Hachiya *et al.*, 1997).



Abb.3.10: Schematische Darstellung des FBP11-Proteins

Das FBP11-Protein enthält zwei WW-Domänen in den Bereichen der Aminosäuren 440-521 und 560-640. Beide WW-Domänen wurden von dem in Hefen mit mCD95L-intra interagierenden Teil (AS 109-954) des Proteins exprimiert (B).

3.3 Verifikation der Interaktionen *in vitro* durch GST-Pulldown-Experimente

Die Inserts der hier genauer beschriebenen Klone wurden mittels RT-PCR amplifiziert und in andere Vektoren kloniert. Z.T. wurden andere Arbeitsgruppen angeschrieben, um Originalplasmide zu erhalten. Zur Verifizierung der in Hefe beobachteten Interaktionen wurde ein *in vitro* GST-Pulldown mit dem kompletten intrazellulären Anteil von CD95L, aber auch mit verschiedenen CD95L-Deletionsmutanten (Abb.3.11) durchgeführt.



Abb.3.11: Schematische Darstellung der CD95L Deletionsmutanten

Die Deletionsmutante der prolinreichen Domäne (PRD) des CD95L, d.h. die Deletion von Aminosäure 40-80, wird als CD95L Δ 40-80 bezeichnet. CD95L Δ 1-39 beinhaltet nur die PRD sowie die restliche extrazelluläre Sequenz. Die intrazelluläre Domäne, d.h. die Deletionsmutante ohne Transmembran- und extrazellulärer Domäne, wird CD95L-intra genannt. Expressionskonstrukte im Vektor pCR33 wurden uns von H.Eibel aus Freiburg zur Verfügung gestellt.

Zunächst sollten die in Hefen identifizierten potentiellen Interaktionspartner auf ihre Bindung an CD95L *in vitro* hin untersucht werden. Hierfür wurden GST-Pulldown Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe eine direkte Interaktion zweier Proteine *in vitro* nachgewiesen werden kann. Dabei liegt eines der beiden Proteine als bakteriell exprimiertes Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) vor, während der potentielle Interaktionspartner *in vitro* transkribiert und translatiert und dabei mit radioaktivem ^{35}S -Methionin markiert wird. Um ein GST-Fusionsprotein zu erhalten, wurde die jeweilige cDNA in den Vektor pGEX2TK „in frame“ mit der für GST kodierenden Sequenz kloniert. Zur *in vitro* Translation des zu untersuchenden Proteins wird, abhängig von der eingesetzten RNA-Polymerase, ein T7, T3 oder SP6 Promotor benötigt.

Zuerst wurde das GST-Fusionsprotein wie z.B. CD95L-intra-GST in BL21codon⁺ Bakterien exprimiert und mittels Glutathionagarose aufgereinigt, an die der GST-Anteil des Fusionsproteins bindet. Das aufgereinigte Protein wurde dann mit einem *in vitro* translatierten, ^{35}S -Met. markierten Protein inkubiert. Binden die beiden Proteine spezifisch aneinander, verbleibt das *in vitro* translatierte Protein zusammen mit dem GST-Fusionsprotein auch nach mehreren Waschschriffen an der Glutathionagarose und wird nach

III. Ergebnisse

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie detektiert. In der so genannten „Input“-Spur wurden 10% des eingesetzten ^{35}S -markierten Proteins aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde GST alleine eingesetzt, an die das *in vitro* translatierte Protein nicht binden sollte. Zur Abschätzung der Mengen an eingesetztem GST bzw. GST-Fusionsprotein wurden die Proteingele mit Coomassie gefärbt.

Eine *in vitro* Bindung an die intrazelluläre CD95L-Domäne konnte für Lef-1, FBP11, TARPP und PSTPIP nachgewiesen werden.

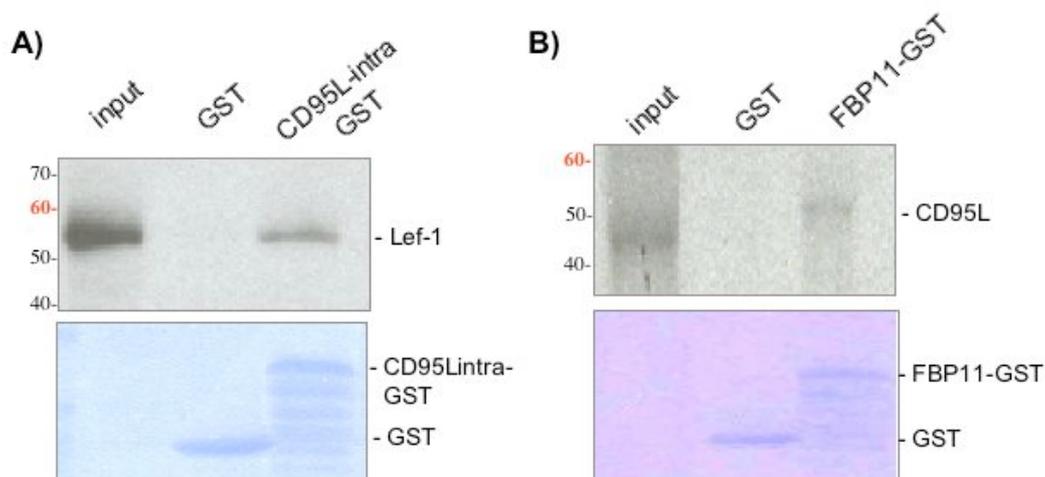


Abb.3.12: Nachweis der Interaktion von CD95L-intra mit Lef-1 bzw. FBP11 im *in vitro* GST-Pulldown.

A: *In vitro* translatiertes Lef-1 bindet an CD95L-intra-GST, jedoch nicht an GST. In der Input-Spur wurde 10% des zum Pulldown verwendeten *in vitro* translatierten Lef-1 eingesetzt. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt die Menge an eingesetztem GST und CD95L-intra-GST Fusionsprotein **B:** Nachweis der Bindung von *in vitro* translatiertem vollständigem CD95L an FBP11-GST. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt die Menge an eingesetztem GST und FBP11-GST Fusionsprotein

Wie in der Abbildung 3.12 zu erkennen ist, bindet *in vitro* translatiertes Lef-1 an den intrazellulären Teil des CD95L-GST-Fusionsproteins. In der als „Input“ bezeichneten Spur wurde 10% des *in vitro* translatierten Lef-1-Proteins aufgetragen. Die Coomassie-Färbung des Gels zeigt eine ungefähr gleiche Menge an GST und GST-Fusionsprotein. Außerdem ist anhand der vielen Banden zu erkennen, dass das CD95L-intra-GST-Fusionsprotein offensichtlich partiell abgebaut wurde, was aber keinen Einfluss auf das Experiment haben sollte, da nur die Proteine aufgereinigt werden, die noch den GST-Anteil exprimieren.

III. Ergebnisse

Da das FBP11 Protein als GST-Fusion vorlag (pGEX2TK-FBP11), wurde in diesem Fall das Experiment mit FBP11-GST und *in vitro* translatiertem CD95L durchgeführt. Auch hier zeigt sich eine Interaktion der beiden Proteine (3.12C).

Eine andere Möglichkeit zur Durchführung des GST-Pulldowns ist die Verwendung von Zelllysaten transfizierter Säugerzellen anstelle von *in vitro* translatierten Proteinen. Der Nachweis des interagierenden Proteins erfolgt im Western Blot über die Detektion durch einen spezifischen Antikörper. Der im Hefe-2-Hybrid Screen gefundene Teil der TARPP-cDNA wurde in den Vektor pGEX2TK kloniert, um ein GST-Fusionsprotein zu erhalten. Dieses Fusionsprotein wurde bakteriell exprimiert, mittels Glutathionagarose aufgereinigt und anschließend mit Lysaten von CD95L-negativen 293T Zellen bzw. mit CD95L-exprimierenden 293-005 Zellen (293 Zellen, die den humanen CD95 Liganden stabil exprimieren) inkubiert.

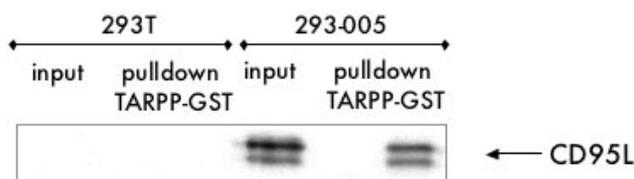


Abb.3.13: TARPP-GST interagiert mit CD95L.

Lysate von 293T bzw. 293-005 Zellen, die mit hCD95L stabil transfiziert worden waren, wurden mit TARPP-GST inkubiert. Die Aufreinigung des TARPP-GST erfolgte mit Glutathionagarose, und der daran gebundene hCD95L konnte im Western Blot mit dem anti-hCD95L-Antikörper G247 nachgewiesen werden.

Wie in der Abbildung 3.13 zu sehen ist, bindet das im Zelllysate vorliegende hCD95L-Protein an TARPP-GST. Dies wurde im Western Blot mit dem anti-hCD95L-Antikörper G247 überprüft.

Es zeigte sich auch eine Interaktion von mPSTPIP mit hCD95L im *in vitro* GST-Pulldown (Abb.3.14).

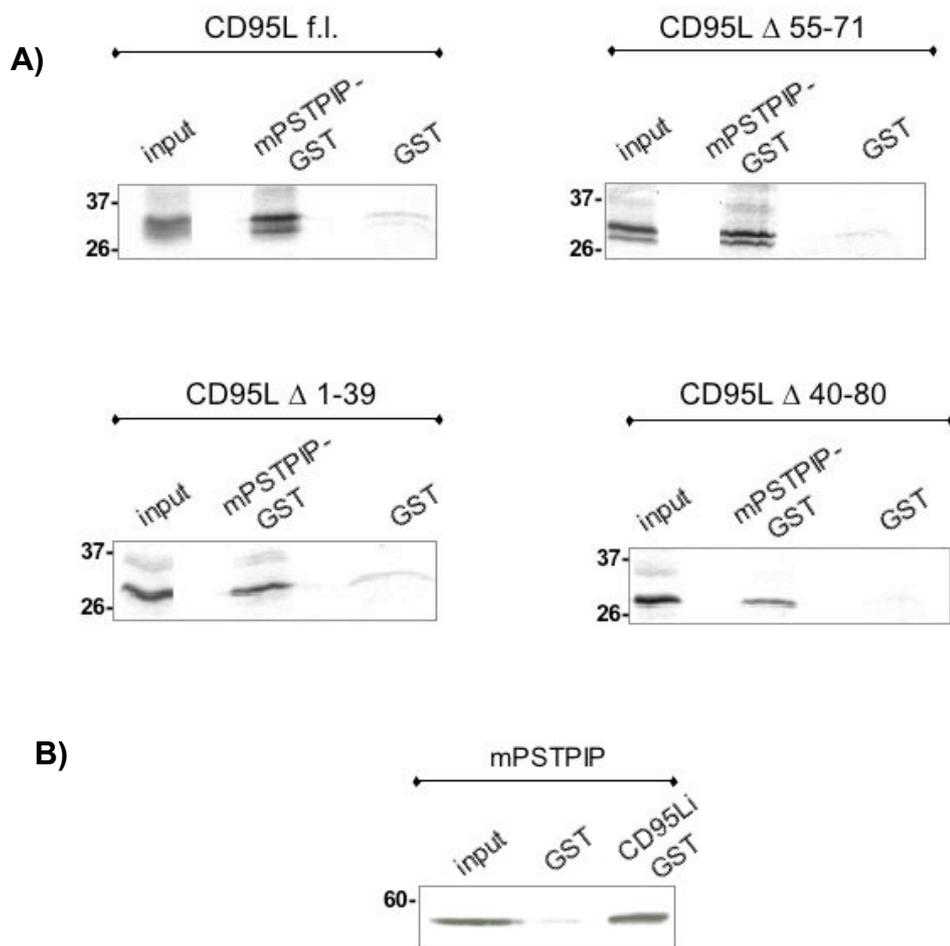


Abb.3.14: Untersuchung der Interaktion des vollständigen hCD95L Proteins sowie verschiedener hCD95L Deletionsmutanten mit mPSTPIP-GST im *in vitro* GST-Pulldown

A: Verschiedene *in vitro* translatierte und mit ^{35}S -Methionin markierte Deletionsmutanten von hCD95L sowie das vollständige hCD95L-Protein wurden auf ihre Bindung an mPSTPIP-GST untersucht. hCD95L bindet an mPSTPIP-GST und zeigt nur eine sehr schwache, unspezifische Bindung an GST. Die Deletion der ersten 39 Aminosäuren (Δ 1-39) des humanen CD95L sowie der Aminosäuren 55-71 (Δ 55-71) hat keinen Einfluß auf die Interaktion mit mPSTPIP. Die Deletionsmutante Δ 40-80, bei der ein Großteil der prolinreichen Region des CD95L deletiert wurde, zeigt im Vergleich zu den anderen Konstrukten eine schwächere Bindung an mPSTPIP-GST **B:** Auch im umgekehrten Experiment, d.h. mit *in vitro* translatiertem mPSTPIP und mCD95L-intra-GST (mCD95Li) konnte die Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden.

Da PSTPIP eine SH3-Domäne besitzt, die bekanntermaßen an prolinreiche Regionen bindet, wurde die Interaktion von PSTPIP mit verschiedenen CD95L-Deletionsmutanten, die entweder die prolinreiche Domäne im Bereich der AS 40-80 enthielten oder diese deletiert wurde, untersucht. Nicht nur das vollständige CD95L-Protein bindet PSTPIP, sondern auch die Deletionsmutante Δ 1-39, die einen Großteil der prolinreichen Domäne exprimiert, sowie Δ 55-71, bei der ein Teil der prolinreichen Region deletiert wurde (Abb.3.14A). Die Deletion der Aminosäuren 40-80, d.h. einem Großteil der prolinreichen Region, führt im Vergleich

III. Ergebnisse

zum vollständigen CD95L-Protein zu einer verringerten, aber nicht vollständig aufgehobenen Bindung an PSTPIP. Die Ursache dafür könnte im Vorhandensein einer weiteren SH3-Konsensussequenz (PxxP) im Bereich der AS 20-25 des humanen Liganden liegen (s.Abb.4.1).

Im Falle der PSTPIP/CD95L-Interaktion wurde der GST-Pulldown in beide Richtungen durchgeführt, d.h. mit mPSTPIP-GST und *in vitro* translatiertem hCD95L bzw. mit mCD95L-intra-GST und *in vitro* translatiertem mPSTPIP (Abb. 3.14B). Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die Spezifität der Interaktion unabhängig von der Spezieszugehörigkeit (murin oder human) der Proteine ist.

Um zu bestätigen, dass die Bindung an CD95L über die PSTPIP-SH3-Domäne vermittelt wird, wurde diese deletiert und das restliche Protein auf seine Interaktion mit CD95L hin untersucht.

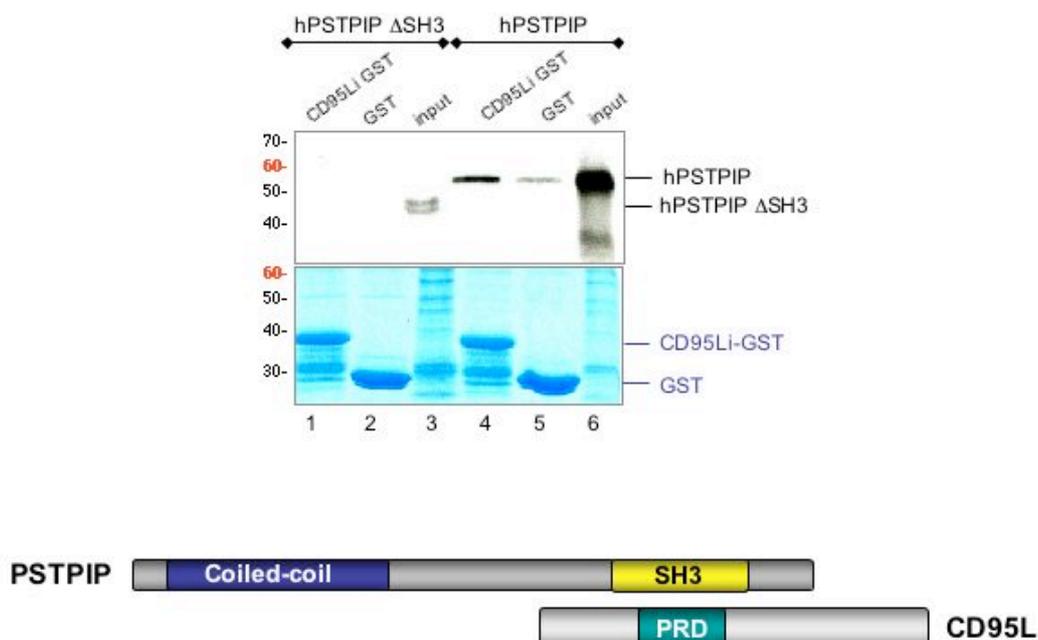


Abb.3.15: Untersuchung der Interaktion von hPSTPIP Deletionsmutanten an CD95Lintra-GST im GST-Pulldown

Humanes PSTPIP (hPSTPIP) und humanes PSTPIP ohne SH3-Domäne (hPSTPIP ΔSH3) wurden *in vitro* translatiert und auf ihre Bindung an mCD95L-intra-GST (CD95Li-GST) hin untersucht. In der „input“ Spur wurden 10% des eingesetzten hPSTPIP aufgetragen, in der GST-Spur wurde die unspezifische Bindung an GST untersucht. *In vitro* translatiertes hPSTPIP zeigt eine schwache Bindung an GST (Spur 5). In der Coomassie-Färbung ist jedoch zu erkennen, dass etwas mehr GST als mCD95L-intra-GST eingesetzt wurde. hPSTPIP wird von mCD95Lintra-GST gebunden (Spur 4), nicht jedoch die hPSTPIP Deletionsmutante ohne SH3-Domäne (Spur 1). Demnach bindet PSTPIP über die SH3-Domäne an CD95L, wie im gezeigten Schema angedeutet wird.

III. Ergebnisse

Durch Deletion der hPSTPIP-SH3 Domäne wird die Bindung von hPSTPIP an mCD95L-intra-GST vollständig aufgehoben (Abb.3.15, Spur 1). Dies und die Ergebnisse des zuvor gezeigten Experimentes belegen, dass die Interaktion von PSTPIP und CD95L über die prolinreiche Region des CD95L und der PSTPIP-SH3-Domäne vermittelt wird, was schematisch in Abbildung 3.15 dargestellt ist.

Als nächstes wurde die Bindung von LIMP II bzw. TLK1 an CD95L untersucht.

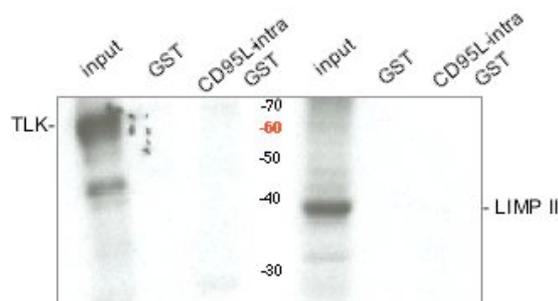


Abb.3.16: GST-Pulldown mit mCD95L-intra-GST und *in vitro* translatiertem TLK1 bzw. LIMP II

Für die Kinase TLK1 und das lysosomale Membranprotein LIMP II konnte *in vitro* keine Bindung an den intrazellulären Anteil des CD95L (CD95L-intra) nachgewiesen werden. Sowohl TLK1 als auch LIMP II wurden mit ^{35}S markiert (*in vitro* Translation) und mit GST alleine oder mCD95L-intra-GST inkubiert. Für beide Proteine zeigte sich keine Bindung an GST und mCD95L-intra-GST.

Wie in der Abbildung 3.16 zu sehen ist, zeigten die Kinase TLK und das lysosomale Membranprotein LIMP II keine Bindung an CD95L-intra-GST im *in vitro* GST-Pulldown. Vladimir Kirkin aus unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch eine Interaktion von LIMP II mit dem vollständigen CD95L-GST Protein zeigen (unveröffentlichte Daten).

Prinzipiell konnten also die im Hefe-2-Hybrid Screen gefundenen Interaktionen mit CD95L von zumindest vier der sechs untersuchten Klone im GST-Pulldown verifiziert werden. Die Bindungen von LIMP II und der Kinase TLK an den intrazellulären Anteil von CD95L im Hefe-2-Hybrid Screen waren entweder falsch-positiv, oder es wird eine posttranslationelle Modifikation – wie zum Beispiel Phosphorylierung – eines Interaktionspartners zur Bindung benötigt, die zwar in Hefen, nicht jedoch bei der bakteriellen Expression bzw. der *in vitro* Translation stattfindet. Alternativ ist es auch möglich, dass die Bindung indirekt über ein oder mehrere in *S.cerevisiae* vorhandene Adaptorproteine stattgefunden hat.

Nachdem die Bindung von PSTPIP an den CD95 Liganden *in vitro* bestätigt werden konnte und dieses Protein aufgrund seiner publizierten Eigenschaften im Kontext der Funktionen des CD95L sehr interessant erschien, wurden mit diesem Protein weitere *in vivo* Untersuchungen durchgeführt.

3.4 Verifikation der CD95L/PSTPIP-Interaktion durch *in vivo* Co-Immunpräzipitations-Experimente

Eine Möglichkeit, Interaktionen zweier Proteine *in vivo* nachzuweisen, ist die Co-Immunpräzipitation (Co-IP). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein Protein oder ein Proteinkomplex aus einem Zelllysate gebunden und durch Bindung des Antikörpers an Protein A- oder Protein G-Agarose vom restlichen Lysat getrennt werden kann. Mit den Lysaten transfizierter 293T Zellen wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit einem spezifischen Antikörper gegen CD95L oder alternativ gegen PSTPIP durchgeführt. Interagieren die beiden Proteine miteinander, kann das jeweils andere Protein im Western Blot detektiert werden.

In der „input“-Spur wurde ein Aliquot (5-10%) des für die IP eingesetzten Zelllysates aufgetragen. Dessen Analyse im Western Blot sollte die Anwesenheit und die Menge der jeweiligen Bindungspartner im Zelllysate belegen.

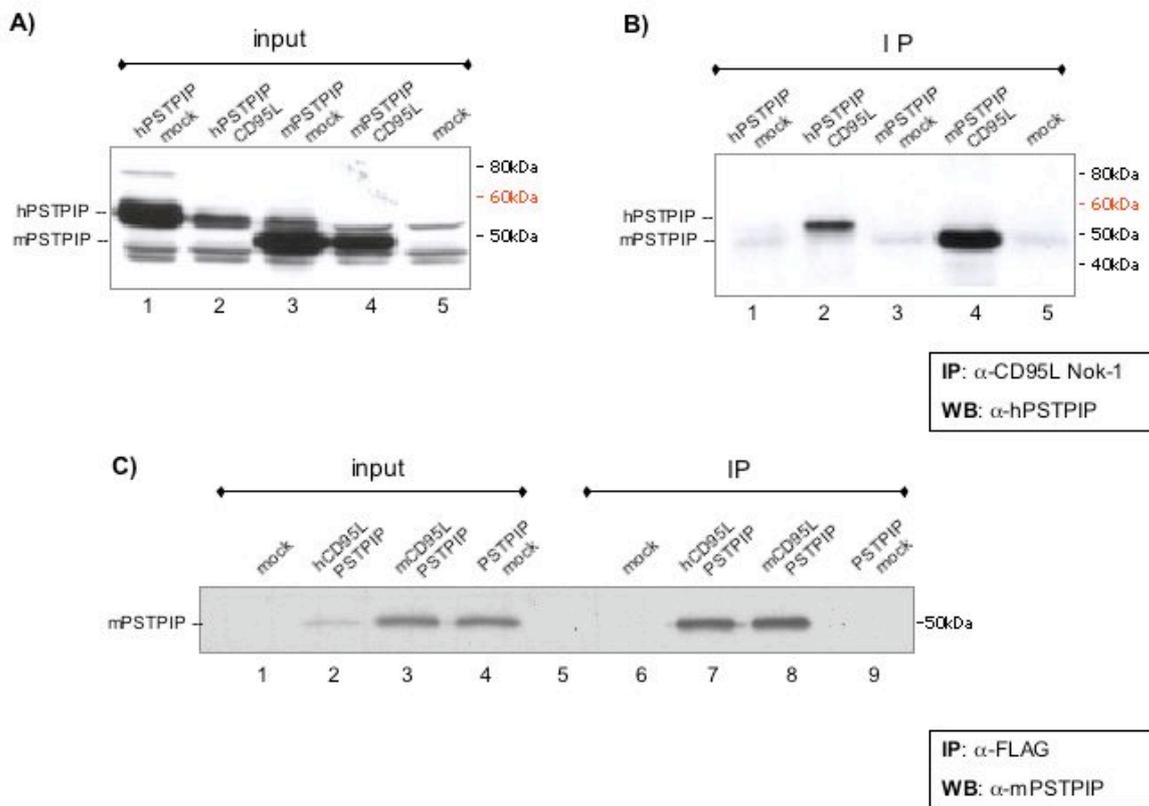


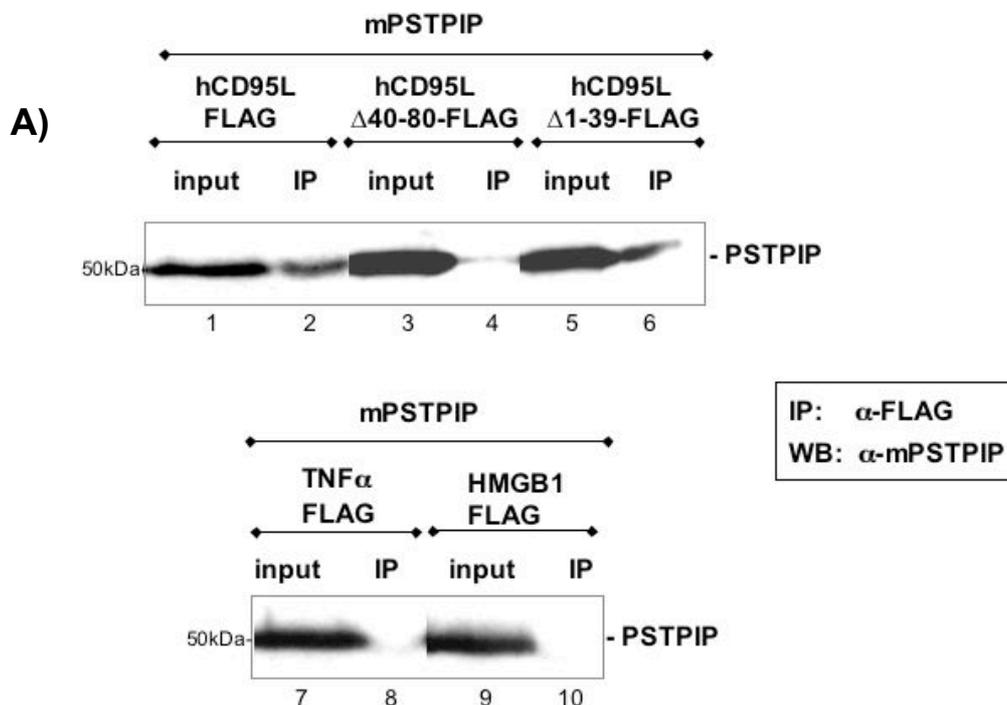
Abb.3.17: In 293T Zellen überexprimiertes PSTPIP und CD95L können co-immunpräzipitiert werden

293T Zellen wurden mit *pRK-mPSTPIP* bzw. *pcDNA3.1-hPSTPIP* und *pCR33-hCD95L* oder *pRK-PSTPIP* bzw. *pcDNA3.1-hPSTPIP* und Leervektor (mock) transfiziert und nach 48h lysiert. In **A** ist ein Western Blot gezeigt, in dem die Zelllysate auf die Expression von PSTPIP hin untersucht wurden. Das unaufgereinigte hPSTPIP-Antiserum (erhalten von C.Wise, Texas, USA) erkennt die humane und murine Form von PSTPIP, zeigt aber auch unspezifische Banden in allen Spuren. **B**: Nach Immunpräzipitation mit dem anti-CD95L-Antikörper Nok-1 und Protein G konnte im Western Blot mit dem anti-hPSTPIP-Antikörperserum eine spezifische Bindung von humanem und murinem PSTPIP an hCD95L gezeigt werden (Spur 2 und 4). **C**: In einem weiteren Experiment wurden 293T Zellen mit *pRK-mPSTPIP* und *pCR33-hCD95L* bzw. *pcDNA3.1-mCD95L* transfiziert. Die IP wurde in diesem Fall mit dem anti-FLAG-Antikörper M2 durchgeführt, da sowohl das hCD95L- als auch mCD95L-Konstrukt ein N-terminales FLAG-tag aufweisen. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sowohl der humane als auch der murine CD95L *in vivo* an Maus-PSTPIP (mPSTPIP) binden (Spur 7 und 8). In Spur 2 wurde weniger Lysat aufgetragen.

Es wurde gezeigt, dass sowohl humanes (hPSTPIP, 53 kDa) als auch murines PSTPIP (mPSTPIP, 50 kDa) *in vivo* an den humanen CD95L binden. Dazu wurden 293T Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und nach 48h lysiert. Die Immunpräzipitation wurde mit Antikörpern gegen CD95L bzw. gegen FLAG durchgeführt. PSTPIP wurde in diesem Western Blot mit einem Kaninchen-anti-hPSTPIP-Antiserum, welches sowohl humanes als

III. Ergebnisse

auch murines PSTPIP erkennt, detektiert. Wie in 3.17B zu erkennen ist, wird PSTPIP nur in hCD95L-exprimierenden 293T Zellen mit dem spezifischen anti-CD95L Antikörper co-immunpräzipitiert (B, Spur 2 und 4), jedoch nicht in *PSTPIP*/mock transfizierten Zellen (B, Spur 1 und 3). Dies zeigt, dass PSTPIP spezifisch an CD95L und nicht an den Antikörper bzw. Protein G-Agarose bindet. Wie schon in den GST-Pulldown-Experimenten beobachtet wurde, bestätigt das in Abbildung 3.17 gezeigte Experiment, dass aufgrund der jeweils hohen Homologien der humanen und murinen PSTPIP-SH3-Domänen (93% auf Proteinebene) sowie des intrazellulären CD95L-Anteils von Maus und Mensch (76% auf Proteinebene) die Spezieszugehörigkeit der Proteine für die Interaktion nicht relevant ist. Auch in Co-Immünpräzipitations-Experimenten wurden die hCD95L-Deletionsmutanten verwendet, die im *in vitro*-GST-Pulldown auf ihre Bindung an PSTPIP-GST hin untersucht worden waren. Da diese Mutanten ein FLAG-Tag besitzen, konnte die IP mit anti-FLAG Antikörpern durchgeführt werden.



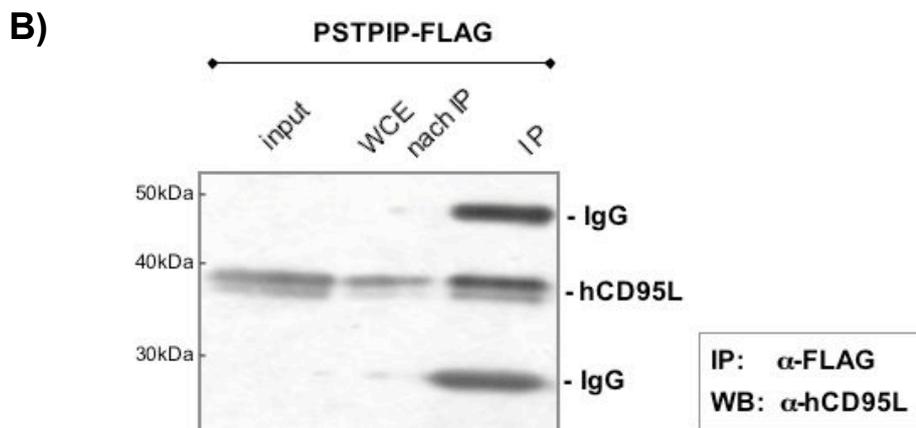


Abb.3.18: Die Bindung von mPSTPIP an hCD95L ist spezifisch und wird durch Deletion der hCD95L prolinreichen Domäne aufgehoben

A: Mit Lysaten von 293T Zellen, die mPSTPIP und verschiedenen FLAG-Tag-Proteine überexprimierten, wurde eine IP mit anti-FLAG-M2 gekoppelter Agarose (Sigma) durchgeführt. mPSTPIP wird mit dem mCD95L Protein und der Δ 1-39 CD95L-Deletionsmutante immunpräzipitiert (Spur 2 und 6), jedoch nicht mit Δ 40-80-hCD95L und den Negativkontrollen TNF α und HMGB1 (Spur 4, 8, 10).

B: Stabil hCD95L-exprimierende 293-005 Zellen wurden mit mPSTPIP-FLAG transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und eine IP mit anti-FLAG-M2 gekoppelter Agarose durchgeführt. Auch hier wurde die Bindung von CD95L an PSTPIP in einem Western Blot mit dem anti-hCD95L Antikörper G247 verifiziert. In einem Aliquot des zur IP verwendeten Zelllysates (WCE: "whole cell extract") welches nach der IP entnommen wurde, erkennt man eine Reduktion der Menge an CD95L-Protein (Spur 2). In der IP-Spur sind auch die leichte und schwere Kette des für die IP verwendeten anti-FLAG Maus IgG₁-Antikörpers bei 25kDa bzw. 50kDa zu erkennen.

In der vorherigen Abbildung ist zu erkennen, dass die Bindung von hCD95L an mPSTPIP durch die Deletion von AS 40-80 verhindert wird, andere (nicht gezeigte) Experimente zeigten allerdings eine schwache Restbindung von mPSTPIP an hCD95L- Δ 40-80. Als Negativkontrollen wurde zwei andere FLAG-markierte Proteine, HMGB1-FLAG und TNF α -FLAG, verwendet. Es zeigte sich keine Bindung von mPSTPIP an diese beiden Proteine (Abb.3.18A). Auch im umgekehrten Fall, d.h. bei der IP von PSTPIP-FLAG mit anti-FLAG-gekoppelter Agarose, konnte hCD95L co-präzipitiert werden (Abb.3.18B).

Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die Stimulation des CD95L durch agonistische Antikörper einen Einfluss auf die Rekrutierung von PSTPIP hat. Dazu wurden die Zellen für eine bzw. 8 Minuten mit 1 μ g/ml des anti-hCD95L-Antikörper Nok-1 inkubiert und anschließend lysiert. Zur IP wurde erneut Nok-1-Antikörper zu den Zelllysaten gegeben.

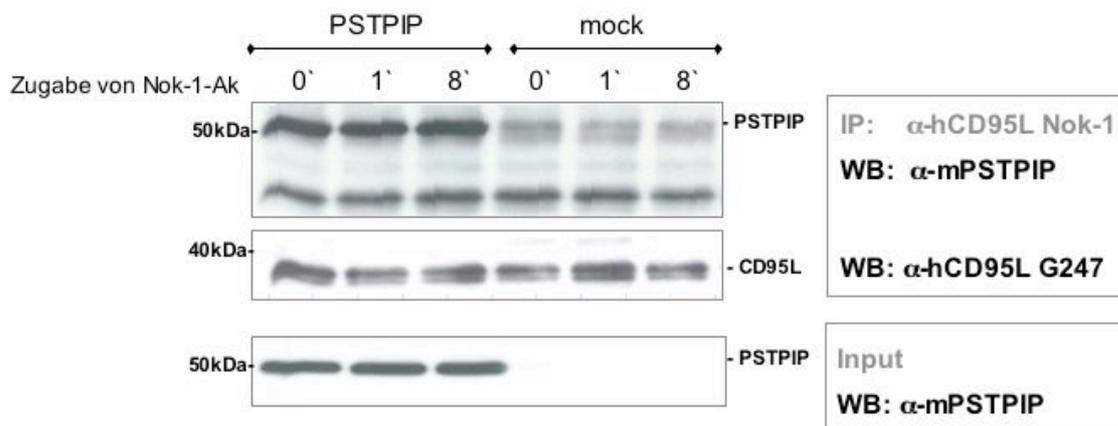


Abb.3.19: Durch CD95L-Stimulation wird die Menge an gebundenem PSTPIP nicht beeinflusst

Stabil hCD95L-exprimierende und mit *pRK-mPSTPIP* bzw. mit Leervektor (mock) transfizierte 293-005 Zellen wurden zur Stimulation des Liganden für eine bzw. 8 Minuten mit 1µg/ml anti-hCD95L-Antikörper Nok-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und zur IP wurde erneut Nok-1 Antikörper zugegeben. Die IP mit anti-hCD95L-Ak Nok-1 zeigt, dass sich die Menge an gebundenem mPSTPIP sowie hCD95L durch hCD95L-Stimulation nicht ändert. In der input-Spur ist zu erkennen, dass die Menge an exprimiertem mPSTPIP in allen Zelllysaten gleich ist.

In der vorherigen Abbildung ist zu erkennen, dass sich die Menge des an CD95L bindenden PSTPIP durch Antikörperbindung bzw. Stimulation des Liganden nicht ändert. Limitiert ist die Interpretation dieses Versuches allerdings dadurch, dass aufgrund des Mangels an Daten zur Funktion des intrazellulären CD95L-Anteils nicht bekannt ist, ob für einen derartigen Versuch der anti-hCD95L-Antikörper Nok-1 im kreuzvernetzten Zustand hätte vorliegen müssen. In anderen Experimenten, genauer der Untersuchung der MAPK-Phosphorylierung (s. Abschnitt 3.11), reichte der lösliche Antikörper allerdings aus, um eine reverse Signalübertragung über CD95L zu initiieren.

3.5 Untersuchung der Interaktion von endogenem PSTPIP mit CD95L

Zur weiteren Analyse der reversen Signaltransduktion über den CD95L wurde eine Zelllinie benötigt, die CD95L stabil exprimiert. Voraussetzung für die Auswahl der Zellen war, dass sie keinen CD95 Rezeptor exprimieren sollten, da sonst durch Bindung des CD95 Liganden Apoptose der CD95-positiven Zellen induziert werden würde.

III. Ergebnisse

Die CD95-Rezeptor-defiziente -und daher gegenüber CD95L induzierter Apoptose resistente-Maus-Thymoma-Zelllinie L12.10 wurde mittels Elektroporation mit *pBabe-mCD95L* transfiziert und anschließend durch Zugabe von Hygromycin zum Wachstumsmedium auf das Vorhandensein des Vektors selektioniert. Nach mehrmaligem Mediumwechsel wurden die selektionierten Zellen im FACS auf die Expression des murinen CD95L hin untersucht. Dazu wurden die Zellen mit dem biotinmarkierten anti-mCD95L-Antikörper Mfl-3 und einem PE-markierten Streptavidin-Sekundärantikörper markiert. Da die Zellen nicht permeabilisiert worden waren, wurde nur der membranständige Rezeptor angefärbt.

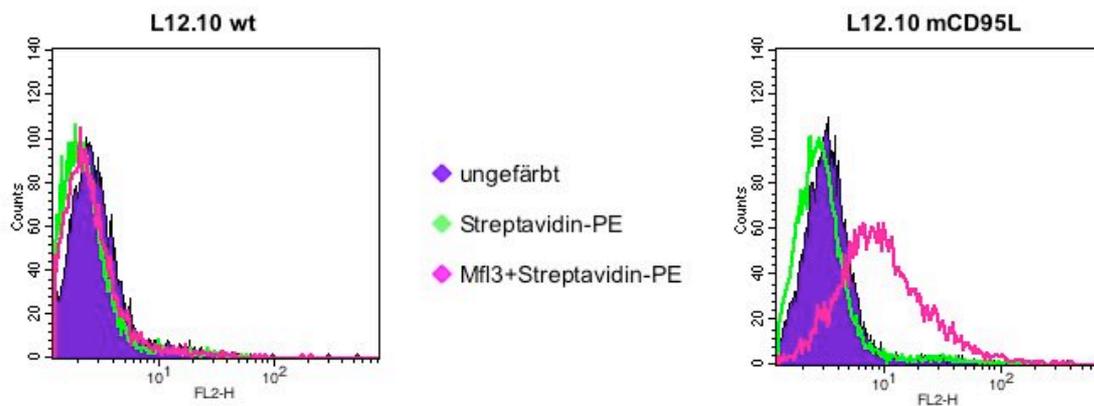


Abb.3.20: Nachweis der Expression von mCD95L auf stabil transfizierten L12.10 Maus-Thymoma Zellen

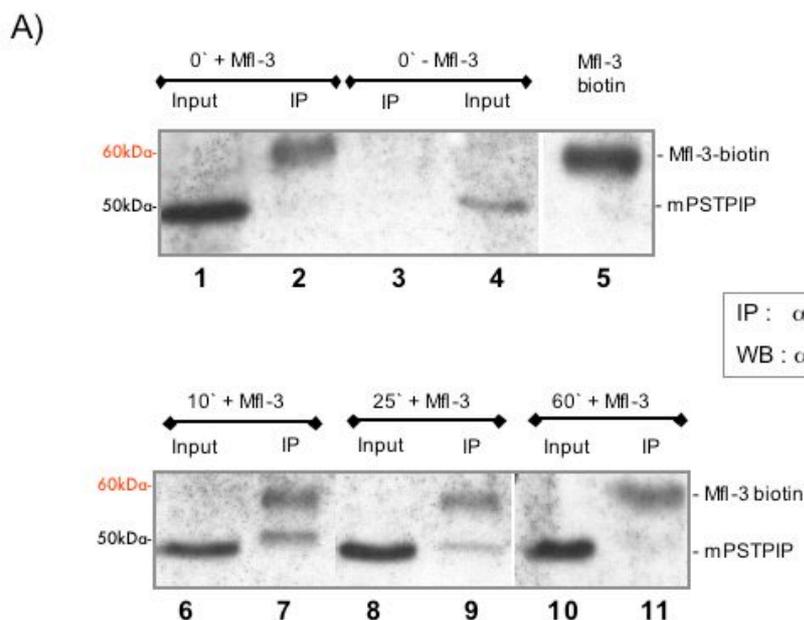
Zur Analyse im FACS wurden ung. 1×10^6 stabil transfizierte L12.10-mCD95L Zellen bzw. L12.10 Wildtyp-Zellen (L12.10 wt) für 30min. mit einem biotinmarkierten anti-mCD95L-Antikörper (Mfl-3) und anschließend mit Streptavidin-PE inkubiert. Die Messung erfolgte im FL-2 Kanal des FACS. Im Histogramm wird die Fluoreszenzintensität der mit Mfl-3 und Streptavidin-PE markierten mCD95L-positiven Zellen (pink) im Verhältnis zu Zellen, die nur mit Streptavidin-PE markiert wurden (grün), gezeigt.

Im Histogramm ist zu sehen, dass L12.10 Wildtyp-Zellen (L12.10 wt) negativ für CD95L sind, stabil transfizierte mCD95L-L12.10-Zellen hingegen mCD95L exprimieren (rosa Kurve). Dies erkennt man an der auftretenden Fluoreszenz der Zellen, die von einer spezifischen Bindung des anti-mCD95L-Antikörpers Mfl-3-biotin und des PE-markierten Streptavidins herrührt. Diese Zellen wurden verwendet, um eine „endogene IP“ durchzuführen, d.h. eine Co-Immünpräzipitation von endogenem mPSTPIP mit transfiziertem murinem CD95L. Die mCD95L-L12.10 Maus-Thymoma-Zellen wurden vor jedem Experiment per FACS auf die

III. Ergebnisse

Expression des CD95 Liganden auf der Zelloberfläche überprüft (Abb.3.20), da die Expression dieses Proteins nach einiger Zeit in Kultur herunter reguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht und spricht dafür, dass die Expression des CD95L einen negativen Einfluss auf die Zellen hat. Eventuell wird der CD95 Rezeptor doch zu einem geringen Level exprimiert, so dass durch Bindung des CD95L Apoptose induziert wird.

Um den möglichen Einfluss der Liganden-Stimulation auf die Rekrutierung von endogenem PSTPIP zu untersuchen, wurden die Zellen in Eppendorf-Röhrchen für verschiedene Zeitpunkte mit dem biotinylierten anti-mCD95L-Antikörper Mfl-3-biotin inkubiert. Über diesen Antikörper ist bekannt, dass er zumindest die native Form des mCD95L-Proteins, z.B. im FACS, erkennt. Ob er auch in der Lage ist, mCD95L zu immunpräzipitieren, konnte aufgrund des Mangels eines zum Western Blot geeigneten anti-mCD95L-Antikörpers nicht überprüft werden. Zu Beginn des Experiments wurde der Antikörper in einer löslichen Form zu den Zellen gegeben und diese nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. In einem parallelen Experiment wurde eine 24-Loch-Zellkulturschale mit dem anti-mCD95L-Antikörper Mfl-3-biotin beschichtet, um der Konformation des membranständigen, physiologischen CD95L näher zu kommen. Für die angegebenen Zeitpunkte wurden je 5×10^7 L12.10-mCD95L-Zellen pro Loch in den mit dem Antikörper beschichteten Platten inkubiert.



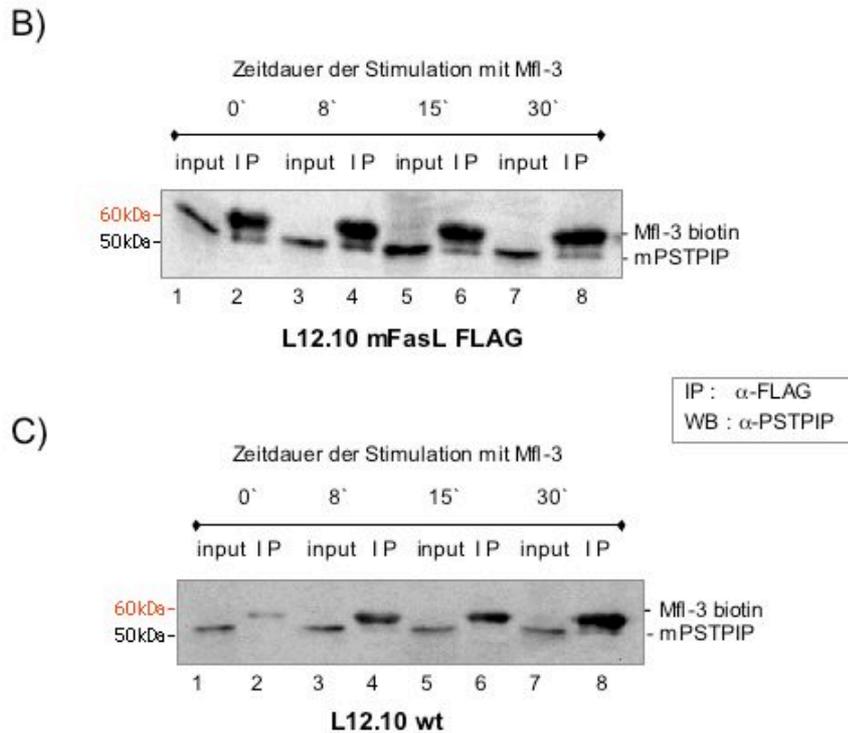


Abb.3.21: Co-Immunpräzipitation von mCD95L und endogenem mPSTPIP

A: Jeweils 1×10^8 mCD95L-L12.10-Zellen wurden in Eppendorf-Röhrchen für die angegebenen Zeitpunkte mit löslichem anti-mCD95L Antikörper Mfl-3 inkubiert (0' = keine Stimulation) und anschließend lysiert. Der mCD95L wurde mit Mfl-3-biotin und Streptavidin-gekoppelter Agarose immunpräzipitiert und die Bindung von mPSTPIP im Western Blot mit einem Kaninchen-anti-mPSTPIP Antikörper analysiert. Der HRP-konjugierte anti-Kaninchen-Zweitantikörper detektiert nicht nur den mPSTPIP-Antikörper sondern auch die schwere Kette des für die IP verwendeten Mfl-3-Antikörpers, wie in Spur 5 zu erkennen ist, da hier reiner Mfl-3-Antikörper (ohne Zelllysate) aufgetragen wurde. In diesem Experiment ist eine stimulationsabhängige Rekrutierung von PSTPIP zu beobachten, d.h. mPSTPIP bindet nicht an CD95L in unstimulierten Zellen (Spur 2), jedoch nach 10- bzw. 25-minütiger (Spur 7 und 9) Antikörperinkubation. Nach 60min wird kein PSTPIP mehr detektiert, das an CD95L bindet (Spur 11).

B/C: Eine 24-Lochplatte wurde über Nacht mit $2 \mu\text{g/ml}$ Mfl-3-biotin beschichtet. Die Zugabe von 5×10^7 L12.10-mCD95L- (**B**) bzw. der L12.10 wt (**C**) Zellen erfolgte für die angegebenen Zeiten. Nach Lyse der Zellen wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde erneut $1 \mu\text{g/ml}$ anti-mCD95L Antikörper Mfl-3-biotin zugegeben und durch Inkubation mit Streptavidin-Agarose präzipitiert. Auf das Gel wurden jeweils zuerst ein Aliquot des zur IP verwendeten Zelllysates (input) und daneben die immunpräzipitierten Proteine (IP) aufgetragen. Endogenes PSTPIP wird in CD95L transfizierten Zellen mit Mfl-3 immunpräzipitiert (Spur 2,4,6,8 in B), nicht jedoch in Wildtyp Zellen, wobei in Spur 8 auch eine Bande auf der Höhe des PSTPIP Proteins detektiert wurde (Spur 2,4,6,8 in C).

Wie in der Abbildung 3.21 zu erkennen ist, kann nicht nur überexprimiertes sondern auch endogenes mPSTPIP mit mCD95L co-immunpräzipitiert werden. Bei Stimulation des Liganden

III. Ergebnisse

mit löslichem Antikörper zeigt sich eine zeitabhängige Rekrutierung von mPSTPIP. Werden die Zellen nicht stimuliert, wird mPSTPIP nicht immunpräzipitiert (Abb.3.21, Spur 2A). Im oberen Teil der Abbildung 3.21A wurden die Zellen nicht mit Mfl-3 inkubiert (0'), dieser wurde jedoch z.T. nachträglich zur Immunpräzipitation des mCD95L zugegeben (Spur 2). Die bei 60kDa laufende Bande ist die schwere Kette des für die IP verwendeten anti-mCD95L-Antikörpers Mfl-3. Dies ist in Spur 5 der Abbildung 3.21A zu erkennen, da hier nur Antikörper ohne Zelllysate aufgetragen wurde. In Spur 3 wurden die Lysate von Zellen aufgetragen, die nicht stimuliert worden waren und zu denen auch zur IP kein Antikörper zugegeben wurde. Hier findet sich diese 60kDa Bande nicht. Die Stimulation des murinen CD95 Liganden durch Inkubation mit biotinyliertem Mfl-3 führt dazu, dass PSTPIP rekrutiert und anschließend co-immunpräzipitiert wird. Das Ausmaß der Bindung erreicht ihren Höhepunkt nach 10 Minuten, wird dann schwächer und ist nach 60 Minuten nicht mehr zu sehen. Dies könnte aber auch daran liegen, dass der Antikörper nach einiger Zeit degradiert bzw. zusammen mit CD95L internalisiert wird. Bei Immobilisierung des Antikörpers auf der Zellkulturschalenoberfläche, beobachtet man, dass nach 8 Minuten eine größere Menge von mPSTPIP rekrutiert wird. Warum in diesem Fall PSTPIP zusammen mit CD95L auch ohne Stimulation (0') co-immunpräzipitiert werden kann, ist unklar.

Die Menge an präzipitiertem mCD95L konnte nicht überprüft werden, da kein Antikörper bekannt war, der spezifisch den murinen CD95L im Western Blot detektiert. Zur Präzipitation wurde Streptavidin-gekoppelte Agarose verwendet, da der Antikörper in biotinylierter Form vorlag.

Die endogene Interaktion von mCD95L und PSTPIP wurde auch in primären Milzzellen untersucht. Frisch isolierte Maus-Milzzellen wurden mit 10ng/ml PMA und 0,2µg/ml Ionomycin stimuliert, was zu einer schnellen und kompletten Aktivierung von T-Zellen führt. Nach 18 Stunden wurden die Zellen lysiert, und es wurde eine Co-Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern gegen mCD95L durchgeführt. Publizierten Daten zufolge wird die Expression des murinen PSTPIP-Proteins in T-Zellen durch die Stimulation mit PMA/Ionomycin induziert (Bai *et al.*, 2001).

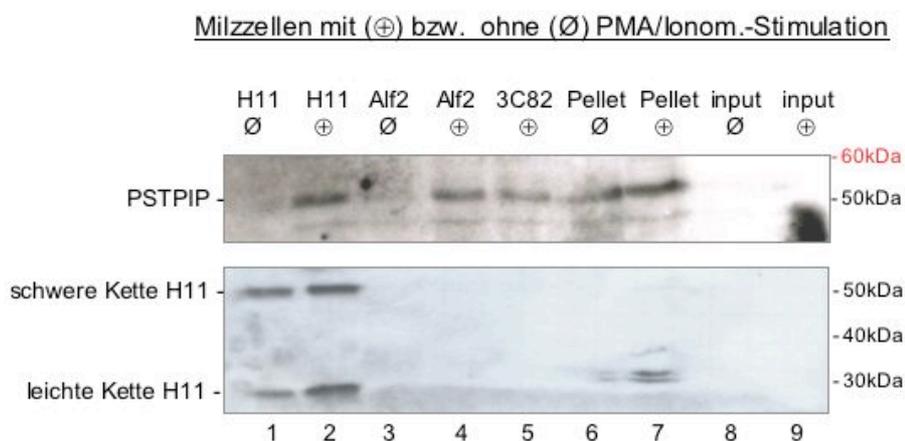


Abb.3.22: Co-Immünpräzipitation von mCD95L und endogenem PSTPIP in Milzzellen

1,5 x 10⁷ Milzzellen wurden nicht (∅) bzw. mit 10ng/ml PMA und 0,2µg/ml Ionomycin stimuliert (⊕). Nach 18h wurden die Zellen für 30min mit dem Metalloproteinase-Inhibitor Phenantrolidine behandelt, lysiert und eine Co-Immünpräzipitation mit unterschiedlichen anti-mCD95L-Antikörpern [H11 (Alexis), Alf2.a (Ansell) und 3C82 (Alexis)] durchgeführt. mPSTPIP wird nur in stimulierten Milzzellen mit allen drei anti-mCD95L Antikörpern präzipitiert (Spur 2,4,5). Der Blot wurde gestrippt und mit dem Ratte anti-mCD95L Antikörper H11 inkubiert. In Spur 6 und 7 wurde das Pellet, also die im Lysispuffer unlöslichen Bestandteile der Milzzellen, mit 2x SDS-PAGE Ladebuffer aufgekocht und der Überstand auf das Gel aufgetragen.

Wie in Abbildung 3.22 zu erkennen ist, kann mPSTPIP in aktivierten „(⊕)“ jedoch nicht in unstimulierten „(∅)“ Milzzellen mit Antikörpern gegen mCD95L immunpräzipitiert werden (Spur 2, 4 und 5 bzw. Spur 1 und 3). Es ist unklar, warum in der input-Spur, d.h. im Zelllysat nach Zentrifugation, auch nach Stimulation keine PSTPIP-Bande zu sehen ist, dafür jedoch im Pellet, also den im Lysispuffer unlöslichen Bestandteilen der Milzzellen. Eventuell wurde zu wenig Protein aufgetragen; es wurde leider keine Ladekontrolle durchgeführt. Im unteren Teil der Abbildung ist ein Western Blot gezeigt, der mit dem anti-mCD95L-Antikörper H11 inkubiert wurde. Auch wenn in Spur 7 eine Doppelbande mit der ungefähren Größe des mCD95L-Proteins zu erkennen ist, zeigte sich in anderen Western Blot Experimenten, dass dieser Antikörper selbst überexprimierten mCD95L nicht detektiert. Der anti-mCD95L-Blot bestätigt aber, dass die mit anti-PSTPIP/anti-Kaninchen-Ak detektierte Bande nicht die schwere Kette des IP-Antikörpers ist, da dieser auch für die IPs unstimulierter Zellen verwendet wurde, wie anhand der schweren und leichten Kette des zur IP verwendeten H11-Antikörpers, die durch den anti-Ratte-Zweitantikörper detektiert wurden, auf dem unteren Blot zu sehen ist.

3.6 Lokalisationsstudien mit dem konfokalen Mikroskop

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises einer Interaktion zweier Proteine sind Immunfluoreszenzfärbungen und Lokalisationsstudien mit Hilfe des konfokalen Laserscanning Mikroskopes [„confocal laser scanning microscope“ (CLSM)]. Das Prinzip des CLSMs beruht darauf, dass durch die Fokussierung des monochromatischen Laserlichtes einzelne horizontale Schichten der Zelle abgebildet werden können (Amos, 1988). Die übereinstimmende Lokalisation („Co-Lokalisation“) zweier Proteine gibt jedoch nur einen weiteren Hinweis auf eine aufgrund von Daten anderer Experimente vermutete Interaktion.

Transfizierte 293T Zellen wurden zur besseren Adhäsion auf poly-Lysin beschichteten Deckgläsern wachsen gelassen und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung und Abblocken der unspezifischen Bindestellen mit BSA wurden die Zellen nacheinander mit dem ersten Antikörper gegen einen der Bindungspartner, dann mit dem dazu gehörenden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper und anschließend mit dem zweiten Antikörperpaar gegen den zweiten Bindungspartner inkubiert.

Bei dem in Abbildung 3.23 gezeigten Experiment wurden ein grün-fluoreszierender Alexa488 anti-Maus Sekundärantikörper für den Maus-anti-FLAG-Antikörper gegen CD95L-FLAG und ein rot fluoreszierender Alexa546 anti-Kaninchen Sekundärantikörper für den anti-mPSTPIP-Antikörper eingesetzt. Zur Detektion wurden die Laserlinien bei 488nm und 543nm verwendet, und durch sequenzielles Scannen wurde gewährleistet, dass die energiereichere emittierte Strahlung des ersten Fluorochroms nicht im Detektionskanal für die Strahlung des zweiten Fluorochroms detektiert wurde. Die Stellen, an denen beide Proteine co-lokalisieren, erkennt man an der gelben Färbung in der Überlagerungsansicht beider Bilder.

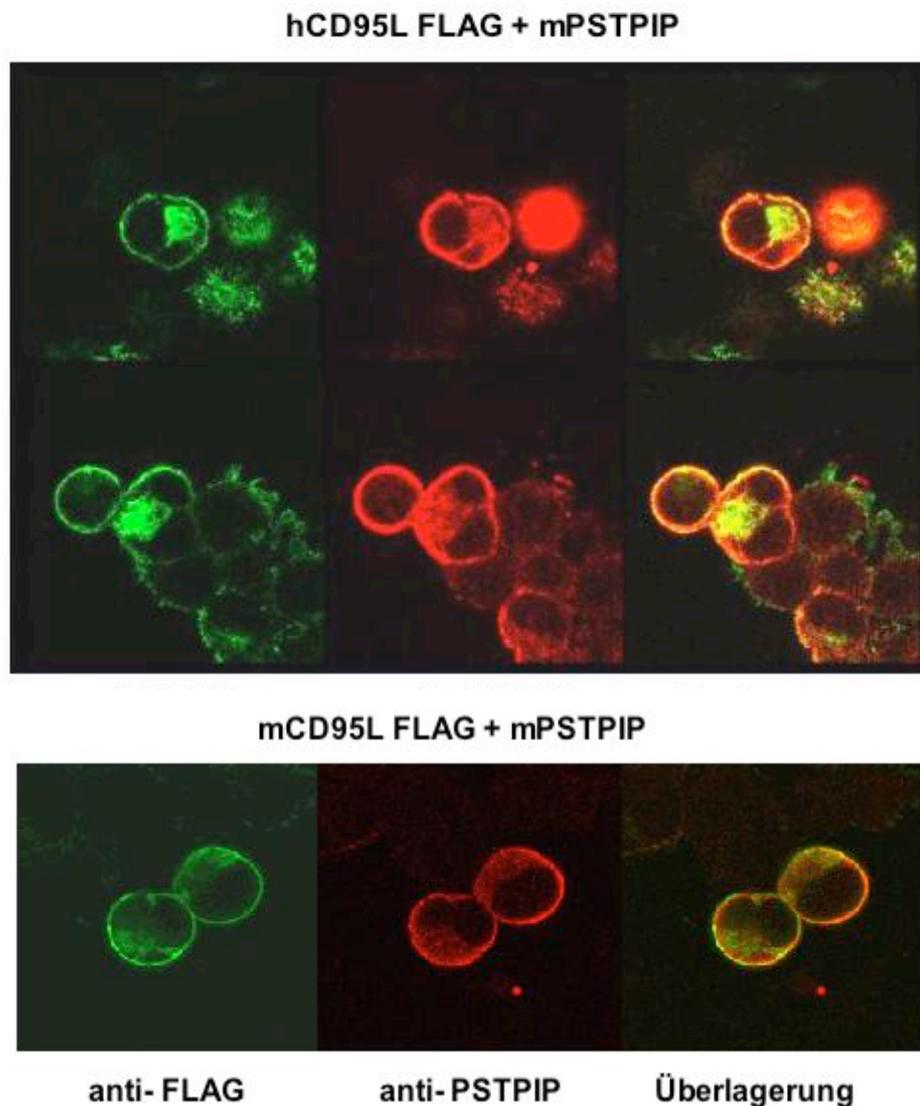


Abb.3.23: Überexprimiertes mPSTPIP und hCD95L bzw. mCD95L co-lokalisieren in 293T Zellen

293T Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit *pCR33-hCD95L-FLAG* bzw. *pcDNA3.1-mCD95L* und *pRK-PSTPIP* transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit anti-FLAG/anti-Maus-Alexa488- und anti-mPSTPIP/anti-Kaninchen-Alexa546- Antikörpern unterzogen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskopes. In der Überlagerungsansicht erkennt man gelb erscheinende Bereiche, in denen beide Proteine co-lokalisieren.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, gibt es Bereiche, in denen die beiden Proteine h/mCD95L und mPSTPIP co-lokalisieren.

In weiteren Untersuchungen wurden auch die mit einem FLAG-Tag markierten hCD95L-Deletionsmutanten $\Delta 1-39$ und $\Delta 40-80$ (Abb.3.11) auf ihre Co-Lokalisation mit PSTPIP im CLSM hin untersucht.

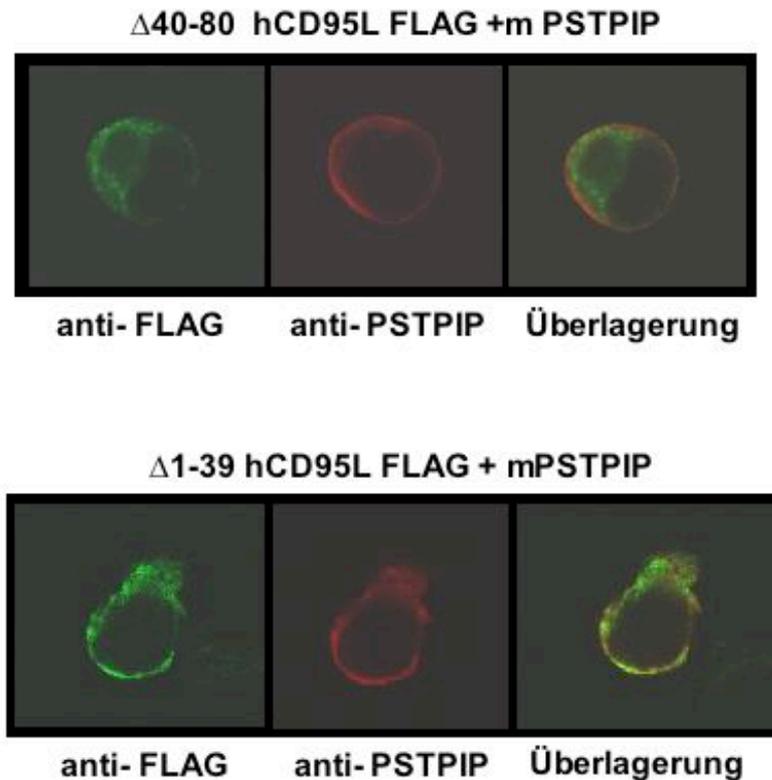


Abb.3.24: mPSTPIP co-lokalisiert nur mit der hCD95L Mutante, die die prolinreiche Domäne enthält
293T Zellen, die Δ 1-39 hCD95L-FLAG bzw. Δ 40-80 hCD95L-FLAG und mPSTPIP überexprimieren, wurden mit anti-FLAG/anti-Maus-Alexa488 und anti-PSTPIP/anti-Kaninchen-Alexa546 Antikörpern inkubiert. Wie in der Überlagerung beider Einzelansichten an der gelben Färbung zu erkennen ist, co-lokalisiert PSTPIP nur mit Δ 1-39 CD95L-FLAG, jedoch nicht mit der PRD-Deletionsmutante Δ 40-80 CD95L-FLAG.

mPSTPIP co-lokalisiert mit hCD95L- Δ 1-39, nicht jedoch mit der Deletionsmutante hCD95L- Δ 40-80, in der die prolinreiche Region deletiert wurde. Dies entspricht den Ergebnissen der Co-Immunpräzipitations-Experimenten.

In einer Stimulationskinetik mit Fas-Fc konnte innerhalb von 30 Minuten keine Veränderung der CD95L-Lokalisierung gesehen werden (Daten nicht gezeigt). Es sollte jedoch auch überprüft werden, ob sich durch Fas-Fc-Stimulation die Rekrutierung von PSTPIP an CD95L verändert.

3.7 Co-Stimulation über CD95L in primären Maus T-Zellen

Um die von Suzuki und Kollegen gemachten Beobachtungen, denen zufolge die Stimulation des CD95 Liganden die Proliferation aktivierter, muriner T-Zellen induziert (Suzuki und Fink, 2000), zu verifizieren, wurden T-Zellen aus Mäuse-Milzen isoliert. Die Aufreinigung von Gesamt-T-Zellen bzw. CD4⁺ oder CD8⁺ einzelpositiven T-Zellen erfolgte mit Hilfe von Depletions-Säulen der Firma R&D-Systems. Diese Säulen reinigen die T-Zellen über Negativselektion auf, d.h. dass alle „Nicht-T-Zellen“ über Antikörperbindung am Säulenmaterial verbleiben und nur T-Zellen eluiert werden. Im Falle der Aufreinigung von CD4⁺ oder CD8⁺ einzelpositiven T-Zellen wurden die Zellen vor der Aufreinigung über Gesamt-T-Zellsäulen mit einem Antikörpercocktail gegen den jeweils anderen Oberflächenmarker inkubiert, so dass diese Zellen zusätzlich auf den Säulen verblieben. Die Reinheit der isolierten T-Zellfraktionen wurde im FACS überprüft, wofür die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit PE-markiertem anti-mCD4- und FITC-markiertem anti-mCD8-Antikörper markiert wurden.

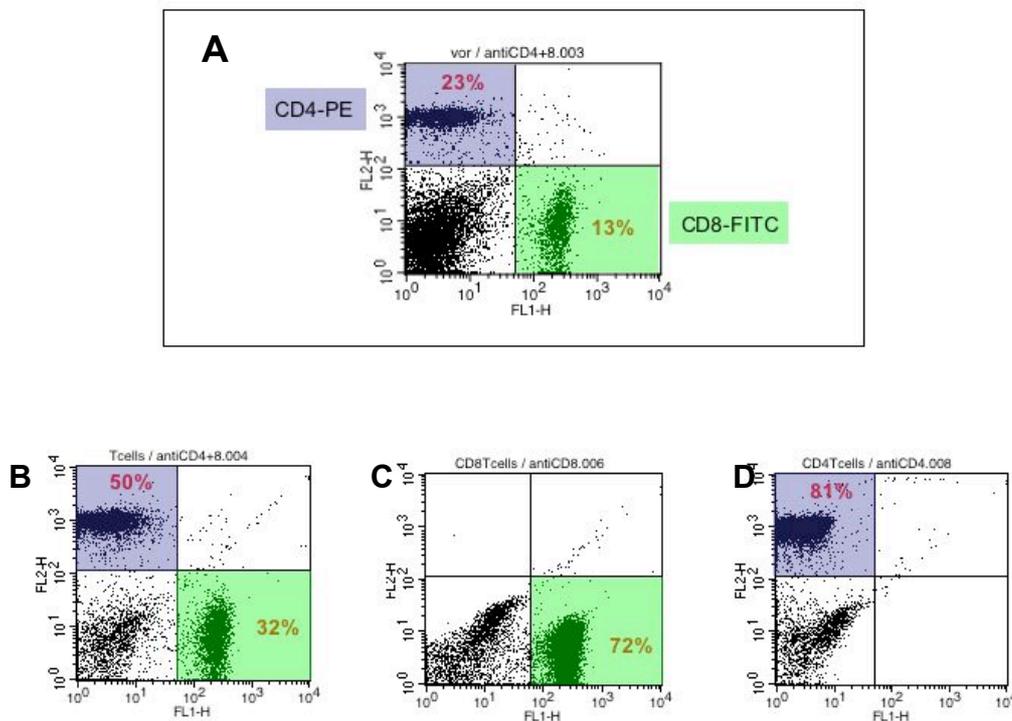


Abb.3.25: FACS Analyse zur Kontrolle der Reinheit der aufgereinigten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

Immunfluoreszenzfärbung von Milzzellen oder über Negativselektion aufgereinigten T-Zellen mit PE-gekoppelten anti-mCD4- und FITC-gekoppelten anti-mCD8-Antikörpern. Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes FITC erfolgt im FL-1 Kanal des FACS, die von PE im FL-2 Kanal. **A:** 23% der gesamten Milzzellen waren positiv für CD4, 13% waren positiv für CD8. Nach der Aufreinigung mit Hilfe von Gesamt-T-Zell-Säulen zeigten 50% der Zellen CD4-Expression und 32% CD8-Expression (**B**). Die Aufreinigung mit CD8-T-Zellsäulen ergab eine Reinheit von 72% CD8-T-Zellen (**C**), die

III. Ergebnisse

Aufreinigung mit CD4-T-Zellsäulen 81% CD4 T-Zellen (D). Diese Werte entsprachen den durchschnittlichen Ergebnissen jeder Aufreinigung.

Wie in der Abbildung 3.25 zu erkennen ist, sind vor der Aufreinigung 23% der Milzzellen einzelpositiv für den T-Zellmarker CD4 und 13% für CD8 (A). Nach Aufreinigung der T-Zellen sind nur noch 18% der Zellen negativ für CD4 und CD8 (vor allem B-Zellen), hingegen 32% CD8-positiv und 50% CD4-positiv (B). Publizierten Daten zufolge findet sich ein normales Verhältnis von CD4- zu CD8-positiven Zellen in der Mäuse-Milz von 2:1. Die Reinheit der einzelpositiven Zellen nach Aufreinigung mit Hilfe der CD4- oder CD8-Depletionssäulen lag zwischen 70 und 80% (C/D).

Auch die Vitalität der aufgereinigten T-Zellen wurde überprüft. Dazu wurden die Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid angefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches nur in apoptotischen Zellen in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist (Fadok *et al.*, 1992). Propidiumiodid dagegen ist ein nicht membranpermeables kationisches Fluorochrom, das nekrotische und spät-apoptotische Zellen anfärbt, da bei diesen die Membranintegrität verloren gegangen ist. Vitale Zellen erkennt man in diesem Versuch demnach daran, dass sie weder mit Annexin V-FITC gefärbt werden noch Propidiumiodid aufnehmen, spät apoptotische Zellen dadurch, dass sie sowohl mit Annexin V-FITC als auch mit Propidiumiodid angefärbt werden. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte im FACS.

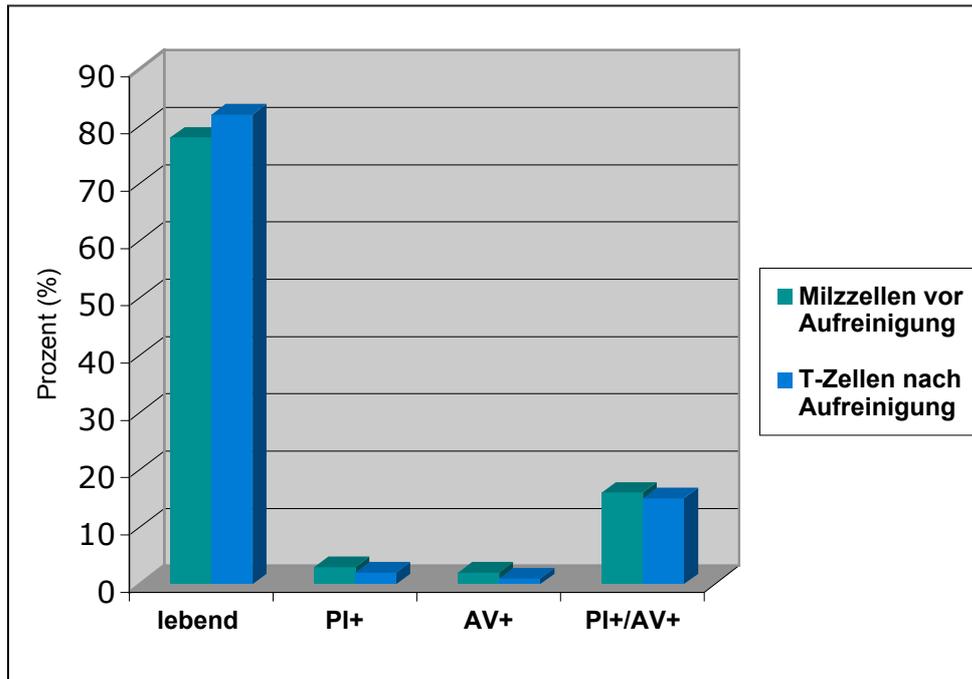


Abb.3.26: Bestimmung der Vitalität der Maus-T-Zellen im FACS

Unaufgereinigte Milzzellen oder über Depletionssäulen aufgereinigte T-Zellen wurden mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid gefärbt. Apoptotische Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass Annexin V an das Membranphospholipid Phosphatidylserin bindet (AV+), nekrotische Zellen werden durch Propidiumiodid angefärbt (PI+) und so genannte spät-apoptotische Zellen sind positiv für beide Farbstoffe (PI+/AV+). Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS; Annexin V-FITC-positive Zellen wurden im FL-1 Kanal, Propidiumiodid-gefärbte Zellen im FL-2 Kanal detektiert. Im dargestellten Balkendiagramm ist zu sehen, dass nach der Aufreinigung der T-Zellen 82% der Zellen vital (also negativ für Annexin V-FITC und Propidiumiodid) waren.

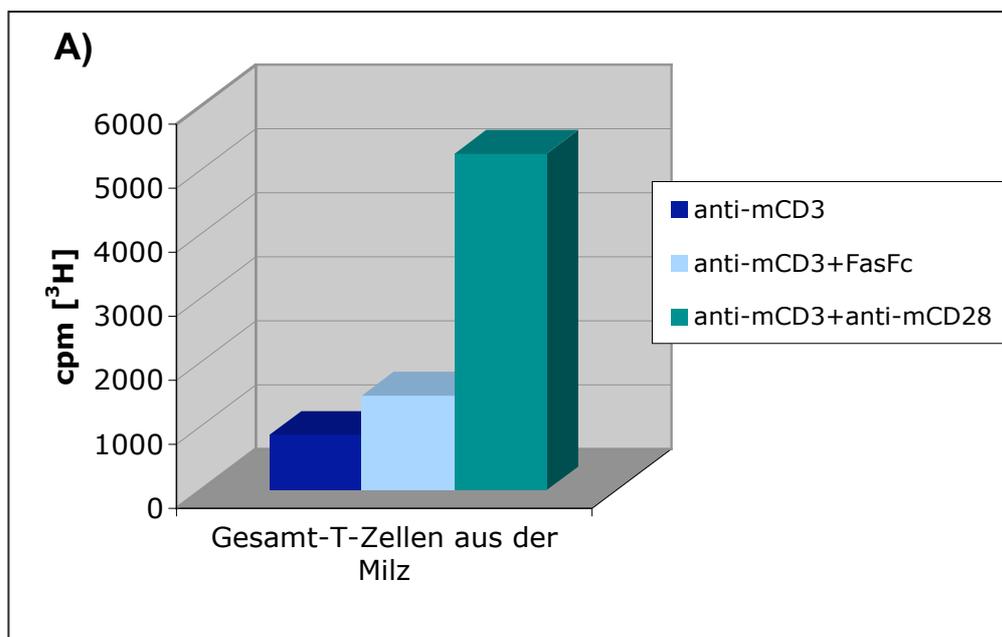
Wie in der Abbildung 3.26 zu erkennen ist, waren im gezeigten Experiment vor Aufreinigung der T-Zellen über eine Depletionssäule 78% und nach Aufreinigung 82% der Zellen vital. Die Bestimmung der Vitalität ist wichtig, da bei einem hohen Prozentsatz an toten Zellen die T-Zellen schlechter proliferieren würden, weil sie eine Mindestdichte zum Wachstum brauchen.

Um die Proliferation muriner T-Zellen zu untersuchen, wurde ein Thymidinassay durchgeführt. Das Prinzip dieses Experiments basiert darauf, dass mit Tritium [³H] markiertes Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Die von [³H] emittierte Strahlung kann anschließend gemessen werden und korreliert mit der DNA-Syntheserate und damit mit dem Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen.

Einen Tag vor dem Experiment wurden die Vertiefungen einer flachen 96-Lochplatte mit verschiedenen Antikörpern, wie anti-mCD3 und anti-mCD28, beschichtet. Die Inkubation von T-Zellen mit anti-mCD3-Antikörpern führt zur Aktivierung dieser Zellen, da durch die Bindung

III. Ergebnisse

dieses Antikörpers an den T-Zellrezeptor/CD3-Komplex die *in vivo* durch MHC und Antigen vermittelte Aktivierung des T-Zellrezeptors nachgeahmt wird. Zusätzlich wird ein zweites, so genanntes co-stimulatorisches Signal anderer Rezeptoren, wie z.B. des CD28-Rezeptors, welcher *in vivo* durch die Bindung seiner auf antigenpräsentierenden Zellen exprimierten Liganden (CD80/CD86) aktiviert wird, benötigt (Sharpe *et al.*, 2002). Auch der CD95 Ligand wurde als co-stimulatorisches Molekül beschrieben, was in diesem Experiment überprüft werden sollte (Suzuki *et al.*, 1997). Dazu wurden die Schalen zusätzlich zum anti-mCD3-Antikörper mit Fas-Fc beschichtet. Unter Fas-Fc versteht man ein rekombinantes Protein, bei dem der extrazelluläre Anteil des rekombinanten humanen CD95 Rezeptors an den konstanten Teil des humanen IgG1 fusioniert wurde (Schneider *et al.*, 1997). Die frisch aufgereinigten Maus-T-Zellen wurden in den beschichteten Platten 72h inkubiert, und anschließend wurde für weitere 16 Stunden [³H]-Thymidin zugegeben.



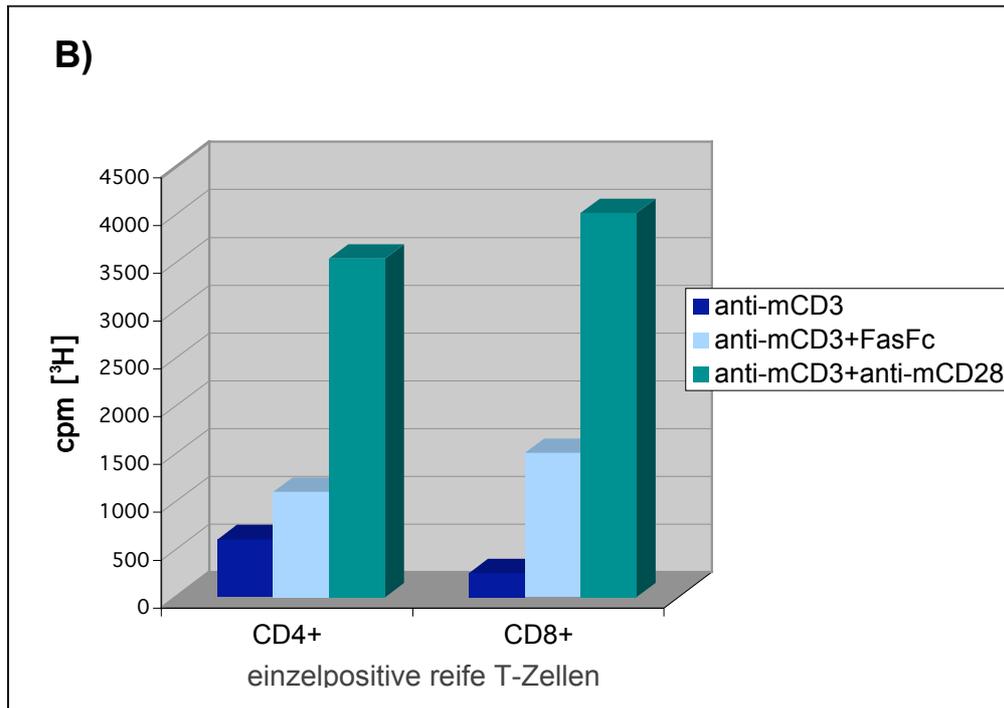


Abb.3.27: Fas-Fc wirkt als co-stimulatorisches Molekül nach anti-mCD3-Stimulation in Maus-T-Zellen

$[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbau in Gesamt-T-Zellen (A) bzw. CD4- und CD8-einzelpositiven T-Zellen (B). 1×10^4 frisch isolierte und aufgereinigte T-Zellen wurden für 72h in flachen 96-Lochplatten wachsen gelassen, die zuvor mit den in der Legende angegebenen Antikörpern beschichtet wurden. Der anti-mCD3-Antikörper wurde in der Konzentration $1 \mu\text{g/ml}$, der anti-mCD28-Antikörper in der Konzentration $10 \mu\text{g/ml}$ und Fas-Fc in der Konzentration $5 \mu\text{g/ml}$ zum Beschichten eingesetzt. Anschließend wurde für 18h $1 \mu\text{Ci } [^3\text{H}]d\text{Thymidin}$ in $100 \mu\text{l}$ T-Zellmedium zu den Zellen gegeben. Das Wachstum der mit anti-mCD3-Antikörper stimulierten CD4⁺ bzw. CD8⁺-T-Zellen wird durch die Co-Stimulation mit anti-mCD28, aber auch mit Fas-Fc erhöht. Das Verhältnis von eingebautem $[^3\text{H}]$ -Thymidin das in mit anti-mCD3 inkubierten T-Zellen gemessen wurde, zu dem, das in mit anti-mCD3 und Fas-Fc stimulierten Zellen ermittelt wurde (CD3:CD3/Fas-Fc) betrug in diesem Experiment für CD8⁺-T-Zellen 1:6 und für CD4⁺-T-Zellen 1:1,8.

Wie anhand der gemessenen Radioaktivität des eingebauten Thymidins in Abb.3.27 zu erkennen ist, zeigen die Zellen nach Co-Stimulation sowohl mit anti-CD28-Antikörpern, als auch mit Fas-Fc einen Anstieg in der Proliferation im Verhältnis zu den nur mit anti-CD3 stimulierten Zellen. Allerdings ist festzustellen, dass die absoluten cpm-Werte auffällig niedrig ausfielen.

In einer Publikation von Suzuki und Kollegen (2000) wurde die Proliferation von T-Zelllinien nach anti-CD3- und anti-CD3/Fas-Fc-Stimulation gemessen. Es zeigte sich, dass die relativen Mengen an eingebautem $[^3\text{H}]$ -Thymidin in mit anti-mCD3 inkubierten T-Zellen, im Verhältnis zu denen, die mit anti-mCD3 und Fas-Fc inkubiert wurden (CD3:CD3/Fas-Fc) die gleiche Tendenz wie in dem von mir durchgeführten Experiment (Abb.3.27) aufweisen. Das Verhältnis von eingebautem Thymidin in anti-CD3 zu anti-CD3 plus Fas-Fc stimulierten Zellen

betrug 1:6 in CD8⁺-T-Zellen und 1:1,8 in CD4⁺-T-Zellen; in der erwähnten Publikation betrug das Verhältnis von eingebautem Thymidin in anti-CD3 plus HulgG zu anti-CD3 plus Fas-Fc (FaslgG) stimulierten Zellen 1:3,5 in CD8⁺ T-Zellen und 1:1,9 in CD4⁺ T-Zellen. HulgG (ohne den extrazellulären Anteil des CD95 Rezeptors) diente als Negativkontrolle. Die Co-Stimulation durch anti-CD28 zeigte den erwarteten erhöhten Anstieg in der Proliferation. Zusätzlich wurden T-Zelllinien von lpr- bzw. gld-Mäusen (siehe Einleitung 1.4.1) verwendet. Es wurde beobachtet, dass CD95L-Stimulation in gld-Mäusen wie erwartet zu keinem Anstieg in der CD3-induzierten T-Zellproliferation führte. Die von uns durchgeführten Experimente bestätigen also die von Suzuki und Kollegen gemachten Beobachtungen.

3.8 Proliferationsbestimmung über die Messung von BrdU-Einbau

Eine andere Möglichkeit der Proliferationsmessung ist die Quantifizierung von eingebautem Bromodesoxyuridin (BrdU, ein Thymidinanalogon) in neu-synthetisierter DNA mit einem anti-BrdU-Antikörper im FACS. Der Vorteil dieser Art der Proliferationsmessung liegt darin, dass im FACS lebende von toten Zellen durch ihre unterschiedliche Größe voneinander getrennt werden können und so tote Zellen keinen Einfluss auf das Ergebnis der Messung haben. Auch für dieses Experiment wurden frisch isolierte Maus-T-Zellen in Schalen wachsen gelassen, die zuvor mit Antikörpern beschichtet worden waren. Die Markierung mit BrdU erfolgte für 4 Stunden nach einem 72-stündigen Wachstum der Zellen.

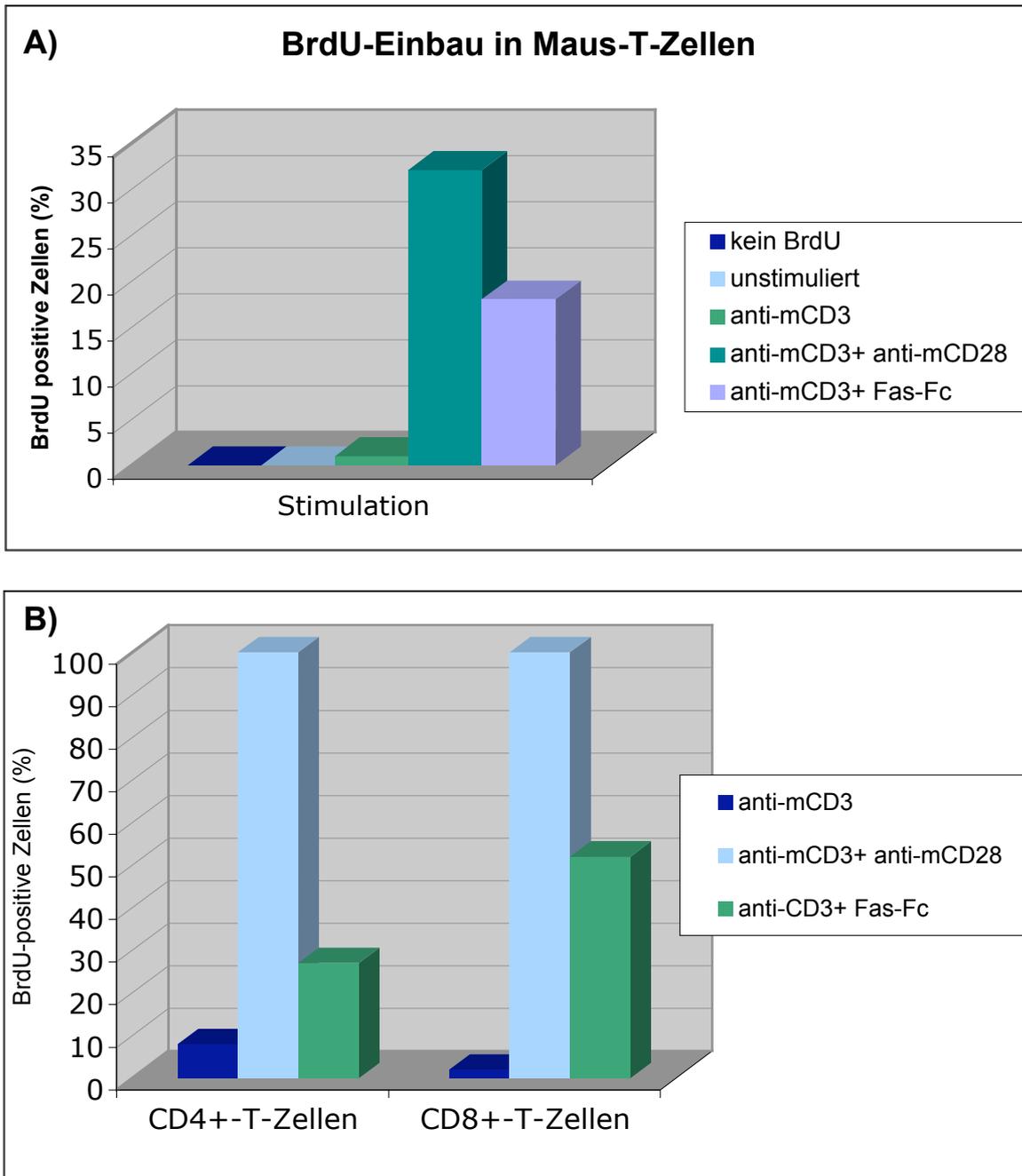


Abb.3.28: Proliferationsmessung durch Nachweis von eingebautem BrdU in neusynthetisierter DNA im FACS

Maus T-Lymphozyten (A) bzw. einzelpositive CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen (B) wurden mit immobilisierten anti-mCD3-Antikörpern (Ak) alleine, mit anti-mCD3/anti-mCD28-Ak oder mit anti-mCD3-Ak/Fas-Fc für 72h stimuliert. Die Zellen wurden für weitere 4 Stunden mit 60µM BrdU inkubiert, und in neusynthetisierte DNA eingebautes BrdU wurde nach Permeabilisierung der Zellen und Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten anti-BrdU-Antikörpern im FACS nachgewiesen. Der Anteil an BrdU positiven, d.h. proliferierenden Zellen erhöht sich von 1% nach anti-mCD3-Ak Stimulation auf 32% bei zusätzlicher anti-mCD28-Ak Zugabe und auf 16% nach zusätzlicher Stimulation des CD95L durch Fas-Fc. In B wurde zur besseren Vergleichbarkeit die Menge an eingebautem BrdU nach maximaler Stimulation durch anti-mCD3- und anti-mCD28-Ak auf 100% gesetzt. Die gleiche Tendenz wurde in verschiedenen Experimenten gesehen.

III. Ergebnisse

In der Abbildung 3.28 ist der beschriebene co-stimulatorische Effekt von Fas-Fc in T-Lymphozyten bzw. in einzelpositiven CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen wiederum gut zu erkennen. Der leichte Anstieg der Proliferation durch Inkubation mit anti-mCD3 Antikörpern im Vergleich zu unstimulierten Zellen wird nach gleichzeitiger Stimulation durch Fas-Fc um ein Mehrfaches erhöht (Abb.3.28A). Wie erwartet, zeigt die Co-Stimulation mit anti-mCD28 Antikörpern eine noch stärkere Proliferation. In 3.28B wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Anteil BrdU-positiver Zellen nach maximaler Stimulation mit anti-mCD3 plus anti-mCD28 Antikörpern auf 100% gesetzt. Daraus ergibt sich nach Stimulation mit anti-mCD3 Antikörpern und Fas-Fc ein Anstieg von 8% auf 27% BrdU positiver CD4⁺-T-Zellen und von 2% auf 52% BrdU positiver CD8⁺-T-Zellen.

Eine andere Möglichkeit zu zeigen, dass die Co-Stimulation mit Fas-Fc zur Aktivierung der T-Zellen führt, ist die Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD25 (alpha-Kette des hochaffinen IL-2 Rezeptor) im FACS. CD25 ist eines der ersten Gene, das nach TZR-Aktivierung und Co-Stimulation induziert wird. Diese Induktion ist abhängig von NF- κ B (Ballard *et al.*, 1989). Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden frisch isolierte Maus-T-Zellen für 72h auf Schalen wachsen gelassen, die mit verschiedenen Antikörpern beschichtet worden waren. Die Detektion des CD25-Oberflächenmarkers erfolgte mit einem PE-markierten anti-CD25 Antikörper im FACS.

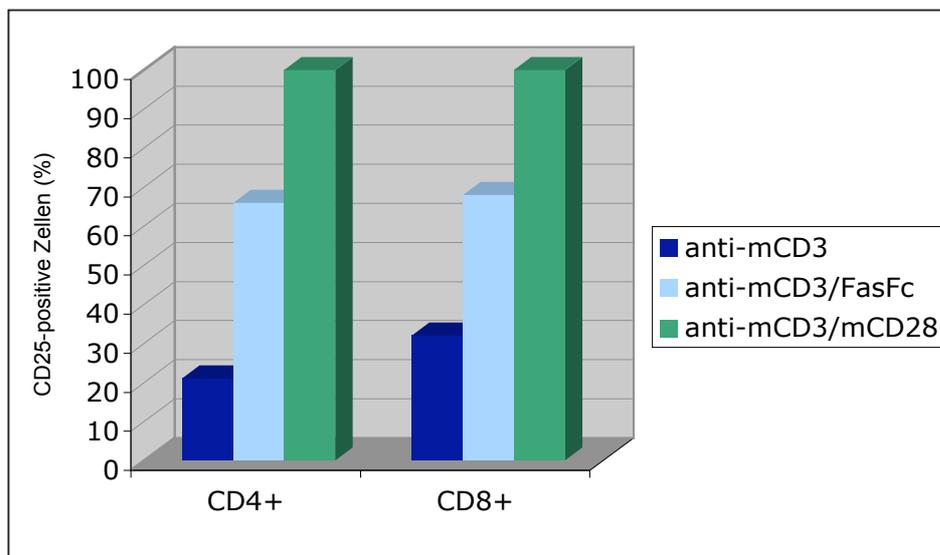


Abb.3.29: Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf stimulierten T-Zellen

Einzelpositive CD4⁺ oder CD8⁺-Maus-T-Zellen wurden mit immobilisierten anti-mCD3-Ak alleine, anti-mCD3-Ak/Fas-Fc oder anti-mCD3-/anti-mCD28-Ak für 72h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einem PE-konjugierten anti-mCD25-Antikörper inkubiert. Die Detektion der CD25-positiven Zellen erfolgte im FACS. Der Anteil an CD25-positiven Zellen, die mit anti-mCD3- und anti-mCD28-Antikörpern maximal stimuliert worden waren, wurde auf 100% gesetzt.

Die Co-Stimulation von Fas-Fc und anti-CD28-Antikörpern bewirkt einen Anstieg der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 im Vergleich zu CD3-stimulierten Zellen sowohl in CD4⁺- als auch in CD8⁺-T-Zellen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die CD25-Expression mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern maximal stimulierter Zellen auf 100% gesetzt (Abb. 3.29).

3.9 Oberflächenexpression von CD95L in Abhängigkeit von PSTPIP

Als Transmembranprotein wird die Aktivität des CD95L nicht nur auf transkriptioneller Ebene reguliert, sondern auch über dessen zelluläre Lokalisation. Für zytotoxische T-Lymphozyten wurde z.B. gezeigt, dass der CD95L in ruhenden Zellen in sekretorischen Lysosomen gespeichert und nach Stimulation der T-Zellen an die Zelloberfläche transportiert wird, wo er mit Targetzellen interagieren kann (Blott *et al.*, 2002). Nur der membranständige bzw. der durch Abspaltung durch eine Metalloproteinase generierte lösliche extrazelluläre Anteil des Liganden kann an den CD95 Rezeptor anderer Zellen binden. Um die Expression von CD95L an der Zelloberfläche zu untersuchen, wurden die Zellen mit anti-hCD95L-Antikörpern (Nok-1 oder Alf2.a) und FITC-markierten anti-Maus-Sekundarantikörpern inkubiert. Nur Zellen, die CD95L auf der Zelloberfläche exprimieren, werden markiert und können im FACS von ungefärbten Zellen unterschieden werden. Es ist auch möglich, die relativen Mengen eines Oberflächenproteins auf diese Weise zu bestimmen. Da die Bindung von PSTPIP an den intrazellulären Anteil des CD95L dessen Transport zur Zelloberfläche beeinflussen könnte, wurde untersucht, ob die Co-Expression von PSTPIP einen Einfluss auf die Expression von CD95L auf der Zellmembran hat.

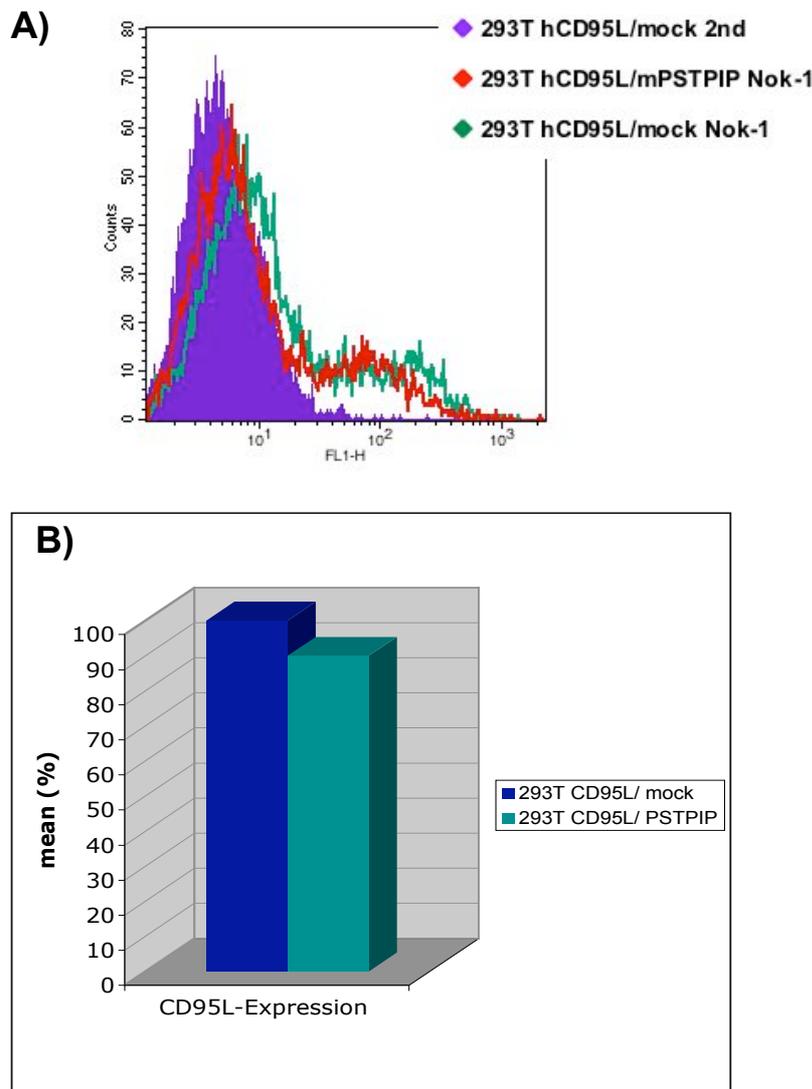


Abb.3.30: Einfluss von PSTPIP auf die Expression von CD95L auf der Zelloberfläche transient transfizierter 293T Zellen.

A: Durch Inkubation transient hCD95L-exprimierender 293T Zellen mit dem anti-hCD95L-Antikörper Nok-1 und einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörper zeigen hCD95L positive Zellen (grüne Kurve) im FACS eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu ungefärbten Zellen (violette Kurve). Die gleichzeitige Expression von mPSTPIP führt zu einer leicht verringerten hCD95L Oberflächenexpression (rote Kurve). **B:** Um verschiedene Experimente besser vergleichen zu können, wurde der „mean“-Fluoreszenzwert der CD95L/mock-transfizierten Zellen jedes Experiments auf 100% gesetzt. Die Oberflächenexpression des CD95L in Zellen, die mit PSTPIP co-transfiziert wurden, beträgt durchschnittlich 90% der CD95L-Oberflächenexpression von CD95L/mock transfizierten Zellen, dabei wurden 10 verschiedene Einzelmessungen berücksichtigt.

Wie im Histogramm in Abb.3.30A zu sehen ist, zeigen hCD95L/mPSTPIP co-transfizierte Zellen in einer FACS-Messung eine leicht verringerte hCD95L Oberflächenexpression (rote Kurve) im Vergleich zu 293T Zellen, die mit pCR33-hCD95L und Leervektor (mock)

transfiziert wurden (grüne Kurve). Die zwei Peaks im Histogramm weisen auf zwei unterschiedliche Zellpopulationen hin. Eine verringerte CD95L-Oberflächenexpression war allerdings nicht in allen Experimenten zu sehen. Um den Mittelwert aller durchgeführten Versuche zu bestimmen, wurde der „mean“-Fluoreszenzwert der CD95L/mock-transfizierten Zellen jedes Experiments auf 100% gesetzt. In den hier zusammengefassten 10 Experimenten zeigt sich, dass die Expression von CD95L durch die gleichzeitige Expression von PSTPIP auf 90% des Levels von CD95L/mock-transfizierten Zellen reduziert wird (Abb.3.30). Allerdings wurde die Menge der tatsächlich in den Zellen aufgenommenen Plasmid-DNA nach der Transfektion nicht überprüft.

3.10 Quantifizierung von Apoptose in CD95-positiven Targetzellen nach Co-Kultivierung mit CD95L exprimierenden Effektorzellen

Werden zwei Zellpopulationen zusammen inkubiert, von denen die eine den CD95 Liganden und die andere den CD95 Rezeptor exprimiert, beobachtet man die Induktion von Apoptose in den CD95 Rezeptor exprimierenden Zellen. In dem hier verwendeten System wurden hCD95L-überexprimierende 293T Zellen mit hCD95-positiven Jurkatzellen inkubiert. Das Prinzip auf dem dieses Experiment beruht ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

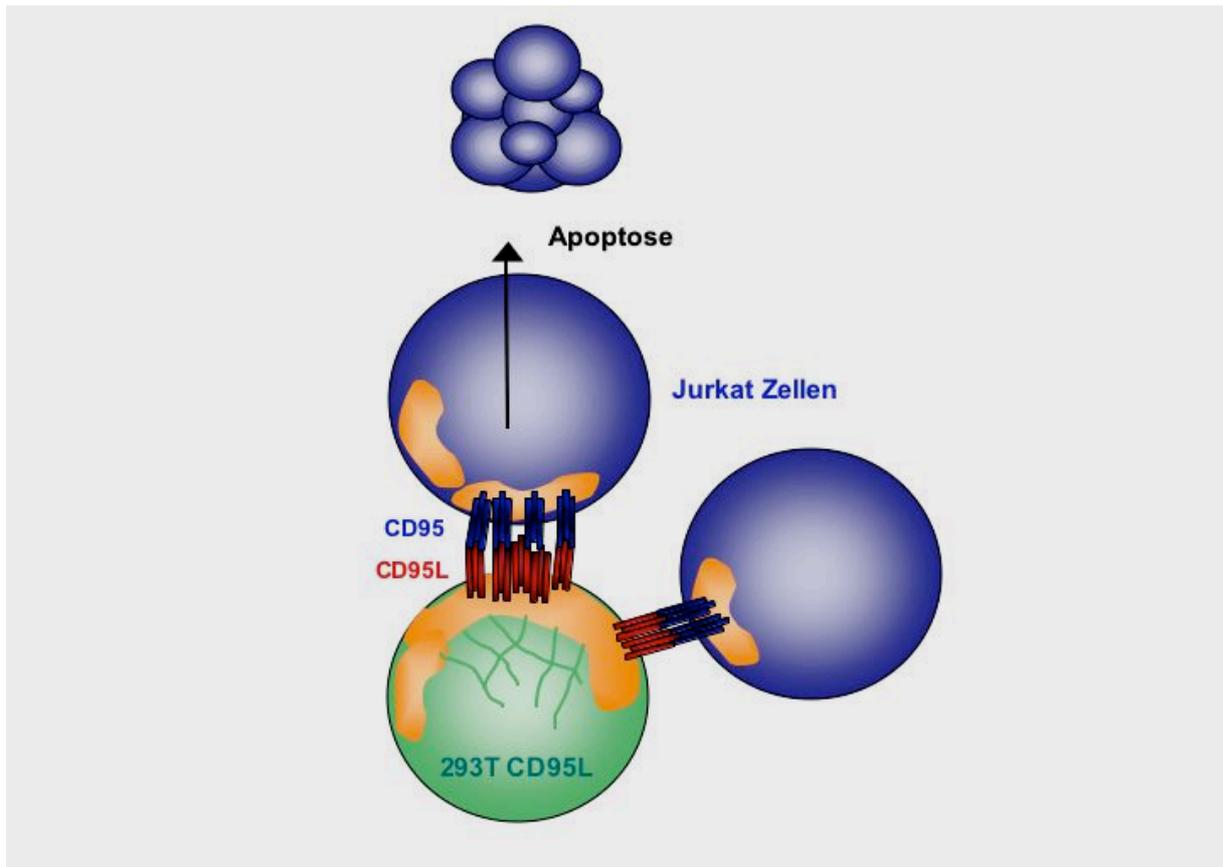


Abb.3.31: Schematische Darstellung der durch Co-Kultivierung durch CD95L induzierten Apoptose

In dem in dieser Arbeit verwendeten System wurden je nach Experiment stabil oder transient CD95L-exprimierende 293T Zellen mit CD95 positiven Jurkatzellen inkubiert. Durch Bindung des membranständigen, trimerisierten Liganden an den CD95 Rezeptor wird Apoptose in den Jurkatzellen induziert. Sowohl der CD95 Ligand als auch der CD95 Rezeptor finden sich in speziellen Mikrodomänen der Zellmembran, den so genannten Lipid Rafts.

Um die beiden Zellpopulationen später im FACS unterscheiden zu können, wurden die Jurkatzellen mit CFSE markiert. CFSE ist membranpermeabel, wird aber im Zytoplasma der Zelle von einer nicht-spezifischen Esterase gespalten und bindet irreversibel an zytoplasmatische Bestandteile. Das gesplattene CFSE fluoresziert und ist im FACS im FL-1-Kanal detektierbar (Lyons und Parish, 1994).

Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte über die Bestimmung des Anteils an Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt im FACS. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert und anschließend mit Propidiumiodid, einem DNA-interkalierenden kationischen Farbstoff, gefärbt. Im Durchflusszytometer lassen sich Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus mit diploidem DNA-Gehalt von Zellen in der G2-Phase mit tetraploidem DNA-Gehalt und von zwischen diesen beiden Populationen liegenden S-Phase-Zellen unterscheiden; zudem erkennt man deutlich

apoptotische Zellen mit einem DNA-Gehalt kleiner als $2n$ („subG1-Peak“) (Nicoletti *et al.*, 1991). Nachfolgend ist ein Beispiel eines solchen Experiments gezeigt. Dabei wurde der Prozentanteil an CFSE-markierten Jurkat-Zellen mit subG1-DNA-Gehalt aufgetragen.

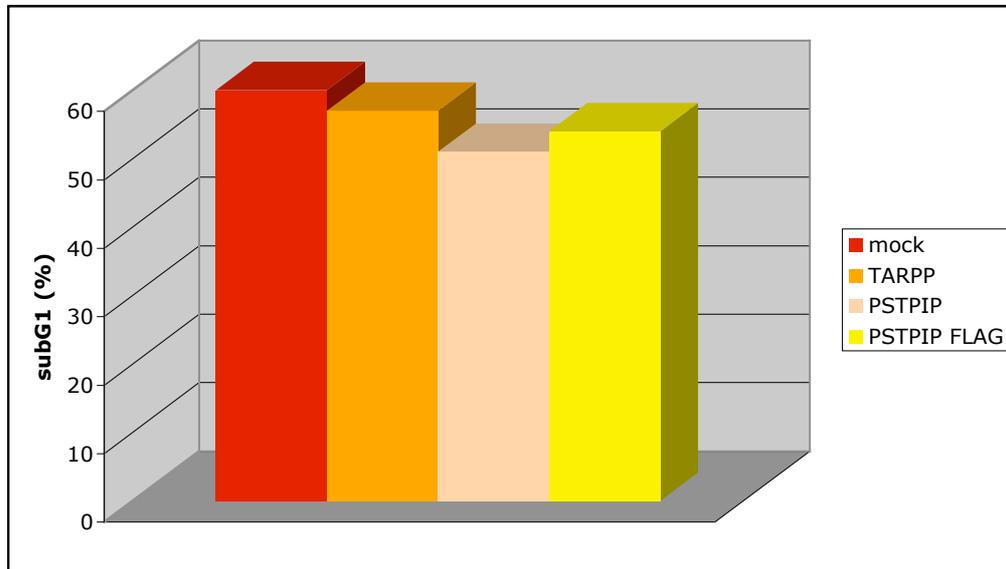


Abb.3.32: Beispiel eines Co-kultivierungsexperiments

In dem hier beispielhaft gezeigten Experiment wurde die Kapazität des CD95L zum Abtöten der Jurkat-Zielzellen von der gleichzeitigen Expression von mPSTPIP und hTARPP beeinflusst. Es zeigt sich eine leicht verringerte Apoptoserate. 293T Zellen wurden mit hCD95L und zusätzlich mit Leervektor, mPSTPIP bzw. hTARPP transfiziert. Nach 24h wurden 5×10^5 293T Zellen mit der gleichen Anzahl an JA3-Jurkatzellen, die zuvor mit CFSE markiert worden waren, für weiter 6h zusammen inkubiert, anschließend fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS gemessen.

In dem gezeigten Experiment führt die Co-expression von mTARPP bzw. mPSTPIP/ mPSTPIP-FLAG dazu, dass weniger Jurkatzellen getötet werden. Im Falle von mPSTPIP könnte dies im Zusammenhang damit stehen, dass auch die Oberflächenexpression von hCD95L im Durchschnitt niedriger ist, wenn mPSTPIP co-exprimiert wird (Abb.3.30). Allerdings ist zu erwähnen, dass in anderen Experimenten kein Einfluss von mPSTPIP auf die Kapazität des hCD95L Apoptose zu induzieren gesehen werden konnte.

3.11 Aktivierung des MAPK-Signalweges durch reverse Signalübertragung über CD95L

Wie in der Publikation von Ulisse und Kollegen (2000) gezeigt wurde, führt die Stimulation von CD95L in murinen Sertoli-Zellen zur Phosphorylierung von p42/p44-MAPK. Dieses Ergebnis ist interessant, da die MAPK-Signaltransduktion proliferative Signale vermittelt. Um zu untersuchen, ob dieses Ergebnis auch in 293 Zellen reproduziert werden kann, wurden mit hCD95L stabil transfizierte 293-005 Zellen gehungert, d.h. sie wurden in Medium ohne Serum inkubiert, damit die durch Serum induzierte MAPK-Phosphorylierung reduziert wird. Anschließend wurde mit dem anti-hCD95L-Antikörper Nok-1 oder mit Fas-Fc stimuliert. Der Phosphataseinhibitor Na_3VO_4 wurde zugegeben, um die Aktivität von Phosphatasen, die MAPK wieder dephosphorylieren könnten, zu blockieren. Als Kontrollantikörper wurde ein anti-Lef-1 Antikörper verwendet (gleicher IgG1 Isotyp).

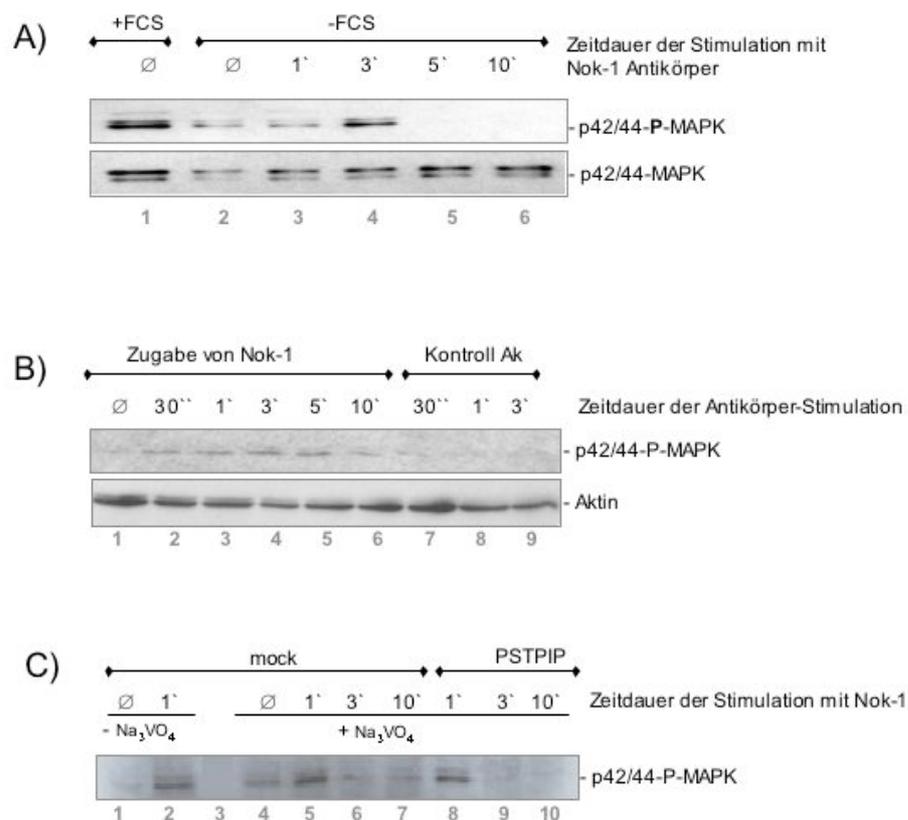


Abb.3.33: p42/44-MAPK werden nach CD95L-Stimulation mit dem anti-CD95L Antikörper Nok-1 phosphoryliert

A: Stabil hCD95L exprimierende 293-005 Zellen wurden über Nacht gehungert, d.h. in Medium ohne Serum wachsen gelassen (-FCS), um die normalerweise durch das Serum im Medium induzierte MAPK-Phosphorylierung (+FCS, Spur 1) zu reduzieren. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit dem anti-hCD95L Antikörper Nok-1 inkubiert, abzentrifugiert und direkt in 2xSDS-

III. Ergebnisse

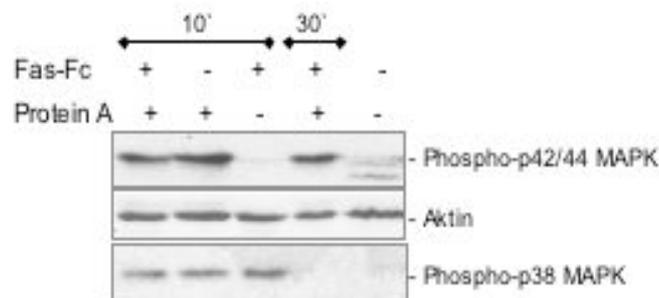
PAGE Ladebuffer lysiert. Die durch Nok-1 induzierte transiente MAPK-Phosphorylierung ist nach 5 Minuten nicht mehr zu erkennen. Die Menge an unphosphoryliertem p42/p44 wurde auch überprüft und ist im unteren Blot zu sehen.

B: Stabil hCD95L exprimierende 293-005 Zellen wurden 17 Stunden gehungert, 1,5h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in Eppendorf- Röhrcchen überführt. Die Zugabe von 1µg/ml Nok-1 oder dem Kontrollantikörper Lef-1 erfolgte für die angegebenen Zeiten unter ständigem Mischen auf einem Überkopf-Rotator. Die Zellen wurden abzentrifugiert und sofort in 2xSDS-PAGE Ladebuffer lysiert. Der mit Nok-1 beobachtete Anstieg der p42/44-MAPK Phosphorylierung innerhalb der ersten 5 Minuten erfolgt nach der Behandlung der Zellen mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps nicht. Mit einem anti-Aktin-Antikörper wurde die Beladung des Gels überprüft.

C: 293-005 Zellen wurden mit *pRK-mPSTPIP* oder Leervektor (mock) transfiziert, 6,5h vor der Durchführung des Experiments gehungert und wo erwähnt für 1h mit dem Phosphataseinhibitor Natriumvanadat (Na_3VO_4) inkubiert. Die Stimulation erfolgte in Eppendorf-Röhrcchen mit 0,33µg/ml Nok-1. Die durch Stimulation induzierte p42/44-MAPK Phosphorylierung ist transient und wird durch die gleichzeitige Expression von mPSTPIP nicht beeinflusst. Die Zugabe von Na_3VO_4 führt zu einer leicht vermehrten Phosphorylierung, da es die Aktivität verschiedener Tyrosinphosphatasen blockiert.

Auch in CD95L-exprimierenden 293 Zellen führt die Stimulation des CD95 Liganden durch Antikörper zur Phosphorylierung von p42/p44-MAPK (Abb.3.33). Dazu wurden die Zellen mit anti-hCD95L-Antikörper für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Diese Phosphorylierung erfolgt sehr schnell und dauert nur wenige Minuten. Die Stimulation derselben Zellen mit einem anderen Antikörper des gleichen Isotyps führt nicht zur MAPK-Phosphorylierung, was die CD95L-Spezifität dieser Phosphorylierung belegt (Abb.3.33B, Spur 7-9). Die gleichzeitige transiente Expression von mPSTPIP zeigte keinen veränderten MAPK-Phosphorylierungsstatus (Abb.3.33C), was nahelegt, dass die Interaktion von PSTPIP mit CD95L die MAPK-Phosphorylierung über CD95L nicht beeinflusst.

In einem anderen Experiment wurden die Zellen mit Fas-Fc und Protein-A -zur Vernetzung des Moleküls- stimuliert.



3.34: Untersuchung der Phosphorylierung von p42/44-MAPK und p38-MAPK in 293-005 Zellen

Stabil CD95L-exprimierende 293-005 Zellen wurden mit Fas-Fc bzw. Protein A für 10 bzw. 30 Minuten inkubiert. Protein A wurde verwendet, um Fas-Fc zu vernetzen. In Spur 2 ist zu erkennen, dass auch Protein A alleine zur Phosphorylierung von p42/44-MAPK und p38-MAPK führt.

Allerdings führt auch Protein A alleine zur Phosphorylierung der p42/44-MAPK und p38-MAPK (Spur 2). Fas-Fc ohne vernetzendes Protein A phosphoryliert p42/44-MAPK nicht, was aber auch daran liegen könnte, dass die 10-minütige Stimulation zu lang war und man nach kürzeren Zeiträumen schauen müsste (siehe dazu Abb.3.34, allerdings wurde hier mit anti-hCD95L-Antikörpern stimuliert). Die Phosphorylierung der p38-MAPK dagegen ist nach 10-minütiger Stimulation mit Fas-Fc erkennbar (Abb.3.34 Spur 3).

3.12 Interaktion von PSTPIP mit der PTP-PEST Phosphatase

Da bekannt ist, dass PSTPIP auch an die Phosphatase PTP-PEST bindet (Dowbenko *et al.*, 1998), wurde untersucht, ob diese Interaktion durch die Bindung von PSTPIP an CD95L beeinflusst wird. Für andere mit PSTPIP interagierende Proteine, wie z.B. WASp oder c-Abl, wurde gezeigt, dass sie in einem ternären Komplex mit PSTPIP und PTP-PEST vorliegen können (Côté *et al.*, 2002).

Die PTP-PEST-exprimierende DNA wurde von N.Tonks (Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA) im viralen Vektor pBabe-puro erhalten und zur weitergehenden Untersuchung in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. In einem *in vitro* GST-Pulldown wurde mPSTPIP-GST mit *in vitro* translatiertem mPTP-PEST und zusätzlich mit *in vitro* translatiertem hCD95L inkubiert.

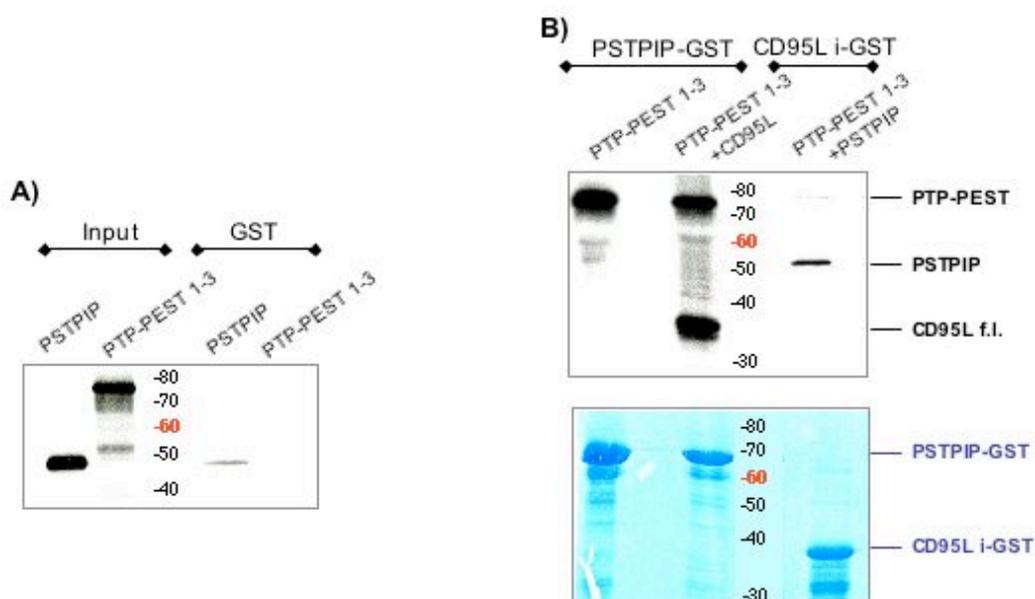


Abb.3.35: *In vitro* Interaktion von PSTPIP, PTP-PEST und CD95L

Die Phosphatase mPTP-PEST, hCD95L und mPSTPIP wurden *in vitro* translatiert und mit GST, mCD95L-intra-GST (intrazellulärer Anteil des mCD95L) bzw. mPSTPIP-GST inkubiert. In **A** wurden *in vitro* translatiertes mPTP-PEST und mPSTPIP (input, Spur 1 und 2) auf ihre unspezifische Bindung an GST hin untersucht. In **B** ist zu sehen, dass bei gleichzeitiger Inkubation von mPTP-PEST und hCD95L mit mPSTPIP-GST beide Proteine an mPSTPIP binden können (**B**: Spur 2). Mit mCD95L-intra-GST wird nur mPSTPIP, nicht jedoch mPTP-PEST präzipitiert (**B**: Spur 3). Im Coomassie-Gel erkennt man die Mengen an GST-Fusionsproteinen.

In GST-Pulldown-Experimenten sollte untersucht werden, ob PSTPIP, PTP-PEST und CD95L in einem ternären Komplex vorliegen. Wurden *in vitro* translatiertes mPTP-PEST und hCD95L zusammen mit mPSTPIP-GST inkubiert, zeigte sich, dass beide Proteine gleichzeitig an PSTPIP binden (Abb.3.35B, Spur 2). Wurden jedoch *in vitro* translatiertes mPSTPIP und mPTP-PEST gleichzeitig auf ihre Bindung an mCD95L-intra-GST hin untersucht, wurde nur mPSTPIP in der Audiographie detektiert (Abb.3.35B, Spur 3). Läge hier ein ternärer Komplex vor, müsste auch PTP-PEST über das Adaptorprotein PSTPIP an CD95L-intra-GST binden. Allerdings war in diesem Experiment auch die Bindung von mPSTPIP an mCD95L-intra-GST im Vergleich zum „input“ (Abb.3.35A, Spur 1) sehr schwach (Abb.3.35B, Spur 3).

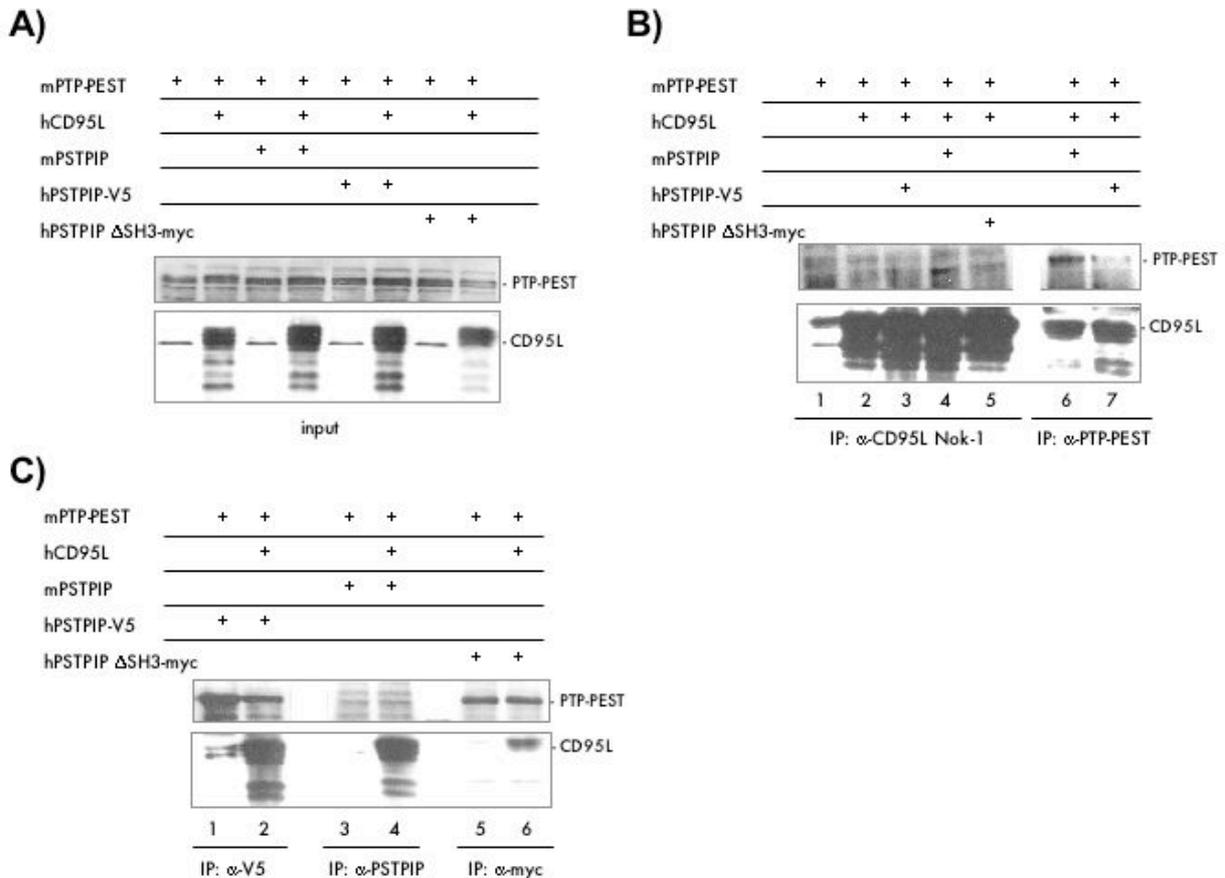


Abb.3.36: Interaktion von PSTPIP, PTP-PEST und CD95L in Co-Immünpräzipitationsexperimenten

293T Zellen wurden mit hCD95L, h/mPSTPIP bzw. der Phosphatase mPTP-PEST transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Verwendet wurden der anti-hCD95L Antikörper Nok-1, ein anti-mPTP-PEST Antiserum, ein anti-V5-Tag Antikörper gegen hPSTPIP-V5, ein anti-mPSTPIP Antikörper und ein anti-myc-Tag Antikörper (9B11) gegen hPSTPIPΔSH3-myc. In **A** wurden jeweils 5% des für die IP eingesetzten Zelllysates aufgetragen und im Western Blot die Expression von hCD95L und mPTP-PEST überprüft. Dazu wurden der Maus-anti-hCD95L Antikörper G247-4 und ein Kaninchen-anti-mPTP-PEST Antiserum (N.Tonks) verwendet. In **B** wurden Immunpräzipitationen mit anti-hCD95L Nok-1 und anti-PTP-PEST aufgetragen, in **C** IPs mit anti-V5 (hPSTPIP, besitzt ein V5-Tag), mit Kaninchen-anti-PSTPIP und zur Immunpräzipitation von hPSTPIPΔSH3 mit dem anti-myc-Tag Antikörper 9B11. In **B** ist zu erkennen, dass hCD95L mit PTP-PEST immunpräzipitiert werden kann, wenn mPSTPIP bzw. hPSTPIP anwesend sind (Spur 6 und 7). Die Kontrolle, dass PTP-PEST und hCD95L nicht direkt aneinander binden, wurde in einem anderen Experiment gezeigt (Daten nicht gezeigt). Im umgekehrten Experiment, d.h. in der IP mit Nok-1, lässt sich eine PTP-PEST-Bande bei Anwesenheit von PSTPIP erahnen (Spur 4). In **C** ist zu erkennen, dass CD95L mit m- und hPSTPIP immunpräzipitiert wird (Spur 2 und 4), nicht jedoch mit hPSTPIP ohne SH3-Domäne (Spur 6). Die Deletion dieser SH3-Domäne beeinflusst die Bindung von PSTPIP an PTP-PEST wie erwartet nicht. Warum in diesem Experiment PTP-PEST nicht mit mPSTPIP immunpräzipitiert werden konnte (Spur 3 und 4) ist unklar.

Wie in den vorliegenden GST-Pulldown Experimenten (Abb.3.35) wurde in anschließenden Co-Immunpräzipitationsexperimenten die publizierte Bindung von PSTPIP und PTP-PEST, sowie die Tatsache, dass diese Bindung nicht über die PSTPIP-SH3-Domäne stattfindet, bestätigt (Abb.3.36). Die humane Form von PSTPIP, in der die SH3-Domäne deletiert wurde, bindet PTP-PEST, nicht jedoch den CD95L (Abb.3.36C, Spur 6). Es zeigte sich zudem *in vivo*, dass hCD95L und PTP-PEST, die nicht direkt aneinander binden (Daten nicht gezeigt), bei Anwesenheit von PSTPIP co-immunpräzipitiert werden (Abb.3.36B, Spur 4, 6 und 7). Diese Ergebnisse legen also nahe, dass CD95L, PSTPIP und PTP-PEST als ternärer Komplex vorliegen, auch wenn im *in vitro* GST-Pulldown PTP-PEST nicht über die Bindung an den Adaptor PSTPIP von CD95L-intra-GST gebunden werden konnte. Eventuell ist eine Modifikation von PSTPIP nötig, die bei bakterieller Expression und *in vivo* stattfindet, nicht jedoch bei der *in vitro*-Translation des Proteins. Es ist auch möglich, dass die Konformation des mCD95L-intra-GST Fusionsproteins nicht der Konformation des vollständigen hCD95L-Proteins entspricht.

3.13 Lokalisation von CD95L in Lipid Rafts

Als Lipid Rafts werden spezielle Mikrodomänen der Zellmembran bezeichnet, die sich durch eine hohe Konzentration von Sphingolipiden und Cholesterol auszeichnen. Substanzen, die Cholesterol aus der Membran entfernen, zerstören die Rafts.

Wie in der Arbeitsgruppe von Anne-Odile Hueber (Inserm, Nizza, Frankreich) gezeigt werden konnte, lokalisiert ein Teil des humanen CD95 Liganden konstitutiv in Lipid Rafts (Abb.3.37). Stabil CD95L-exprimierende 293-005 Zellen wurden mit Detergentien (Brij-98) behandelt und die Proteine im Sucrose-Gradienten aufgetrennt. Raft-assoziierte Proteine finden sich in den Fraktionen 1-5.

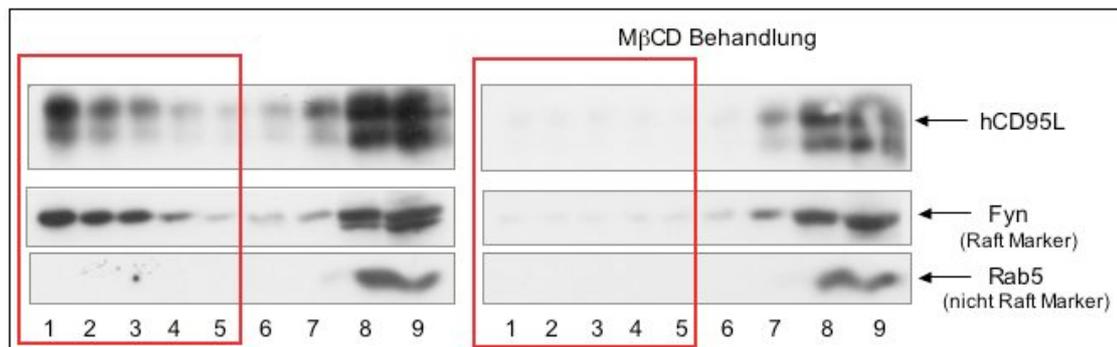


Abb.3.37: CD95L lokalisiert konstitutiv in Lipid Rafts

Im Sucrose Gradienten nach Brij-98-Behandlung von 293-005 Zellen findet man Raft-assoziierte Proteine in den Fraktionen 1-5. Die unterschiedlichen Fraktionen wurden im Western Blot auf die Expression verschiedener Proteine untersucht. Als Kontrolle wurde die Lokalisation von Fyn, als bekanntes Raft-assoziiertes Protein (Toyoshima *et al.*, 1989) und Rab-5, als nicht in Rafts lokalisierendes, endosomales Protein (Gorvel *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 1994) überprüft. Die konstitutive Lokalisation des hCD95L in diesen Fraktionen wird durch Behandlung der Zellen mit MβCD und der damit einhergehenden Zerstörung der Lipid Rafts aufgehoben. (Die Abbildung stammt aus der Arbeitsgruppe von A.-O. Hueber, Inserm, Nizza)

Die Abbildung 3.37 zeigt, dass sich ein Teil des hCD95L in den Gradienten-Fraktionen 1-5 befindet und offensichtlich Raft-assoziiert ist. Nach Cholesteroldepletion und damit einhergehender Zerstörung der Rafts durch Cholesterol-entfernende Substanzen, wie z.B. Methyl-β-Cyclodextrin MβCD, beobachtet man die Lokalisierung in den Fraktionen 1-5 nicht mehr.

Da für viele andere membranständige Proteine, wie z.B. CD95 (Hueber *et al.*, 2002), bekannt ist, dass ihre Funktion von der Lokalisierung in Rafts abhängig ist, wurde untersucht, ob die Raft-Assoziation des CD95L einen Einfluss auf seine apoptoseauslösende Aktivität hat. Dazu wurde ein Co-Kultivierungsexperiment von CD95- und CD95L-exprimierenden Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.10). Als CFSE-markierte Zielzellen wurden CD95-sensitive Jurkat Zellen (JH6.2) verwendet und als apoptoseauslösende Effektorzellen dienten stabil CD95L-exprimierende 293 Zellen, die zum Teil mit Substanzen, die Cholesterol entfernen und so die Lipid Rafts zerstören, behandelt wurden. Die Wirksamkeit der Substanzen wurde durch die Behandlung von CD95-exprimierenden Zellen mit anschließender Co-Kultivierung getestet, da die Aktivierung des nicht in Rafts lokalisierten Rezeptors nicht zur Apoptose führt (Hueber *et al.*, 2002).

Die Messung der Apoptose erfolgte durch Bestimmung des Anteils an CFSE-negativen 293 Zellen mit sub-diploidem DNA-Gehalt im FACS.

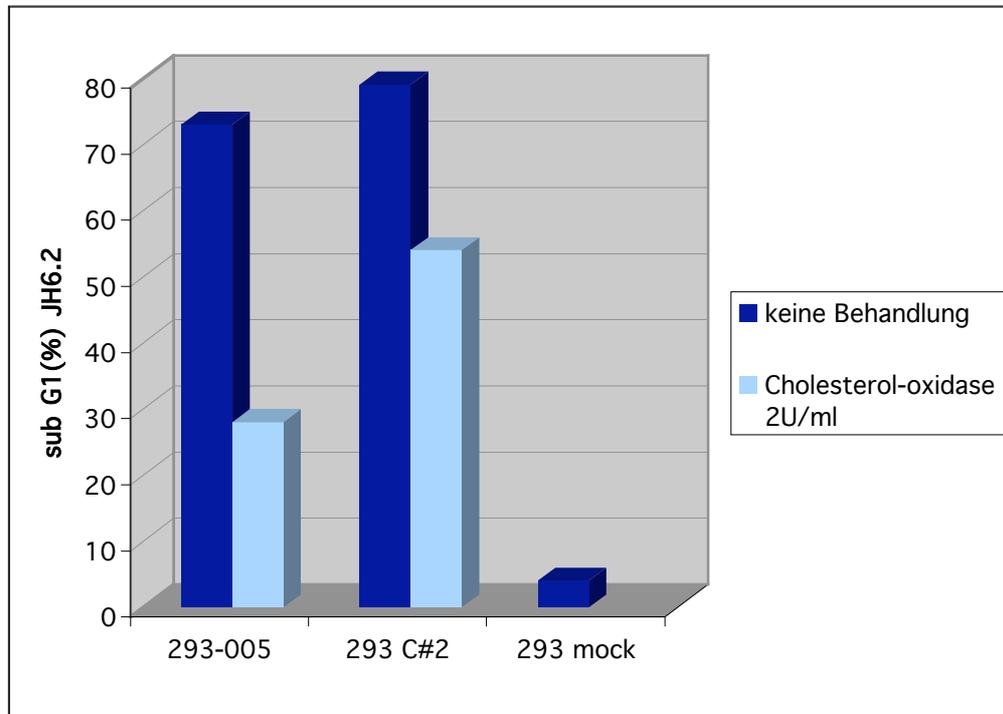


Abb.3.38: Die Zerstörung der Lipid Rafts führt zur Inhibition der CD95L-induzierten Apoptose

CFSE-markierte JH6.2 Jurkat Zellen wurden zusammen mit zwei unterschiedlichen *hCD95L*-stabil transfizierten 293 Zellen (293-005 bzw. 293#C2) bzw. mit Leervektor (mock) transfizierten 293 Zellen für 5 Stunden kultiviert. Die 293 Zellen wurden z.T. vor der Co-Kultivierung für zwei Stunden mit 2U/ml der Cholesterol-entfernenden Substanz Cholesteroloxidase behandelt (hellblaue Balken). Anschließend wurden die Zellen mit 70% Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Die Messung des Zellzyklusprofils dieser Zellen erfolgte im FACS, wobei die beiden Zelltypen aufgrund der CFSE-Färbung der Jurkatzellen zu unterscheiden waren. Der Anteil an CFSE-positiven Zellen mit sub-G1 DNA ist in dem Balkendiagramm aufgetragen. In diesem Experiment führte die Behandlung der 293 Zellen mit Cholesteroloxidase zur Reduktion der CD95L-induzierten Apoptose von 72% auf 26% (293-005) bzw. von 78% auf 52% (293C#2).

Die gleichzeitige Inkubation von zwei verschiedenen stabil CD95L-exprimierenden 293T Zellen (293-005 und 293C#2 (V.Kirkin)) mit JH6.2 Jurkatzellen führte nach 5h zur Induktion von Apoptose (72% bzw. 78%) der JH6.2-Zellen.

Wie in der Abbildung 3.38 zu erkennen ist, führt die Zerstörung der Rafts durch Cholesteroloxidase zu einer verringerten Apoptoseinduktion in CD95-positiven Jurkatzellen. 293T Zellen, die den Liganden nicht exprimieren (293 mock), induzieren keine Apoptose in Jurkatzellen, was belegt, dass der beobachtete Zelltod durch den CD95 Liganden ausgelöst wurde.

III. Ergebnisse

Die Lokalisation in Lipid Rafts scheint für die Aktivität des Liganden essentiell zu sein, da die Behandlung der CD95L-positiven 293T Zellen mit Cholesterol-depletierenden Substanzen die durch CD95L ausgelöste Apoptose hemmen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Proteine zu finden, die mit dem intrazellulären Anteil des CD95L interagieren. Dieser hoch konservierte zytoplasmatische Teil ist für verschiedene Funktionen des CD95 Liganden von Bedeutung, wie z.B. der Signalübertragung ins Innere der Zelle („reverse signalling“) und der zellulären Lokalisierung des CD95L. Daher können Proteine, die spezifisch mit CD95L interagieren, Aufschluss über die genauen molekularen Vorgänge bei den oben genannten Prozessen geben.

Außerdem wurden erste Experimente durchgeführt um herauszufinden, ob der CD95 Ligand genau wie der CD95 Rezeptor auf der Zelloberfläche in Lipid Rafts lokalisiert und ob eine solche Lokalisierung die CD95L-Funktionen beeinflusst.

4.1 Isolierung von Proteinen, die mit dem intrazellulären Anteil des CD95L interagieren

In einem Hefe-2-Hybrid Screen mit der intrazellulären Domäne des CD95L konnten verschiedene potentielle CD95L-Interaktionspartner isoliert werden. Auch wenn zu dem Zeitpunkt, als der Screen durchgeführt wurde, noch keine *in vivo* Interaktionspartner des CD95L bekannt waren und daher keine Positivkontrolle existierte, konnte aufgrund der Identifizierung von Proteinen, die Poly-Prolinbindungsdomänen wie SH3 (engl.:src homology 3)- oder WW-Domänen (s. unten) enthalten, davon ausgegangen werden, dass der Screen plausible Interaktionspartner geliefert hatte, da sich im intrazellulären Anteil des CD95L eine prolinreiche Domäne befindet. Die Kinase ^{p59}Fyn, deren Interaktion mit Peptiden des intrazellulären Anteils des CD95 Liganden *in vitro*, aber nicht *in vivo*, gezeigt worden war (Hane *et al.*, 1997), wurde nicht gefunden. Ein Teil der Sequenz eines der identifizierten Proteine (FBP 11) ist zusätzlich als „human fas-ligand associated factor 1“ (FLAF1) in der NCBI-Datenbank zu finden (#U70667; Hachiya, 1996). Eine Publikation zur Assoziation von FLAF1 mit dem humanen CD95L gibt es jedoch nicht. Interessanterweise wurden in der Arbeitsgruppe von PD Ottmar Janssen (Immunologisches Institut, Kiel), in der auch nach CD95L-interagierenden Molekülen gesucht wird, Proteine gefunden, die homolog zu den

von uns identifizierten sind. Das „Formin binding protein FBP17“ und „PACSIN2“ gehören der gleichen Proteinfamilie an wie PSTPIP.

In dieser Arbeitsgruppe wurden bekannte SH3- und WW-Domänen-enthaltende Proteine auf ihre *in vitro*-Bindung an die prolinreiche Domäne (PRD) im intrazellulären Anteil des CD95L hin untersucht. SH3-Domänen sind ungefähr 60 Aminosäuren lang und finden sich in einer Vielzahl von Signalmolekülen und zytoskelettalen Proteinen (Bar-Sagi *et al.*, 1993). Man unterscheidet zwei Typen von SH3-Erkennungsmotiven, die jeweils die Kernsequenz PxxP besitzen (s.Abb.4.1): Die Sequenz „RxxPxxP“ wurde als Typ I-, die Sequenz „PxxPxR“ als Typ II-Erkennungsmotiv definiert, wobei „x“ für beliebige Aminosäuren steht und „R“ (Arginin) auch durch „K“ (Lysin) ersetzt werden kann. WW-Domänen sind nur 38 Aminosäuren lang und werden vor allem in den so genannten Forminen und Forminbindenden Proteinen gefunden. Der Name „WW-Domäne“ wurde gewählt, weil für die Stabilisierung der Domäne zwei konservierte Tyrosinreste (W) wichtig sind (Sudol *et al.*, 1996; Bedford *et al.*, 1997). Die Kernsequenz der Interaktionsdomänen lautet PPxY oder PPLP (Abb.4.1).

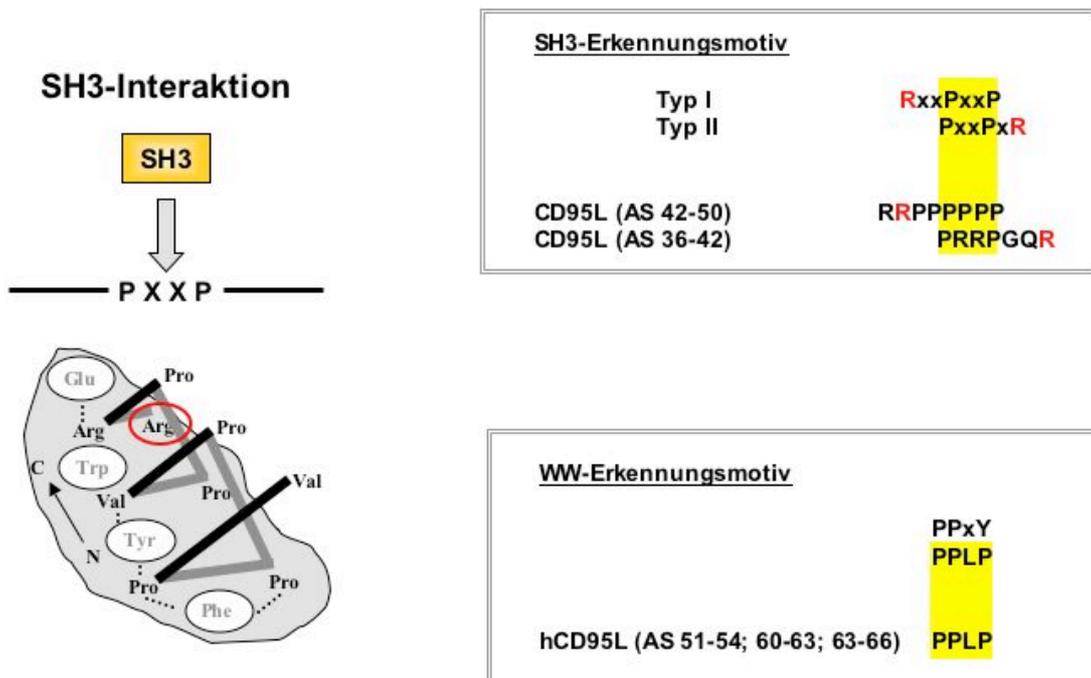


Abb. 4.1: Die Interaktion von SH3- bzw. WW-Domänen mit prolinreichen Regionen

Es existieren zwei verschiedene Typen von SH3-Domänen-Erkennungsmotiven: Typ I (RxxPxxP) und Typ II (PxxPxR), wobei die Aminosäure Arginin (R) auch durch eine andere positiv geladene Aminosäure ersetzt werden kann. Beide Sequenzen findet man in der intrazellulären Domäne des hCD95L. Das Erkennungsmotiv von WW-Domänen lautet PPxY bzw. PPLP. Die Peptidsequenz PPLP findet sich mehrfach im intrazellulären Bereich des hCD95L. (Abb. mod. nach Wenzel *et al.*, 2001)

In der Arbeitsgruppe von PD O.Janssen wurde z.B. eine Interaktion der SH3-Domänen von Grb-2, PI3-Kinase, Nck-1, Phox-47 bzw. der WW-Domänen von FE65 und FBP11 mit dem prolinreichen intrazellulären Anteil des CD95L gezeigt (Wenzel *et al.*, 2001). Einige dieser Interaktionspartner erscheinen im Hinblick auf T-Zellfunktionen sehr viel versprechend, z.B. Grb-2, welches an der TZR-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist. Nck-1 assoziiert mit der aktiven Isoform der Casein Kinase I (CKI- α), und es wäre möglich, dass dadurch CKI in die Nähe seines potentiellen Substrates CD95L gebracht wird. In einem anderen Ansatz identifizierte dieselbe Gruppe als weitere CD95L Interaktionspartner mit Hilfe von GST-Pulldowns aus T-Zelllysaten und zweidimensionaler Gelelektrophorese PACSIN2 und FBP17 (Ghadimi *et al.*, 2002). Beide Proteine besitzen eine ähnliche Domänenstruktur wie PSTPIP, d.h. eine Fes/CIP-homologe Domäne im N-Terminus und eine C-terminale SH3-Domäne.

Es zeigte sich, dass alle in der Tabelle 3.1 aufgelisteten Proteine in Hefen spezifisch mit der intrazellulären Domäne des murinen CD95L interagierten, da in Kontrollexperimenten, in denen die isolierten pACT-Plasmide in FADD-Gal-4-DBD-Fusionsprotein-exprimierende Hefen, transfiziert wurden, kein Hefewachstum beobachtet wurde. Dieser zusätzliche Test ist wichtig um auszuschließen, dass die gefundenen Proteine selber, d.h. ohne weitere Interaktion in der Hefe, in der Lage sind, die Aktivierung von Reporter genen zu induzieren. Für verschiedene im Hefe-2-Hybrid Screen identifizierte Proteine konnte anschließend die Interaktion mit CD95L in weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten verifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Hefe-2-Hybrid Screen Proteine identifiziert werden konnten, die auch unter *in vivo* Bedingungen in Säugerzellen in der Lage sind, den CD95L zu binden. Ein mögliches Problem des Hefe-2-Hybrid Screens mit dem intrazellulären CD95L-Anteil stellte die Tatsache dar, dass der CD95 Ligand in Säugerzellen als trimeres Transmembranprotein vorliegt, im Hefe-2-Hybrid Screen jedoch als monomeres Protein im Hefe-Zellkern. Die Trimerisierung ist abhängig von einer Domäne, die sich im extrazellulären Bereich von CD95L und daher nicht in dem verwendeten Köder-Protein befindet (s. Abb.1.8, AS 137-183) (Orlinick *et al.*, 1997). Es ist demnach möglich, dass mit dem von uns verwendeten experimentellen Ansatz die potentiellen Bindungspartner ausgelassen werden, die präferentiell an den trimerisierten Liganden binden, der eine andere Konformation als das Ligandenmonomer einnehmen könnte. Allerdings wurden auch einige der Proteine, die *in vivo* ausschließlich an den trimerisierten CD95 Rezeptor binden, in einem Hefe-2-Hybrid

Screen mit dem Rezeptormonomer als Köderprotein identifiziert (z.B. FADD/Mort1; Boldin *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996).

Da aus Zeit- und Kapazitätsgründen nicht alle gefundenen Proteine weiter untersucht werden konnten, wurden einige der potentiellen Interaktionspartner aufgrund ihrer publizierten Funktionen und Eigenschaften für weitergehende Experimente ausgewählt. Das Protein **LIMP II** z.B. wurde wegen seiner lysosomalen Lokalisation gewählt (Tabuchi *et al.*, 1997), da CD95L in zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen in sekretorischen Lysosomen gelagert und nach TZR-Stimulation in diesen Lysosomen an die Zelloberfläche transportiert wird (Bossi und Griffiths, 1999). **Lef-1** wurde untersucht, da zumindest in B-Zellen dieser Transkriptionsfaktor mit Proliferation und Apoptose in Zusammenhang steht. Lef-1-negative B-Zellen weisen einen Proliferationsdefekt sowie eine erhöhte Apoptosesensitivität auf, die von einer verstärkten CD95-Expression abhängig zu sein scheinen (Reya *et al.*, 2000). Das **FBP11**-Protein war schon vorher im Zusammenhang mit CD95L veröffentlicht worden („fas ligand associated factor“ FLAF) und konnte daher möglicherweise als Positivkontrolle dienen. Kürzlich wurde gezeigt, das FBP11 im Zellkern mit WASp interagiert; ein Protein, das ebenfalls an PSTPIP bindet (siehe unten) (Mizutani *et al.*, 2004).

Die im Screen identifizierte cDNA des später als **TARPP** bezeichneten Proteins zeigte eine hohe Homologie zu einer unbekannt humanen cDNA (#AL133109), weshalb die ersten Untersuchungen mit letzterer durchgeführt wurden. Später wurde dann die Mausequenz als TARPP in der NCBI-Datenbank veröffentlicht und diese verwendet. Die genaue Funktion von TARPP ist immer noch nicht bekannt, die zeitlich begrenzte Expression des Proteins während der Reifung von T-Zellen im Thymus lässt jedoch auf eine direkte oder indirekte Beteiligung von TARPP an diesem Prozess schließen (Kisielow *et al.*, 2001). Hierzu passt, dass auch eine Beteiligung des CD95L an der T-Zellreifung, genauer an der positiven Selektion im Thymus, beschrieben wurde (Boursalian und Fink, 2002).

Das „proline, serine, threonine phosphatase interacting“ Protein **PSTPIP** wurde zuerst 1997 als ein mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP-HSCF interagierendes Protein publiziert (Spencer *et al.*, 1997). Eine andere Gruppe identifizierte das humane Homolog bei der Suche nach Proteinen, die an das T-Zell-spezifische Oberflächenmolekül CD2 binden. Das humane Protein wird daher **CD2BP1** („CD2 binding Protein 1“) genannt (Li *et al.*, 1998). In

der vorliegenden Arbeit wurde die humane Form jedoch als hPSTPIP bezeichnet. PSTPIP wird ausschließlich in Zellen des haematopoietischen Gewebes, hauptsächlich in T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK), exprimiert und ist homolog zu Cdc15, einem *S.pombe* Protein, welches mit dem Zytoskelett assoziiert ist und nach dem eine Proteinfamilie, die sogenannten PCH („*pombe cdc15* homolog“) Familie, benannt wurde (Abb.4.2). Diese Familie ist strukturell durch eine ähnliche Domänenstruktur, genauer einer N-terminalen Fes/CIP-homologen (FCH) Domäne, einer Coiled-Coil-Domäne, einer PEST-Sequenz und einer C-terminalen SH3-Domäne, charakterisiert. Außerdem sind die meisten Familienmitglieder an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zytokinese oder dem vesikulären Transport beteiligt (Lippincott und Li, 2000). Für das Familienmitglied FAP52 konnte gezeigt werden, dass es oligomerisieren kann (Nikki *et al.*, 2002) und vermutlich als Homotrimer vorliegt. Das Vorhandensein dieser für die Oligomerisierung wichtigen N-terminalen, alpha-helikalen Domäne in den anderen Familienmitgliedern legt nahe, dass sie alle als Homotrimere vorliegen können. Dies ist im Zusammenhang mit der CD95L-Interaktion interessant, da auch dieses Protein als Homotrimer aktiv ist (Nagata, 1999).

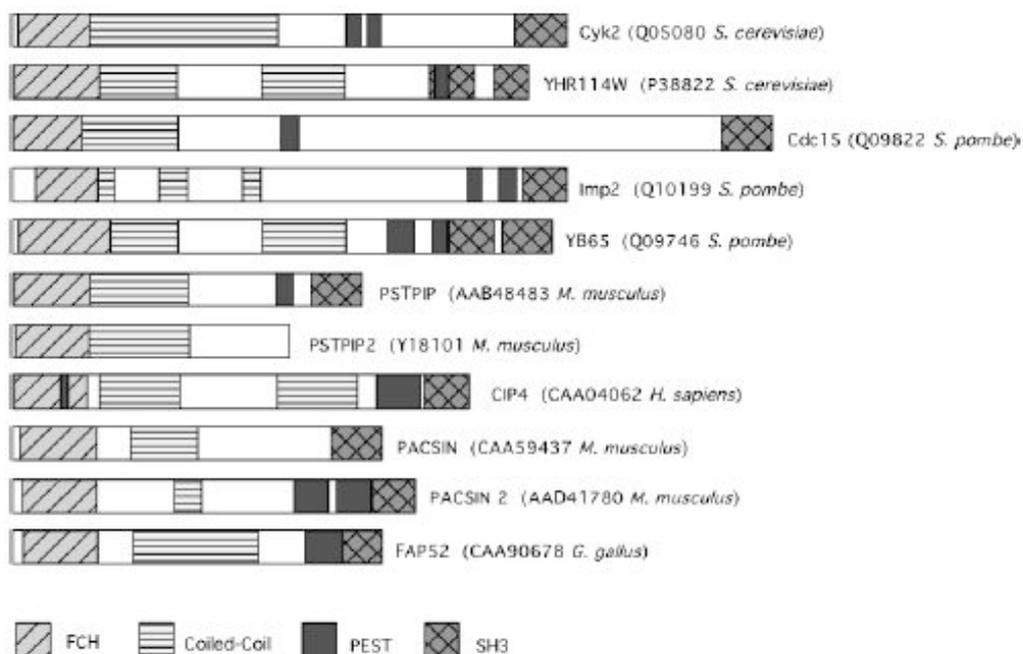


Abb.4.2: Schematische Darstellung von elf Mitgliedern der PCH-Familie

Die verschiedenen Mitglieder der PCH-Familie und deren Domänen sind schematisch dargestellt. Man unterscheidet eine FCH- (Fes/CIP-homologe) Domäne, eine Coiled-coil Protein-Interaktionsdomäne, eine PEST-Sequenz und eine „Src-homology“ SH3-Domäne. Die Genbank-Referenznummern und die Herkunft der jeweiligen Proteine sind in Klammern angegeben. (Abb. aus Lippincott und Li, 2000)

PSTPIP bindet nicht nur an die Phosphatase PTP-HSCF sondern auch an andere Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) wie PTP-PEST (Yang *et al.*, 1993). Diese Interaktion wird über die N-terminale Coiled-coil Region des PSTPIP-Proteins und die prolinreiche Region im C-Terminus der PTPs vermittelt (Dowbenko *et al.*, 1998) und spielt physiologisch eine wichtige Rolle. Beim so genannten PAPA-Syndrom („pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne“), einer autoinflammatorischen Krankheit, wurden Mutationen im hPSTPIP Gen gefunden, die die Bindung von hPSTPIP an PTP-PEST verhindern (Wise *et al.*, 2002).

An die PSTPIP-SH3-Domäne binden verschiedene Proteine wie CD2 (Li *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2001), WASp (Cote *et al.*, 2002), c-Abl (Cong *et al.*, 2000) und Pyrin (Shoham *et al.*, 2003). Die SH3-Domänen von humanem und murinem PSTPIP sind sehr homolog (zu 93% identisch) und besitzen außerdem große Ähnlichkeiten zu SH3-Domänen von Spectrin, Fodrin, Grb-2 und PI3-K. Das vor allem auf T-Zellen exprimierte Typl Transmembranprotein CD2 vermittelt den ersten Kontakt einer T-Zelle mit einer antigenpräsentierenden Zelle (engl.: antigen presenting cell, APC) durch Bindung der APC-ständigen Rezeptoren CD48 (murin) bzw. CD58 (human) (Selvaraj *et al.*, 1987). Li und Kollegen konnten zeigen, dass hPSTPIP, welches an den C-terminalen intrazellulären Anteil des CD2-Proteins bindet, einen Einfluss auf die CD2-vermittelte T-Zell-Adhäsion hat, da diese Adhäsion durch ansteigende Konzentrationen von hPSTPIP verringert wird (Li *et al.*, 1998). Die durch Bindung seines membranständigen Rezeptors bzw. agonistischer Antikörper induzierte Aktivierung und Vernetzung („Crosslinking“) des CD2-Moleküls führt zur Translokation des hPSTPIP Proteins vom Zytoplasma zur Zellmembran. In murinen T-Zellen wurde gezeigt, dass durch verschiedene T-Zell-aktivierende Stimuli die Interaktion von CD2 und unphosphoryliertem mPSTPIP verstärkt werden kann (Bai *et al.*, 2001). Zusätzlich zu seiner Funktion als Adhäsionsmolekül übermittelt das membranständige CD2-Molekül über seinen zytoplasmatischen Anteil Signale ins Zellinnere der CD2-exprimierenden Zelle. Die durch suboptimale Konzentrationen von anti-CD3-Antikörpern induzierte T-Zell-Proliferation wird durch die gleichzeitige Stimulation des CD2-Proteins durch agonistische Antikörper vermehrt. Die molekularen Grundlagen dieser CD2-vermittelten Co-Stimulation sind jedoch noch nicht völlig aufgeklärt. Dieselbe Beobachtung wurde auch für CD95L gemacht, da die Stimulation dieses Moleküls durch agonistische Antikörper die durch anti-CD3-Antikörper induzierte Proliferation zytotoxischer T-Zellen vermehrt (Suzuki *et al.*, 1998). Im intrazellulären Bereich

des CD2-Proteins befinden sich mindestens 4 prolinreiche Regionen, an die verschiedene SH3-Domänen-haltige Proteine binden können, wie z.B. die Kinasen p^{59} Fyn und p^{56} Lck (Carmo *et al.*, 1993) oder CD2AP (Dustin *et al.*, 1998). Wie im ersten Abschnitt dieses Kapitels erwähnt, wurde p^{59} Fyn von Hahne und Kollegen nach *in vitro*-Studien als Interaktionspartner von CD95L diskutiert (Hane *et al.*, 1997).

In Zellen, in denen die mit PSTPIP interagierenden Phosphatasen nicht exprimiert werden, liegt PSTPIP in der phosphorylierten Form vor. Diese Phosphorylierung an Tyrosin 334 konnte auch experimentell z.B. durch die Expression der Kinasen v-Src oder c-Abl induziert werden. PSTPIP bindet c-Abl und reguliert seinerseits die c-Abl Dephosphorylierung und die damit einhergehende Inhibition der Kinase-Aktivität durch die Rekrutierung von PTP-PEST (Cong *et al.*, 2000).

Ein anderes PSTPIP-bindendes Protein ist das "Wiskott Aldrich Syndrom Protein" WASp. Die Funktionen dieses Proteins stehen wiederum in engem Zusammenhang mit der T-Zell-Aktivierung; so ist WASp essentiell für Aktin-Polymerisierung und die Neustrukturierung des Aktin-Zytoskeletts im Bereich der immunologischen Synapse (Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APC) sowie für die NFAT-vermittelte Transkription aktivierungsinduzierter Gene nach T-Zell-Rezeptor (TZR)-Aktivierung (Badour *et al.*, 2003). Im Bereich der immunologischen Synapse findet man eine Anhäufung von Lipid Rafts, an deren „Clustering“ WASp auch beteiligt zu sein scheint (Dupre *et al.*, 2002). Die PSTPIP/WASp-Interaktion ist abhängig von der Signalübertragung durch den TZR und es wurde beobachtet, dass diese Interaktion *in vitro* durch die Phosphorylierung eines Tyrosinrestes in der PSTPIP-SH3-Domäne (Y367) reguliert wird (Wu *et al.*, 1998), obwohl diese Phosphorylierung, wie später gezeigt wurde, *in vivo* keine Rolle für die Funktionen von PSTPIP zu spielen scheint (Côté *et al.*, 2002). Zusätzlich bildet WASp, wie auch c-Abl, einen ternären Komplex mit PSTPIP und PTP-PEST, was zur Dephosphorylierung von WASp führt (Cote *et al.*, 2002)(Abb. 4.4). Die durch die Kinase p^{59} Fyn induzierte Phosphorylierung von WASp an Tyrosin 219 ist essentiell für die Effektorfunktionen von WASp, wie der Bildung der immunologischen Synapse und der Induktion der NFAT-vermittelten Transkription nach TZR-Aktivierung. Die Überexpression von PTP-PEST und die damit einhergehende Dephosphorylierung von WASp verhindern die Formation der immunologischen Synapse (Badour *et al.*, 2004). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die CD95L-Expression durch NFAT induziert werden kann (Rengarajan *et al.*, 2000).

4.2 Verifikation der Interaktionen im *in vitro* GST-Pulldown

Die in Hefen gefundenen Interaktionen wurden zuerst *in vitro* mit Hilfe des GST-Pulldowns verifiziert. Dazu wurde der intrazelluläre Anteil des CD95 Liganden an die GST-Domäne fusioniert, bakteriell exprimiert und an Glutathionagarosebeads gebunden. Die potentiellen Interaktionspartner wurden *in vitro* sowohl transkribiert als auch translatiert und anschließend auf ihre Bindung an CD95L-GST hin untersucht. Z.T. wurde auch CD95L *in vitro* translatiert und die Interaktion mit GST-Fusionsproteinen wie FBP11-GST oder PSTPIP-GST überprüft. Für vier von sechs untersuchten Molekülen –PSTPIP, FBP11, TARPP und Lef-1- wurde in GST-Pulldown-Studien eine Bindung an CD95L nachgewiesen (Abb.3.12- 3.14).

Der Grund dafür, dass zwei Proteine („TLK“ und „LIMP II“) trotz beobachteter Interaktion in Hefen im GST-Pulldown Experiment nicht mit CD95L interagierten (Abb.3.16), könnte z.B. daran liegen, dass für die Bindung an CD95L eine Modifikation eines der Proteine nötig ist, die möglicherweise bei bakterieller Expression bzw. bei der *in vitro* Translation nicht stattfindet. Eine andere Möglichkeit ist, dass eine indirekte, über ein unbekanntes, in Hefen vorliegendes Adaptorprotein vermittelte Interaktion von LIMP II bzw. TLK1 mit CD95L besteht. Vladimir Kirkin aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Co-Expression des lysosomalen Proteins LIMP II und CD95L einen Einfluss auf die Expression und die Prozessierung des Liganden hat. LIMP II ist für die Ausbildung von Endosomen essentiell (Kuronita *et al.*, 2002). Eine direkte Interaktion *in vivo* wurde zwar nicht beobachtet, allerdings konnte im GST-Pulldown-Experiment *in vitro* translatiertes LIMP II mit dem vollständigen CD95L-GST-Fusionsprotein präzipitiert werden.

Bei GST-Pulldown-Untersuchungen mit einer PSTPIP-Mutante, bei der die SH3-Domäne deletiert wurde, zeigten sich keine Interaktionen mit CD95L *in vitro* (Abb. 3.15). Der Versuch, die PSTPIP-SH3-Domäne alleine zu exprimieren, schlug fehl; eventuell ist das Protein zu instabil oder es wurde aufgrund seiner geringen Größe nicht detektiert. Es wäre daher sinnvoll, die SH3-Domäne als GST-Fusionsprotein zu exprimieren und auf eine Bindung an den *in vitro* translatierten CD95L hin zu untersuchen. Die Bindung von PSTPIP und CD95L kann aber aufgrund der oben erwähnten Experimente auf den Bereich der PSTPIP-SH3-Domäne beschränkt werden. Die Interaktion von PSTPIP und CD95L wurde auch mit CD95L-Deletionskonstrukten untersucht. Nach Beseitigung der prolinreichen Region im Bereich der Aminosäuren (AS) 40-80 des CD95 Liganden zeigt sich eine reduzierte, jedoch

immer noch nachweisbare Bindung (Abb. 3.14). Dies könnte daran liegen, dass sich auch im Bereich der AS 1-39 eine SH3-Konsensussequenz -PxxP- befindet (Abb.4.3). Es fehlt zwar das Arginin in unmittelbarer Nähe (s.Abb.4.1; SH-3 Erkennungsmotive), aber für andere Proteine wurde bereits gezeigt, dass -PxxP- als SH3-Erkennungsmotiv ausreichen kann (Mayer und Eck, 1995). Auch die Interaktion von hPSTPIP und CD2 konnte zwar auf einen bestimmten Bereich des CD2-Proteins eingeschränkt werden, aber auch hier zeigte sich mit dem vollständigen Protein eine stärkere Bindung (Li *et al.*, 1998). Zur genaueren Untersuchung müssten neue CD95L-Deletionsmutanten kloniert werden, in denen einzelne prolinreiche Bereiche (wie z.B. AS 22-26 oder AS 37-43) fehlen.



Abb.4.3: Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne des humanen (oben) bzw. des murinen (unten) CD95 Liganden

Der intrazelluläre Anteil des CD95L besteht aus 80 (Mensch) bzw. 78 (Maus) Aminosäuren, von denen 32 bzw. 25 Proline sind. Bereiche, in denen sich SH-3 Konsensussequenzen (-PxxP-) bzw. WW Konsensussequenzen (-PPLP-) befinden, wurden farbig markiert.

4.3 Verifikation der Interaktionen *in vivo*

Auch die Ergebnisse der *in vivo* Experimente bestätigten die CD95L-Interaktion mit PSTPIP. In Co-Immunpräzitations-Studien sowohl mit überexprimierten (Abb. 3.17; 3.18) als auch mit endogenen (Abb. 3.21; 3.22) Proteinen zeigte sich eine spezifische Bindung beider Proteine. Die Immunpräzitation endogener Proteine wurde mit Lysaten von aktivierten T-Zellen durchgeführt. Zusätzlich co-lokalisieren beide Proteine in 293T Zellen, was mit Hilfe des Konfokalen Laserscanning Mikroskopes gezeigt werden konnte (Abb. 3.23). Diese Co-Lokalisation mit PSTPIP konnte auch mit der CD95L-Mutante beobachtet werden, die die prolinreiche Region enthielt, nicht jedoch, wenn diese Region deletiert worden war (Abb. 3.24). Bei diesen Bindungsstudien zeigte sich, dass aufgrund der hohen Homologien von

murinen und humanen Proteinen die Spezieszugehörigkeit von CD95L bzw. PSTPIP keinen Einfluss auf eine Interaktion hat.

Es wurde auch untersucht, ob die Stimulation des CD95 Liganden mit agonistischen Antikörpern die Rekrutierung von PSTPIP zum Liganden beeinflusst. Diese Überlegung liegt nahe, da z.B. die Bindung von hPSTPIP an CD2 unter physiologischen Bedingungen abhängig von der Stimulation des CD2-Moleküls durch agonistische Antikörper bzw. der Bindung des CD2-Rezeptors CD58 ist. Allerdings wurde bei Stimulation des humanen Liganden mit dem anti-hCD95L-Antikörper Nok-1 für 0, 8 bzw. 15 Minuten keine vermehrte Rekrutierung des überexprimierten PSTPIP-Proteins beobachtet (Abb. 3.19). Bei der Präzipitation des endogenen mPSTPIP-Proteins mit mCD95L zeigte sich ein Einfluss bei Zugabe des anti-mCD95L-Antikörpers, da dadurch die Bindung von mPSTPIP an mCD95L zuerst induziert wurde und nach 60 Minuten keine Interaktion mehr detektiert werden konnte (Abb. 3.21A). Letzteres könnte jedoch auch an der Instabilität des Antikörpers oder an der Internalisierung des Antikörper/mCD95L-Komplexes mit anschließender Degradation liegen. Dies konnte leider nicht genauer überprüft werden, da zur Zeit dieser Arbeit kein spezifischer anti-mCD95L-Antikörper zur Detektion des Maus-Proteins im Western Blot existierte. In einem parallelen Experiment, bei dem der anti-mCD95L-Antikörper an der Zellkulturschale immobilisiert worden war, zeigten sich keine zeitabhängigen Unterschiede (Abb. 3.21B).

Bei der Verwendung von Konstrukten, in denen entweder die Aminosäuren 1-40 oder 40-80 des hCD95L Proteins deletiert worden waren, zeigte sich eine reduzierte Bindung von PSTPIP an die Deletionsmutante von CD95L, bei der ein Großteil der prolinreichen Region (AS 40-80) fehlt. Auch die Präzipitation von CD95L mit einem PSTPIP-Protein ohne SH3-Domäne war im Vergleich zum vollständigen PSTPIP-Protein sehr stark verringert (Abb. 3.18A). Diese Ergebnisse lassen daher im Einklang mit den *in vitro* GST-Pulldown-Experimenten darauf schließen, dass die Interaktion von CD95L und PSTPIP über die prolinreiche Region des CD95 Liganden und die SH3-Domäne des PSTPIP-Proteins vermittelt wird (Abb. 3.15). Für die Interaktionen von hPSTPIP mit CD2 bzw. Pyrin, die auch über die PSTPIP-SH3-Domäne vermittelt werden, wurde beschrieben, dass die SH3-Domäne zwar essentiell, aber nicht alleine für die Bindung verantwortlich ist (Li *et al.*, 1998; Shoham *et al.*, 2003).

Die bereits publizierte Interaktion von PSTPIP und der Phosphatase PTP-PEST (Dowbenko *et al.*, 1998) konnte in unseren Experimenten bestätigt werden. Dies zeigte sich sowohl in GST-Pulldown-Studien (Abb. 3.35), als auch in Co-Immunpräzipitations-Experimenten (Abb. 3.36). Die Deletion der PSTPIP-SH3 Domäne hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die Rekrutierung von PTP-PEST, sehr wohl jedoch auf die Bindung von PSTPIP an den CD95 Liganden (Abb. 3.36C, Spur 6).

4.4 Überlegungen zur Rolle der Interaktion von CD95L und PSTPIP

Das Protein PSTPIP wurde aufgrund seiner spezifischen Bindung an den intrazellulären CD95L-Anteil im Hefe-2-Hybrid Screen aber auch wegen seiner interessanten publizierten Eigenschaften für die weitere Untersuchung ausgewählt. Die Expression dieses Proteins ist z.B. genau auf die Gewebe und Zellen beschränkt, in denen auch CD95L vorkommt, und seine bekannten Funktionen stehen, wie auch die des CD95L, in Zusammenhang mit der T-Zellaktivierung, dem vesikulären Transport bzw. dem Zytoskelett.

Andere PSTPIP-bindende Proteine, wie WASp oder c-Abl, können mit PSTPIP und der Phosphatase PTP-PEST einen ternären Komplex bilden. In diesem Komplex dephosphoryliert PTP-PEST nicht nur das direkt interagierende Protein PSTPIP, sondern auch das indirekt gebundene Protein (s. Abb 4.4). Auch wenn bisher keine Phosphorylierung des CD95 Liganden nachgewiesen wurde, könnte die Funktion des Adaptorproteins PSTPIP darin liegen, den CD95L in die Nähe der Phosphatase PTP-PEST zu bringen um damit seine Dephosphorylierung zu ermöglichen. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen des CD95L verschiedener Wirbeltiere findet man mehrere konservierte Tyrosinreste, die möglicherweise phosphoryliert werden könnten. Einer dieser Tyrosinreste liegt im intrazellulären Anteil des CD95L-Proteins (Y-7) und könnte in der reversen Signaltransduktion eine Rolle spielen. In dieser Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass CD95L mit einem anti-Phosphotyrosin-bindenden Antikörper immunpräzipitiert werden kann (Daten nicht gezeigt), dies ist aber kein eindeutiger Beweis für dessen Phosphorylierung, da die Präzipitation auch indirekt, über phosphorylierte CD95L-Interaktionspartner, geschehen könnte.

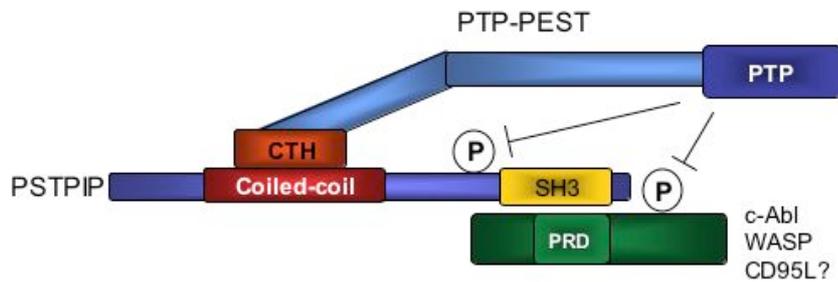


Abb.4.4: Modell eines ternären Komplexes aus PSTPIP/ PTP-PEST und c-Abl, WASp bzw. CD95L

Die Phosphatase PTP-PEST interagiert mit PSTPIP über die PTP-PEST-CTH- (C-terminal 24-amino acid homology domain) und die PSTPIP-Coiled-coil-Domäne. Die Bindung von PSTPIP an WASp, c-Abl oder auch CD95L wird über die PSTPIP-SH3- und die prolinreiche Domäne (PRD) des Interaktionspartners vermittelt. PTP-PEST dephosphoryliert in diesem Komplex PSTPIP und WASp/c-Abl. Ob dies auch für CD95L gilt, ist unbekannt.

Es wäre demnach möglich, dass CD95L von einer Kinase, wie z.B. ^{p59}Fyn, phosphoryliert wird und durch die indirekte Interaktion mit der Phosphatase PTP-PEST über das Adaptorprotein PSTPIP dephosphoryliert wird. Die Stimulation des Liganden mit dem CD95 Rezeptor oder mit agonistischen Antikörpern könnte entweder zur Phosphorylierung oder aber zur Dephosphorylierung eines konstitutiv phosphorylierten CD95L führen. Die Dephosphorylierung durch Stimulation wurde z.B. im Falle von membrangebundenem TNF α (mTNF) beobachtet, wobei es sich aber um eine Serin-Phosphorylierung handelt (Watts *et al.*, 1999).

Wie bereits angedeutet, konnte bisher auch in anderen Arbeitsgruppen weder eine Tyrosin- noch eine Serin-/Threonin-Phosphorylierung des CD95L nachgewiesen werden. Neben den konservierten Tyrosinresten besitzt CD95L eine Casein Kinase 1 (CK1) Phosphorylierungsstelle im intrazellulären Bereich. Diese Serin-/Threonin-Kinase phosphoryliert das zweite Serin des Peptids mit der Konsensussequenz -S(P)xx*S-, wobei das erste Serin in phosphorylierter Form vorliegen muss (Kennelly und Krebs, 1991). Im Falle von TNF α konnte gezeigt werden, dass die rekombinante CK1 in der Lage ist, dieses Molekül zu phosphorylieren. Durch Stimulation von mTNF durch den löslichen, dimeren TNF-Rezeptor (sTNFR) wird mTNF im intrazellulären Bereich dephosphoryliert und dadurch eine Signalkaskade induziert, die zum Anstieg an intrazellulärem Kalzium führt (Watts *et al.*, 1999).

Grundsätzlich gibt es mehrere Funktionen, für die eine PSTPIP/CD95L-Interaktion wichtig sein könnte. Dies ist in der folgenden Abbildung gezeigt:

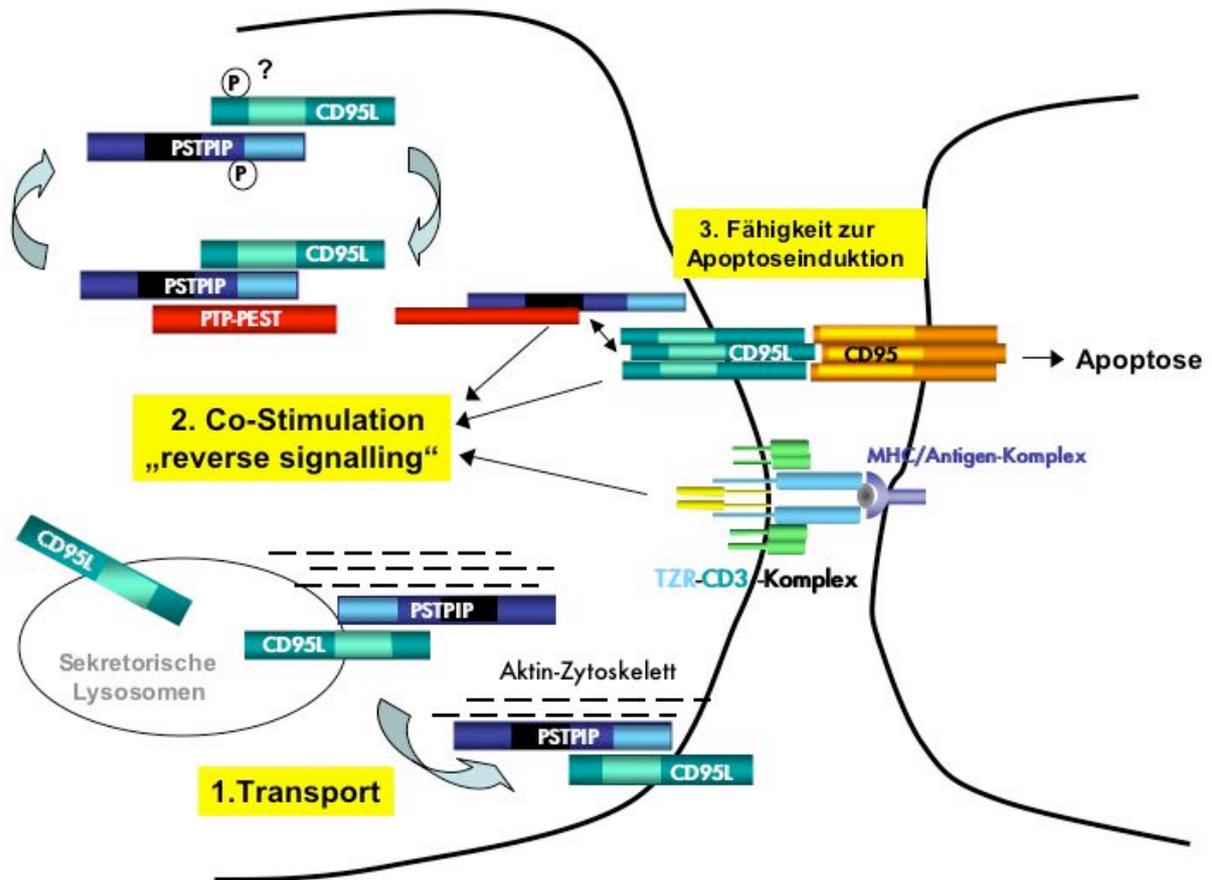


Abb.4.5: Modell zu möglichen Funktionen der CD95L/PSTPIP/PTP-PEST-Interaktion

Die Interaktion von PSTPIP und CD95L könnte verschiedene Funktionen haben, wie die Verknüpfung von CD95L mit dem Aktin-Zytoskelett, was für den Transport zu sekretorischen Lysosomen oder zur Zelloberfläche wichtig sein könnte, oder die Transduktion eines Signals (Co-Stimulus) ins Zellinnere, wobei Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung eine Rolle spielen könnten. Eine andere Möglichkeit ist, dass durch die Interaktion von PSTPIP/CD95L im Zellinneren die apoptoseauslösenden Eigenschaften des Liganden verändert werden.

Eine Interaktion des Adaptorproteins PSTPIP mit CD95L könnte einen Einfluss auf den Transport des Liganden zu Lysosomen bzw. zur Zelloberfläche, auf eine reverse Signaltransduktion oder auf die Kapazität des Liganden zur Apoptoseinduktion haben. Dabei könnte die Assoziation von PSTPIP mit dem Zytoskelett oder auch die Dephosphorylierung von CD95L durch die Phosphatase PTP-PEST eine Rolle spielen.

Ein erster Hinweis auf die Funktion einer PSTPIP/CD95L-Interaktion wurde in Studien zur Oberflächenexpression des CD95L erhalten. Dabei zeigte sich, dass die gleichzeitige Expression von PSTPIP zu einer geringeren CD95L-Oberflächenexpression (Abb. 3.30) und daraus resultierend zu einer verringerten Kapazität zur Apoptoseinduktion führte (Abb. 3.32). Diese Daten müssten jedoch noch genauer verifiziert werden, da sich in verschiedenen Experimenten unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Möglicherweise variierte die Expression von PSTPIP sehr stark, was nicht in jedem Experiment untersucht wurde. Die Verwendung von EGFP-PSTPIP Fusionskonstrukten mit anschließender Messung im FACS, bei der ausschließlich GFP-positive Zellen auf die CD95L-Oberflächenexpression untersucht werden, könnte genauere Ergebnisse liefern.

Zur Phosphorylierung des CD95L und zu den oben beschriebenen möglichen Funktionen der PSTPIP/CD95L-Interaktion müssten weitergehende Versuche durchgeführt werden. Dies könnte zum einen mit rekombinanten Proteinen, aber auch durch Co-Immünpräzipitationsexperimente und der Verwendung von anti-Phosphotyrosin-Antikörpern im Western Blot überprüft werden. Da in unserem Labor mittlerweile ein anti-mCD95L-Antikörper existiert, der mCD95L spezifisch im Western Blot detektiert, und funktionelle *in vivo* Daten zur reversen Signalübertragung des CD95L bisher nur in Mäusen existieren, sollten die Experimente in murinen T-Zellen durchgeführt werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein Modell, das für die reverse Signalübertragung von ephrinB existiert. ephrinB und seine EphB Rezeptoren sind an der Zellmigration und Angiogenese beteiligt. Es wurde gezeigt, dass durch die Aktivierung von ephrinB zwei hintereinander geschaltete und voneinander abhängige Signalwege induziert werden (Palmer *et al.*, 2002). Das „Crosslinking“ des ephrinB Liganden durch EphB Rezeptoren führt zur dessen Verlagerung in Lipid Rafts, wo es in die Nähe der Raft-ständigen Src-Kinasen gebracht wird. Diese phosphorylieren Tyrosine im intrazellulären ephrinB-Anteil und leiten einen von dieser Phosphorylierung abhängigen Signalweg ein, welcher für die Angiogenese primärer Endothelzellen wichtig ist. Zeitversetzt wird die Phosphatase PTP-BL rekrutiert, die Src inaktiviert, EphrinB dephosphoryliert und eine zweite Signalkaskade induziert. Prinzipiell ist ein ähnliches Modell auch für die CD95L Signalübertragung denkbar.

4.5 Studien zur Rolle des CD95L als signalübertragender Rezeptor

Das Phänomen der reversen Signalübertragung wurde nicht nur für CD95L, sondern auch für andere Mitglieder der TNF-Liganden-Familie beschrieben. In den intrazellulären Bereichen von 6 der 15 membranständigen Mitglieder findet sich eine Casein Kinase 1 (CK1) Konsensus-Phosphorylierungsstelle, und zwar bei CD40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, CD95L und mTNF α . Die Tatsache, dass man in all diesen Molekülen eine reverse Signalübertragung beobachtete, führte zu der Hypothese, dass die durch CK1 induzierte Phosphorylierung essentiell für das „reverse signalling“ ist. Experimentelle Daten dazu gibt es bisher jedoch nur für die membrangebundene Form von TNF α (Watts *et al.*, 1999).

Evidenzen für eine reverse Signalübertragung gibt es für OX40L/CD134 (Stuber *et al.*, 1995), CD40L/CD40 (Cayabyab *et al.*, 1994), CD27L/CD27 (Lens *et al.*, 1999), CD30L/CD30 (Wiley *et al.*, 1996), 4-1BB-L/CD137 (Langstein *et al.*, 1998), TRANCE/RANK (Chen *et al.*, 2001), LIGHT/LIGHT-R (Scheu *et al.*, 2002) sowie mTNF α /TNF-R (Harashima *et al.*, 2001) und TRAIL/TRAIL-R (Chou *et al.*, 2001). Die Aktivierung verschiedener Liganden durch Antikörper-Crosslinking führt im Fall von CD30L in frisch aufgereinigten Neutrophilen zu einer vermehrten IL-8 Produktion (Wiley *et al.*, 1996), im Fall von mTNF in Macrophagen zur Herunterregulierung der Expression von löslichem TNF und IL-6 (Eissner *et al.*, 2000) und in aktivierten CD4⁺-T-Zellen zur Induktion der Expression von E-Selectin (Harashima *et al.*, 2001). Für LIGHT bzw. TRAIL wurde beschrieben, dass die Stimulation dieser Liganden ein co-stimulatorisches Signal in CD4⁺-T-Zellen (Wan *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002) bzw. Gesamt-T-Zellen (Chou *et al.*, 2001) auslöst, und dass diese Co-Stimulation abhängig von der p38-MAPK Signalübertragung ist. Auch im Falle von TRAIL ist nicht bekannt, welche Moleküle an den sehr kurzen intrazellulären Anteil dieses Proteins binden und zur Weiterleitung des Signals führen.

Da bisher nur wenig über die duale Rolle von CD95L als Ligand sowie als signalübertragender Rezeptor bekannt ist, wurde zunächst versucht, die bisher publizierten Daten zu reproduzieren, um ein entsprechendes System für weitergehende Experimente nutzen zu können. Die co-stimulatorische Aktivität des Liganden in murinen T-Zellen konnte in verschiedenen Proliferationsexperimenten bestätigt werden. Das Prinzip der von mir durchgeführten Versuche basiert auf dem Einbau von markiertem Thymidin oder

Thymidinanalogen während der DNA-Synthese. Frisch isolierte und über Depletionssäulen aufgereinigte Maus-T-Zellen wurden in Zellkulturschalen wachsen gelassen, die zuvor mit Antikörpern beschichtet worden waren („Coating“). Die Stimulation der T-Zellen mit einem immobilisierten anti-CD3-Antikörper ahmt die *in vivo* durch MHC und Antigen vermittelte Aktivierung des T-Zellrezeptors nach. Wie unter physiologischen Bedingungen wird zur optimalen Aktivierung ein zweites Signal durch Co-Stimulation anderer Rezeptoren benötigt. Der am besten charakterisierte co-stimulatorische Rezeptor ist CD28, welcher normalerweise durch die Bindung seiner auf antigenpräsentierenden Zellen exprimierten Liganden (CD80/CD86) aktiviert wird (Lenschow *et al.*, 1996). Auch die reverse Signalübertragung über den CD95 Ligand wurde als co-stimulatorisches Signal beschrieben, was in diesem Experiment überprüft werden sollte (Suzuki *et al.*, 1998). Die Zellkulturschalen wurden mit anti-CD3 Antikörpern alleine oder mit anti-CD3 Antikörpern plus Fas-Fc bzw. anti-CD28 Antikörpern beschichtet. Als Fas-Fc wird ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären Anteil von CD95 (Fas) und dem konstanten Teil (F_c) des humanen IgG1 bezeichnet. Dieses chimäre Molekül kann CD95L binden und aktivieren. Auch in meinen Experimenten zeigte sich ein proliferationsfördernder, also co-stimulatorischer Effekt von Fas-Fc. Zur Kontrolle wurden die T-Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28- Antikörpern maximal stimuliert, was wie erwartet zu einer höheren Proliferation führte als nach Stimulation mit anti-CD3 und Fas-Fc (Abb. 3.27A). Zusätzlich wurden aus der Gesamtpopulation aller Milz-T-Zellen CD4- bzw. CD8-einzelpositive T-Zellen isoliert und auf ihr Aktivierungsverhalten nach CD95L-Stimulation hin untersucht, da die Co-Stimulation in diesen beiden Zelltypen kontrovers diskutiert wurde. Die Reinheit der durch Negativselektion aufgereinigten einzelpositiven T-Zellen betrug 70-80% (Abb. 3.25). Auch hier zeigte sich ein durch Fas-Fc induzierter Anstieg in der Proliferation. Die durch anti-CD3-Antikörper plus Fas-Fc induzierte Proliferation im Vergleich zur nur mit anti-CD3-Antikörpern induzierten Proliferation war um den Faktor 1,8 in CD4⁺ Zellen und um den Faktor 6 in CD8⁺ T-Zellen erhöht (Abb. 3.27B). Dies entspricht ungefähr dem von Suzuki und Kollegen publizierten Anstieg in der Proliferation anti-CD3 plus Fas-Fc stimulierter Zellen um den Faktor 1,9 (CD4⁺-T-Zellen) und 3,5 (CD8⁺-T-Zellen) im Vergleich zu anti-CD3 stimulierten Zellen. Anzumerken ist, dass die von mir gemessenen „counts per minute; cpms“ im Thymidinassay insgesamt sehr viel niedriger waren als erwartet, was vermutlich an einer suboptimalen T-Zellkultivierung lag. Ein Nachteil dieses Versuchsansatzes liegt darin, dass das Ergebnis dieses Experiments keine Unterscheidung zwischen lebenden, nicht

proliferierenden und toten Zellen erlaubt, d.h. dass die Messung eines niedrigen cpm-Wertes bedeuten kann, dass die Zellen nicht proliferieren (Zellzyklusarrest) oder dass sie tot sind.

Aus diesem Grund wurde in anderen Experimenten die Proliferation über die Detektion von eingebautem Bromodesoxyuridin gemessen. Die Detektion des BrdUs erfolgte im FACS über den Nachweis eines Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten anti-BrdU Antikörpers, mit dem die permeabilisierten Zellen zuvor inkubiert wurden. Der Vorteil einer FACS-Messung besteht in der Möglichkeit, im Vorwärts-/Seitwärts-„Scatter“ tote Zellen elektronisch von der Quantifizierung ausschließen zu können. Zusätzlich zur Detektion des BrdUs können auch andere Proteine mit Antikörpern, die mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, detektiert werden, und so kann die Proliferation spezieller Zelltypen im FACS untersucht werden, wie z.B. von CD4- oder CD8-positiven T-Zellen. Auch in diesen Experimenten zeigte sich ein co-stimulatorischer Effekt von Fas-Fc auf die anti-CD3 induzierte Proliferation von Gesamt- und einzelpositiven T-Zellen (Abb. 3.28). Bei CD4⁺-T-Zellen wurde ein dreifacher, bei CD8⁺-T-Zellen ein 25-facher Anstieg in der Proliferation anti-CD3-stimulierter zu anti-CD3/Fas-Fc-stimulierter T-Zellen beobachtet. Dies war zu erwarten, da das co-stimulatorische Potential des CD95L in CD8⁺-T-Zellen stärker ausgeprägt ist und zuerst auch in diesen beobachtet wurde. Zusätzlich zu den von Suzuki und Kollegen gemachten Beobachtungen einer reversen Signalübertragung über den CD95L in CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (Suzuki *et al.*, 1998) untersuchte auch eine andere Arbeitsgruppe dieses Phänomen. Desbarats und Kollegen bestätigten das Vorhandensein einer reversen Signalübertragung über CD95L, diese führte in ihren Experimenten jedoch zum Zellzyklusarrest von CD4⁺-T-Zellen durch eine verringerte T-Zellaktivierung und damit einhergehender eingeschränkter IL-2 Produktion (Desbarats *et al.*, 1998). In weiterführenden Studien beobachteten Suzuki und Kollegen jedoch eine grundsätzlich durch CD95L vermittelte positive Co-Stimulation in T-Zellen, die in CD4⁺-T-Zellen aber durch die Induktion von Apoptose maskiert ist, da CD4⁺-T-Zellen sehr viel sensitiver gegenüber CD95 induzierter Apoptose sind als CD8⁺-T-Zellen (Suzuki und Fink, 2000)(s.Abb. 4.6). In der folgenden Tabelle, die aus der Publikation von Suzuki und Fink entnommen wurde, werden die verschiedenen Ergebnisse bezüglich CD95L Co-Stimulation und Apoptose in murinen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten verglichen.

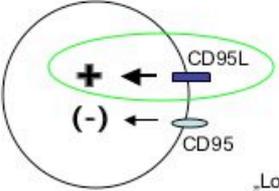
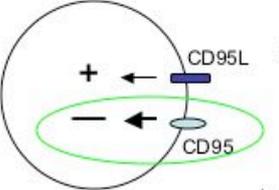
		1. CD95L vermittelte Co-Stimulation		2. CD95L vermitteltes Todessignal	
		CD95L Expression	CD95L Co-Stimulation	CD95L Expression	CD95 induzierte Apoptose
CD8⁺-T-Zelle  Nativ „Longterm“ Zelllinien	Hochregulation innerhalb von 3h nach Ag-Stimulation Höchste Expression an Tag 3	Tag 0-2	Abfall nach Tag 3	Nein	
	Hochregulation innerhalb von 3h nach Ag-Stimulation Höchste Expression an Tag 3	Tag 0-1	Abfall nach Tag 3	Nein	
CD4⁺-T-Zelle  Nativ „Longterm“ Zelllinien	Anstieg innerhalb von 1Tag nach Ag-Stimulation Höchste Expression an Tag 3	Tag 0-2	Höchste Expression bis zur nächsten Ag-Stimulation	Ja	
	Konstitutiv Herunterregulation nach Ag-Stimulation	Keine Co-Stimulation	Herunterregulation nach Ag-Stimulation Re-Expression ab Tag 3	Ja	

Abb. 4.6: Vergleich von CD95L Expression, CD95-induzierter Apoptose und Co-Stimulation in murinen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen.

Der Hauptweg der durch CD95L vermittelten Signaltransduktion in CD8⁺-T-Zellen ist die zur Aktivierung der Zelle führende Co-Stimulation, wohingegen in CD4⁺-T-Zellen CD95L über Bindung seines Rezeptors (CD95) hauptsächlich Apoptose induziert. Die Dicke der Pfeile korreliert mit der Stärke des beobachteten Effektes. In nativen, d.h. frisch isolierten CD8⁺-T-Zellen, sowie in CD8-Zelllinien wird die Expression des CD95L nach Antigen- (Ag)Stimulation hochreguliert und fällt nach drei Tagen wieder ab. Co-Stimulation wird in CD8⁺-T-Zellen, die nahezu resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose sind, bis zum Tag 2 nach Ag-Stimulation beobachtet. In CD4⁺-T-Zellen wird die Expression des CD95 Liganden innerhalb von einem Tag nach Ag-Stimulation hochreguliert, erreicht den Höhepunkt an Tag 3 und bleibt von da an bis zur nächsten Ag-Stimulation konstant. Co-Stimulation nativer Zellen beobachtet man *in vivo* in den ersten zwei Tagen nur nach Blockade der CD95-induzierten Apoptose. In CD4-Zelllinien hingegen wurde keine Co-Stimulation beobachtet.

Nach Suzuki und Fink, 2000

Zusammengefasst kann man also sagen, dass das CD95L/CD95-System in CD4⁺-T-Zellen hauptsächlich negative Signale über die Induktion von Apoptose vermittelt, in CD8⁺-T-Zellen hingegen positive Signale durch Co-Stimulation.

Eine weitere Möglichkeit aktivierte Zellen von nicht aktivierten Zellen zu unterscheiden, ist die Expression von CD25 (IL-2 Rezeptor) sowie die Synthese von IL-2 in aktivierten Zellen. In murinen T-Zellen wurde nach Fas-Fc Co-Stimulation eine erhöhte CD25-

Oberflächenexpression beobachtet (Abb. 3.29). Des Weiteren zeigte die Auswertung von Microarrays, in denen die mRNA mit verschiedenen Stimuli behandelten T-Zellen analysiert wurde, in anti-CD3/Fas-Fc eine erhöhte IL-2 mRNA-Konzentration im Vergleich zu anti-CD-3 stimulierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Einen Hinweis darauf, dass auch in Jurkat Zellen das Crosslinking von CD3 und CD95L zur IL-2 Produktion führt, findet sich bei Boursalian und Fink (2003).

Wie in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden konnte, wird in 293T Zellen nach Stimulation des überexprimierten humanen CD95 Liganden durch einen anti-hCD95L Antikörper ein Signal weiter geleitet, das u.a. zur Phosphorylierung von p42/p44-MAPK (ERK-1/2) führt. Diese Phosphorylierung, sowie erhöhte Phospholipase A₂ (cPLA₂)-Aktivität, wurde von Ulisse und Kollegen auch nach Stimulation des murinen Liganden mit einem anti-mCD95L-Antikörper (H11) in der Maus-Sertoli Zelllinie TM4 beobachtet (Ulisse *et al.*, 2000). Die Aktivierung der p42/p44-MAPK war in ihren Experimenten essentiell für die apoptoseauslösende Funktion des CD95L, da in Co-Kultivierungsexperimenten gezeigt wurde, dass die Behandlung der CD95L-exprimierenden TM4-Zellen mit einem MAPK-Inhibitor die Apoptoseinduktion dieser Zellen verhinderte. Dies ist in diesen Zellen darauf zurückzuführen, dass die CD95L Stimulation durch agonistische Antikörper eine reverse Signaltransduktion induziert, an der p42/p44-MAPK und cPLA₂ beteiligt sind und die dazu führt, dass vermehrt löslicher CD95L (sCD95L) gebildet wird. Die p42/p44-MAPK Phosphorylierung in 293T Zellen ist transient und erreicht nach wenigen Minuten ihren Höhepunkt. Dass der Abfall der Phosphorylierung in einem Experiment nach einer Minute und in einem anderen Experiment nach 5 Minuten stattfand (Abb. 3.33.A-C), ist vermutlich auf experimentelle Unterschiede zurückzuführen, wichtig ist jedoch, dass sich bei allen Versuchen grundsätzlich das gleiche Ergebnis, nämlich eine transiente MAPK-Phosphorylierung nach Antikörperstimulation, zeigte. Nach Stimulation untransfizierter 293T Zellen mit dem anti-CD95L-Antikörper Nok-1 bzw. der Stimulation stabil CD95L exprimierender 293-005 Zellen mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps fand keine p42/p44-MAPK Phosphorylierung statt. In den zuerst durchgeführten Experimenten wurde festgestellt, dass auch Protein A, welches zur Kreuzvernetzung („Crosslinking“) des anti-hCD95L Antikörpers Nok-1 verwendet wurde, zur p42/p44-MAPK Phosphorylierung führt (Abb. 3.34). Daher wurden die weiteren Experimente mit dem Nok-1 Antikörper alleine

ohne Protein A durchgeführt. Der Versuch, die MAPK-Phosphorylierung in TM4-Zellen mit dem anti-mCD95L-Antikörper H11 zu induzieren, schlug fehl, der Grund dafür ist nicht bekannt.

Die Verknüpfung der reversen CD95L-Signalübertragung mit der Aktivierung von MAP-Kinasen ist interessant, da die Aktivierung letzterer für die Zellproliferation essentiell ist. In zukünftigen Untersuchungen sollten auch andere Signalwege, wie z.B. die Aktivierung anderer MAPK oder von NF- κ B, genauer untersucht werden.

Der Nachweis der reversen Signalübertragung über CD95L wird durch viele Faktoren erschwert. Zum einen wurde dieses Phänomen *in vivo* nur in primären Maus-T-Zellen beschrieben. In diesen ist allerdings der Nachweis des Liganden sehr schwierig, da es zur Zeit dieser Arbeit keine geeigneten anti-mCD95L-Antikörper zur Detektion im Western Blot gab. Der von uns verwendete anti-mCD95L-Antikörper Mfl-3-biotin detektiert mCD95L im FACS, jedoch nicht im Western Blot. Das war auch der Grund, warum in dieser Arbeit hauptsächlich im humanen System gearbeitet wurde. Zusätzlich gibt es bisher keine effiziente Möglichkeit, primäre Maus T-Zellen zu transfizieren, um Proteine überzuexprimieren oder die Proteinexpression z.B. durch siRNA (s.u.) herunter zu regulieren. Auch die Nukleofektion (amaxa[®]), mit der gute Erfolge in primären humanen T-Lymphozyten erzielt wurden, ist in murinen T-Lymphozyten noch nicht erfolgreich angewendet worden. Alternativ wurde über die retrovirale Transduktion nachgedacht, es bestand jedoch ein Problem darin, dass die Zellen vor der Transduktion hätten aktiviert werden müssen, und genau diese primäre Aktivierung und die Möglichkeit ihrer Auslösung durch CD95L sollte untersucht werden.

Eine Möglichkeit, die Expression bestimmter Proteine herunter zu regulieren, ist die Verwendung so genannter „small interfering“ RNAs (siRNAs). Diese kurzen RNA-Moleküle binden spezifisch an die mRNA des Zielproteins und führen dazu, dass eine spezifische RNA-Degradation und daher keine Proteinsynthese stattfindet. Es wurden bereits verschiedene siRNAs für PSTPIP synthetisiert und mit einer dieser siRNAs schien es möglich, überexprimiertes mPSTPIP herunter zu regulieren. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar, weshalb andere siRNAs synthetisiert wurden, die jedoch aus zeitlichen Gründen noch nicht eingesetzt worden sind.

Das co-stimulatorische Potential von CD95L wurde auch in humanen T-Zellen untersucht. Dazu wurde ein Thymidinassay durchgeführt, bei dem die gemessene Strahlung des eingebauten [³H]-Thymidins jedoch so niedrig war, dass die Ergebnisse nicht verwendet werden können, obwohl sie die Tendenz zeigten, dass auch Fas-Fc -genau wie anti-CD28-Antikörper- zusammen mit anti-CD3-Antikörper (OKT) zur T-Zellaktivierung führt (Daten nicht gezeigt). Die in diesem Experiment verwendeten humanen T-Zellen (erhalten von K. Junker, AG Grez, GSH, Frankfurt) waren durch positive Selektion über den CD3-Komplex aufgereinigt worden, wobei sie bereits einen primären Stimulus erhielten. Diese primäre Stimulation könnte jedoch für Proliferationsmessungen ein Problem darstellen, da T-Zellen bei sekundärer Stimulation über einen als AICD („activation induced cell death“) bezeichneten Zelltod absterben.

4.6 Die duale Rolle des CD95L im Immunsystem

Sowohl die Reifung von T-Zellen im Thymus als auch die T-Zellantwort in der Peripherie werden durch apoptotische Selektionsprozesse bzw. durch Aktivierung reguliert. Dabei spielt das CD95/CD95L-System eine wichtige Rolle. Der AICD peripherer T-Zellen wird hauptsächlich über CD95/CD95L-Interaktionen gesteuert, was die Analyse von *lpr*- bzw. *gld*-Mäusen zeigte, da in diesen Mäusen die Akkumulation von aktivierten T-Zellen in Lymphknoten und Milz beobachtet wird (Hahne *et al.*, 1995). Unreife Thymozyten weisen eine hohe Expression von CD95L und CD95 auf; diese Moleküle haben jedoch keinen Einfluss auf die während der Selektion im Thymus induzierte Apoptose (Sidman *et al.*, 1992; Singer *et al.*, 1994). Hingegen findet sich eine Beteiligung des CD95L an der positiven Selektion über eine reverse Signalübertragung (Boursalian und Fink, 2003). Dies wurde in TZR-transgenen Mäusen mit *gld*-Genotyp beobachtet, wobei allerdings verschiedene TZR-transgene Mausstämme unterschiedlich empfindlich gegenüber CD95L transduzierten Signalen waren.

Das CD95L/CD95-System ist also durch die Transduktion von positiven und negativen Signalen für die genaue Regulation („fine tuning“) der T-Zell-vermittelten Immunantwort mit verantwortlich. Dabei versteht man unter negativen Signalen die Induktion von Apoptose in CD95-positiven Zellen, während ein positives Signal die durch CD95L (Suzuki und Fink,

2000) und CD95 (Alderson *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 2000) induzierte Co-Stimulation darstellt. So induzieren z.B. CD8⁺-CTLs, die nach antigenem Stimulus CD95L auf der Zelloberfläche präsentieren, Apoptose in CD95-positiven Targetzellen und erhalten gleichzeitig ein co-stimulatorisches Signal über eine reverse Signaltransduktion des CD95L. CD8⁺-T-Zellen selber sind relativ resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, und auch der AICD wird in CD8⁺-T-Zellen nicht über CD95L/CD95 sondern über TNF α /TNF-R1 vermittelt (Ehl *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1995). Genauere Untersuchungen werden Aufschluss darüber geben, ob die reverse Signaltransduktion in CD8⁺-T-Zellen an der „Entscheidung“ beteiligt ist, welche Zellen zu Effektor- und welche zu Gedächtniszellen differenzieren.

In CD4⁺-Zellen hingegen wirkt CD95L vermutlich als negativer Regulator durch Induktion von Apoptose in anderen CD4⁺-T-Zellen. Interessanterweise sind Th1-Zellen sensitiver gegenüber CD95L-vermittelter Apoptose als Th2-Zellen (Zhang *et al.*, 1997), und zusätzlich exprimieren sie im Gegensatz zu Th2-Zellen eine hohe Menge an CD95L (Zhang *et al.*, 2003). Es wäre daher interessant, die reverse Signalübertragung in Th1- versus Th2-Zellen zu untersuchen.

Bei der Interpretation der publizierten Daten zur Expression von CD95L in Mäusen ist zu berücksichtigen, dass die meisten Ergebnisse mittels RT-PCR erhalten wurden. Zumindest in CD8⁺-T-Zellen korreliert die Oberflächenexpression des CD95L nicht mit dem Anstieg der mRNA, da der Ligand in diesen Zellen in sekretorischen, intrazellulären Lysosomen gelagert wird (Blott *et al.*, 2001).

CD95L-knockout-Mäuse zeigen einen Phänotyp, welcher dem von *gld*-Mäusen ähnelt, sich aber früher manifestiert, eine deutlich verstärkte Ausprägung zeigt und nach 4 Monaten zum Tod von mehr als der Hälfte der Tiere führt (Karray *et al.*, 2004). Die Autoren spekulieren, dass in *gld*-Mäusen die Bindung von CD95L an CD95 nur schwach ist, aber dennoch stattfindet. In einer älteren Publikation wurde jedoch gezeigt, dass Fas-Fc nicht in der Lage ist, aktivierte *gld*-T-Zellen zu markieren (Ramsdell *et al.*, 1994). Eine alternative Überlegung ist daher, dass die reverse Signalübertragung des CD95L eine wichtige Rolle spielt und sich ein stärkerer Phänotyp zeigt, weil in den knock-out-Mäusen die gesamte CD95L-Sequenz, also auch die intrazelluläre Domäne, deletiert wurde. Die physiologische Relevanz des CD95L Proteins zeigt sich auch darin, dass, abgesehen von einem einzigen SLE-Fall (Wu *et al.*, 1996), bisher keine Krankheit dokumentiert ist, die auf Mutationen im

CD95L-Gen beruht. Dies legt nahe, dass die Expression von CD95L so wichtig ist, dass inaktivierende Mutationen zu einem letalen Phänotyp führen. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass im Menschen ein zweiter Ligand existiert, der die Funktionen von CD95L z.T. übernehmen kann.

Fasst man die Daten, die in unserer und in anderen Arbeitsgruppen erhalten wurden, zusammen, zeigt sich, dass eine große Anzahl von Proteinen in der Lage ist, mit dem intrazellulären Anteil des CD95L zu interagieren. Es existieren noch keine Daten, die zeigen, dass diese Interaktionen eine essentielle Rolle für die bekannten CD95L-Funktionen spielen. Vermutlich wird erst die Analyse von CD95L-knock-out/knock-in Mäusen, die zurzeit in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden, Aufschluss über die *in vivo* relevanten Funktionen des intrazellulären Bereiches geben. In diesen Mäusen wird das endogene CD95L-Gen durch eine Deletionsmutante ersetzt, die den extrazellulären (apoptoseauslösenden) Bereich enthält, jedoch keine intrazelluläre Domäne mehr aufweist und daher nicht zur reversen Signalübertragung in der Lage ist.

4.7 Die Lokalisierung von CD95L in Lipid Rafts

Die Aktivität membranständiger Proteine wird nicht nur auf transkriptioneller Ebene reguliert, sondern hängt z.B. auch von der Lokalisation dieser Proteine ab. Dabei zeigt sich immer wieder der Einfluss spezieller Mikrodomänen der Zellmembran, in denen sich bestimmte Proteine konzentrieren. Als „Lipid Rafts“ werden Cholesterol- und Glycolipid-reiche Mikrodomänen bezeichnet, die sich aufgrund ihrer Unlöslichkeit in bestimmten Detergentien bei 37°C aufreinigen lassen. Die Signalübertragung einiger Rezeptoren, wie z.B. des T-Zellrezeptors oder CD95, ist abhängig von der Rekrutierung dieser Moleküle zu Lipid Rafts (Moran *et al.*, 1998; Grassme *et al.*, 2001; Hueber *et al.*, 2002). Dies liegt zum einen daran, dass in diesen Domänen viele Rezeptormoleküle konzentriert werden, zum anderen aber auch daran, dass sie in räumliche Nähe zu anderen regulatorischen Proteinen gebracht werden.

Für den CD95 Rezeptor wurde z.B. gezeigt, dass er zu einem bestimmten Anteil konstitutiv in Lipid Rafts lokalisiert ist und dass Adaptorproteine wie FADD und Caspase-8 nur zu den

Raft-ständigen Rezeptormolekülen rekrutiert werden und folglich nur diese Raft-ständigen CD95-Moleküle ein Apoptosesignal ins Zellinnere transduzieren können (Hueber *et al.*, 2002).

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Anne-Odile Hueber (Inserm, Nizza, Frankreich) konnte gezeigt werden, dass sowohl der CD95 Ligand als auch PSTPIP konstitutiv in Rafts vorliegen. Dazu wurden stabil CD95L exprimierende 293-005 Zellen mit Detergentien (Brij-98) behandelt und die Proteine im Sucrose-Gradienten aufgetrennt, wobei sich Raft-assoziierte Proteine in den ersten Fraktionen befinden (Abb. 3.37). Die Behandlung von Zellen mit Cholesterol-depletierenden Substanzen, wie Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) oder Cholesteroxidase, führt zur Zerstörung der Lipid Rafts. Mit Hilfe von Co-Kultivierungsexperimenten wurde untersucht, ob die Zerstörung der Rafts einen negativen Einfluss auf die Kapazität des CD95L, den CD95 Rezeptor zu binden und Apoptose zu induzieren, zeigt (Abb. 3.38). Die Ergebnisse legen nahe, dass CD95L, der sich nach der Behandlung der 293 Zellen mit Cholesterol-depletierenden Substanzen nicht mehr in Rafts befindet, keine Apoptose mehr in Targetzellen auslösen kann.

5. Literaturverzeichnis

- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. and Nagata, S. (1993) Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1756-1760.
- Aggarwal, B.B., Singh, S., LaPushin, R. and Totpal, K. (1995) Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett*, 364, 5-8.
- 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.
- 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.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Amos, W.B. (1988) Results obtained with a sensitive confocal scanning system designed for epifluorescence. *Cell Motil Cytoskeleton*, 10, 54-61.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G. and Fais, S. (2002) Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*, 195, 1303-1316.
- Angers-Loustau, A., Cote, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A. and Tremblay, M.L. (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol*, 144, 1019-1031.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. and Martinou, J.C. (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 276, 11615-11623.
- Arai, H., Gordon, D., Nabel, E.G. and Nabel, G.J. (1997) Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13862-13867.
- Badour, K., Zhang, J., Shi, F., Leng, Y., Collins, M. and Siminovitch, K.A. (2004) Fyn and PTP-PEST-mediated Regulation of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASp) Tyrosine Phosphorylation Is Required for Coupling T Cell Antigen Receptor Engagement to WASp Effector Function and T Cell Activation. *J Exp Med*, 199, 99-112.
- 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.
- Bai, C., Connolly, B., Metzker, M.L., Hilliard, C.A., Liu, X., Sandig, V., Soderman, A., Galloway, S.M., Liu, Q., Austin, C.P. and Caskey, C.T. (2000) Overexpression of M68/DcR3 in human

gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1230-1235.

- Bai, Y., Ding, Y., Spencer, S., Lasky, L.A. and Bromberg, J.S. (2001) Regulation of the association between PSTPIP and CD2 in murine T cells. *Exp Mol Pathol*, 71, 115-124.
- Ballard, D.W., Bohnlein, E., Hoffman, J.A., Bogerd, H.P., Dixon, E.P., Franza, B.R. and Greene, W.C. (1989) Activation of the interleukin-2 receptor alpha gene: regulatory role for DNA-protein interactions flanking the kappa B enhancer. *New Biol*, 1, 83-92.
- Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V. and Schlessinger, J. (1993) SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell*, 74, 83-91.
- Barker, C.F. and Billingham, R.E. (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol*, 25, 1-54.
- Barr, P.J. and Tomei, L.D. (1994) Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)*, 12, 487-493.
- Bedford, M.T., Chan, D.C. and Leder, P. (1997) FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *Embo J*, 16, 2376-2383.
- Bedford, M.T., Reed, R. and Leder, P. (1998) WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10602-10607.
- Beletsky, I.P., Moshnikova, A.B. and Proussakova, O.V. (2002) Cytotoxic signal transduction pathways via TNF family receptors. *Biochemistry (Mosc)*, 67, 312-328.
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A. and Duke, R.C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, 377, 630-632.
- Bennett, M.W., O'Connell, J., O'Sullivan, G.C., Brady, C., Roche, D., Collins, J.K. and Shanahan, F. (1998) The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol*, 160, 5669-5675.
- Bierer, B.E., Peterson, A., Gorga, J.C., Herrmann, S.H. and Burakoff, S.J. (1988) Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J Exp Med*, 168, 1145-1156.
- Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, 100, 243-255.
- Blair, P.J., Riley, J.L., Harlan, D.M., Abe, R., Tadaki, D.K., Hoffmann, S.C., White, L., Francomano, T., Perfetto, S.J., Kirk, A.D. and June, C.H. (2000) CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med*, 191, 651-660.
- 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.

- Boatright, K.M., Ratus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R. and Salvesen, G.S. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, 11, 529541.
- Boise, L.H., Noel, P.J. and Thompson, C.B. (1995) CD28 and apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 7, 620-625.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. and Wallach, D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, 270, 7795-7798.
- 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.
- Bossi, G., Stinchcombe, J.C., Page, L.J. and Griffiths, G.M. (2000) Sorting out the multiple roles of Fas ligand. *Eur J Cell Biol*, 79, 539-543.
- 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.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7297-7301.
- Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533-544.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F. and et al. (1995) Cellautonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activationinduced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, 373, 441-444.
- Cantrell, D. (1998) Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav? *Curr Biol*, 8, R535-538.
- Cantrell, D., Bluestone, J., Vivier, E. and Tybulewicz, V. (1998) Signalling through the TCR. *Res Immunol*, 149, 866-867.
- Carmo, A.M., Mason, D.W. and Beyers, A.D. (1993) Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Eur J Immunol*, 23, 2196-2201.
- Cayabyab, M., Phillips, J.H. and Lanier, L.L. (1994) CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*, 152, 1523-1531.
- Cerretti, D.P., Hollingsworth, L.T., Kozlosky, C.J., Valentine, M.B., Shapiro, D.N., Morris, S.W. and Nelson, N. (1994) Molecular characterization of the gene for human interleukin-1 beta converting enzyme (IL1BC). *Genomics*, 20, 468-473.
- Cerutti, A., Schaffer, A., Goodwin, R.G., Shah, S., Zan, H., Ely, S. and Casali, P. (2000) Engagement of CD153 (CD30 ligand) by CD30+ T cells inhibits class switch DNA recombination and antibody production in human IgD+ IgM+ B cells. *J Immunol*, 165, 786-794.
- Chan, D.C., Bedford, M.T. and Leder, P. (1996) Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *Embo J*, 15, 1045-1054.

- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L. and Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288, 2351-2354.
- Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E. and Yang, X. (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J*, 22, 41324142.
- Chen, F., Hersh, B.M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y. and Horvitz, H.R. (2000) Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science*, 287, 1485-1489.
- Chen, G. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296, 1634-1635.
- Chen, J.J., Sun, Y. and Nabel, G.J. (1998) Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science*, 282, 1714-1717.
- Chen, N.J., Huang, M.W. and Hsieh, S.L. (2001) Enhanced secretion of IFN γ by activated Th1 cells occurs via reverse signaling through TNF related activation-induced cytokine. *J Immunol*, 166, 270-276.
- Chou, A.H., Tsai, H.F., Lin, L.L., Hsieh, S.L., Hsu, P.I. and Hsu, P.N. (2001) Enhanced proliferation and increased IFN- γ production in T cells by signal transduced through TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Immunol*, 167, 1347-1352.
- 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.
- Chung, J.B., Wells, A.D., Adler, S., Jacob, A., Turka, L.A. and Monroe, J.G. (2003) Incomplete activation of CD4 T cells by antigen-presenting transitional immature B cells: implications for peripheral B and T cell responsiveness. *J Immunol*, 171, 1758-1767.
- Ciechomska, I., Pyrzynska, B., Kazmierczak, P. and Kaminska, B. (2003) Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells. *Oncogene*, 22, 7617-7627.
- Clark, R. and Griffiths, G.M. (2003) Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol*, 15, 516-521.
- Cline, J., Braman, J.C. and Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 24, 3546-3551.
- Cong, F., Spencer, S., Cote, J.F., Wu, Y., Tremblay, M.L., Lasky, L.A. and Goff, S.P. (2000) Cytoskeletal protein PSTPIP1 directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation. *Mol Cell*, 6, 1413-1423.
- Conradt, B. and Horvitz, H.R. (1998) The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED9. *Cell*, 93, 519-529.
- Cory, S., Huang, D.C. and Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22, 8590-8607.

- Cote, J.F., Chung, P.L., Theberge, J.F., Halle, M., Spencer, S., Lasky, L.A. and Tremblay, M.L. (2002) PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP. *J Biol Chem*, 277, 2973-2986.
- Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., Belka, C. and Guner, D. (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem*, 39, 73-88.
- Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334, 395-402.
- DeBenedette, M.A., Shahinian, A., Mak, T.W. and Watts, T.H. (1997) Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol*, 158, 551-559.
- Degterev, A., Boyce, M. and Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-8567.
- 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.
- 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.
- Desbarats, J. and Newell, M.K. (2000) Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med*, 6, 920-923.
- Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L. and Gregory, C.D. (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392, 505-509.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, 373, 438-441.
- Domonkos, A., Udvardy, A., Laszlo, L., Nagy, T. and Duda, E. (2001) Receptorlike properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur Cytokine Netw*, 12, 411-419.
- Dowbenko, D., Spencer, S., Quan, C. and Lasky, L.A. (1998) Identification of a novel polyproline recognition site in the cytoskeletal associated protein, proline serine threonine phosphatase interacting protein. *J Biol Chem*, 273, 989-996.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16, 6127-6145.
- Drevot, P., Langlet, C., Guo, X.J., Bernard, A.M., Colard, O., Chauvin, J.P., Lasserre, R. and He, H.T. (2002) TCR signal initiation machinery is preassembled and activated in a subset of membrane rafts. *Embo J*, 21, 1899-1908.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- Dupre, L., Aiuti, A., Trifari, S., Martino, S., Saracco, P., Bordignon, C. and Roncarolo, M.G. (2002) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity*, 17, 157-166.

- Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M. and Shaw, A.S. (1998) A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*, 94, 667-677.
- Dzialo-Hatton, R., Milbrandt, J., Hockett, R.D., Jr. and Weaver, C.T. (2001) Differential expression of Fas ligand in Th1 and Th2 cells is regulated by early growth response gene and NF-AT family members. *J Immunol*, 166, 4534-4542.
- Ehl, S., Hoffmann-Rohrer, U., Nagata, S., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. (1996) Different susceptibility of cytotoxic T cells to CD95 (Fas/Apo-1) ligand-mediated cell death after activation in vitro versus in vivo. *J Immunol*, 156, 2357-2360.
- Eischen, C.M., Williams, B.L., Zhang, W., Samelson, L.E., Lynch, D.H., Abraham, R.T. and Leibson, P.J. (1997) ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis. *J Immunol*, 159, 1135-1139.
- Eissner, G., Kirchner, S., Lindner, H., Kolch, W., Janosch, P., Grell, M., Scheurich, P., Andreesen, R. and Holler, E. (2000) Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol*, 164, 6193-6198.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 43-50.
- Essers, L. and Kunze, R. (1996) A sensitive, quick and semi-quantitative LacZ assay for the two-hybrid system. *Trends Genet*, 12, 449-450.
- Ethell, D.W., Kinloch, R. and Green, D.R. (2002) Metalloproteinase shedding of Fas ligand regulates beta-amyloid neurotoxicity. *Curr Biol*, 12, 1595-1600.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148, 2207-2216.
- Faris, M., Latinis, K.M., Kempiak, S.J., Koretzky, G.A. and Nel, A. (1998) Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol Cell Biol*, 18, 5414-5424.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340, 245-246.
- Franke, T.F. and Cantley, L.C. (1997) Apoptosis. A bad kinase makes good. *Nature*, 390, 116-117.
- 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.
- Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R. and Galluzzo, A. (1997) Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science*, 275, 960-963.
- Golstein, P. (1997) Controlling cell death. *Science*, 275, 1081-1082.

- Golstein, P. (2000) Signal transduction. FasL binds preassembled Fas. *Science*, 288, 2328-2329.
- Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991) rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 64, 915-925.
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R. and Gulbins, E. (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 276, 20589-20596.
- Green, D.R., Bissonnette, R.P., Glynn, J.M. and Shi, Y. (1992) Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin Immunol*, 4, 379-388. Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R. and Ferguson, T.A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270, 1189-1192.
- Griffith, T.S. and Ferguson, T.A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today*, 18, 240-244.
- Grohmann, U. and Puccetti, P. (2003) CTLA-4, T helper lymphocytes and dendritic cells: an internal perspective of T-cell homeostasis. *Trends Mol Med*, 9, 133-135.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S.J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, 274, 1156-1163.
- Hahne, M., Peitsch, M.C., Irmeler, M., Schroter, M., Lowin, B., Rousseau, M., Bron, C., Renno, T., French, L. and Tschopp, J. (1995) Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int Immunol*, 7, 1381-1386.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. and Tschopp, J. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274, 1363-1366.
- Hamada, K., Oike, Y., Ito, Y., Maekawa, H., Miyata, K., Shimomura, T. and Suda, T. (2003) Distinct roles of ephrin-B2 forward and EphB4 reverse signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1901-1907.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- Hane, M., Lowin, B., Peitsch, M., Becker, K. and Tschopp, J. (1995) Interaction of peptides derived from the Fas ligand with the Fyn-SH3 domain. *FEBS Lett*, 373, 265-268.
- Harashima, S., Horiuchi, T., Hatta, N., Morita, C., Higuchi, M., Sawabe, T., Tsukamoto, H., Tahira, T., Hayashi, K., Fujita, S. and Niho, Y. (2001) Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol*, 166, 130-136.
- Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R. and Bleackley, R.C. (2000) Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med*, 192, 1391-1402.

- Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, 14, 1235-1244.
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994) Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 581-586.
- 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.
- Hiltbold, E.M., Poloso, N.J. and Roche, P.A. (2003) MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol*, 170, 1329-1338.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-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.
- Huang, D.C. and Strasser, A. (2000) BH3-Only proteins—essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 103, 839-842.
- Hueber, A.O., Bernard, A.M., Herincs, Z., Couzinet, A. and He, H.T. (2002) An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep*, 3, 190-196.
- Hueber, A.O., Zornig, M., Bernard, A.M., Chautan, M. and Evan, G. (2000) A dominant negative Fas-associated death domain protein mutant inhibits proliferation and leads to impaired calcium mobilization in both T-cells and fibroblasts. *J Biol Chem*, 275, 10453-10462.
- Hunt, J.S., Vassmer, D., Ferguson, T.A. and Miller, L. (1997) Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol*, 158, 4122-4128.
- Igney, F.H., Behrens, C.K. and Krammer, P.H. (2000) Tumor counterattack—concept and reality. *Eur J Immunol*, 30, 725-731.
- Igney, F.H., Behrens, C.K. and Krammer, P.H. (2003) The influence of CD95L expression on tumor rejection in mice. *Eur J Immunol*, 33, 2811-2821.
- Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*, 71, 907-920.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. and Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.
- Jackson, R.J. and Hunt, T. (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol*, 96, 50-74.

- Janssen, O., Qian, J., Linkermann, A. and Kabelitz, D. (2003) CD95 ligand-death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ*, 10, 1215-1225.
- Janssen, O., Sanzenbacher, R. and Kabelitz, D. (2000) Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res*, 301, 85-99.
- Janssen, O., Stocker, A., Sanzenbacher, R., Oberg, H.H., Siddiqi, M.A. and Kabelitz, D. (2000) Differential regulation of activation-induced cell death in individual human T cell clones. *Int Arch Allergy Immunol*, 121, 183-193.
- Kane, L.P., Lin, J. and Weiss, A. (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*, 12, 242-249.
- 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.
- Kelekar, A. and Thompson, C.B. (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 8, 324-330.
- Kennelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem*, 266, 15555-15558.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- Kiener, P.A., Davis, P.M., Rankin, B.M., Klebanoff, S.J., Ledbetter, J.A., Starling, G.C. and Liles, W.C. (1997) Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol*, 159, 1594-1598.
- Kim, H.H., Kwack, K. and Lee, Z.H. (2000) Activation of c-jun N-terminal kinase by 4-1BB (CD137), a T cell co-stimulatory molecule. *Mol Cells*, 10, 247-252.
- Kisielow, J., Nairn, A.C. and Karjalainen, K. (2001) TARPP, a novel protein that accompanies TCR gene rearrangement and thymocyte education. *Eur J Immunol*, 31, 1141-1149.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. and Schlesinger, P.H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 7, 1166-1173.
- Krammer, P.H. (1998) The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol Lett*, 102-103, 131-137.
- Krammer, P.H. (1999) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, 71, 163-210.
- Langstein, J., Michel, J., Fritsche, J., Kreutz, M., Andreesen, R. and Schwarz, H. (1998) CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol*, 160, 2488-2494.
- Latinis, K.M., Norian, L.A., Eliason, S.L. and Koretzky, G.A. (1997) Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem*, 272, 31427-31434.

- Lee, H.O. and Ferguson, T.A. (2003) Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 325-335.
- Lens, S.M., Drillenburger, P., den Drijver, B.F., van Schijndel, G., Pals, S.T., van Lier, R.A. and van Oers, M.H. (1999) Aberrant expression and reverse signalling of CD70 on malignant B cells. *Br J Haematol*, 106, 491-503.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-258.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Li, J., Nishizawa, K., An, W., Hussey, R.E., Lialios, F.E., Salgia, R., Sunder-Plassmann, R. and Reinherz, E.L. (1998) A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *Embo J*, 17, 7320-7336.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-489.
- 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.
- Li-Weber, M., Laur, O. and Krammer, P.H. (1999) Novel Egr/NF-AT composite sites mediate activation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter in response to T cell stimulation. *Eur J Immunol*, 29, 3017-3027.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R. and Thompson, C.B. (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, 6, 1389-1399.
- Linkermann, A., Qian, J. and Janssen, O. (2003) Slowly getting a clue on CD95 ligand biology. *Biochem Pharmacol*, 66, 1417-1426.
- Lippincott, J. and Li, R. (1998) Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J Cell Biol*, 143, 1947-1960.
- Los, M., Stroh, C., Janicke, R.U., Engels, I.H. and Schulze-Osthoff, K. (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol*, 22, 31-34.
- Lynch, D.H., Watson, M.L., Alderson, M.R., Baum, P.R., Miller, R.E., Tough, T., Gibson, M., Davis-Smith, T., Smith, C.A., Hunter, K. and et al. (1994) The mouse Fas-ligand gene is mutated in *gld* mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity*, 1, 131-136.
- Lyons, A.B. and Parish, C.R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 171, 131-137.
- Mackay, F. and Kalled, S.L. (2002) TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Curr Opin Immunol*, 14, 783-790.

- Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S. and Morris, R. (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *Embo J*, 18, 6917-6926.
- Mariani, S.M., Matiba, B., Armandola, E.A. and Krammer, P.H. (1994) The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol*, 24, 3119-3123.
- Martinez-Lorenzo, M.J., Anel, A., Gamen, S., Monleon, I., Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Alava, M.A. and Naval, J. (1999) Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol*, 163, 1274-1281.
- Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A. and Ju, S.T. (1998) Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol*, 161, 3469-3473.
- Matsui, K., Xiao, S., Fine, A. and Ju, S.T. (2000) Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine fasl promoter. *J Immunol*, 164, 3002-3008.
- Mayer, B.J. and Eck, M.J. (1995) SH3 domains. Minding your p's and q's. *Curr Biol*, 5, 364-367.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J*, 16, 2794-2804.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C. and Grutter, M.G. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 277, 45162-45171.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114, 181-190.
- Mihara, S., Suzuki, N., Takeba, Y., Soejima, K. and Yamamoto, S. (2002) Combination of molecular mimicry and aberrant autoantigen expression is important for development of anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 129, 359-369.
- Mizutani, K., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2004) FBP11 regulates nuclear localization of N-WASP and inhibits N-WASP-dependent microspike formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 468-474.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A. (1998) Threedimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395, 82-86.
- Monleon, I., Martinez-Lorenzo, M.J., Monteagudo, L., Lasierra, P., Taules, M., Iturralde, M., Pineiro, A., Larrad, L., Alava, M.A., Naval, J. and Anel, A. (2001) Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol*, 167, 6736-6744.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.A., Chauvin, J.P., Pierres, M. and He, H.T. (1998) Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J*, 17, 5334-5348.
- Moran, M. and Miceli, M.C. (1998) Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity*, 9, 787-796.

- Mountz, J.D., Wu, J., Cheng, J. and Zhou, T. (1994) Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum*, 37, 1415-1420.
- Muzio, M. (1998) Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res*, 28, 141-147.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/ CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85, 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, 273, 2926-2930.
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.
- Nagata, S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, 33, 29-55.
- Nagata, S. and Suda, T. (1995) Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol Today*, 16, 39-43.
- 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.
- Nguyen, T. and Russell, J. (2001) The regulation of FasL expression during activation-induced cell death (AICD). *Immunology*, 103, 426-434.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139, 271-279.
- Niehans, G.A., Brunner, T., Frizelle, S.P., Liston, J.C., Salerno, C.T., Knapp, D.J., Green, D.R. and Kratzke, R.A. (1997) Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res*, 57, 1007-1012.
- Nikki, M., Merilainen, J. and Lehto, V.P. (2002) Focal adhesion protein FAP52 self-associates through a sequence conserved among the members of the PCH family proteins. *Biochemistry*, 41, 6320-6329.
- 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.
- Ottoneo, L., Tortolina, G., Amelotti, M. and Dallegri, F. (1999) Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*, 162, 3601-3606.
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K.S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. and Klein, R. (2002) EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*, 9, 725-737.
- Park, A. and Baichwal, V.R. (1996) Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J Biol Chem*, 271, 9858-9862.
- Pastor, M.I., Woodrow, M. and Cantrell, D. (1995) Regulation and function of p21ras in T lymphocytes. *Cancer Surv*, 22, 75-83.

- Pelham, H.R. and Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, 67, 247-256.
- Peter, M.E. (2001) Signaling through the death receptor cd95 (apo-1/fas). *ScientificWorldJournal*, 1, 90.
- Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F. and Krammer, P.H. (1999) The death receptors. *Results Probl Cell Differ*, 23, 25-63.
- Petronilli, V., Penzo, D., Scorrano, L., Bernardi, P. and Di Lisa, F. (2001) The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem*, 276, 12030-12034.
- Pitti, R.M., Marsters, S.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D. and Ashkenazi, A. (1998) Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396, 699-703.
- Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M. and Matrisian, L.M. (1999) The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*, 9, 1441-1447.
- Punt, J.A., Roberts, J.L., Kearse, K.P. and Singer, A. (1994) Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains. *J Exp Med*, 180, 587-593.
- Qin, H., Srinivasula, S.M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. and Shi, Y. (1999) Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature*, 399, 549-557.
- Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Picha, K.S., Kennedy, M.K. and Lynch, D.H. (1994) Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol*, 6, 1545-1553.
- Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Tough, T.W., Alderson, M.R. and Lynch, D.H. (1994) *gld/gld* mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol*, 24, 928-933.
- Raynal, P. and Pollard, H.B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1197, 63-93.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. and Abbas, A.K. (1998) Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, 8, 615-623.
- Rengarajan, J., Mittelstadt, P.R., Mages, H.W., Gerth, A.J., Kroczeck, R.A., Ashwell, J.D. and Glimcher, L.H. (2000) Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity*, 12, 293-300.
- Reya, T., Okamura, R. and Grosschedl, R. (1999) Control of lymphocyte differentiation by the LEF-1/TCF family of transcription factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 64, 133-140.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F. and Fischer, A. (2003) Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ*, 10, 124-133.

- Rivat, C., Le Floch, N., Sabbah, M., Teyrol, I., Redeuilh, G., Bruyneel, E., Mareel, M., Matrisian, L.M., Crawford, H.C., Gespach, C. and Attoub, S. (2003) Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion. *Faseb J*, 17, 1721-1723.
- Roberts, R.J. and Macelis, D. (1996) REBASE—restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res*, 24, 223-235.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*, 13, 3179-3184.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96-99.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matsiyak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tambllyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Yeh, W.C., McGlade, J.C., Ohashi, P.S. and Hakem, R. (2003) Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*, 17, 883-895.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-446.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M.P. (1993) Signal transducing molecules and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol*, 122, 789-807.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, 17, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 274, 15411-15418.
- 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.
- Scaffidi, C., Volkland, J., Blomberg, I., Hoffmann, I., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (2000) Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol*, 164, 1236-1242.
- Scheel-Toellner, D., Wang, K., Singh, R., Majeed, S., Raza, K., Curnow, S.J., Salmon, M. and Lord, J.M. (2002) The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 297, 876-879.
- Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S.C., Krammer, P.H. and Kirchhoff, S. (2004) Resistance of Short Term Activated T Cells to CD95-Mediated Apoptosis Correlates with De Novo Protein Synthesis of cFLIP(short). *J Immunol*, 172, 2194-2200.
- Schneider, P., Bodmer, J.L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M.C. and Tschopp, J. (1997) Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem*, 272, 18827-18833.

- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A. and Tschopp, J. (1998) Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*, 187, 1205-1213.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254, 439-459. Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol*, 66, 1453-1458.
- Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K. and Yagita, H. (1997) Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med*, 3, 165-170.
- Selvaraj, P., Plunkett, M.L., Dustin, M., Sanders, M.E., Shaw, S. and Springer, T.A. (1987) The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature*, 326, 400-403.
- Sera, N., Kawakami, A., Nakashima, T., Nakamura, H., Imaizumi, M., Koji, T., Abe, Y., Usa, T., Tominaga, T., Ejima, E., Ashizawa, K., Yokoyama, N., Ishikawa, N., Ito, K. and Eguchi, K. (2001) Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. *Clin Exp Immunol*, 124, 197-207.
- Shaikh, R.B., Santee, S., Granger, S.W., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H. and Ware, C.F. (2001) Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J Immunol*, 167, 6330-6337.
- Shalom, S. and Don, J. (1999) Tlk, a novel evolutionarily conserved murine serine threonine kinase, encodes multiple testis transcripts. *Mol Reprod Dev*, 52, 392-405.
- Shapiro, D.J. (1981) Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Anal Biochem*, 110, 229-231.
- Shi, G., Luo, H., Wan, X., Salcedo, T.W., Zhang, J. and Wu, J. (2002) Mouse T cells receive costimulatory signals from LIGHT, a TNF family member. *Blood*, 100, 3279-3286.
- Shi, Y.F., Szalay, M.G., Paskar, L., Sahai, B.M., Boyer, M., Singh, B. and Green, D.R. (1990) Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol*, 144, 3326-3333.
- Shoham, N.G., Centola, M., Mansfield, E., Hull, K.M., Wood, G., Wise, C.A. and Kastner, D.L. (2003) Pypin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13501-13506.
- Sidman, C.L., Marshall, J.D. and Von Boehmer, H. (1992) Transgenic T cell receptor interactions in the lymphoproliferative and autoimmune syndromes of *lpr* and *gld* mutant mice. *Eur J Immunol*, 22, 499-504.
- Siegel, J.N., Egerton, M., Phillips, A.F. and Samelson, L.E. (1991) Multiple signal transduction pathways activated through the T cell receptor for antigen. *Semin Immunol*, 3, 325-334.
- Sillje, H.H., Takahashi, K., Tanaka, K., Van Houwe, G. and Nigg, E.A. (1999) Mammalian homologues of the plant *Tousled* gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. *Embo J*, 18, 5691-5702.
- Singer, A.L. and Koretzky, G.A. (2002) Control of T cell function by positive and negative regulators. *Science*, 296, 1639-1640.

- 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.
- Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. and Lasky, L.A. (1997) PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol*, 138, 845-860.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, 1, 949-957.
- Stassi, G., Zeuner, A., Di Liberto, D., Todaro, M., Ricci-Vitiani, L. and De Maria, R. (2001) Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol*, 21, 19-23.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267, 1445-1449.
- Strasser, A., Harris, A.W., Vaux, D.L., Webb, E., Bath, M.L., Adams, J.M. and Cory, S. (1990) Abnormalities of the immune system induced by dysregulated bcl-2 expression in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol*, 166, 175-181.
- Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P. and Strober, W. (1995) Crosslinking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity*, 2, 507-521.
- Suda, T., Hashimoto, H., Tanaka, M., Ochi, T. and Nagata, S. (1997) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med*, 186, 2045-2050.
- Suda, T. and Nagata, S. (1997) Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity? *J Allergy Clin Immunol*, 100, S97-101.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K. and Nagata, S. (1995) Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*, 154, 3806-3813.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75, 1169-1178.
- Sudol, M. (1996) Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol*, 65, 113-132.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446.
- 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.
- 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.
- 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.

- Szabo, I. and Zoratti, M. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett*, 330, 201-205.
- Tabuchi, N., Akasaki, K., Sasaki, T., Kanda, N. and Tsuji, H. (1997) Identification and characterization of a major lysosomal membrane glycoprotein, LGP85/LIMP II in mouse liver. *J Biochem (Tokyo)*, 122, 756763.
- 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.
- 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.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. and Nagata, S. (1998) Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med*, 4, 31-36.
- Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T. and Nagata, S. (1995) Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J*, 14, 1129-1135.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.
- Thorburn, A. (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, 16, 139144.
- Thornberry, N.A. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*, 5, R97-103.
- Toyoshima, K., Yamanashi, Y., Katagiri, T., Inoue, K., Semba, K. and Yamamoto, T. (1989) Characterization and functional allotment of proto-oncogenes belonging to the src family. *Princess Takamatsu Symp*, 20, 111-117.
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. and Grosschedl, R. (1991) LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev*, 5, 880894.
- Tschopp, J., Irmeler, M. and Thome, M. (1998) Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol*, 10, 552-558.
- Tsuji, S., Hosotani, R., Yonehara, S., Masui, T., Tulachan, S.S., Nakajima, S., Kobayashi, H., Koizumi, M., Toyoda, E., Ito, D., Kami, K., Mori, T., Fujimoto, K., Doi, R. and Imamura, M. (2003) Endogenous decoy receptor 3 blocks the growth inhibition signals mediated by Fas ligand in human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 106, 17-25.
- Tuschl, T. (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem*, 2, 239-245.
- Ulisse, S., Cinque, B., Silvano, G., Rucci, N., Biordi, L., Cifone, M.G. and D'Armiento, M. (2000) Erk-dependent cytosolic phospholipase A2 activity is induced by CD95 ligand cross-linking in the mouse derived Sertoli cell line TM4 and is required to trigger apoptosis in CD95 bearing cells. *Cell Death Differ*, 7, 916-924.
- van Essen, D., Kikutani, H. and Gray, D. (1995) CD40 ligand-transduced costimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*, 378, 620-623.

- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell*, 96, 245-254.
- Vaux, D.L. and Silke, J. (2003) Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 499-504.
- Verhagen, A.M., Coulson, E.J. and Vaux, D.L. (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol*, 2, REVIEWS3009.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43-53.
- Villalba, M., Kasibhatla, S., Genestier, L., Mahboubi, A., Green, D.R. and Altman, A. (1999) Protein kinase ctheta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol*, 163, 5813-5819.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 615-619.
- Wagelie-Steffen, A.L., Hartmann, K., Vliagoftis, H. and Metcalfe, D.D. (1998) Fas ligand (FasL, CD95L, APO-1L) expression in murine mast cells. *Immunology*, 94, 569-574.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003) Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 53-66.
- Walker, P.R., Saas, P. and Dietrich, P.Y. (1998) Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol*, 10, 564-572.
- Walsh, C.M., Wen, B.G., Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Dixit, V.M. and Hedrick, S.M. (1998) A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity*, 8, 439-449.
- Wan, X., Zhang, J., Luo, H., Shi, G., Kapnik, E., Kim, S., Kanakaraj, P. and Wu, J. (2002) A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells. *J Immunol*, 169, 6813-6821.
- 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.
- 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.
- 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.
- Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D. and Palmer, E. (2003) Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science*, 299, 1859-1863.
- Werlen, G. and Palmer, E. (2002) The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Opin Immunol*, 14, 299-305.

- Wiley, S.R., Goodwin, R.G. and Smith, C.A. (1996) Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol*, 157, 3635-3639.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22, 474-476, 478-481.
- Wise, C.A., Gillum, J.D., Seidman, C.E., Lindor, N.M., Veile, R., Bashiardes, S. and Lovett, M. (2002) Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Hum Mol Genet*, 11, 961-969.
- Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P.H. and Mountz, J.D. (1996) Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest*, 98, 1107-1113.
- Wu, Y., Spencer, S.D. and Lasky, L.A. (1998) Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J Biol Chem*, 273, 5765-5770.
- Wyllie, A.H. (1997) Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*, 53, 451-465.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Xiao, S., Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A., Widom, R.L. and Ju, S.T. (1999) FasL promoter activation by IL-2 through SP1 and NFAT but not Egr-2 and Egr-3. *Eur J Immunol*, 29, 3456-3465.
- Yang, E. and Korsmeyer, S.J. (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88, 386-401.
- Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J. and Tonks, N.K. (1993) Cloning and expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, 268, 6622-6628.
- Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L. and Du, C. (2003) Omi/ HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev*, 17, 1487-1496.
- Zhang, J. and Winoto, A. (1996) A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 16, 2756-2763.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, 92, 83-92.
- Zhang, W., Tribble, R.P. and Samelson, L.E. (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, 9, 239-246.
- Zhang, X., Brunner, T., Carter, L., Dutton, R.W., Rogers, P., Bradley, L., Sato, T., Reed, J.C., Green, D. and Swain, S.L. (1997) Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med*, 185, 1837-1849.
- Zhang, X.R., Zhang, L.Y., Devadas, S., Li, L., Keegan, A.D. and Shi, Y.F. (2003) Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ*, 10, 2032-10.

- Zheng, L., Fisher, G., Miller, R.E., Peschon, J., Lynch, D.H. and Lenardo, M.J. (1995) Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature*, 377, 348-351.
- Zhu, L., Yu, X., Akatsuka, Y., Cooper, J.A. and Anasetti, C. (1999) Role of mitogen-activated protein kinases in activation-induced apoptosis of T cells. *Immunology*, 97, 26-35.
- Zornig, M., Hueber, A., Baum, W. and Evan, G. (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1551, F1-37.
- Zornig, M., Hueber, A.O. and Evan, G. (1998) p53-dependent impairment of Tcell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. *Curr Biol*, 8, 467-470.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90, 405-413.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274, 11549-11556.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino- 1,2,4-triazol
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	activation induced cell death (Aktivierungsinduzierter Zelltod)
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
APC	antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
AS (aa)	Aminosäure (aminoacid)
ATP	Adenin-Triphosphat
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodesoxyuridine
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation (Zelloberflächenmarker)
CIP	Kälber (calf) intestinale Phosphatase
cpm	counts per minute (Ereignisse pro Minute)
CTL	cytotoxic T-lymphocyte (Zytotoxischer T-Lymphozyt)
CK I	Casein Kinase I
DD	“death domain”, Todesdomäne
DED	“death effector domain” ,Todeseffektordomäne
DMEM	„Dulbecco ´s modified eagles medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOBA	Dropout Medium (Hefen)
DOBA -trp, -leu, -his	Dropout Medium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell (cell) Sortierer
FADD	“Fas associated factor with a death domain”
FCS	Fötale Kälber (calf) Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
h	human
HRP	horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-D-galactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luri-Bertani
m	murin
M	Molar
MAPK	mitogen activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisierungssignal)
NK	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte (buffered) Salzlösung
PCD	programmed cell death (Programmierter Zelltod)
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumiodid
PRD	prolinreiche Domäne

PSTPIP	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src-homology domain
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
Th	T-helper cell
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zellrezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse (weight)/Volumen
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Der CD95 Ligand (CD95L, FasL) ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-Superfamilie und ist in der Lage, Apoptose oder -unter bestimmten Bedingungen- Proliferation in CD95 Rezeptor-positiven Zellen auszulösen. Zusätzlich überträgt der CD95 Ligand aber auch als Rezeptor Signale in die ligandentragende Zelle, ein Phänomen, das auch bei anderen TNF-Familienmitgliedern beobachtet und als „reverse signalling“ bezeichnet wird. Diese reverse Signalübertragung bewirkt in T-Zellen ein co-stimulatorisches Signal, welches zur vollständigen Aktivierung nach Antigen-Erkennung durch den T-Zellrezeptor (TZR) benötigt wird und über bisher unbekannte Adaptorproteine stattfindet, die vermutlich an den intrazellulären Anteil des CD95L binden. Die zytoplasmatische CD95L-Domäne ist auf Primärsequenzebene stark konserviert und besitzt eine prolinreiche Proteininteraktionsdomäne sowie eine Casein Kinase I Phosphorylierungsstelle, welche sich auch im intrazellulären Bereich des membrangebundenen TNF α findet und bei diesem Protein für die reverse Signalübertragung essentiell ist. Eine weitere Funktion des CD95L ist der Transport des Liganden zu einem speziellen Typ von Lysosomen in NK- und zytotoxischen T-Zellen. Hierfür ist die prolinreiche Region in der CD95L-intrazellulären Domäne wichtig. In diesen sekretorischen Lysosomen wird der CD95L gespeichert, bis er nach einem TZR-vermittelten Signal an die Zelloberfläche transportiert wird und dort mit dem CD95 Rezeptor der Zielzellen interagieren kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufklärung der oben beschriebenen Funktionen des CD95 Liganden ein Hefe-2-Hybrid Screen mit der intrazellulären CD95L-Domäne als Köder durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich, mehrere potentielle Interaktionspartner zu identifizieren. Eines dieser Proteine, FBP11, wurde schon zuvor als „human fas ligand associated factor“ in der Datenbank veröffentlicht. Der HMG-Box-Transkriptionsfaktor Lef-1, das Formin-bindende Protein FBP11, das thymozytenspezifische Protein TARPP und das Adaptorprotein PSTPIP („proline serine threonin phosphatase interacting protein“)/CD2BP1 („CD2 binding protein“) interagierten *in vitro* in einem GST-Pulldown-Experiment mit der intrazellulären Domäne des CD95 Liganden. Mit Hilfe von Co-Immünpräzipitationsstudien und Co-Lokalisierungsexperimenten konnte die Interaktion von überexprimiertem CD95L und PSTPIP auch *in vivo* bestätigt werden. Des Weiteren wurde

in dieser Arbeit gezeigt, dass diese Interaktion über eine nicht näher eingegrenzte Aminosäuresequenz in der prolinreichen Region des CD95L mit der SH3-Domäne des PSTPIP-Proteins realisiert wird. Die Phosphatase PTP-PEST bindet an einen Bereich der PSTPIP-Coiled-coil-Domäne, und es besteht die Möglichkeit, dass CD95L, PSTPIP und PTP-PEST in der Zelle als ternärer Komplex vorliegen, in welchem der Phosphorylierungsstatus von PSTPIP und CD95L durch PTP-PEST reguliert wird.

Wie die gleichzeitige Expression von PSTPIP die Oberflächenexpression von CD95L beeinflusst, war ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Es konnte festgestellt werden, dass bei Überexpression von PSTPIP weniger CD95L auf der Oberfläche nachgewiesen wird. Interessanterweise wurde auch weniger Apoptose durch den CD95L ausgelöst, sobald PSTPIP überexprimiert wurde.

Neben den Untersuchungen zur Interaktion von CD95L und PSTPIP (sowie PTP-PEST) wurden auch funktionelle Studien zur reversen Signalübertragung des CD95L durchgeführt. Sowohl in CD4- als auch in CD8-einzelpositiven frisch isolierten Maus-T-Zellen wurde ein co-stimulatorisches Signal nach suboptimaler TZR-Stimulation über CD95L beobachtet, was sich in verstärkter Proliferation und erhöhter Expression von Aktivierungsmarkern wie CD25 äußerte. Außerdem führt die Stimulation des CD95 Liganden zu einer transienten p42/p44-MAPK-Phosphorylierung, die durch Co-Expression von PSTPIP jedoch nicht beeinflusst wird. Die MAPK-Signalkaskade führt zur Zellproliferation und könnte daher eine wichtige Rolle in der CD95L-vermittelten Co-Stimulation spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Lokalisation des CD95L in Lipid Rafts (Mikrodomänen der Zellmembran) wichtig für dessen apoptoseauslösendes Potential ist, da die Behandlung CD95L-positiver Zellen mit Substanzen, die Cholesterol entfernen und so Rafts zerstören, zur Inhibition der Apoptoseinduktion führt. Die Lokalisation sowohl des CD95 Rezeptors als auch des CD95 Liganden in unterschiedlichen Kompartimenten der Zellmembran könnte beide Moleküle voneinander abschirmen und so autokrine Apoptosemechanismen verhindern. Dadurch wird eine weitere Möglichkeit der Regulation der durch CD95L induzierten Apoptose realisiert.

Summary

The type II transmembrane protein CD95 ligand (CD95L, FasL) is involved as a death factor in the regulation of activation induced cell death and establishment of immune privilege by inducing apoptosis in CD95 expressing cells. In addition, CD95L may serve as a costimulatory molecule for T-cells. This phenomenon is also documented for other members of the TNF-ligand-family and is called reverse signalling. The intracellular domain of CD95L is highly conserved between different species and contains different signalling motifs like a proline-rich region and a casein kinase I phosphorylation site, that is also present in other members of the TNF-ligand-family that transmit reverse signals. In the context of the reverse signalling capacity of TNF this site is necessary for the reverse signalling capacity. Another observation that has been linked to the proline rich region in the intracellular domain of CD95L is the transport and storage of the ligand in secretory lysosomes of CTLs and NK-cells. After a TCR transduced signal CD95L is transported to the cell surface at the area of contact between T-cell and APC (immunological synapse).

To get more insight into the various functions of CD95L a yeast-two-hybrid screen with the intracellular domain of CD95L was performed. With this method I was able to identify 15 different proteins that bound the cytoplasmic tail of CD95L at least in yeast. One of these proteins (FBP11) has already been published as "human fas ligand associated factor". Some of these proteins like the HMG-transcriptionfactor Lef-1, the thymocyte specific protein TARPP, the forming-binding Protein FBP11 and the PTP-interacting protein PSTPIP bound to CD95L *in vitro*, as shown in GST-pulldown experiments. The interaction of CD95L with PSTPIP, which is an adaptor protein that contains an SH3-proline-binding domain and that is known to bind to different proteins like CD2, c-Abl, WASp or Protein-Tyrosin-Phosphatases, was studied further. During this thesis I could show that PSTPIP binds to the proline-rich region of CD95L via its SH3-domain. This was shown in GST-pulldowns, co-immunoprecipitation experiments and co-localization studies. As PSTPIP binds to the PTP-PEST phosphatase via its coiled-coil domain it may serve as a bridging protein that brings PTP-PEST near CD95L to dephosphorylate it.

Activation of freshly isolated and purified mouse T-lymphocytes with anti-CD3-antibodies leads to proliferation and expression of activation markers if co-stimulatory molecules like CD28 are co-activated. As published before CD95L can also act as a co-stimulatory

molecule. This could be shown in proliferation assays of CD4- and CD8- singlepositive T-cells.

Furthermore I could show that the stimulation of the CD95L-molecule with a specific antibody led to the phosphorylation of p42/p44-MAPK in 293-005 cells that stably express CD95L. As the MAPK-cascade is involved in the regulation of proliferation this may be the reason why the reverse signalling of CD95L leads to increased proliferation in T-cells after CD95L-co-stimulation. This phosphorylation was transient and was not influenced by the expression of PSTPIP. Furthermore it was found that CD95L, like its receptor CD95, constitutively localizes to specialized membrane microdomains called lipid rafts and that its apoptosis inducing function was impaired in cells where the lipid rafts were disturbed. This may serve as a further step to regulate the killing capacity of CD95L.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich meinem Betreuer am Georg-Speyer-Haus Herrn Dr. Martin Zörnig für die Vergabe des Themas und die freundliche und kompetente Betreuung danken. Seine motivierende Art und sein Enthusiasmus haben mir sehr geholfen, und er stand mir während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite. Auch wurden keine Kosten und Mühen gescheut, um unsere Ideen zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé und Herrn Prof. Dr. Bernd Groner danke ich für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit von Seiten der Fakultät für Biochemie der Universität Frankfurt und des Georg-Speyer-Hauses.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zörnig: Tim Bläsner, Susanne Bösser, Marie-Luise Brezniceanu, Vladimir Kirkin, Sara Mateus-Fernández, Ina Oehme, Robert Pick und Kirsten Völp danke ich für eine tolle Zeit mit anregenden wissenschaftlichen Gesprächen und vor allem für die nette, kollegiale und herzliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Sara, Susanne, Ina und Vladimir danke ich auch für ihre praktische Hilfe im Labor. Für fachliche Probleme, aber auch alles andere, habe ich immer ein offenes Ohr gefunden. Ich finde, wir waren ein echt tolles Team und ich werde Euch vermissen.

- und was soll bloß aus der Weihnachtsfeier werden, wenn wir nicht mehr da sind?

Des Weiteren danke ich meinen „Mensagängern“ und „Kaffee-Tanten“ für nette Pausen auch an stressigen Arbeitstagen. Auf dem Weg zur Mensa sind nicht selten gute Ideen zustande gekommen.

Allen anderen, die mich inspiriert oder mir geholfen haben, aber nicht persönlich erwähnt werden, danke ich nicht minder.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie, meinen Freunden und vor allem Daniel für alles, was sie mir Gutes tun und getan haben.

Lebenslauf

Name	Wiebke Baum
Geburtsdatum und -ort	04. Juli 1974, Marburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung	Grundschule, Amöneburg Stiftsschule St. Johann, Amöneburg • 1993 Abitur
---------------------	---

Studium	Grundstudium Biologie an der Philipps-Universität Marburg • 1995 Vordiplom Grundstudium Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg • 1996 Vordiplom Hauptstudium Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg • 1999 Diplom
----------------	--

Diplomarbeit September 1998- August 1999	in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Müller, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) in Marburg „Etablierung von Antisense-Oligonukleotiden zur Induktion von Apoptose in aktivierten Endothelzellen“
---	---

Praktikum September 1999- November 1999	Bayer AG, Wuppertal
--	---------------------

Doktorarbeit seit Dezember 1999	in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Zörnig am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt
---	--

Veröffentlichungen

Poster

- Gordon Conference on Cell Death, Juli 2001, Oxford, UK, *„Identification of proteins interacting with the intracellular domain of CD95 Ligand“*, Wiebke Baum and Martin Zörnig
 - Keystone Symposia „Molecular Mechanisms of Apoptosis“, 08.-13. Februar 2003; Banff, Alberta, Kanada, *„Identification of proteins that interact with the CD95 Ligand intracellular domain“* Wiebke Baum and Martin Zörnig
-

Vorträge

- Förderschwerpunkt der Dr. Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung: *„Apoptosedefizienz und ihre Modulation bei malignen Erkrankungen“* 18.-19.04.2002, Bonn, GSI: *„Identification of CD95 Ligand binding proteins“*
 - *„The third european workshop on cell death“* Salobrena, Spanien, 23.-28.02.2002: *„Identification of proteins interacting with the intracellular domain of CD95 Ligand“*
-

Die Daten aus dieser Arbeit werden in folgenden Veröffentlichungen publiziert

- Baum, W; Herincs, Z; Zörnig, M and Hueber, A.O. *„The localization of CD95 Ligand in Lipid Rafts“*, in Vorbereitung
- Baum, W and Zörnig, M *„The intracellular domain of CD95 Ligand interacts with the adaptorprotein PSTPIP“*, in Vorbereitung

Sonstige Veröffentlichungen:

- Zornig, M.; Hueber, A.; Baum, W. und Evan, G.: „Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis“ (2001) *Biochim Biophys Acta*, 1551(2)
- Buchkapitel in „The molecular basis of cancer, 2nd edition“ , WB Saunders Company: Zörnig, M.; Baum, W.; Hueber, A.O. and Evan, G.;
„Programmed cell death and senescence“

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den.....

.....

Wiebke Baum