# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN Lehrstuhl für Genetik

# Die Bedeutung des Signaltransduktionswegs der Todesrezeptoren für Differenzierung und Aktivierung von T-Lymphozyten der Maus

Svetla Toshkova Rangelova

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl 2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 17.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.09.2008 angenommen.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	
АК	Antikörper	
Amp.	Ampicillin	
AP-1	Activator Protein 1	
APS	Amoniumpersulfat	
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	
ATP	Adenosin-5´-triphosphat	
ВН	Bcl-2-Homologie-Domäne	
BSA	Rindserumalbumin	
Bcl-3	B-cell lymphoma 3	
CDK	Cyclinabhängige Proteinkinasen	
ConA	Concanavalin A	
CsA	Cyclosporin A	
DD	Todesdomäne	
DED	Todeseffektordomäne	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
DISC	Death-inducing signalling complex	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
cDNA	Complementary DNA	
DTT	Dithiothreitol	
E.coli	Escherichia coli	
EMSA	Electophoretic Mobility Shift Assay	
FACS	Fluorescence-activated cell sorter	
FADD	Fas-Associated Protein with Death Domain	
FCS	fetal calf serum	
FITC	Fluorescein Isothiocyan	
c-FLIP	Cellular FLICE-inhibitory Protein	
GFP	grün fluoreszierendes Protein	

HRP	horse radish peroxidase
IL	Interleukin
JNK	Jun N-terminal kinase
kB	Kilobasenpaar(e)
LKn	Lymphknoten
МАРК	Mitogen-activated protein kinase
NF-AT	Nuclear factor of activated T cells
NF-kB	Nuklaerfaktor kappa B
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
РМА	Phorbol 12-Myristate 13-acetate
PS	Phosphatidilserin
mRNA	Messenger RNA
RPA	RNase protection assay
RT-PCR	Real time PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOCS-3	Suppressor of cytokine signalling 3
TNF	Tumor necrosis factor
UV	Ultravioletes Licht
z-VAD-fmk	Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone
WT	Wildtyp

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
INHALTSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	7
1.1. Das Adaptorprotein FADD	7
1.1.1. Signalwege der Apoptose und die Rolle von FADD in der To	desrezeptor-
induzierten Apoptose	9
1.1.2. Die Rolle von FADD in der Embryonalentwicklung	11
1.1.3. Die Rolle von FADD in der T-Zellproliferation	
1.2. Das Protein FLIP	14
1.3. Funktionen des FLIP – Proteins	15
1.3.1. Die Rolle von FLIP in der Todesrezeptor-induzierten Apoptose	15
1.3.2. Die Rolle von FLIP in der T-Zellproliferation	17
1.4. Proliferation oder Zelltod- die Rolle der Transkriptionsfaktoren NF-AT,	NF-κB und
AP-1	
1.5. IL-2- Expression und Funktion	
1.6. Zielsetzung der Arbeit	
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. Material	
2.1.1. Chemikalien und Radiochemikalien	
2.1.2. Antikörper	
2.1.3. Enzyme	
2.1.4. Synthetische Oligonukleotide	
2.1.5. Kits	
2.1.6. Geräte	
2.1.7. Medien	
2.1.8. Sonstiges	
2.2. Methoden	

2.2.1. Molekularbiologische Methoden	33
2.2.2. Biochemische Methoden	38
2.2.3. Zellkulturmethoden	44
3. ERGEBNISSE	50
3.1. Analyse der Genexpression in FADDdn-T-Zellen	50
3.2. Erhöhte IL-2 mRNA Expression in FADDdn-T-Zellen	53
3.3. Normale NF-AT Induktion in FADDdn-T-Zellen	56
3.4. AP-1-mRNA-Transkription in FADDdn-Zellen	61
3.5. Normale AP-1-Bindungsaktivität einiger AP-1-Mitglieder in FADDdn-T-Zellen	63
3.6. Erhöhte Bcl-3- und SOCS-3- mRNA in FADDdn-T-Zellen	64
3.7. Retrovirale Expression von SOCS-3 und Bcl-3 supprimiert T-Zellproliferation	66
3.8. Erhöhte SOCS-3-mRNA-Expression nach Überexpression von Bcl-3	67
3.9. Reduzierter Effekt von Bcl-3 in SOCS-3 <sup>+/-</sup> -T-Zellen	68
3.10. Der gemeinsame Verlust von Bcl-3- und FADD- Funktionen führt zu einer Redu	ıktion
der T-Zellpopulation	69
3.11. Reduzierte Proliferation der FADD/bcl3 <sup>-/-</sup> -T-Zellen	72
3.12. Erhöhte Apoptose der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> -T-Zellen	73
3.13. Normale Thymozytenentwicklung in FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> /vav-bcl2-Maus	76
3.14. Reduzierte Proliferation der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> /vav-bcl2-T-Zellen	77
4. DISKUSSION	79
4.1. Auswirkung des FADD dominant negativen Proteins auf die Genexpression	80
4.2. Deregulation der IL-2 mRNA Expression in FADD T-Zellen	80
4.3. Deregulation der AP-1 Transkriptionsfaktor in FADDdn T-Zellen	82
4.4. Auswirkungen der SOCS-3 und Bcl-3 auf die Proliferation der T-Zellen	84
4.5. Zusammenhang zwischen Bcl-3 und SOCS-3	85
4.6. Der Verlust von Bcl-3 und FADD bewirkt eine gestörte T-Zellproliferation	86
4.7. Die Abwesenheit von FADD und Bcl-3 beeinflußt nicht die Thymozytenentwick	clung,
verursacht jedoch eine Abnahme der T-Zellpopulation	87
4.8. Der Verlust von Bcl-3 und FADD führt zu einer erhöhten Apoptose	87
4.9. Die Bedeutung von FADD/Caspase-8/FLIP-Signalweg für die T-Zellproliferation.	88
ZUSAMMENFASSUNG	91

DANKSAGUNG	
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
LITERATURVERZEICHNIS	96
PUBLIKATIONEN	

### 1. EINLEITUNG

Die molekularen Signaltransduktionswege von Apoptose und Zellaktivierung wurden lange Zeit als von einander unabhängige Netzwerke betrachtet. Arbeiten in den letzten Jahren haben jedoch gezeigt, dass Komponenten des Todesrezeptorsignaltransduktionwegs in einzelnen Zelltypen, wie z.B. T-Lymphozyten, eine wichtige Rolle nicht nur bei der Apoptoseinduktion, sondern auch bei der Zellaktivierung und Differenzierung spielen. An zentraler Stelle dieser Signaltransduktion steht das FADD-Protein. In dieser Arbeit wurden die Bedeutung und die molekularen Funktionen des FADD-Proteins in der T-Zellproliferation untersucht.

### 1.1. Das Adaptorprotein FADD

FADD (Fas Associated protein with **D**eath **D**omain) ist ein zytosolisches Adaptorprotein, das für die Übertragung der Todesrezeptor-induzierten Apoptosesignale unverzichtbar ist. Die Familie der Todesrezeptoren ist ein Teil der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor-Subfamilie. Zu ihr gehören sechs Mitglieder: TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor 1), CD95 (APO-1/Fas), DR3 (death receptor 3), TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, DR4), TRAIL-R2 (DR5) und DR6 (Schmitz et al., 2000; Schulze-Osthoff et al., 1998).

Das humane- und das murine-FADD-Gen bestehen aus zwei Exonen (286 bp und 341 bp in Menschen und 286 bp und 332 bp in Maus), die durch ein Intron mit Größe von ungefähr 2 kB getrennt sind (Abb. 1). Das menschliche- (208 Aminosäuren) und das Maus- (205 Aminosäuren) FADD-Protein haben ein Molekulargewicht von 23 kDa (Strasser and Newton, 1999) und zeigen etwa 80 % Ähnlichkeit zueinander (Kim et al., 1996).

Zwei Domänen wurden beim FADD-Protein identifiziert. Die C-Terminale Todesdomäne (Death Domain (DD)) enthält 69 Aminosäuren und ist für die Bindung an die DD des Todesrezeptors notwendig. Die 79 Aminosäuren im N-Terminus bilden die so genannte Todeseffektordomäne (Death Effector Domain (DED)), die für die Bindung an Procaspase-8 verantwortlich ist. Northern Blot und *in situ* Hybridisation haben gezeigt, dass die FADD mRNA in relativ hohen Mengen und in fast allen Organen von Menschen und Maus exprimiert wird (Chinnaiyan et al., 1995). In unstimulierten Zellen befindet sich FADD im

Cytosol, allerdings wird es nach Stimulation des CD95-Rezeptors schnell an die Plasmamembran rekrutiert (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Die neuesten Studien zeigen überraschenderweise, dass FADD hauptsächlich im Kern von adherenten MCF10a und HeLa Zellen lokalisiert ist (Frisch, 2004). Seine Rolle im Kern bleibt jedoch bis jetzt ungeklärt.



Abb. 1 Die Struktur des menschlichen FADD-Gens

A: Die FADD cDNA; B: Die Exon/Intron Organisation des menschlichen FADD-Gens. Die Kodierungssequenzen sind in schwarz und die Todesdomänen (DED)- in gelb gekennzeichnet (nach Chinnaiyan et al., 1996).

Auf dem FADD-Molekül sind zwei Phosphorylierungsstellen identifiziert worden: Serin191 (Maus)/194 (Mensch) und Threonin (Kischkel et al., 1995; Zhang and Winoto, 1996). Die Kinase, die zu dieser Phosphorylierung führt, ist Casein Kinase I $\alpha$  (CKI $\alpha$ ). Experimente mit T-Zellen von der Maus mit einer Mutation an der Serin191-Phosphorylierungsstelle haben gezeigt, dass diese Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Regulierung des T-Zellwachstums und des Überlebens spielt (Scaffidi et al., 2000). Bezüglich der Rolle dieser Phosphorylierung bei der Apoptose ist jedoch gezeigt worden, dass die nicht phosphorylierte und die phosphorylierte Form mit vergleichbarer Affinität an den aktivierten CD95-Rezeptor binden können (Zhang and Winoto, 1996).

### 1.1.1. Signalwege der Apoptose und die Rolle von FADD in der Todesrezeptor-induzierten Apoptose

Am besten untersucht ist die Rolle von FADD als Signalübertragungsmolekül bei der Fasinduzierten-Apoptose. Fas-Liganden, die an die Todesrezeptoren binden, führen zu deren Oligomerisierung, und FADD ermöglicht die Rekrutierung und Aktivierung von Caspasen.

Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase im vielzelligen Organismus (Thompson, 1995). Durch Apoptose werden kranke, geschädigte und infizierte oder nicht mehr benötigte Zellen getötet. Apoptose ist ein evolutionär hoch konservierter Mechanismus. Apoptose kann durch eine Vielzahl von Stimuli, wie z.B. UVund  $\gamma$ - Bestrahlung, Chemotherapeutica, Wachstumsfaktorentzug und Todesrezeptorsignale induziert werden. In den meisten Fällen ist Apoptose durch morphologische Veränderungen wie z.B. Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, Chromatinkondensierung, DNA-Fragmentierung, und "membrane blebbing" charakterisiert. Die Zelle zerfällt in die so genannten "apoptotischen Körperchen", die *in vivo* von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden (Krammer, 2000).

Schlüsselmoleküle der Apoptose, verantwortlich für die oben genannten morphologischen Veränderungen, sind die Caspasen. Das sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten und auf dieser Weise eine wichtige Rolle bei der Apoptosevermittlung spielen. Caspasen werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) in jeder kernhaltigen Zelle synthesiert und nach einem apoptotischen Stimulus aktiviert. Man unterscheidet zwei Gruppen: die Initiator- und die Effektorcaspasen. Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen 8, 9 und 10, zu den Effektorcaspasen die Caspasen 3, 6 und 7. Ihre Aktivierung erfolgt entweder durch Autoproteolyse (Initiatorcaspase) oder durch die Spaltung durch eine andere Caspase (Effektorcaspase) (Budd, 2001). Effektorcaspasen können dann verschiedene zelluläre Proteine, die für die DNA-Reparatur wichtig sind, inaktivieren oder solche, die für die DNA-Fragmentierung verantwortlich sind, aktivieren. Als Folge davon wird die DNA abgebaut, was zum Absterben der Zelle führt.

Es gibt zwei Hauptwege, die zur Apoptose führen: der Todesrezeptorweg und der mitochondriale Weg. Der Todesrezeptorweg wird durch Bindung der Todes-Liganden an die Todesrezeptoren aktiviert. Die Todesrezeptoren enthalten in ihrem zytosolischen Teil die so

genannte Todesdomäne (DD), die an die DD von FADD oder an andere Adaptorproteine nach Aktivierung des Rezeptors binden. Das **FADD-Protein** enthält auch eine Todeseffektordomäne (DED), die an die DED von Caspase-8 binden kann (Abb. 2). Die Oligomerisierung von Todesrezeptoren führt zur Oligomerisierung des Adaptorproteins FADD und dadurch zur Oligomerisierung von Pro-Caspase-8. Dabei wird der so genannte Tod-induzierende Signalkomplex, DISC (Death-Inducing Signaling Complex) gebildet, was zur Autoprozessierung und Aktivierung von Caspase-8 führt (Kischkel et al., 1995; Walczak and Krammer, 2000; Walczak and Sprick, 2001). Aktive Caspase-8 kann wiederum Caspase-3 aktivieren und durch die Spaltung von intrazellulären Substraten zum Tod der Zelle führen.



Abb. 2 Todesrezeptorvermittelte Apoptose

Die Bindung eines Todesliganden an den Todesrezeptor führt zu Rekrutierung von FADD an die Plasmamembran. FADD wiederum kann Procaspase-8 binden und aktivieren, was die Aktivierung von Procaspase-3 bewirkt (nach Thome and Tschopp, 2001).

Im Falle des mitochondrialen Signalwegs wird die Apoptose durch verschiedene intra- und extrazelluläre Stimuli, wie zellulärer Stress, Mangel an Zytokinen, an Wachstumsfaktoren, durch Chemotherapeutika und UV-Bestrahlung ausgelöst. Dabei werden spezifische mitochondriale Veränderungen hervorgerufen, die zu der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol führen. Dort wird in Anwesenheit von dATPs die Oligomerisierung von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) eingeleitet. Dieses Protein rekrutiert dann Caspase-9 und es wird das so genannte Apoptosom gebildet (Cain,

2003). Dabei wird Caspase-9 proteolytisch gespalten und kann wiederum die Effektorcaspase-3 aktivieren und auf diese Weise den Tod der Zelle auslösen. (Hengartner, 2000; Strasser et al., 2000). Dieser Prozess wird von der Bcl-2-Protein-Familie reguliert. Zu der Bcl-2-Familie gehören drei Untergruppen, basierend auf deren struktureller Ähnlichkeit und funktionellen Unterschieden. Bcl-2, Bcl- $x_L$ , Bcl-w, A1 und Mcl-1 haben vier Bcl-2 Homologiedomänen, die so genannten BH-Regionen (BH 1-4). Diese so genannten anti-apoptotischen Proteine verhindern die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Infolgedessen wird der mitochondriale Apoptoseweg blockiert. Bax und Bak enthalten drei BH-Regionen (BH 1-3) und trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den anti-apoptotischen Proteinen der ersten Gruppe wirken sie pro-apoptotisch. Zu der dritten Gruppe gehören Bim, Bik, Bad, Bid, Hrk, Bmf, Noxa und Puma, die pro-apoptotischen Proteine können miteinander interagieren und gegenseitig ihre Funktionen beeinflussen (Strasser and Bouillet, 2003).

Eine Verbindung der beiden Apoptosewege wird durch das BH3-only Protein Bid ermöglicht. Todesrezeptoraktivierte Caspase-8 kann Bid spalten. Das proteolytisch aktivierte Bid-Fragment (tBid, truncated Bid) kann zu den Mitochondien translozieren und dort den Austritt von Cytochrom C durch Aktivierung von Bax/Bak induzieren (Kuwana et al., 1998; Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

### 1.1.2. Die Rolle von FADD in der Embryonalentwicklung

Die Rolle von FADD für die Todesrezeptor-induzierte Apoptose ist sehr gut untersucht. Überaschenderweise wurde beobachtet, dass FADD<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht lebensfähig sind, was schließen lässt, dass FADD eine wichtige Rolle auch während der Embryonalentwicklung spielt. Es wurde festgestellt, dass FADD<sup>-/-</sup>-Mäuse einen Defekt in der Entwicklung des Endotheliums der großen Gefäße aufweisen, was wahrscheinlich zu ihrem Tod führt. Da Mäuse ohne Caspase-8 oder FLIP einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, wurde vermutet, dass FADD, Caspase-8 und FLIP noch während der Embryogenese zusammen kooperieren und eine wichtige Rolle bei der Differenzierung spielen (Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 2000; Yeh et al., 1998).

### 1.1.3. Die Rolle von FADD in der T-Zellproliferation

Wie oben beschrieben ist die Rolle von Todesrezeptor-assoziierten Proteinen nicht nur auf die Induktion von Apoptose begrenzt. Es wurde beobachtet, dass nach Stimulation des FasR mit einem Antikörper, spezifisch für Fas (CD95)-Molekül, die Proliferation der T-Zellen induziert werden kann (Alderson et al., 1993). Die Erkenntnisse, dass TNF-R1 und CD95-R auch Wachstumssignale übertragen können, veranlassten auch andere Autoren dazu, die Rolle von FasR-assoziierten Proteinen wie FADD und Caspase-8 bei der T-Zellaktivierung zu untersuchen (Alderson et al., 1993; Newton et al., 1998).

Durch Expression von FADD dominant negativem (FADDdn) Protein konnte gezeigt werden, dass das FADD-Protein eine wichtige Rolle bei der mitogen- und antigen- induzierten Proliferation der T-Zellen spielt (Newton et al., 1998; Newton et al., 2001; Walsh et al., 1998; Zornig et al., 1998).



Abb. 3 Generierung der FADDdn transgenen Maus

Ein 5,5 kB DNA-Fragment aus dem menschlichen FADD-Gen (ohne DED) wurde zwischen dem lck proximal-Promotor und dem Gen für ein menschliches Wachstumshormon integriert (aus Newton et al., 1998).

Die Expression des FADD dominant negativen Proteins wird durch den T-Zell-spezifischen Lck-Promotor reguliert und deswegen wird dieses Protein nur in den T-Zellen der Maus exprimiert. Dem FADDdn–Protein fehlen 79 N-terminale Aminosäuren und damit die für die Assoziation an Capase-8 notwendige Todeseffektordomäne (DED)(Abb. 3). Diese Deletionsmutante kann nicht an Caspase-8 binden und blockiert dadurch die Signalübertragung (Newton et al., 1998; Newton et al., 2001; Walsh et al., 1998; Zornig et al., 1998, Abb. 4).



Abb. 4 Die Rolle des FADD-Proteins in T-Zellen

Die Expression von FADDdn-Protein kann die todesrezeptorvermittelte Apoptose blockieren und auch die mitogen- oder-antigen-induzierte Proliferation einschränken.

Die T-Zellen von diesen Mäusen sind resistent gegenüber FasRezeptor-induzierter Apoptose und zeigen daneben eine gestörte Proliferation nach Stimulation mit verschiedenen mitogenen und antigenen Stimuli. Newton et al. konnten zeigen, dass die Mitogen-abhängige Proliferation stark eingeschränkt ist, jedoch die IL-2 Produktion, die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, sowie die (MAP)-Kinasen- und die NF-kB-Aktivierung nicht beeinträchtigt sind (Newton et al., 2001). Auch die Daten von Arechiga et al. zeigten, dass in FADDdn-Zellen nicht nur die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung und Degradierung, sondern auch die IL-Sekretion und die Expression verschiedener Aktivierungsmarker normal sind (Arechiga et al., 2005).

Zörnig et al. berichteten, dass die gestörte Proliferation in FADDdn-Zellen durch Überexpression des Tumorsuppressorproteins p53 verursacht wurde. Eine weitere Untersuchung mit Hilfe der p53<sup>-/-</sup>/FADDdn-Mäusen konnte diesen Befund nicht bestätigen;

das Fehlen von p53 konnte den Proliferationdefekt in FADDdn T-Zellen nicht ausgleichen (Newton et al., 2001).

Zhang et al. haben die Rolle des FADD-Proteins in der T-Zellaktivierung weiter untersucht (Zhang et al., 2001). Sie beobachteten, dass frisch isolierte FADD<sup>-/-</sup> T-Zellen den Zellzyklus ohne experimentelle Stimulation durchlaufen; sie befinden sich in einem ständig aktivierten Zustand. Obwohl viele FADD<sup>-/-</sup>-Zellen spontan aus der Ruhephase austreten können, ist nach einer Stimulation mit CD3/CD28 Antikörper nur eine kleine Fraktion dieser T-Zellen fähig, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten. Die Analyse von zellzyklusabhängigen Proteinen zeigte manche Unterschiede zu der Wildtyp-Maus, z.B. die Überexpression von p21, die niedrige Expression von Zyklin D2/D3 nach Stimulation und die konstitutive Expression von Zyklin E, Zyklin A, cdc2, cdk2 und cdk6 in den ruhenden Zellen. Diese Abnormalität konnte allerdings in FADDdn-T-Zellen nicht bestätigt werden (s. Ergebnisse).

Weiterhin wurde berichtet, dass FADD eine wichtige Rolle bei der T-Zellreifung spielt und der Verlust von funktionellem FADD zu einer unvollständigen Entwicklung von CD4- und CD8-einfach positiven Zellen im Thymus führt; eine Inhibierung wurde in der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>doppelt negativen Phase beobachtet (Kabra et al., 2001). Außerdem können FADDdn-Thymozyten während der Thymozytenreifung nach der Expression des Prä-T-Zellrezeptors nicht normal proliferieren (Newton et al., 2000). Trotz dieser T-Zell-Differenzierungsprobleme konnten Zhang et al. zeigen, dass reife FADD<sup>-/-</sup>-T-Zellen eine normale Expression von CD44, CD25 und CD122 Molekülen auf der T-Zelloberfläche haben (Zhang et al., 1998).

#### 1.2. Das Protein FLIP

Wie oben dargestellt, befinden sich die molekularen Signaltransduktionswege, die zur Apoptose und Proliferation führen, in einer engen Verbindung. Die Regulation dieser Prozesse findet in einer engen Zusammenarbeit von pro- und antiapoptotischen Proteinen statt. Das Adaptormolekül FADD und Caspase-8 sind zwei Proteine, die die Apoptose-induzierenden Signale weiterleiten können. Die Rolle von c-FLIP-Protein (cellular FLICE-inhibitory Proteins, auch FLAME-1, I-FLICE, Casper, CASH, MRIT, CLARP und Usurpin genannt) ist dagegen in diesem Prozess kontrovers. Es kann sowohl als Inhibitor als auch als

Aktivator der Apoptose wirken (Chang et al., 2002; Scaffidi et al., 1999; Thome and Tschopp, 2001).

Es sind mehr als zehn mRNA Isoformen dieses Proteins identifiziert worden. Nur zwei davon, die Spliceformen  $FLIP_S$  und  $FLIP_L$  wurden auf Proteinniveau genauer untersucht (Scaffidi et al., 1999).  $FLIP_S$  hat ein Molekulargewicht von 26 kDa und besitzt nur zwei DED in seinem N-Terminus.  $FLIP_L$  ist ein 55 kDa Protein und enthält außer den beiden N-terminalen DED auch eine C-terminale Caspase-8-ähnliche-Domäne (Abb. 5). Obwohl FLIP eine sehr ähnliche Struktur zu Caspase-8 hat, fehlt ihm der Cysteinrest im aktiven Zentrum, der für die proteolytische Funktion notwendig ist.



Abb. 5 Schematischer Vergleich von Caspase-8, c-FLIP<sub>L</sub> und c-FLIP<sub>S</sub>

Ähnlich wie bei Caspase-8 besteht c-FLIP<sub>L</sub> aus zwei Todesdomänen (DED) und einer Caspase-8 ähnlichen Domäne. Das Protein FLIP<sub>S</sub> enthält dagegen nur die beiden DED in seinem N-Terminus (nach Thome and Tschopp, 2001).

### 1.3. Funktionen des FLIP – Proteins

### 1.3.1. Die Rolle von FLIP in der Todesrezeptor-induzierten Apoptose

Während der FasR-induzierten Apoptose werden das Adaptorprotein FADD, Caspase-8 und FLIP an die Plasmamembran rekrutiert und der Tod-induzuerende Signalkomplex (DISC) gebildet. Der wichtigste Schritt in der Apoptose-Induktion ist die Aktivierung der Caspase-Kaskade durch die Oligomerisierung und Aktivierung der Initiator Caspasen. Dabei spielt das FLIP-Protein eine entscheidende Rolle.

Die neuesten Studien haben gezeigt, dass FLIP<sub>L</sub> in Abhängigkeit von seiner Expressionsstärke Apoptose sowohl inhibieren, als auch aktivieren kann.

Auf Grund der fehlenden enzymatischen Funktion des FLIP-Proteins führt die Rekrutierung von FLIP<sub>S</sub> (Abb. 6b) oder eine hohe Menge von FLIP<sub>L</sub> (Abb.6c) zum nicht vollständigen Prozessieren von Caspase-8. Dadurch wird die Fas-R-induzierte Apoptose inhibiert (Thome and Tschopp, 2001). Anderseits kann eine niedrige Konzentration des FLIP<sub>L</sub>-Proteins zur Bildung von heterodimeren Komplexen zwischen FLIP<sub>L</sub> und Pro-Caspase-8 führen. Ähnlich wie in einem Caspase-8-homodimeren Komplex, wird Caspase-8 in diesem heterodimeren Komplex durch autoproteolytische Spaltung aktiviert. Als Folge wird der Todesrezeptorinduzierte Signaltransduktionsweg weitergeleitet und der Tod der Zelle verursacht (Chang et al., 2002).



Abb. 6 Todesrezeptorsignaltransduktion in An- oder Abwesenheit von FLIP

Die Oligomerisierung des Fas-Rezeptors führt zur Bindung von der Todesdomäne des FADD an die Todesdomäne des Rezeptors. **a**) In der Abwesenheit von FLIP wird Caspase-8 rekrutiert und durch die autoproteolytische Spaltung aktiviert. Als Folge wird Apoptose ausgelöst. **b**) Die Expression von c-FLIP<sub>s</sub> inhibiert die Prozessierung von Pro-Caspase-8 und auf dieser Weise schutzt die Zelle von der Apoptose. **c**) In der Gegenwart vom c-FLIP<sub>L</sub> können pro-Caspase-8 und FLIP<sub>L</sub> gemeinsam rekrutiert werden. Da c-FLIP<sub>L</sub> keine proteolytische Funktion hat, wird die Caspase-8 nicht gespaltet, was zu Inhibition der Apoptose führt (nach Thome and Tschopp, 2001).

Die neuesten Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von c-FLIP<sub>L</sub> in Jurkat- Zellen nicht nur zur Inhibierung der Apoptose, sondern sogar zur Aktivierung der Lymphozyten

führt. Die Überexpression von c-FLIP<sub>L</sub> führt dazu, dass FLIP<sub>L</sub> an Raf-1 bindet, was die Aktivierung von MEK1 und Erk hervorruft (Kataoka et al., 2000). Außerdem konnten Dong et al. zeigen, dass c-FLIP auch an TRAF1 und TRAF2 binden kann, IkB wird dabei phosporyliert und inaktiviert, was zur Aktivierung des Transkriptionfaktors NF-kB führt (Dong et al., 2002, Abb. 7).



Abb. 7 Die FLIP-abhängige Genexpression

Durch die Bindung an FADD im DISC kann  $FLIP_L$  vollständig die Aktivierung von Caspase-8 inhibieren. Gleichzeitig kann  $FLIP_L$  auch andere Signalmoleküle wie TRAF1, 2 und Raf-1 binden und so die Expression bestimmter Gene regulieren (nach Thome and Tschopp, 2001).

### 1.3.2. Die Rolle von FLIP in der T-Zellproliferation

Wie bereits erwähnt, kann c-FLIP neben seiner Rolle in der Apoptoseinhibierung auch eine Rolle in der T-Zellproliferation spielen (Budd, 2002). Das Sterben von FLIP<sup>-/-</sup> Mäusen noch in der Embryonalentwicklung zeigt, dass c-FLIP ähnlich wie FADD und Caspase-8, eine doppelseitige Funktion hat: die Regulation von Zelltod und von Zelldifferenzierung (Newton and Strasser, 2003).

In Studien mit  $FLIP_L$ - transgenen Mäusen wurden widersprüchliche Ergebnisse gewonnen. Die Überexpression von  $FLIP_L$  in aktivierten T- und B-Zellen konnte vor Todesrezeptorinduzierter Apoptose schützen, zeigte aber keinen Effekt auf die Proliferation (Van Parijs et al., 1999). Lens et al. konnten dagegen eine Erhöhung oder Verminderung der Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten mitogenen Stimulus beobachten (Lens et al., 2002). FLIP<sub>L</sub>-Überexpression konnte eine gestörte Proliferation verursachen, wenn ein Stimulus mit optimaler Konzentration (eine optimale Proliferation in normalen Zellen erzeugt) verwendet wurde. Jedoch erfolgte eine bessere T-Zellproliferation nach Stimulation mit suboptimaler Konzentration. Diese Daten lassen schließen, dass c-FLIP ähnlich den Apoptose-inhibierenden und -induzierenden Funktionen auch auf die Proliferation blockierend oder aktivierend wirken kann.

# 1.4. Proliferation oder Zelltod- die Rolle der Transkriptionsfaktoren NF-AT, NF-кB und AP-1

Ein Aktivierungssignal durch den T-Zellrezeptor oder PMA/Ionomycin führt in T-Zellen zur Aktivierung einer Reihe von Kinasen, was wiederum die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren verursacht (Clements et al., 1999; Rudd, 1999). NF-AT (nuclear factor of activated T cells), NF-κB (nuclear factor-kB) und AP-1 (Activator protein-1) sind Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in T-Zellen spielen.

Die NF-AT- Familie enthält fünf Mitglieder: NF-AT1-NF-AT5. NF-AT1, NF-AT2 und NF-AT4 werden in Zellen des Immunsystems exprimiert, und ihre Rolle in die Immunantwort ist gut charakterisiert. Nach Stimulation wird NF-AT durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert, was zu Konformationsänderungen und zu seiner Translokation in den Kern führt, wo er durch die Bindung an den Promotor verschiedener Gene zu deren Expression beiträgt (Crabtree and Olson, 2002; Masuda et al., 1998). Die entscheidende Rolle von NF-AT bei der T-Zellproliferation konnte mit Hilfe von NF-ATc2<sup>-/-</sup> T-Zellen gezeigt werden. Der Verlust dieses Transkriptionsfaktors verursacht eine Überexpression der Cykline A2, B1, E und F und ein schnelleres Durchlaufen des Zellzyklus, was zu einer starken Zunahme der Proliferation nach Stimulation führt (Caetano et al., 2002).

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an vielen biologischen Prozessen wie z.B. Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt ist. Die Jun- (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), Fos- (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), ATF (Activating transcription factor)- und

CREB-Protein-Familien sind die Hauptkomponenten der AP-1-Familie (Eferl and Wagner, 2003). Es gibt zwei Wege um AP-1-Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Nach einer Stimulation werden die AP-1-Mitglieder sowohl neu synthesiert (transkriptionelle Ebene), als auch durch verschiedene MAP-Kinasen (ERK, JNK) phosphoryliert (posttranskriptionelle Ebene) (Michael Karin, 1995). Dabei wird AP-1 als ein Heterodimer von Jun- und Fos-Familien Mitgliedern an die DNA gebunden. Das führt zur Expression bestimmter Gene, die eine AP-1 Bindungstelle in ihrem Promotor besitzen (Angel and Karin, 1991). Durch Expression verschiedener AP-1-abhängiger Gene, wie zum Beispiel Cyclin D1, p53, p21, p19 und p16, kann der AP-1- Transkriptionsfaktor die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der Zellen regulieren (Eferl and Wagner, 2003; Shaulian and Karin, 2002).

NF-kB ist für die antigeninduzierte Proliferation, die Produktion von Zytokinen und das Überleben von T-Zellen notwendig. Die NF- kB/Rel-Familie enthält die Proteine RelA(p65)-, RelB-, c-Rel, NF-KB1(p50/p105)- und NF-KB2(p52/p100) (Blank et al., 1992; Nolan and Baltimore, 1992; Verma et al., 1995). NF-kB Proteine existieren als Homo- oder Heterodimere, die an IkB-Proteine (NF-kB-Inhibitorische Proteine) gebunden sind und in einer inaktiven Form im Cytosol vorliegen. Verschiedene Stimuli können die IkB-Kinasen (IKK- $\alpha$  und - $\beta$ ) aktivieren, die wiederum durch Phosphorylierung eine Ubiquitin- abhängige Degradierung von IkB verursachen, was zur NF-kB-Aktivierung führt (Karin and Ben-Neriah, 2000). Zu den Inhibitoren der NF-kB- Familie gehören außer den typischen IkBa und IkBß auch das untypische Mitglied Bcl-3. IkBa und IkBß befinden sich im Cytosol und werden durch den oben beschriebenen Weg nach Stimulation abgebaut (Zhang et al., 1994). So wird NF-kB frei und kann in den Kern translozieren und durch die Bindung an Erkennungssequenzen in Promotoren die Expression bestimmter Gene regulieren. Bcl-3 ist dagegen immer im Kern zu finden (Franzoso et al., 1993; Nolan et al., 1993). Nach den neusten Daten kann Bel-3 sowohl als Inhibitor, als auch als Ko-Aktivator der NF-KBabhängigen Transkription wirken. Bcl-3-mRNA wird in allen lymphatischen Organen exprimiert und eine mitogene Stimulation führt zu einer verstärkten Expression (Ohno et al., 1990).

### 1.5. IL-2- Expression und Funktion

Wie oben schon erwähnt, werden nach Stimulation des T-Zellrezeptors (TCR) durch einen antigenen oder mitogenen Stimulus verschiedene Signalkaskaden ausgelöst. Das führt zum Eintreten von Lymphozyten in den Zellzyklus, zur Proliferation und Expression verschiedener Gene, wie z.B. Zytokine. Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die das Verhalten der Zielzelle beeinflüssen. Zytokine, die von T-Zellen produziert werden, werden als Interleukine bezeichnet. Da das Interleukin-2 (IL-2) ein wichtiger von T-Zellen produzierter Wachstumsfaktor ist, führen Defekte in der IL-2- Expression und Sekretion, so wie unvollständige Synthese des IL-2-Rezeptors, zu einer gestörten T-Zellaktivierung und Proliferation.

Fünf Transkriptionsfaktoren (AP-1, AP-3, NF-kB, NF-AT und OCT-1) können an den IL-2-Promotor binden (Abb. 8). Ihre kooperative Interaktion führt zur effektiven IL-2-Transkription.



#### Abb. 8 Regulierung des IL-2 Promotors

Die Aktivierung der NF-AT-, NF-kB- und AP-1-Transkriptionsfaktoren wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. NF-AT wird durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und wandert in den Kern. Nach der Phosphorylierung und Degradierung der IkB wird die NF-kB freigesetzt. Die MAP-Kinasen JNK und ERK können die Mitglieder der AP-1 Familie phosphorylieren. Auf dieser

Weise aktivierte Transkriptionsfaktoren binden an den IL-2 Promotor und führen zu der Expression von IL-2.

Das sezenierte IL-2 bindet spezifisch an den Interleukin-2-Rezeptor, der aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten besteht (O'Shea et al., 1997). Nach Bindung kommt es zu Dimerisierung des Rezeptors. Dabei werden die Proteinkinasen (Janus Kinasen (Jak)), die an den cytoplasmischen Domänen des Zytokinrezeptors assoziiert sind, durch gegenseitige Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierten Kinasen Jak1 und Jak3 phosphorylieren und aktivieren wiederum Mitglieder der STAT- (Signal Transducers and Activators of Transcription) Familie. Die phosphorylierten STAT-Proteine translozieren in den Kern und durch die Bindung an die DNA wird die Transkription bestimmter Gene in Gang gesetzt (Leonard and O'Shea, 1998).



Abb. 9 Die Rolle von CIS/SOCS-Familie-Mitgliedern als negativen Regulatoren der Cytokinsignalwegen

In unstimulierten Zellen befinden sich Jak- und STAT-Proteine in einem inaktiven Zustand. Nach Stimulation des Rezeptors werden Janus Kinasen phosphoryliert, was zu Aktivierung der STAT-Protein-Familie führt. Als Folge werden die CIS/SOCS-Familien Mitglieder exprimiert. Diese Proteine wiederum binden an der Zytokinrezeptor und inhibieren auf diese Weise die Zytokinsignalübertragung (nach Krebs and Hilton, 2001). T-Zellaktivierung und Proliferation können durch verschiedene Proteine reguliert werden. Es ist bekannt, dass Mitglieder der SOCS (Suppressors of cytokine signaling)- Familie nach Zytokinstimulation exprimiert werden und als negative Regulatoren der Zytokinsignalwege wirken (Abb. 9). Es wurde berichtet, dass SOCS-3 die IL-2-Signalübertragung blockieren kann (Cohney et al., 1999). Da IL-2 sehr wichtig für die T-Zellproliferation ist, führt die Blockierung des IL-2-Signaltransduktionswegs durch das SOCS-3-Protein zu Inhibierung des T-Zellwachstums. SOCS-3 wird nach IL-2-Stimulation schnell phosphoryliert und an den T-Zellrezeptorkomplex gebunden. Dabei wird Jak1-Phosphorylierung inhibiert, was zur Inhibierung der IL-2-getriebenen Proliferation führt (Yu et al., 2003).

### 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Um die zelluläre Homeostase aufrecht zu erhalten, ist die genauere Balance zwischen Apoptose und Proliferation sehr wichtig. Eine Störung dieses Gleichgewichts könnte zur Entstehung verschiedener Krankheiten, wie Krebs, Alzheimer und Autoimmunerkrankungen führen. Veröffentlichungen in den letzen Jahren zeigten, dass Komponenten des Todesrezeptor-induzierten Signalwegs auch eine nicht-apoptotische Funktion ausüben können. So führt zum Beispiel, die Blockade dieses Signalweges zur Reduzierung der T-Zellproliferation und kann mit Hilfe von T-Zellen, die eine dominant negative Form des FADD-Proteins exprimieren (FADDdn), genauer untersucht werden. In dieser Arbeit sollte daher die molekulare Rolle und die Bedeutung des FADD/FLIP/Caspase-8-Signalweges für die Reifung und Aktivierung peripherer T-Zellen der Maus untersucht werden. Um den Einfluß dieses FADDdn-Proteins auf die Genexpression zu erforschen, sollte zuerst die Genexpression von FADDdn- und WT-T-Zellen verglichen werden. Damit könnte eine Aussage über die möglichen Kandidaten, die zu der gestörten Proliferation der FADDdn-T-Zellen geführt haben, getroffen werden. Schließlich sollten diese Kandidaten und ihre Rolle auf die Biologie der T-Zelle näher untersucht werden.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

### 2.1.1. Chemikalien und Radiochemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung(29:1)	Bio-Rad, München
Agarose	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Amoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Amoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Annexin-V-FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, CA
Azetat (Na-Azetat)	Merck, Darmstadt
Bio-11-CTP	Enzo Life Sciences, Canada
Bio-16-UTP	Enzo Life Sciences, Canada
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calziumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
CHAPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Concanavalin A (conA)	Amersham Biosciences, Schweden
Cyclosporin A (CsA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deoxynucleotide (dATP, dCTP, cGTP, dTTP)	Boehringer/Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin Rot	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %)	Roth, Karlsruhe

Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd-Lösung (37 %)	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
GolgiStop	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA
Hexamer Random Primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
HEPES	Biochrom, Berlin
IPTG (Isopropylthiogalactosid)	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid (MgCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol 99 %	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
MOPS-EDTA-Sodium Acetate Buffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumthiosulfat (Pentahydrat)	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40) (= IGEPAL CA630)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS Dulbecco (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PEG 3350, 4000 (Polyethylenglycol)	Merck, Darmstadt
peqGOLD TriFast <sup>TM</sup>	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitoren Complete EDTA-frei	Boehringer/Roche, Mannheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure 25 %	Roth, Karlsruhe
Saponin	Roth, Karlsruhe
5 x Second Strand Buffer	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N'N'-Tetraethylmethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tri Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyethylensorbitan Monolaureat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid Zitronensäure	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

Die Radiochemikalien  $[\alpha^{32}P]$ -dCTP und Methyl- $[^{3}H]$ -Thymidine wurden von der Firma Amersham Biosciences (Schweden) bezogen.

### 2.1.2. Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung	Hersteller
Anti-NF-AT1 (NF- ATc2)	Maus	Western Blot und Fluoreszenzmikroskopie	Abcam, Cambridge, UK
Anti-JunB (N-17)	Kaninchen	Primärer Antikörper im Western Blot	SantaCruz Biotechnology, California
Anti-NF-kB, p52 (K-27)	Kaninchen	Primärer Antikörper im Western Blot	SantaCruz Biotechnology, California

Anti-p16 (F-12)	Maus	Primärer Antikörper im Western Blot	SantaCruz Biotechnology, California
Anti-ß-Actin	Maus	Primärer Antikörper im Western Blot	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-Maus	Ziege	Zweitantikörper im Western Blot	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen	Ziege	Zweitantikörper im Western Blot	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus-IgG- Cy3-konjugiert	Ziege	Zweitantikörper im Fluoreszenzmikroskopie	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-CD3-Cy5- konjugiert		FACS-Färbung	Eigene Herstellung
anti-B220 (CD45R)-FITC- konjugiert	Rate	FACS-Färbung	Pharmingen, San Diego, USA
anti-NK-1.1- FITC-konjugiert	Maus	FACS-Färbung	Pharmingen, San Diego, USA
anti-maus-CD90.1 (Thy-1.1)-FITC- konjugiert	Maus	FACS-Färbung	Pharmingen, San Diego, USA
Anti-CD3 (Klon 145-2C11)	Hamster	T-Zellstimulation	Pharmingen, San Diego, USA
Anti-CD28 (Klon 37.51)	Hamster	T-Zellstimulation	Pharmingen, San Diego, USA
anti-IL-2-PE- konjugiert	Ratte	FACS-Färbung	Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD4-PE- konjugiert	Ratte	FACS-Färbung	Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD8-PE- konjugiert	Ratte	FACS-Färbung	Pharmingen, San Diego, USA
Anti-p50		Primärer Antikörper im Western Blot	Stratagene, La Jolla, CA

# 2.1.3. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Rnasin	Promega, Mannheim
DNase I	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteinase K	Fluka, Neu-Ulm
RNase, DNase-free	Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis
T4 DNA Polymerase	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Taq Polymerase	Eigene Herstellung (E.coli)
Pwo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Ribonuclease H (RNase H)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAseout	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
E. coli DNA Ligase	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
E. coli DNA Poymerase I	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA

## 2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
hFADD-sense	5'-TAG GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG G-3'	PCR
hFADD-antisense	5'-AGA GTC TCT CAA AGT CAG TGG GG-3'	
Bcl3-sense Bcl3-antisense (WT) Bcl3-antisense (Mutante)	5'-CCA CAG AGC AAC CTG GAA GCA-3' 5'-GGC TCC CAA GCT TGA AAA GGC-3' 5'-GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC-3'	PCR
ß-Actin-sense ß-Actin-antisense	5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT-3' 5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG T-3'	PCR
SOCS-3-sense SOCS-3-antisense	5'-AGG GGA AGA GAC TGT CTG GGG-3' 5'-CCG CAC AGC GGC CGC TAC C-3'	PCR

(WT)		
SOCS-3-antisense (Mutante)	5'-ACC ACA CTG CTC GAC ATT GGG T-3'	
IL-2-sense	5'-TCATCAGCAATATCAGAGTAACTGTTGTAA-3'	Echtzeit-PCR
IL-2-antisense	5'-GAA AGT CCA CCA CAG TTG CTG AC-3'	
Bcl3-sense	5'-GGA GCC GCG AAG TAG ACG T-3'	Echtzeit-PCR
Bcl3-antisense	5'-TGT GGT GAT GAC AGC CAG GT-3'	
Cyclophilin-sense	5'-ATG GTC AAC CCC ACC GTG T-3'	Echtzeit-PCR
Cyclophilin- antsense	5'-TTC TGC TGT CTT TGG AAC TTT GTC-3'	
SOCS-3-sense	5'-CGG AGA TTT CGC TTC GGG-3'	Echtzeit-PCR
SOCS-3-antisense	5'-AAC TTG CTG TGG GTG ACC ATG G-3'	
AP-1	AGC TTA CTC AGT ACT AGT ACG	EMSA
NF-kB	CTA GTC TCA ACA GAG GGG ACT TTC CGA GAG GCC AT	EMSA
NF-AT	AGC TTC CAA AGA GGA ATT TGT TTC ATA CAG A	EMSA
Oligo-T7-Primer	5'-T7-Sequenz+T(24x)+VN-3'	Oligonukleotid Array Analyse

### 2.1.5. Kits

Name	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen`s RNAse Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II RT Systeme	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SybrGreen Master Mix	Applied Biosystems, USA
RiboMax T7 Kit	Promega, Mannheim
Bio-Rad Protein Assay	Bio-rad Laboratories, München
TrasnAM Family Kit	Actif Motif, Carlsbad, CA, USA
OptEIA <sup>TM</sup> mouse IL-2 Set	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA

### 2.1.6. Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller	
Brutschränke:			
Bakterien	WB300	Mytron, Heiligenstadt	
Zellen	Hera Cell 240	Heraeus, Hanau	
ELISA-Lesegerät	ELISAreader Argus 400	Bio-Tek Instruments Inc., USA	
FACS (Durchflußzytometer)	FACS Calibur	Becton Dickinson, USA	
Filmentwicklungsgerät	Curix 60	AGFA	
Heizbad	M20 Lauda		
Heizblock	Stuart Scientific	UK (Unated Kindom)	
Konfokales Mikroskop	Axiovert 100M Laser Scanning Microscope	Zeiss, Jena	
Lichtmikroskop	ID 03	Zeiss, Jena	
PCR-Maschine	Trio-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen	
pH-Meter	MultiCal pH526	WTW, Weiheim	
PhosphoImager	Storm 840	Molecular Dynamics, CA, USA	
Photometer	Nanodrop		
Sterilbank	HERA safe HSP 18	Heraeus Instruments, Hanau	
Western-Blotting:			
Blotkammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München	
Elektrophoresekammer	Mighty Small SE260 Minivertikal Unit	Hoefer, San Francisco, CA, USA	
Spannungsquelle	EPS 1001	Amersham Pharmacia, Biotech, Schweden	
Zentrifugen:			
Tischzentrifugen	Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau	
	Biofuge fresco, 4°C	Heraeus Instruments, Hanau	
Großzentrifugen	Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments, Hanau	
	Megafuge 1.OR, 4 °C	Heraeus Instruments, Hanau	
Agarosegelelektrophorese:			
Elektrophoresekammer	Hoefer HE33	Hoefer, San Francisco, CA,	

	Hoefer HE99X	USA
Spannungsquelle	Hoefer PS 500 XT	Hoefer, San Francisco, CA, USA

### 2.1.7. Medien

### 2.1.7.1. Zellkulturmedien

Click's- und DMEM-Trockenmedien (Biochrom, Berlin). Die Medien wurden nach Angaben des Herstellers in 10 l destilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

<u>Click's</u> 23,83 g HEPES, pH 7,2 11,75 g NaHCO<sub>3</sub>

<u>DMEM</u> 37 g NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,2

Vor der Anwendung wurden folgende Zusätze beigemischt:

2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin)
10 % FCS (Biochrom, Berlin)
1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10000 μg/ml) (Biochrom, Berlin)
50 μM β-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Fetales Kälberserum (FCS) wurde vor der Anwendung für 1h bei 56°C inaktiviert

### 2.1.7.2. Bakterienmedien

LB-(Luria-Bertani) Medium:

1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH = 7,2

Für die Herstellung von Selektionsmedien wurden die Medien mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert (Ampicillin-100µg/ml, Kanamycin-50µg/ml).

Für die Herstellung von Agarplatten wurde 2 % Agar zusätzlich zu LB-Medium hinzugefügt.

# 2.1.8. Sonstiges

Materialien	Hersteller		
Western-Blotting:			
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel		
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schüll, Dassel		
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, USA		
Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL High performance chemiluminescence film	Amersham Biosciences, England		
Proteinmarker SeeBlue	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA		
ELISA:			
Duoset ELISA Mouse IL-2 Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA		
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland		
MACS:			
LS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland		
Anti-FITC Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland		
Proliferation:			
Glass Fiber Filters	Perkin Elmer, Life Sciences, Inc., Boston, USA		
Echtzeit PCR:			
MicroAmpOptical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, USA		
Optical Caps	Applied Biosystems, USA		

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Kompetenzinduktion wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in 5 ml LB-Flüssigmedium überführt. Die so angelegte Übernachtkultur wurde am nächsten Morgen 1:100 verdünnt, so dass ein Gesamtvolumen von 500 ml entstand. Nach 3-4 Stunden Inkubation im Schüttler bei 37 °C wurde eine optische Dichte von  $OD_{600} = 0,3 - 0,4$  erreicht und die Bakterien wurden bei 1000 x g für 10 min (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml kaltem 1x TSS-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

<u>1x TSS:</u>

LB-Medium 50 mM MgCl<sub>2</sub> 10 % PEG 4000 5 % DMSO

2.2.1.2. Transformation von E.coli-Bakterien

100 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Ein Ligationsansatz von 100 µl 1x KCM und 1-5 µl DNA wurde zu den Bakterien gegeben und 20 min auf Eis belassen. Anschließend erfolgte die Transformation durch Hitzeschock bei 42°C für 2 min und eine weitere Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB- Flüssigmedium wurde die Probe 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 50-500 µl der Bakteriensuspension auf LB- Platten mit Antibiotikum, Ampicillin oder Kanamycin (je nach Resistenzgen in dem Vektor), ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### <u>5x KCM</u>

0,5 M KCl 0,15 M CaCl<sub>2</sub> 0,25 M MgCl<sub>2</sub>

#### 2.2.1.3. Isolierung von Plasmid- DNA

Mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN, Hilden) wurde nach Herstellerangaben aus 2 ml E.coli Bakterienkultur bis zu 20 µg Plasmid DNA gereinigt. Um größere Mengen Plasmid- DNA zu gewinnen, wurde eine Maxi-Prep mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Hilden) durchgeführt.

#### 2.2.1.4. Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Um transgene von WT-Mäusen zu unterscheiden, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Dabei wurde genomische DNA aus Mäuseschwänzen verwendet. Um diese zu erhalten, wurde ein 0,5 bis 1 cm langes Schwanzstück abgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Es wurde Lyse-Puffer zugefügt und über Nacht bei 37°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Dieser Schritt führt zum vollständigen Auflösen des Schwanzstücks. Anschließend folgte Zentrifugieren bei 13 000 rpm für 5 min und die Überstände wurden in ein frisches Röhrchen überführt. Danach wurde 500 µl Phenol/Chloroform pro Probe dazugegeben, durch mehrfaches Umwenden durchgemischt und anschließend für 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase, die erneut in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Nach Zugabe von 950 µl 100 % Ethanol wurden sichtbare DNA-Präzipitate gebildet. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden die Präzipitate entnommen, in ein mit 70 % Ethanol gefülltes Gefäß überführt und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 300 µl TE-Puffer gelöst.

#### Lyse Puffer (pro Probe):

500 μl TNE (10 mM Tris, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) 50 μl 10 % SDS 16 μl Proteinase K (10 mg/ml) TE-Puffer:

10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA

2.2.1.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mit dieser Methode können spezifische Sequenzen aus genomischer DNA oder cDNA mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase amplifiziert werden.

Typischer PCR-Ansatz

1 μl DNA-Matrize
0,5 μl Oligonukleotid, 100 μM (sense)
0,5 μl Oligonukleotid, 100 μM (antisense)
5 μl 10x PCR-Puffer
10 μl dNTP-Mix
32 μl H<sub>2</sub>O

10x PCR-Puffer:

100 mM Tris HCl

500 mM KCl

 $20 \ mM \ MgCl_2$ 

0,1 % BSA

#### dNTP- Mix:

je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Der Reaktionsansatz wurde mit 3 Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet.

Die PCR- Bedingungen waren:

1.95 °C 5 min Initiale Denaturierung

2. 80 ° C Pause +1 µl Taq Polymerase

3. 95 ° C 30 sec	Denaturierung	
4. 68 ° C 30 sec	Anlagerung	35 Zyklen
5. 72 ° C 1 min	Synthese	
6. 20 ° C Pause		

Die Temperatur und die Dauer der einzelnen Zyklusschritte wurden in Abhängigkeit von Primer und der Länge der zu amplifizierenden DNA spezifisch angepasst.

### 2.2.1.6. Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die DNA-Fragmente sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe von Agarosegelen, deren Konzentration je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle variierte. Agarosepulver wurde durch Kochen in 1 x TAE-Puffer geschmolzen. Nach Abkühlen auf 50-60°C wurde 0,8 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und luftblasenfrei in eine Gießkammer gegossen. Durch Einsetzen eines Plastikkammes wurden Taschen in gewünschter Größe geschaffen. Die DNA-Proben wurden mit einem 6-fach konzentrierten Ladepuffer (40 % (w/v) Saccharose; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt und in die Geltasche pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 80-160 V durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid konnten die Banden im Gel mit UV- Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

#### <u>50x TAE</u>:

242 g Tris (MW 121,14)
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen
#### 2.2.1.7. Isolieren von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das TriFast-Reagenz nach Anleitung des Herstellers verwendet. Gereinigte T-Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in 1 ml TriFast resuspendiert. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten, wurde die Probe für 5 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde Chloroform dazugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Die Probe wurde in drei Phasen getrennt und die RNA, die in der oberen wässrigen Phase sich befand, wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit Zugabe von Isopropanol und anschließende 10 minutige Inkubation. Die Probe wurde für 10 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde mit 75 %-igem Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) gelöst.

#### 2.2.1.8. Reverse Transkription

Zur reversen Transkription der aus T-Zellen gewonnenen RNA wurde das Superscript II System nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zuerst wurde zur Entfernung restlicher genomischer DNA ein DNA-Verdauungsschritt durchgeführt (10 min, 37 °C). Es folgte eine Inaktivierung der DNase für 10 min bei 75 °C. Anschließend wurden mit Hilfe von Oligo-dT-, Hexamer Random Primern und dNTP Mix 2  $\mu$ g gesamt-RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden alle Schritte in 0,5  $\mu$ l Eppendorf Gefäßen in der PCR Maschine durchgeführt, da dort schnell die benötigten Temperaturen erreichen werden konnten.

#### 2.2.1.9. Echtzeit-PCR (Real Time PCR)

Echtzeit-PCR ist eine Methode, die eine direkte Detektion von PCR-Produkten während der exponenziellen Phase der Reaktion erlaubt. Als Matrize zur relativen Quantifizierung einer spezifischen RNA diente die Erststrang-cDNA aus der reversen Transkription der gesamt-RNA. Zum Detektieren der PCR-Produkte wurde der mit doppelsträngiger DNA interagierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Mittels spezifischer PrimerPaare wurde die Amplifikation von cDNA-Fragmenten durchgeführt und auf einem Echtzeit-PCR Gerät aufgezeichnet.

Die parallel amplifizierte Menge an Cyclophilin-cDNA wurde als interne Kontrolle verwendet. Die PCR-Reaktion wurde mit 300 nM von jedem Primer und 1x SybrGreen Master Mix durchgeführt.

#### Die PCR- Bedingungen waren:

95 ° C 10 min 95 ° C 15 sec | 45 Zyklen 60 ° C 1 min |

#### 2.2.1.10. Oligonukleotide Array Analyse

Diese Methode ermöglicht es, gleichzeitig die Expression einer Vielzahl von Genen zu untersuchen. Dafür wurde zuerst RNA aus ruhenden oder für 20h mit PMA/Ionomycin stimulierten T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen isoliert. 20 µg RNA wurden mit Hilfe des SuperScript II Systems (Invitrogen) und Oligo-dT-T7 Primers in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize für die Herstellung von biotinylierter cRNA. Dabei wurde ein Promega RiboMax T7 Kit nach Herstellersangaben verwendet. Eine anschließende Fragmentierung der cRNA erlaubte ihre bessere Hybridisierung mit den immobilisierten Oligonukleotiden auf dem Chip (MG-U74Av2, Affymetrix). Nach der Hybridisierung wurden die Oligonukleotid-Chips gewaschen und die spezifische Bindung mit einem konfokalen Mikroskop nachgewiesen. Die Daten wurden mit dem Affymetrix-Programm MAS 5.0 (Affymetrix Microarray Suite 5.0) analysiert.

#### 2.2.2. Biochemische Methoden

#### 2.2.2.1. Zellkern-Proteinextrakte aus T- oder LKn-Zellen

Zur Erzeugung von Kernextrakten wurden  $1 \ge 10^7$  Zellen  $10^7$  Zellen  $10^7$  Zellen  $10^7$  Zellen Zellen Zellen Zellen

g für 30 sec abzentrifugiert. Das aus Kerne bestehende Pellet wurde in kaltem Puffer C aufgenommen, für 1h auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert und danach bei 10 000 x g für 10 min sedimentiert. Die Kernprotein-Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße transferiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### Puffer A:

10 mM HEPES 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA

Frisch zugeben:

1 mM Dithiotreitol (DTT)
 5 mM NaF
 1 mM NaVO<sub>3</sub>
 1 x PI (Roche, Mannheim)

#### Puffer C:

20 mM HEPES 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA

#### Frisch zugeben:

1 mM Dithiotreitol (DTT)
 5 mM NaF
 1 mM NaVO<sub>3</sub>
 1 x PI (Roche, Mannheim)

#### 2.2.2.2. NP-40-Extrakt

1 x  $10^{6}$  Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und in 50 µl NP-40 Lyse Puffer resuspendiert. Die Proben wurden für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend, nach kurzem Vortexen, bei 15 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der NP-40-Extrakt in neue Eppendorf-Gefäße transferiert und bei – 80 °C aufbewahrt.

#### NP-40 Lyse Puffer:

50 mM Tris, pH=8,0

150 mM NaCl

1 % NP-40 (Igepal CA-630, Sigma)

Frisch zugeben:

1 x (PI) Protease Inhibitor Koktail (Roche, Mannheim)

#### 2.2.2.3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Methode bestimmt (Bradford, 1976). Dabei wurde Bio-Rad Protein Assay nach Anwendung des Herstellers verwendet. In einer 96-Loch-ELISA-Platte wurde 250  $\mu$ l Färbereagenz (1:5 mit Aqua dest. verdünnt) vorpipettiert und 1  $\mu$ l Proteinextrakt dazugegeben. Mit Hilfe einer Standardreihe mit Konzentrationen von 0,2 bis 8  $\mu$ g/ $\mu$ l wurde der Proteingehalt photometrisch bei 595 nm in ELISA-Reader bestimmt.

#### 2.2.2.4. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)

PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelen, deren Konzentration je nach Größe der aufzutrennenden Proteine variierte. Zuerst wurde ein Trenngel gemischt und luftblasenfrei in eine Gießkammer gegossen. Nach Gießen des Sammelgels wurden durch Einsetzen eines Plastikkammes Taschen in gewünschten Großen geschaffen. Die Proben wurden mit einem 4-fach konzentrierten Lämmlipuffer gemischt, bei 95°C für 5 min erhitzt und nach Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 130-180 V durchgeführt.

Trenngel	15 %	12,5 %	10 %	8 %
LGB (ml)	7,5	7,5	5,0	5,0
Acrylamid	15	12,6	6,6	5,2
H <sub>2</sub> O	7,5	9,9	8,4	9,8
10 % APS (µl)	180	180	120	120
Temed (µl)	30	30	20	20

Die benötigte Menge für 5 Gele war:

Sammelgel		
UGB (ml)	3,75	
Acrylamid	2,4	
H <sub>2</sub> O	13,8	
10 % APS (µl)	70	
Temed (µl)	30	

### LGB:

182 g Tris

4 g SDS

32 % HCl

H<sub>2</sub>0 auf 1L auffüllen

pH 8,8

## UGB:

30 g Tris

2 g SDS

H<sub>2</sub>O auf 500ml auffüllen

pH 6,8

### 5 x Laufpuffer:

15 g Tris

72 g Glycine

2,5 g SDS

H<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen

4 x Lämmli Ladepuffer:

240 mM Tris-Cl pH 6,8
9,2 % SDS
40 % Glycerol
0,004 % Bromphenolblau
0,4 M DTT

#### 2.2.2.5. Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden bei 100 V konstanter Spannung in einer Blotting-Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Danach wurde die Membran für eine Stunde in Magermilchlösung (5 % Magermilch Pulver (MMP) in TBST) bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wird verwendet, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem gewünschten Erstantikörper in 5 % MMP für mindestens 1h inkubiert. Nach den folgenden Waschschritten mit 1x TBST (3x je 10 min) wurde die Membran mit dem Zweitantikörper inkubiert. Mit Hilfe der Meerrettichperoxidase, die an den Zweitantikörper gekoppelt ist, und Luminol-Reagenz, wurden die spezifisch gesuchten Proteine auf einem Fotofilm detektiert.

Transferpuffer:

10 % Tris/Glycine Puffer (10x) 20 % Methanol

#### 10 xTris/Glycine Puffer:

60,6 g Tris (250 mM) 288 g Glycine (192 mM) H<sub>2</sub>O auf 2 l auffüllen

#### 10 x TBS Puffer:

24,2 g Tris 80 g NaCl pH 7,6 H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

#### 2.2.2.6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Durch diese Methode lassen sich bestimmte Protein-DNA-Komplexe in einer Mischung nachweisen. Es werden <sup>32</sup>[P] radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet, die spezifisch für das gesuchte Protein sind. Mit Hilfe einer nativen Gelelektrophorese werden die Protein-DNA-Komplexe und die freie Oligonukleotide nach der Größe aufgetrennt (DNA-Protein-Komplexe laufen langsamer als freie DNA-Fragmente oder doppelsträngige Oligonukleotide) und mittels Phosphoimager detektiert.

Um AP-1-Aktivierung in WT und FADDdn T-Zellen zu untersuchen, wurden Kernextrakte vorbereitet. 5  $\mu$ g davon wurden mit 100 ng/ $\mu$ l poly dIdC und <sup>32</sup>[P]-markierten-AP-1 Oligonukleotiden (50 000 cpm) in Bindepuffer (4% Glycerol, 10 mM Tris und 100 mM NaCl) für 1h auf Eis inkubiert. Die Komplexe wurden auf 5 % Polyacrylamidgel bei Raumtemperatur getrennt. Nach dem Trocknen des Gels folgte eine autoradiografische Analyse.

#### 2.2.2.7. IL-2 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Der ELISA basiert auf einer Antigen-Antikörper Wechselwirkung, die durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen wird. Diese Methode wird zum Nachweis und zur Quantifizierung bestimmter Proteine in einer Lösung verwendet. Für die Bestimmung von IL-2 wurde eine 96-Loch-Platte mit nichtmarkiertem IL-2-Antikörper über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag, nach dreimaligem Waschen mit ELISA- Waschpuffer (0,05%Tween20 in PBS) wurden die unspezifischen Bindungsstellen 2h bei Raumtemperatur blockiert. Nach den folgenden Waschschritten wurde Probelösung (Überstände) auf die Platte pipettiert und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen konnte das gebundene IL-2 Protein mittels Biotin-gekoppeltem-IL-2-Antikörper und Zugabe eines Substratreagenz nachgewiesen werden. Die Reaktion der Streptavidin-gekoppelten-Meerrettichperoxidase mit dem Substratreagenz führen zur Erzeugung eines fotometrischen Signals, das bei 450 nm Wellenlänge in einem ELISA-Reader gemessen wurde. Die Konzentration des gebundenen IL-2-Proteins wurde mit Hilfe einer Standardkurve errechnet.

#### 2.2.2.8. TransAM

Das TrasnAM Family Kit von Firma Active Motif wurde nach Herstellerangaben verwendet. TransAM ist eine ELISA-ähnliche Methode, die es ermöglicht, die AP-1-Aktivierung in verschiedenen Kernextrakten zu untersuchen. In einer 96-Loch-Platte wurden AP-1 bindende Oligonukleotide immobilisiert, Kernextrakt dazupipettiert und nach dem Waschen konnten die gebundenen Komplexe mittels spezifischer Antikörper gegen c-Fos, FosB, Fra-1, c-Jun, JunB und JunD identifiziert werden. Dabei wurde ein Peroxidase konjugierter Sekunderantikörper verwendet, der ein fotometrisches Signal erzeugt, das bei 450 nm in ELISA-Reader bestimmt worden ist.

#### 2.2.3. Zellkulturmethoden

#### 2.2.3.1. T-Zellen Aufreinigung, Stimulierung und Proliferationsmessung

Die gesamten Lymphknoten oder die Milz wurden aus C57BL/6 Mäusen präpariert, in Click's Medium überführt und durch ein Metallsieb gedrückt. Die Einzelzellsuspension wurde gewaschen (1500rpm, 5 min) und bei den Milzzellen eine Lysierung der Erythrozyten durchgeführt (2 ml 1x Erylyse Puffer, 2 Minuten bei RT). Nach dem zweiten Waschschritt wurden die Zellen gefärbt. T-Zellen wurden mittels negativer Selektion (Depletion) und MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)- System isoliert. Dabei wurden B- und NK- Zellen mit spezifischen FITC-gekoppelten Antikörpern gefärbt (20 min, 4°C), 2 x mit PBS/BSA gewaschen und nach Inkubation mit anti-FITC magnetischen Beads (20 min, 4°C), durch eine Säule, die im Magnetfeld steht, durchgelassen. Die ungefärbten T-Zellen, die durchgelaufen sind, wurden in einem 15 ml Spitzboden-Röhrchen gesammelt und gezählt.

Für die Proliferationsbestimmung wurden je 3-5 x  $10^5$  Zellen (3-Fach-Werte) in 96-Loch-Platten mit Click`s Medium (plus 50 µM β-Merkaptoethanol) mit verschiedenen Stimuli wie z.B. ConA (2 µg/ml), PMA (2 ng/ml) plus Ionomycin (0,2 µg/ml), CD3 (5 µg/ml), CD3 (2 µg/ml) plus CD28 (10 µg/ml) für 48h stimuliert. In den letzten 6 Stunden wurde 25 µl (1 µCi) <sup>3</sup>[H] Thymidin pro Loch dazugegeben. Die Menge des eingebauten <sup>3</sup>[H] Thymidins wurde mittels β-Counter(Zähler) bestimmt und diente als Zeichen für die Proliferationsrate.

Für die Echtzeit-PCR-Versuche wurden je  $3-5 \ge 10^6$  Zellen in 12-Loch-Platten mit und ohne PMA/Ionomycin für die angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend wurde die gesamt-RNA wie oben beschrieben isoliert.

10 x Erythrozyten Lyse Puffer:

1,5 M NH<sub>4</sub>Cl 100 mM NaHCO<sub>3</sub> 10 mM EDTA pH 7,4

Vor Gebrauch wird 1 x Erylyse Puffer mit destilliertem Wasser vorbereitet.

Waschpuffer:

PBS mit 0,5 % BSA

2.2.3.2. Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse)

Zum Nachweis von Antigenen auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zelle wurden diese mit fluoreszenz-markierten Antikörpern markiert und durch einen fluoreszenzaktivierten Zellsorter analysiert. Dabei befinden sich die Zellen in Zellsuspension und werden durch die höhere Geschwindigkeit vereinzelt und an einem Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Die gemessene Fluoreszenzintensität dient als Marker für die gebundenen Antikörper.

Diese Methode erlaubt auch die Detektion von Proteinen, die direkt von den Zellen produziert werden, wie zum Beispiel GFP (Green Fluorescent Protein). Damit lässt sich z.B. die

Transfektionseffizienz kontrollieren oder die Transkription eines Gens in der lebenden Zelle nachweisen.

Mindestens 1 x  $10^5$  Zellen pro Probe wurden mit dieser Methode analysiert. Die Ergebnisse wurden mit dem FlowJo Programm ausgewertet.

#### 2.2.3.3. Annexin-V/PI Färbung

Die Annexin-V/PI-Färbung wird zum Nachweis der Apoptose verwendet. Das Phosphatidylserin (PS) ist ein Protein, das unter normalen Bedingungen auf der cytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist. Während der Apoptose wird das PS an die Außenseite der Zellmembran lokalisiert und kann durch fluoreszenzmarkiertes Annexin-V-Protein gebunden werden. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von Apoptose. Die Unterscheidung zwischen primär-, sekundärapoptotischen und nekrotischen Zellen war durch Ko-Färbung mit Propidiumjodid (PI) möglich. Dieser Farbstoff färbt nur die DNA von toten Zellen an, so dass die primär apoptotischen Zellen, die noch eine intakte Zellmembran besaßen, von PI nicht gefärbt wurden. Nekrotische Zellen lassen sich sowohl mit AnnexinV als auch mit PI färben.

Um den Zelltod bei unstimulierten und stimulierten Zellen zu untersuchen, wurden 3 x  $10^5$  gereinigte T-Zellen 1 x mit PBS gewaschen und in 50 µl Annexin-V-Bindepuffer aufgenommen. Danach wurden je 5 µl Annexin-V-FITC und 10 µl Propidiumiodid (Endkonzentrazion 5 µg/ml) dazupipettiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. 200 µl wurden pro Probe zugefügt und innerhalb von einer halben Stunde wurden die Zellen per Durchflußzytometrie analysiert.

#### Annexin-V-Bindepuffer (für 100 ml):

10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4 (Stock: 100 mM)	10 ml
140 mM NaCl (Stock: 1 M)	14 ml
2,5 mM CaCl <sub>2</sub> (Stock: 1 M)	250 µl
Dest. H <sub>2</sub> O	75,75 ml

## 2.2.3.4. Intrazelluläre Färbung für die konfokale Mikroskopie und Durchflußzytometrie

Für die Konfokal-Färbung wurden 5x10<sup>5</sup> gereinigte T-Zellen für 30 min mit PMA/Ionomycin in Gegenwart und in Abwesenheit von CsA (100 ng/ml) stimuliert. Danach wurden die Zellen sofort in 3 % Formaldehydlösung fixiert (20 min, RT) und mit 0,5 % NP-40 (Igepal CA-630) permeabilisiert (20min, RT). Mit Hilfe von einem Primärantikörper gegen anti-NF-ATc2 (20 min, RT, dunkel) und dem Cy3-markierten Zweitantikörper (20 min, RT, dunkel) wurde die NF-AT-Translokation mit einem Konfokal-Mikroskop analysiert.

Um eine intrazelluläre Färbung durchzuführen, wurden 3-5 x 10<sup>5</sup> gereinigte T-Zellen für 6h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart und in Abwesenheit von GolgiStop für die letzten 2 Stunden stimuliert. Danach wurden die Zellen mit anti-CD3-Cy5 Antikörper gefärbt (20 min, 4°C) und mit 2 % Formaldehydlösung fixiert (20 min, RT, dunkel). Die Zellen wurden 2 x mit 0,5 % BSA/PBS gewaschen und anschließend in 0,5 % Saponin permeabilisiert. Der PE-markierte-IL-2 Antikörper wurde verwendet, um die IL-2-positiven Zellen durch Durchflußzytometrie zu bestimmen.

#### 2.2.3.5. Retrovirus Produktion (Transfektion von Phönix-Zellen)

Um ein Gen und dessen Rolle in primären Zellen besser untersuchen zu können, wurde ein retrovirales System verwendet. Dabei wurde das gewünschte Gen in einen retroviralen Vektor kloniert und in Phönix-Zellen transfiziert (Abb. 10). Diese Zellen sind modifizierte 293 T-Zellen, die in der Lage sind, Viren zu produzieren. Die Kalzium-Phosphat Transfektionsmethode wurde durchgeführt. Dabei wurden 2 x 10<sup>6</sup> Phönix-Zellen am vorherigen Tag auf einer 10 cm Platte ausgesät, so dass am Tag der Transfektion eine optimalle Zelldichte erreicht wurde. Es wurde ein Master-Mix gemischt (850 µl) und die 2x HBS Puffer (850 µl) wurde unter ständigem "bubbling" zu jeder Probe sehr langsam pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Mischung ganz langsam auf die Zellen pipettiert. Acht Stunden später wurde das Medim abgesaugt und die Zellen in 6 ml neuem Medium für weitere 16-18h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde gesammelt und entweder sofort verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.



Abb. 10 Klonierungsvektor für die Retrovirusproduktion

Das gewünschte Gen wird vor dem IRES (Internal ribosome entry site) kloniert. Die IRES- Sequenz sichert die gleichzeitige Transkription sowohl des zu untersuchenden Genes, als auch des GFPs oder eines anderen, oberflächlichen Markers (in eine einzige mRNA). Dieser Marker erlaubt die infizierten von nicht infizierten Zellen zu trennen (nur die infizierten Zellen exprimieren den entsprechenden Marker).

Master-Mix:

15 μg DNA
106,3 μl CaCl<sub>2</sub> (2 M)
10 μg Helfer-Plasmid (pCL-Eco)
mit H<sub>2</sub>O auf 850 μl auffüllen

2xHBS Puffer:

1,6 g NaCl (280 mM)
0,04 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O (1,5 mM)
1,2 g HEPES (50mM)
pH 7.05 (sehr kritisch)
mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen
Die Lösung wird steril filtriert (0,2 μM) und bei 4°C aufbewahrt

2.2.3.6. Transduktion von T-Zellen

Eine Möglichkeit, fremdes Genmaterial in primäre Maus-T-Zellen einzubringen, ist die Verwendung von Retroviren. LKn- oder Milzzellen wurden für 2 Tage mit ConA stimuliert und anschließend mit Retroviren infiziert. Dabei wurden je 4-6 x  $10^6$  Zellen in 2 ml Click's Medium und 2 ml Virusüberstand aufgenommen. Es wurden 8 µg/ml Polybrene und 2 µg/ml ConA dazugegeben. Die Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte ausplatiert und für 1,30h bei 1200 x g und  $32^{\circ}$ C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24h bei  $37^{\circ}$ C

inkubiert. Um die infizierten von nicht infizierten Zellen zu trennen, wurde entweder die MoFlo- (für GFP-Expression) oder MACS- (für Thy1.1-Expression) Technik durchgeführt.

## 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Analyse der Genexpression in FADDdn-T-Zellen

Eines der Schlüsselmoleküle, die ein apoptotisches Signal der Todesrezeptoren übertragen, ist das FADD-Protein. Experimente mit einer Deletionsmutante von FADD, die so genannte FADD dominant negative (FADDdn) Form, haben gezeigt, dass dieses Protein ebenfalls eine wichtige Rolle bei der T-Zellproliferation spielt. Dieser Deletionsmutante fehlen die ersten 79 N-terminalen Aminosäuren und damit für die Bindung an Caspase-8 notwendige DED (siehe Einleitung). Dadurch kann Caspase-8 nicht mehr in den DISC rekrutiert werden und die Signale weiter geleitet werden.

Die T-Zellen von FADDdn-Mäusen sind resistent gegen FasRezeptor-induzierte Apoptose und zeigen eine eingeschränkte Proliferation nach Stimulation mit verschiedenen mitogenen und antigenen Stimuli (Newton et al., 1998, Abb. 11).



Abb. 11 Reduzierte Proliferation von FADDdn-T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli  $2 \times 10^5$  gereinigte T-Zellen oder LKn-Zellen von WT- (schwarze Säulen) oder FADDdn-Mäusen (weiße Säulen) wurden für 48h mit den oben genannten Stimuli inkubiert. [<sup>3</sup>H]-Thymidin wurde für die letzten 6h hinzugefügt, und die Proliferation wurde mit Hilfe eines ß-Counters bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Dreifachansätzen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Um die molekularen Mechanismen, die für die gestörte Proliferation in FADDdn-T-Zellen verantwortlich sind, und die Rolle von FADD in der T-Zellproliferation zu verstehen, wurden die Genexpressionprofile der ruhenden und stimulierten T-Zellen von FADDdn- und WT-Mäusen mittels Oligonukleotid-Array-Analyse untersucht. Lymphknotenzellen (LKn- Zellen) von Wildtyp-(WT) und FADDdn-Mäusen wurden entnommen, und T-Zellen wurden durch Depletion von B- und NK-Zellen isoliert. Dabei wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper B220-FITC und NK1.1-FITC gegen die entsprechenden oberflächlichen Moleküle auf B- und NK-Zellen verwendet und die T-Zellen mittels Durchflußzytometrie fraktioniert. RNA wurde entweder von ruhenden oder von PMA/Ionomycin- (20 h) aktivierten gereinigten T-Zellen isoliert. Um die Frage zu beantworten, welche Gene in Abwesenheit von funktionellem FADD unterschiedlich reguliert worden sind, wurde die 20-stündige Stimulation ausgewählt. Ziel war es, nicht nur die früh aktivierten, sondern auch spät- und sekundärregulierte Gene zu untersuchen und so ein komplexes Bild über die FADD-abhängige Signaltransduktionswege, die zu T-Zellaktivierung und Proliferation führen, zu erstellen.

Jede RNA-Probe wurde in cDNA umgeschrieben, die als Matrize für die Generierung von biotinylierter cRNA benutzt wurde. Anschließend wurde die cRNA fragmentiert und auf einem Oligonukleotid-Chip hybridisiert. Die spezifische Bindung wurde mit konfokaler Mikroskopie nachgewiesen, und mittels Affymetrix Software wurde errechnet, ob ein Gen signifikant exprimiert wird und wie hoch das Expressionsniveau ist. Um die möglichen Kandidaten, die zur Störung der T-Zellproliferation in FADDdn-Zellen beitragen, näher einzugrenzen, wurden nur die Gene ausgewählt, die eine mindestens zweifache Zu- oder Abnahme in FADDdn- im Vergleich zu den WT-Zellen zeigten. Eine tabellarische Darstellung der Gene findet sich in Tab. 1.

	FADDdn/WT	
Name	Relative Expression_0h	Relative Expression_20h
Interleukin 2 (IL-2)	1,0	5,3
interferon-inducible GTPase	2,6	6,1
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	1,6	6,1
B-cell leukemia/lymphoma 3 (Bcl-3)	1,9	4,3
interferon inducible protein 1	1,1	2,6

growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	1,2	4,6
growth factor independent 1	1,2	10,6
mitogen activated protein kinase kinase kinase 8	4,9	14,9
interleukin 9 (IL-9)	2,3	9,2
Janus kinase 2 (Jak2)	1,0	2,6
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	1,0	2,0
heat shock protein 1A	0,1	2,8
killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 13	0,3	0,2
chemokine (C-C motif) ligand 5	2,6	6,5
FBJ osteosarcoma oncogene B (FosB)	1,9	2,5
Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3)	3,2	7,9
Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3)	1,9	5,8
interferon-inducible GTPase	2,0	4,3
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	2,0	4,9
Jun-B oncogene	2,0	1,4
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	1,2	4,0
T-cell specific GTPase	0,9	2,5

Tabelle 1 Die Gene, die eine mindestens zweifach verstärkte Expression entweder in unstimulierten oder in PMA/Ionomycin-aktivierten T-Zellen gezeigt haben, wurden in der Tabelle dargestellt. SOCS-3 wurde durch zwei Sonden detektiert.

159 Gene wurden unterschiedlich reguliert, 58 davon in ruhenden und 151 in aktivierten T-Zellen. Basierend auf den ähnlichen Expressionsmustern wurden die ausgewählten Gene in so genanntem hierarchischen Cluster gruppiert (Abb. 12).



Abb. 12 Hierarchischer Cluster

Jedes Gen wird als eine horizontale Reihe aus farbigen Feldern dargestellt, jede Probe als eine Spalte. Die grüne Farbe zeigt, dass die Expression des entsprechenden Gens vermindert ist, die rote Farbe dagegen zeigt eine erhöhte Expression.

## 3.2. Erhöhte IL-2 mRNA Expression in FADDdn-T-Zellen

Um herauszufinden, welche Gene in Verbindung mit FADDdn zu einer Störung der Proliferation geführt haben, wurden Gene weiter untersucht, die eine abnormale Expression in FADDdn-Zellen zeigten, und über deren Expressionsregulation bereits Informationen vorliegen. Ziel war es, Signalwege zurückzuverfolgen, um so eine Aussage über die Rolle von FADD bei der T-Zellaktivierung machen zu können.

Ein bezüglich seiner Regulation sehr gut untersuchtes Gen, dessen mRNA Expression 5,8fach in stimulierten FADDdn- im Vergleich zu den WT-T-Zellen erhöht war, war Interleukin-2 (IL-2) (Tabelle 1). Es war berichtet worden, dass T-Zellen von FADD<sup>-/-</sup> und FADDdn-Mäusen ein gestörtes Wachstum, aber eine normale IL-2-Produktion haben (Mack and Hacker, 2002; Zhang et al., 1998). Da die beobachtete Erhöhung der IL-2 mRNA nach PMA/Ionomycin-Stimulation daher überraschend erschien, wurde Echtzeit-PCR durchgeführt, um die Ergebnisse der Oligonukleotid-Array-Analyse zu prüfen. Dabei wurden LKn-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen entnommen, und T-Zellen wurden mittels MACS-Technik (Magnetic Cell Separation) isoliert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 20 h nach PMA plus Ionomycin-Stimulation wurde die IL-2 mRNA Expression untersucht. IL-2-Expression konnte nicht in unstimulierten T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäuse detektiert werden. Vier bis sechs Stunden nach Stimulation dagegen betrug die IL-2 mRNA in FADDdn-T-Zellen das zwei- bis sechs-fache der IL-2 mRNA in WT-Zellen. Nach 20h wurde eine Abnahme der IL-2 mRNA-Expression sowohl in WT-, als auch in FADDdn-T-Zellen beobachtet. Jedoch blieb der Unterschied in der IL-2-Expression zwischen WT- und mutanten T-Zellen vorhanden und betrug in FADDdn-T-Zellen ungefähr das drei-fache der IL-2 mRNA in WT-Zellen, was auch die Ergebnisse der Oligonukleotid-Array-Analyse bestätigt (Abb.13).



Abb. 13 Erhöhte IL-2-mRNA-Expression in FADDdn-T-Zellen

1-2 x 10<sup>6</sup>/ml gereinigte T-Zellen von WT (schwarze Säulen) und FADDdn (weiße Säulen) wurden mit PMA (2 ng/ml) plus Ionomycin (200 ng/ml) stimuliert. RNA wurde nach den gegebenen Zeitpunkten isoliert, und Echtzeit-PCR wurde durchgeführt. Cyclophilin-Expression wurde als interne Kontrolle verwendet. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-2-mRNA zu Cyclophilin-mRNA. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Um festzustellen, ob die erhöhte IL-2 mRNA Expression auch zu einer erhöhten Proteinproduktion führt, wurde eine intrazelluläre IL-2-Färbung durchgeführt. Da die chemische Substanz GolgiStop den Proteintransport in der Zelle blockieren kann und so die intrazelluläre Menge von IL-2 besser bestimmt werden kann, wurden gereinigte T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen für 6 h mit PMA plus Ionomycin stimuliert und für die letzten 2 Stunden GolgiStop zugegeben. Nach Fixieren und Permeabilisieren der Zellen wurde das IL-2-Protein mit anti-IL-2 Antikörper gefärbt und die intrazelluläre Expression mittels Durchflußzytometrie bestimmt (Abb. 14A).



Abb. 14 Normale IL-2-Proteinproduktion in FADDdn-T-Zellen

Es zeigte sich, dass trotz der starken Expression der IL-2 mRNA die FADDdn-Zellen keine verstärkte IL-2-Proteinproduktion haben. Zusätzlich wurden die IL-2-Spiegel in den Kulturüberständen von FADDdn- und WT-T-Zellen mittels ELISA gemessen. Diese Untersuchung ergab, dass, ähnlich wie bei der intrazellulären Färbung, die IL-2-Sekretion nach Stimulation in FADDdn-Zellen vergleichbar zu der IL-2-Synthese in den WT-T-Zellen war (Abb. 14B).

Ein ähnliches Muster, nämlich gestörte Proliferation aber normale IL-2-Produktion, wurde in der Literatur unter anderen aber verwandten Umständen beschrieben. Mack und Häcker beobachteten, dass die Zugabe des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk die Proliferation von CD3stimulierten Zellen aus der WT-Maus inhibieren kann, jedoch keinen Einfluß auf die IL-2 Sekretion hat (Mack and Hacker, 2002). Mit Hilfe von z-VAD-fmk konnte untersucht werden, ob die Überexpression der IL-2 mRNA in FADDdn-T-Zellen durch einen Defekt in der T-Zell-Entwicklung erfolgt, oder ob sie einen direkten Effekt von dominant negativem FADD nach Stimulation darstellt. Um dies zu testen, wurden normale T-Zellen mit ConA in Ab- und Anwesenheit von Caspase-Inhibitor stimuliert. Es zeigte sich, dass der Caspase-Inhibitor z-

A: Intrazelluläre Färbung für IL-2. Gereinigte LKn-T-Zellen  $(2 \times 10^5 \text{ Zellen/200 }\mu\text{l})$  von WT- und FADDdn-Mäusen wurden mit PMA (2 ng/ml) plus Ionomycin (200 ng/ml) stimuliert. Nach 4h wurde GolgiStop dazugegeben. Die Zellen wurden mit anti-CD3-Cy5 und anti-IL-2-PE Antikörpern gefärbt. B: Normale IL-2-Sekretion in FADDdn T-Zellen. LKn-Zellen  $(3 \times 10^5 \text{ Zellen/200 }\mu\text{l})$  von WT (schwarze Säulen) und FADDdn-Mäusen (weiße Säulen) wurden mit PMA (2 ng/ml) plus Ionomycin (200 ng/ml) stimuliert. Nach 6, 20 und 48h wurden die Überstände gesammelt und mittels ELISA die IL-2-Sekretion bestimmt. Zellen, die ohne PMA/Ionomycin für 48h kultiviert worden sind, wurden als Kontrolle verwendet (mit "-", gekenzeichnet). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Zweifachansätzen.

VAD nach Stimulation nicht zu höherer, sondern sogar zu niedrigerer mRNA-Expression führt (Abb. 15).



Abb. 15 Normale IL-2-mRNA-Induktion in Gegenwart des Caspase-Inhibitors z-VAD

Gereinigte T-Zellen von WT-Maus wurden für die gegebenen Zeitpunkte mit ConA (2  $\mu$ g/ml) in Ab-(schwarze Säulen) und Anwesenheit (weiße Säulen) von Caspase-Inhibitor z-VAD inkubiert. Danach wurde RNA isoliert und Echtzeit-PCR durchgeführt. Cyclophilin-Expression wurde als interne Kontrolle verwendet. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-2-mRNA zu Cyclophilin-mRNA. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Dies ließ darauf schließen, dass die Expression von dominant negativem FADD die Zellen zu einer erhöhten IL-2-Transkription noch während der T-Zell-Entwicklung prädisponiert, aber keinen Einfluss auf die IL-2-Regulation während der T-Zellaktivierung hat.

Da die Promotorregulation des IL-2-Gens davon abhängt, wie stark die verschiedenen Transkriptionsfaktoren aktiviert worden sind, wurde vermutet, dass während der Stimulation eine erhöhte Promotoraktivierung in FADDdn-T-Zellen zu beobachten ist. Jedoch ist die IL-2-Proteinproduktion normal. Wahrscheinlich existiert ein Mechanismus in FADDdn-T-Zellen, der die IL-2 Produktion auf Translationsbene reguliert oder die Proteinmenge, die von der erhöhten mRNA produziert wird, begrenzt.

### 3.3. Normale NF-AT Induktion in FADDdn-T-Zellen

Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF-AT (nuclear factor of activated T cells), AP-1 (activator protein 1) und NF-kB (nuclear factor kB) können an die Promotorregion des IL-2-Gens binden und zur Produktion von IL-2 nach Stimulation der T-Zelle führen. Die veröffentlichten Daten zeigen, dass die NF-kB-Aktivierung in FADDdn- im Vergleich zu den WT-T-Zellen normal ist (Newton et al., 2001). Aus diesem Grund wurden die anderen beiden Transkriptionsfaktoren NF-AT und AP-1 und deren Bindung an den IL-2- Promotor untersucht.



Abb. 16 Calcium-abhängige Signaltransduktion in T-Zellen

Aktivierung des T-Zellrezeptors führt zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Die Ca<sup>2+</sup>-bindende Phosphatase Calcineurin wird dabei aktiviert und kann den Transkriptionsfaktor NF-AT dephosphorylieren. Dephosphoryliertes NF-AT wandert in den Kern und bindet an die Promotoren verschiedener Gene. Durch diese Bindung werden Gene, die für die T-Zellaktivierung verantwortlich sind, exprimiert. Dieser Prozess kann durch die Substanz Cyclosporin A (CsA) inhibiert werden, was zur Inhibierung der T-Zellaktivierung führt.

NF-ATc2 ist ein Transkriptionsfaktor, der an den Promotor vieler Lymphokingene bindet, und der sich in unstimulierten Zellen im Cytosol befindet. Nach Stimulation wird NF-AT durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und wandert in den Zellkern. Cyclosporin ist eine Substanz, die im Cytosol der T-Zellen an Calcineurin bindet. Dadurch wird der Kerntransport von NF-AT und als Folge davon die T-Zellaktivierung inhibiert (Abb. 16).

Um festzustellen , ob die erhöhte Produktion von IL-2 mRNA in FADDdn-T-Zellen auf eine Überaktivierung von NF-AT zurückzuführen ist, wurden gereinigte T-Zellen aus Wildtyp und FADDdn-Mäusen in Gegenwart und in Abwesenheit von Cyclosporin A mit PMA/Ionomycin stimuliert, und nach 4 oder 6 Stunden wurde die Expression von IL-2 mRNA durch EchtzeitPCR bestimmt. Es wurde eine ähnlich geringe IL-2 mRNA-Induktion in Gegenwart von CsA in normalen, wie in FADDdn-T-Zellen beobachtet (Abb. 17).



Abb. 17 Erhöhte, aber CsA-sensitive IL-2-mRNA-Expression in FADDdn-T-Zellen

Gereinigte LKn-T-Zellen von WT (schwarze Säulen) und FADDdn-Mäusen (weiße Säulen) wurden für 4 und 6 h mit PMA/Ionomycin in An- oder Abwesenheit von CsA (100 ng/ml) stimuliert. RNA wurde isoliert und Echtzeit-PCR für die IL-2-Expression durchgeführt. Cyclophilin-Expression wurde als interne Kontrolle verwendet. Dargestellt ist das Verhältnis von IL-2-mRNA zu CyclophilinmRNA.

Da sowohl die Proliferation als auch die IL-2 Produktion (nicht gezeigt) in FADDdn-T-Zellen ähnlich den Wildtyp-Zellen waren, wurde geschlossen, dass die Regulation der NF-AT-Aktivierung in FADDdn-T-Zellen normal ist.

Die DNA-Bindungsaktivität von NF-AT spielt eine wichtige Rolle in der IL-2-Promotoraktivierung (Chow et al., 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob sich die WT- und FADDdn-T-Zellen hinsichtlich ihrer NF-AT-Aktivierung unterscheiden. Es wurden T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen mit PMA/Ionomycin in Gegenwart und Abwesenheit von CsA für 1 Stunde stimuliert, und mittels EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) untersucht. Die NF-AT-Induktion in FADDdn-T-Zellen war nach Stimulation ähnlich der Induktion in WT-Zellen. Außerdem konnte die NF-AT-Bindungsaktivität in FADDdn-T-Zellen in ähnlicher Weise wie in WT-Zellen durch CsA-Behandlung inhibiert werden (Abb. 18A). A



В

Abb. 18 Normale NF-AT-Aktivierung in FADDdn-T-Zellen

A: Normale, CsA-sensitive NF-AT-Bindungsaktivität in FADDdn-T-Zellen. Kernextrakte wurden aus gereinigten T-Zellen (10<sup>7</sup>/pro Probe) von WT- und FADDdn-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden entweder unstimuliert belassen oder für 30 min mit PMA/Ionomycin in Gegenwart oder Abwesenheit von CsA inkubiert. Die NF-AT-Bindungsaktivität wurde mittels EMSA untersucht. Die typische Bande ist mit Pfeil gezeigt. B: Normale NF-AT-c2-Expression in FADDdn-T-Zellen. Gereinigte T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen wurden für 15 und 30 min mit PMA/Ionomycin stimuliert. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt, und WB-Analyse wurde durchgeführt. Anti-NF-ATc2-Antikörper wurde verwendet, um NF-AT-Protein spezifisch nachzuweisen. Anti-β-Actin Antikörper dient als Ladekontrolle.

Um auch die NF-AT-Proteinproduktion zu testen, wurden T-Zellen isoliert, und nach 15- oder 30-minütiger Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden Proben für Western Blot Analyse hergestellt. Mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch gegen den in Lymphozyten exprimierten Transkriptionsfaktor NF-ATc2 gerichtet ist, wurde die gleiche NF-AT-Expressionszunahme in der Kontroll- und in der FADDdn-Maus beobachtet (Abb. 18B).

Gereinigte T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen wurden mit PMA/Ionomycin stimuliert und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Cyclosporin A wurde wieder hinzugegeben, um den Kerntransport von NF-AT zu inhibieren. Es konnte festgestellt werden, dass die Stimulation mit PMA/Ionomycin zu einer normalen NF-AT-Kerntranslokation führt (Abb. 19). Der CsA-inhibierende Effekt auf die NF-AT-Aktivierung war ähnlich, sowohl in FADDdn- als auch in WT-T-Zellen. Alle diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass der funktionelle FADD-Verlust keinen Einfluss auf die NF-AT-Aktivierung hat.



Abb. 19 Normale, CsA-sensitive NF-AT-Kerntranslokation in FADDdn-T-Zellen

Gereinigte T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen wurden für 30 min mit PMA/Ionomycin in Anoder in Abwesenheit von CsA (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-NF-ATc2-Antikörper (rot) gefärbt.

Wie schon oben beschrieben, spielt AP-1 zusammen mit NF-kB und NF-AT eine wichtige Rolle bei der Induktion von IL-2 nach T-Zell-Stimulation.

Da die bisherigen Ergebnisse die erhöhte Transkription von IL-2 nicht erklären konnten, wurde die AP-1-Aktivität in FADDdn-T-Zellen weiter untersucht. LKn-Zellen wurden von WT- und FADDdn-Mäusen isoliert und die AP-1-Bindungsaktivität in den Kernextrakten von diesen Zellen mittels EMSA untersucht. Es konnte eine deutlich erhöhte AP-1-Aktivität bereits in frisch isolierten, unstimulierten FADDdn-Zellen festgestellt werden (Abb. 20A).

Eine weitere Untersuchung der T-Zellen von WT-und FADDdn-Mäusen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin für 30 Minuten zeigte eine leichte Induktion der AP-1-Aktivität in Kontroll-Zellen, aber fast keine Zunahme in FADDdn-T-Zellen. Allerdings war die AP-1-Aktivität in stimulierten WT-Zellen immer noch geringer als diejenige in den ruhenden FADDdn-Zellen (Abb. 20B).



Abb. 20 AP-1-Aktivierung in FADDdn-Zellen

A: Erhöhte AP-1-Aktivierung in ruhenden FADDdn-Zellen. Kernextrakte ( $10^7$  Zellen pro Probe) wurden von WT- und FADDdn-Mäusen isoliert und mittels EMSA untersucht. Die aktivierten AP-1-Komplexe wurden mit einer radioaktivmarkierten AP-1-spezifischen-Sonde detektiert. Die Bindung an eine NF-kB-Sonde wurde als Ladekontrolle verwendet. B: Zellextrakte wurden aus gereinigten unstimulierten oder PMA/Ionomycin-stimulierten T-Zellen (jeweils 4 x  $10^6$ ) von WT- und FADDdn-Mäusen hergestellt. EMSA wurde durchgeführt, um die AP-1-Aktivierung zu untersuchen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die erhöhte AP-1-Aktivität in FADDdn-T-Zellen für die IL-2 Expression alleine nicht ausreichend ist, aber die Zellen für die höhere IL-2 Transkription anfällig macht, nachdem infolge der T-Zellstimulation NF-kB und NF-AT aktiviert worden sind.

## 3.4. AP-1-mRNA-Transkription in FADDdn-Zellen

Da die unstimulierten Zellen eine hohe AP-1-Aktivität aufweisen, wurden die möglichen Ursachen dafür in ruhenden T-Zellen weiter untersucht. Um festzustellen, welche AP-1 Mitglieder eine Rolle in der erhöhten IL-2 Expression spielen, wurden eine Anzahl von Genen, die zur AP-1-Familie gehören, wie z.B. JunB, Fos, FosB, ATF-1, ATF-2 und ATF-3, in der Oligonukleotid-Array-Analyse untersucht.

		FADDdn/WT	
Name	Gene Symbol	Relative Expression_0h	Relative Expression_20h
Jun dimerization protein p21SNFT	Snft	1,0	3,0
Jun-B oncogene	Junb	2,0	1,4
FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	1,0	6,5
FBJ osteosarcoma oncogene B	Fosb	1,9	2,5

Tabelle 2 AP-1-Familienmitglieder, die eine verstärkte Expression (mindestens zweifach) entweder in unstimulierten oder in PMA/Ionomycin-aktivierten T-Zellen zeigen.

Bei zwei davon, JunB (erhöht um Faktor 2,0) und FosB (1,9), wurde eine erhöhte mRNA-Expression in ruhenden FADDdn-T-Zellen im Vergleich zu den T-Zellen der WT-Maus beobachtet. Entsprechende Daten sind in Tabelle 2 gezeigt.

Aufgrund der recht geringen Unterschiede in der mRNA-Expression von JunB und FosB wurde eine andere, unabhängige Methode verwendet, um die Signifikanz der Oligonukleotid-Array-Analyse zu bewerten. Ein Bild der Expression aller AP-1-Mitglieder wurde durch den Ribonuclease Protection Assay (RPA) geliefert. Dabei wurde RNA aus unstimulierten WTund FADDdn-T-Zellen untersucht. Es wurde keine deutliche Zunahme der Expression der einzelnen AP-1-Mitglieder bei der FADDdn im Vergleich zur normalen Maus festgestellt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 21 A gezeigt.



Abb. 21 AP-1-mRNA und JunB-Proteinexpression in FADDdn-T-Zellen

A: Normale mRNA-Expression der AP-1-Familienmitglieder. Gesamt-RNA wurde aus T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen (jeweils 3 Replikate) isoliert und ein Ribonuclease Protection Assay durchgeführt. L32 und GAPDH wurden als Ladekontrollen vewendet. B: Ruhende T-Zellen von jeweils 2 WT- (Nr.1 und Nr.2)- und 2 FADDdn- (Nr.3 und Nr.4) Mäusen wurden isoliert, und Kernextrakte davon wurden hergestellt. Die Kernextrakte wurden auf JunB-Expression im Western Blot untersucht. Anti-p-50-Antikörper wurden zur Detektion der Ladekontrolle vewendet.

Weiterhin wurde für das JunB-Protein eine Western Blot Analyse durchgeführt (Abb. 21B). Es konnte keine erhöhte JunB-Proteinexpression in unstimulierten FADDdn-Zellen beobachtet werden.

# 3.5. Normale AP-1-Bindungsaktivität einiger AP-1-Mitglieder in FADDdn-T-Zellen

Es wurden keine Unterschiede in der mRNA- und Protein-Expression der einzelnen AP-1-Mitglieder in FADDdn-T-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen gefunden. Da die AP-1-Aktivierung auch durch die AP-1-Bindungsaktivität reguliert werden kann, wurde dies mit Hilfe der TransAM Methode untersucht. Diese ELISA-basierende Methode erlaubt es, die aktivierten AP-1-Proteine, die sich im Kernlysat befinden, zu detektieren und zu quantifizieren. Ruhende T-Zellen von WT und FADDdn-Mäusen wurden mittels MACS-

A

Technik isoliert und Kernextrakte wurden davon hergestellt. Die Kernextrakte wurden auf eine mit AP-1-Erkennungssequenz immobilisierte Platte gegeben. Aktivierte AP-1-Mitglieder wurden gebunden und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen einzelne AP-1-Mitglieder detektiert. Wie in Abb. 22 gezeigt, gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Bindungsaktivität der einzelnen AP-1-Mitglieder.



Abb. 22 Aktivierung der einzelnen AP-1-Mitglieder

Kernextrakte wurden aus ruhenden T-Zellen von WT- (schwarze Säulen) und FADDdn- (weiße Säulen) Mäusen hergestellt. Zur Analyse der Anwesenheit von AP-1-Protein-DNA-Komplexen wurde die TransAM Methode durchgeführt. Die Ergebnisse wurden normalisiert (der höchste Wert wurde auf 1 gesetzt). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 6 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Das alles lässt vermuten, dass andere Mitglieder der AP-1-Familie, die hier nicht untersucht wurden, für die erhöhte AP-1-Aktivität in FADDdn-T-Zellen verantwortlich sind.

#### 3.6. Erhöhte Bcl-3- und SOCS-3- mRNA in FADDdn-T-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die IL-2-mRNA-Überexpression wahrscheinlich auf die konstitutiv erhöhte AP-1-Aktivität in ruhenden FADDdn-T-Zellen zurückzuführen ist, jedoch konnte dieser Befund die gestörte Proliferation in FADDdn-Zellen nicht erklären. Aus diesem Grund wurden weitere Gene untersucht, die für die Regulation der Proliferation zuständig sein könnten und deren Expression in FADDdn-Zellen abnormal ist. Bcl-3 und SOCS-3 sind zwei Gene, die möglicherweise eine Rolle spielen.

Bcl-3 gehört zur NFκB-Transkriptionsfamilie, deren Mitglieder an der Regulation verschiedener Gene, die an T-Zellproliferation oder an Zelltod beteiligt sind, mitwirken können. SOCS-3 gehört zur CIS/SOCS-Familie und kann auch die T-Zellaktivierung und die Proliferation regulieren. Durch die Bindung von SOCS-3 an den IL-2-Rezeptor werden die Signalübertragung und somit auch das T-Zellwachstum blockiert (Cohney et al., 1999). Die Oligonukleotid-Array-Analyse hat gezeigt, dass die Bcl-3- und SOCS-3-mRNA verstärkt (zweifach, Tabelle 1, 0h) in unstimulierten FADDdn-T-Zellen im Vergleich zu WT-T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben, und eine Echtzeit-PCR wurde durchgeführt. Es wurde eine Zunahme der Bcl-3- und SOCS-3-Expression in FADDdn-T-Zellen beobachtet, welche die Ergebnisse der Oligonukleotid-Array-Analyse bestätigte (Abb. 23).



Abb. 23 Erhöhte Bcl-3 und SOCS-3 mRNA in FADDdn-T-Zellen

RNA wurde aus ruhenden T-Zellen von WT- (schwarze Säulen)- und FADDdn- (weiße Säulen) Mäusen isoliert. Echtzeit-PCR mit Primern spezifisch für Bcl-3 (A) und für SOCS-3 (B) wurde durchgeführt. Cyclophilin-Expression wurde als interne Kontrolle verwendet. Dargestellt ist das Verhältnis von Bcl3- oder SOCS-3- zu Cyclophilin-mRNA. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus vier (A) bzw. fünf (B) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

## 3.7. Retrovirale Expression von SOCS-3 und Bcl-3 supprimiert T-Zellproliferation

Um die Rolle von Bcl-3 und SOCS-3 für die T-Zellproliferation zu charakterisieren, wurde ein retrovirales System zur Expression verschiedener Gene in primären Maus-T-Zellen verwendet. Dabei wurden LKn- und Milzzellen von WT-Mäusen für 48h mit ConA stimuliert und anschließend mit Retroviren transduziert. Der retrovirale Vektor enthält ein GFP (Green Fluorescent Protein) oder einen spezifischen Oberflächenmarker, wie z.B. Th1.1, der die Trennung der transduzierten von nicht transduzierten Zellen erlaubt. Als Kontrolle wurde ein Leervektor verwendet. Mit dieser Methode konnten etwa die Hälfte der Zellen transduziert werden (Abb. 24).



Abb. 24 GFP-Expression in T-Zellen

WT-T-Zellen wurden mit Retrovirus transduziert. Der Retrovirale Vektor enhält ein grün fluoreszierendes Protein (GFP). Das untersuchte Gen und das GFP werden von einer IRES-Sequenz reguliert, was zu der gleichzeitigen Expression dieser zwei Proteine führt. Um die Transduktionsrate zu bestimmen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Nur die Zellen, welche das grüne Protein exprimiert haben, wurden auch transduziert und konnten mittels Durchflußzytometrie von den nicht transduzierten Zellen getrennt werden.

Um die Frage zu beantworten, ob die verstärkte Expression von SOCS-3 oder Bcl-3 die IL-2getriebene T-Zellproliferation blockieren kann, wurden LKn-Zellen der WT-Maus entweder mit SOCS-3-GFP- bzw. Kontroll-GFP-Retrovirus oder mit Bcl-3-Thy1.1 bzw. Kontroll-Thy1.1-Retrovirus transduziert. Um transduzierte von nicht transduzierten Zellen zu trennen, wurden die GFP-positiven Zellen mittels Durchflußzytometrie (MoFlo) sortiert. Im Falle von Thy1.1-Expression wurden die infizierten Zellen mit dem FITC-markierten anti-Thy1.1Antikörper gefärbt und mittels MACS- (Magnetic Cell Separation) Technik isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin für weitere 16h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Proliferation wurde als Thymidineinbau bestimmt. Eine Proliferationsabnahme wurde sowohl in SOCS-3- als auch in Bcl-3-transduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abb. 25).



Abb. 25 SOCS-3 und Bcl-3 suprimieren die T-Zellproliferation

ConA-stimulierte LKn- und Milzzellen einer WT-Maus wurden mit MIGR1- und MIGR1-SOCS-3-(A) oder mit MIT- und MIT-Bcl-3- (B) Retrovirus transduziert. MIGR1 und MIT sind Leervektorkontrollen und als schwarze Säulen dargestellt, die SOCS-3- und die Bcl-3-infizierten Zellen dagegen, in weiß. Sowohl die Leervektor-, als auch die SOCS-3- und Bcl-3-infizierten Zellen wurden auf Grund der Expressionsmarker sortiert. Nur die Zellen, die diese Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren (infizierte Zellen) wurden weiter in Anwesenheit von 2  $\mu g/\mu l$  ConA und 1 $\mu$ Ci <sup>3</sup>[H]-Thymidin kultiviert. Nach 16h wurde die Proliferation mit Hilfe eines  $\beta$ -Counters bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Dreifachansätzen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von aus drei (A) bzw. fünf (B) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

# 3.8. Erhöhte SOCS-3-mRNA-Expression nach Überexpression von BcI-3

Es wurde beobachtet, dass Bcl-3 und SOCS-3 einen Einfluss auf die T-Zellproliferation haben können, und dass T-Zellen von Bcl3<sup>-/-</sup>-Mäusen sowohl eine bessere Proliferation als auch eine niedrige SOCS-3 mRNA Expression nach Stimulation aufweisen (unpublizierte Daten von

unserer Gruppe). All diese Befunde haben uns dazu geführt, die Verbindung zwischen Bcl-3 und SOCS-3 zu untersuchen.

Für diese Experimente wurden WT-Zellen mit Bcl-3-Retrovirus oder Leervektor transduziert. 24h später wurden die infizierten Zellen, die auf ihrer Oberfläche das Thy1.1-Antigen exprimieren, mittels MACS fraktioniert. Danach wurde RNA aus den transduzierten Zellen präpariert, in cDNA umgeschrieben, und mittels Echtzeit-PCR wurde die SOCS-3-Expression untersucht. Es wurde beobachtet, dass die Bcl-3-Überexpression zu einer leichten Zunahme der SOCS-3-mRNA führt, was darauf schließen lässt, dass während der T-Zellproliferation eine Verbindung zwischen Bcl-3 und SOCS-3 existiert (Abb. 26)



Abb. 26 Verstärkte SOCS-3 mRNA-Expression in Bcl-3-transduzierten Zellen

ConA-stimulierte LKn- und Milzzellen von WT-Mäusen wurden mit Bcl-3-Retrovirus transduziert. RNA wurde aus den infizierten, MACS-sortierten Zellen isoliert und die SOCS-3-Expression mittels Echtzeit-PCR bestimmt. Cyclophilin-Expression wurde als interne Kontrolle verwendet. Dargestellt ist das Verhältnis von SOCS-3 zu Cyclophilin-mRNA. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

## 3.9. Reduzierter Effekt von Bcl-3 in SOCS-3<sup>+/-</sup>-T-Zellen

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, ob der Bcl-3-proliferationsinhibierende Effekt von SOCS-3 abhängt, wurden SOCS-3<sup>+/-</sup>-Mäuse verwendet (SOCS-3<sup>-/-</sup>-Mäuse sind nicht lebensfähig). Es wurde erwartet, dass, falls die Proliferationsreduktion wirklich SOCS-3-abhängig ist, die niedrigere Expression von SOCS-3 in SOCS-3<sup>+/-</sup>-Mäusen zu einer geringen Reduktion der Proliferation nach Bcl-3-Überexpression führen würde. Um dies zu untersuchen, wurden LKn-Zellen von WT- und SOCS-3<sup>+/-</sup>-Mäusen für 48 Stunden mit ConA stimuliert und anschließend mit Bcl-3-Retrovirus transduziert. Die infizierten Zellen wurden wieder mittels MACS fraktioniert und weiter kultiviert. Die Proliferation wurde 16 Stunden

später gemessen. Es wurde beobachtet, dass die Bcl-3-Expression in SOCS-3<sup>+/-</sup>-T-Zellen einen geringeren Proliferation-inhibierenden Effekt hat (Abb. 27). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Bcl-3-verursachte Inhibierung der T-Zellproliferation eine verstärkte Expression von SOCS-3 benötigt.



Abb. 27 Bessere Proliferation der Bcl-3-transduzierten SOCS-3<sup>+/-</sup>-Zellen

ConA-stimulierte LKn- und Milzzellen von WT- oder SOCS-3<sup>+/-</sup>-Mäusen wurden mit MIT- (schwarze Säulen) oder MIT-Bcl-3- (weiße Säulen) Retrovirus transduziert. Sowie die Leervektor-, als auch die Bcl-3-infizierten Zellen wurden auf Grund der Expressionsmarker sortiert. Nur die Zellen, die diesen Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren (infizierte Zellen) wurden weiter in Anwesenheit von 2  $\mu g/\mu l$  ConA und 1 $\mu$ Ci<sup>3</sup>[H]-Thymidin kultiviert. Die Proliferation wurde 16h nach der Zugabe von [3H]-Thymidin mit Hilfe eines  $\beta$ -Counters bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Dreifachansätzen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

## 3.10. Der gemeinsame Verlust von Bcl-3- und FADD-Funktionen führt zu einer Reduktion der T-Zellpopulation

Wie oben beschrieben, führt der Verlust von funktionellen FADD zur Deregulation vieler Gene. Um die Bedeutung der Bcl-3-Expression für die gestörte Proliferation der FADDdn-T-Zellen besser zu verstehen, wurde die Bcl-3-defiziente Maus (*bcl3<sup>-/-</sup>*) mit der FADDdn-Maus gekreuzt, und die doppelt transgene FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>*-Maus weiter untersucht. Ziel war es zu testen, ob die Überexpression von Bcl-3 in FADDdn-T-Zellen zu einer gestörten T-Zellproliferation geführt hat. Im Falle der FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>*-Maus wäre dann zu erwarten, dass die T-Zellen von dieser Maus ein besseres Wachstum im Vergleich zu FADDdn T-Zellen aufweisen würden.

Die neu generierte FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus zeigte keine offensichtlichen Auffälligkeiten. Eine morphologische Untersuchung der inneren Organe zeigte, dass diese Mäuse eine vergrößerte Milz besitzen. Daraufhin wurden Milzzellen der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus mit spezifischen Antikörpern gegen CD3 und B220 mittels Durchflußzytomerie untersucht. Als Kontrollen wurden WT-, FADDdn- und *bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Ein niedrigerer Prozentanteil an peripheren T-Zellen bei der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen wurde beobachtet (Abb. 28).

A



Abb. 28 Relative Abnahme der T-Zellpopulation in FADDdn/bcl3-/--Maus

A:  $3 \times 10^5$  Milzzellen wurden mit Antikörpern spezifisch für CD3- und B220- oberflächliche Marker gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. B: Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Die detailliertere Analyse der T-Zellsubpopulationen der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4 und CD8 zeigte eine prozentualle Abnahme sowohl der reifen CD4- als auch der reifen CD8-T- Zellen (Abb. 29).

A



Abb. 29 Abnahme der CD4- und CD8-T-Zellpopulationen in FADDdn/bcl3-/--Maus

3 x 10<sup>5</sup> Milzzellen von WT, FADDdn, *bcl3<sup>-/-</sup>* und FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>* wurden mit Antikörpern spezifisch für die Oberflächenmarker CD3 und CD4 (A) bzw. CD3 und CD8 (B) gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die gleichen Ergebnisse wurden in drei weiteren unabhängigen Versuchen beobachtet.

Eine mögliche Ursache für die verringte Größe der Population der peripheren T-Zellen in der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus konnte die gestörte T-Zellentwicklung im Thymus sein. Um dies zu untersuchen, wurden Thymocyten von FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>- und Kontrollmäusen isoliert, mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und mittels FACS analysiert. Eine Abnormalität in doppelt positiven-, doppelt negativen-, CD4-positiven und CD8-positiven Zellpopulationen in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus wurde nicht beobachtet (Abb. 30). Diese Ergebnisse lassen darauf

schließen, dass das Fehlen von Bcl-3 und die Expression von dominant negativem FADD-Protein keinen offensichtlichen Einfluß auf die T-Zellentwicklung haben.



Abb. 30 Normale Entwicklung der Thymocytensubpopulationen in der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus 3 x 10<sup>5</sup> Thymocyten von WT, FADDdn und FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup> wurden mit Antikörpern spezifisch für die Oberflächenmarker CD4 und CD8 gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

## 3.11. Reduzierte Proliferation der FADDdn/bcl3<sup>-/-</sup>-T-Zellen

Um die ursprüngliche Frage zu beantworten, ob der Verlust von Bcl-3 in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen zu einer Verbesserung der Proliferation im Vergleich zu FADDdn-T-Zellen beitragen kann, wurde die Proliferation nach Stimulation mit verschiedenen mitogenen Stimuli untersucht. T-Zellen von FADDdn/*bcl-3*<sup>-/-</sup>-Maus wurden mittels MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) fraktioniert und mit anti-CD3-, anti-CD3/CD28-Antikörpern oder ConA stimuliert. Die <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation wurde nach 48 Stunden gemessen und mit den Kontroll-Mäusen (WT, FADDdn, *bcl3*<sup>-/-</sup>) verglichen (Abb. 31). Überraschenderweise wurde die erwartete Verbesserung der Proliferation in Abwesenheit von Bcl-3 in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen nicht beobachtet. Die FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen zeigten sogar eine deutlich geringere Proliferation im Vergleich zu FADDdn-T-Zellen. Der Bcl-3-Verlust führt zu einer Verstärkung des Proliferationsdefekts, beobachtet in T-Zellen mit fehlender FADD-Funktion.


Abb. 31 Reduzierte Proliferation der FADDdn/bcl3--T-Zellen

3 x 10<sup>5</sup> gereinigte T-Zellen von WT- (schwarze Säulen)-, FADDdn- (hellgraue Säulen)-,  $bcl3^{-/-}$  (dunkelgraue Säulen) und FADDdn/ $bcl3^{-/-}$ -(weiße Säulen) Mäusen wurden für 48h mit anti-CD3- (5 µg/ml), anti-CD3- (2 µg/ml) plus anti-CD28- (10 µg/ml) Antikörpern oder ConA (2 µg/ml) stimuliert. Die Proliferation wurde durch [3H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Dreifachansätzen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

#### 3.12. Erhöhte Apoptose der FADDdn/bcl3<sup>-/-</sup>-T-Zellen

Die Reduzierung der T-Zellproliferation kann verschiedene Ursachen haben. Eine Inhibierung des Zellzykluseintrittes, eine Verlangsamung des Zellzyklusdurchlaufes oder eine Erhöhung des Zelltodes können möglicherweise für das Proliferationsproblem in FADDdn/*bcl3*-/--Zellen verantwortlich sein. Um das Sterben der FADDdn/*bcl3*-/-Zellen zu untersuchen, wurden T-Zellen vor und nach der Stimulation mit AnnexinV/PI-Färbung mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, welches während der Apoptose an die Außenseite der Zellmembran transloziert und als früher apoptotischer Marker gilt. Mittels Ko-Färbung mit Propidiumjodid (PI) kann die Summe der toten Zellen erfaßt werden. Frühapoptotische Zellen haben noch eine intakte Zellmembran und werden von PI nicht angefärbt, während die spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen PI- und AnnexinV-positiv werden.

Der Anteil apoptotischer Zellen an den unstimulierten FADDdn/*bcl3*-/--Zellen nach 24h Inkubation war ähnlich wie bei den Kontroll-Mäusen (Abb. 32). Nach Stimulation dagegen wurden über 70 % tote Zellen in FADDdn/*bcl3*-/--Mäusen gegenüber 37 % in WT-Mäusen beobachtet. Insgesamt waren nur 7 % der FADDdn/*bcl3*-/--Zellen am Leben. Dieses



Überlebensproblem könnte daher für die reduzierte T-Zellpopulation in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Milzzellen verantwortlich sein.

A

Abb. 32 Erhöhter Zelltod der FADDdn/bcl3-/-T-Zellen nach Stimulation

unstim.

A: T-Zellen (3 x 10<sup>5</sup>) von WT-, FADDdn-, *bcl3<sup>-/-</sup>*-und FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>*-Mäusen wurden für 24h mit conA (2µg/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit Annexin-V-FITC-markiertem Antikörper und PI gefärbt, und innerhalb von 1h wurde der Tod der Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert. B: Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

PMA/lono

conA

Der Mechanismus, der für das Sterben der FADDdn/bcl3<sup>-/-</sup>-T-Zellen verantwortlich ist, war jedoch unklar. Da die Inhibierung der Apoptose zu einer besseren Untersuchung der

Proliferation beitragen kann, wurde die FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus mit der vav-bcl-2-Maus gekreuzt. vav-bcl-2-Mäuse exprimieren konstitutiv das Bcl-2-Protein (ein Protein, das den mitochondrial-induzierten Zelltod inhibiert) in allen Zellen des hämatopoetischen System.



B

A



Abb. 33 FADDdn/bcl3-/-/vav-bcl2-T-Zellen sind vor Apoptose geschützt

A: T-Zellen (3 x 10<sup>5</sup>) von WT-, FADDdn-, *bcl3<sup>-/-</sup>*, FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>* und FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>*/vav-bcl2-Mäusen wurden für 24h mit PMA (2 ng/ml) plus Ionomycin (200 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit Annexin-V-FITC-markiertem Antikörper und PI gefärbt, und der Tod der Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie analysiert. B: Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Als erstes wurde untersucht, ob die Bcl2-Expression den Tod von FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Zellen blockieren kann. Dafür wurden T-Zellen der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2 Maus isoliert, und nach 24-stündiger Stimulation wurde der Zelltod mittels AnnexinV/PI-Färbung bestimmt. Als Kontrollen wurden T-Zellen von WT-, FADDdn-, *bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2- und FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet (Abb. 33). Dass das Bcl-2-Protein in *bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2 und FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup> /vav-bcl2-Mäusen funktionell aktiv war, konnte durch die Reduktion des spontanen Zelltodes im Kultur (unstimulierten Zellen) gezeigt werden. Wieder wurde ein erhöhter Zelltod der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup> T-Zellen nach Stimulation beobachtet. Jedoch zeigten die T-Zellen von FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2 Maus ein besseres Überleben.

## 3.13. Normale Thymozytenentwicklung in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vavbcl2-Maus

Um die Rolle des Zusammenwirkens von Bcl-2, FADDdn und Bcl-3-Verlust auf die T-Zellentwicklung zu prüfen, wurden die Thymozyten von der dreifach transgenen FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-Maus und von den Kontrollmäusen mit Hilfe von CD4- und CD8-Antikörpern untersucht (Abb. 34). Die FACS-Analyse zeigte eine relative Abnahme der doppelt-positiven CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Population (von 83% in der Kontrollmaus auf 47% in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2 Maus) und eine relative Zunahme der anderen drei thymischen Subpopulationen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Single positive Zellen).



Abb. 34 Bcl-2-ähnliche T-Zellentwicklung in der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-Maus A: Thymocyten von WT, FADDdn, *bcl3*<sup>-/-</sup> und FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-Mäusen wurden mit anti-CD4 und anti-CD8 Antikörpern gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Diese gestörte Lymphozytenentwicklung kann nicht in Wildtyp, FADDdn- und *bcl3*-/-Mäusen beobachtet werden, ist aber, wie Ogilvy et al. in 1999 publiziert haben, typisch für die vav-bcl-2-Mäuse (Ogilvy et al., 1999). Daraus kann man schließen, dass die Thymozytenenwicklung in der FADDdn/*bcl3*-/-/vav-bcl2-Maus ähnlich wie bei der FADDdn/*bcl3*-/--Maus nicht vom FADD- und Bcl-3-Verlust beeinträchtigt ist.

Um T- und B-Zellpopulationen der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-Maus zu charakterisieren, wurden Milzzellen isoliert, mit anti-CD3- und anti-B-220-Antikörpern gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Eine reduzierte T-Zellpopulation in der dreifach mutierten Maus ähnlich wie bei den FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde wieder beobachtet (Abb. 35). Dies lässt schließen, dass die Bcl-2-Überexpression diese Veränderung nicht verhindern kann.



Abb. 35 Abnahme der T-Zellpopulation in FADDdn/bcl3-/-/vav-bcl2-Maus

3x10<sup>5</sup> Milzzellen von WT, FADDdn, *bcl3<sup>-/-</sup>* und FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>*/vav-bcl2-Mäusen wurden mit Antikörpern spezifisch für die Oberflächenmarker CD3 und B220 gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

# 3.14. Reduzierte Proliferation der FADDdn/*bcl3<sup>-/-</sup>/*vav-bcl2-T-Zellen

Ein gestörtes T-Zellwachstum nach Stimulation mit verschiedenen mitogenen Stimuli wurde in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt (s.o.). Da der größte Teil der Zellen nach Stimulation gestorben war, konnte nicht differenziert werden, ob der Grund für die niedrige Proliferationrate in der gestörten T-Zellaktivierung oder in der erhöhten Apoptose lag. Bcl-2-Expression in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2 T-Zellen blockierte die Apoptose (s.o.), so dass nun die Proliferation weiter untersucht werden konnte. Gereinigte T-Zellen von FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2 wurden isoliert, mit anti-CD3-Antikörper in Gegenwart und Abwesenheit von anti-CD28-Antikörper stimuliert, und nach 48 Stunden die Proliferation durch <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Als Kontrollen wurden T-Zellen aus WT-, FADDdn- und *bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet.



Abb. 36 Reduzierte Proliferation der FADDdn/bcl3-/-/vav-bcl2-T-Zellen

 $3x10^5$  gereinigte T-Zellen von WT- (schwarze Säulen), FADDdn- (hellgraue Säulen), *bcl3*<sup>-/-</sup> (dunkelgraue Säulen) und FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2- (weiße Säulen) Mäusen wurden für 48h mit CD3- (5 µg/ml) oder CD3- (2 µg/ml) plus CD28- (10 µg/ ml) Antikörpern stimuliert. Die Proliferation wurde durch [3H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Dreifachansätzen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

Überraschenderweise war die Proliferation der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-T-Zellen sehr gering (Abb. 36). Die Kombination von FADD-Verlust (FADDdn) und der Verlust von Bcl-3 führen also nicht nur zu einem gestörten Überleben der T-Zellen, sondern auch zu einer gestörten T-Zellaktivierung. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Grund für die reduzierte T-Zellpopulation in den peripheren Organen der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-und der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-Maus eher ein Resultat von gestörter Proliferation während der T-Zellentwicklung als von gestörtem Überleben ist.

Alle diese Ergebnisse lassen vermuten, dass zusätzlich zu dem FADD/Caspase-8/FLIP-Signalweg auch ein Bcl-3-abhängiger Signalweg existiert, der in T-Zellaktivierung und Überleben eine Rolle spielt.

#### 4. **DISKUSSION**

FADD und Caspase-8 sind Signalübertragungsmoleküle, die nicht nur für Todesrezeptorinduzierte Apoptose, sondern auch für Aspekte der T-Zellentwicklung und Aktivierung notwendig sind. Inaktivierung des Adaptorproteins FADD führt nicht nur zur Hemmung der Apoptose, sondern auch zur Inhibierung verschiedener T-Zellfunktionen. T-Zellen ohne funktionelles FADD-Protein (FADD<sup>-/-</sup> oder FADDdn-T-Zellen) zeigen ein stark vermindertes Wachstum nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli (Newton et al., 1998; Walsh et al., 1998; Zhang et al., 1998; Zornig et al., 1998). Die Ursachen, die zu der gestörten Proliferation der FADDdn-T-Zellen führen, sind unklar. In einer Vielzahl an Studien (Mack and Hacker, 2002; Newton et al., 2001; Zhang et al., 1998) konnte gezeigt werden, dass diese Abnormalität in der T-Zellaktivierung nicht auf gestörte IL-2-Produktion. intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-NF-kBoder MAPK-Aktivierung Konzentration, zurückzuführen ist. Mittels Zellzyklusanalyse konnte gezeigt werden, dass FADDdn-T-Zellen normal in den Zellzyklus eintreten, aber in Gegensatz zu den WT-Zellen deren T-Zellwachstum gestört ist (Beisner et al., 2003). Alle diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Reihe von Aktivierungswegen in FADDdn-T-Zellen nicht beeinträchtigt ist. Die Frage, welche Signalwege der T-Zellaktivierung in diesen Zellen betroffen sind, ist weiter unbeantwortet.

Daher war der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit die Erforschung der molekularen Ursachen, die zur Störung der T-Zellaktivierung führen. Im Laufe dieser Arbeit konnten folgende Ergebnisse festgestellt werden: **1**) Die Expression von FADDdn-Protein führt zur Deregulation einer Vielzahl von Genen sowohl in ruhenden, als auch in stimulierten FADDdn-T-Zellen; **2**) Es wurde eine normale IL-2-Produktion, aber erhöhte IL-2-mRNA Expression nach Stimulation detektiert; **3**) Die Regulation der NF-AT-Transkriptionsfaktor war normal, der AP-1-Transkriptionsfaktor dagegen wurde in unstimulierten FADDdn-T-Zellen konstitutiv exprimiert; **4**) Die Expression von zwei Genen- Bcl-3 und SOCS-3-, die eine Rolle bei der Proliferation spielen könnten, war gestört; **5**) Mit Hilfe der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup> Maus konnte gezeigt werden, dass FADD- und Bcl3- Proteine eine komplementäre Rolle bei der T-Zellentwicklung (weniger T-Zellen in der Peripherie der Maus), T-Zellaktivierung (sehr verminderte Proliferation) und beim T-Zellüberlebensdauer (erhöhte Apoptose nach Stimulation) spielen.

# 4.1. Auswirkung des FADD dominant negativen Proteins auf die Genexpression

Um die Bedeutung und die molekularen Funktionen des FADD-Signaltransduktionswegs für die T-Zellaktivierung genauer zu charakterisieren, wurde hier die Genexpression in T-Zellen der FADDdn- mit Kontrollmäusen verglichen. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte zunächst mit Oligonukleotid-Array-Analyse. Durch diese Methode wurden Tausende Gene gleichzeitig analysiert. Es wurde eine Deregulation von 159 Genen in FADDdn-T-Zellen festgestellt. Der Vergleich der Genexpression von FADDdn- und WT-T-Zellen machte deutlich, dass die Expression von dominant negativem FADD-Protein zu einer Deregulation der verschiedenen Gene sowohl in ruhenden als auch in stimulierten Zellen führte. Der lck-Promotor, der die FADDdn-Expression in diesen Mäusen reguliert, ist bereits in sehr frühen Stadien der T-Zellentwicklung aktiv. Zhang et al. berichteten, dass die Expression von FADDdn-Protein zu einer Störung der Thymozytenentwicklung führt. Es wurden weniger Thymozyten in der doppelt negativen Phase detektiert (Zhang et al., 1998).

Aufgrund dieser Daten überraschte nicht, dass 51 Gene in noch ruhenden FADDdn-T-Zellen unterschiedlich exprimiert waren. Nach Mitogen-Stimulation für 20 Stunden war die Expression von 151 der untersuchten Gene unterschiedlich nach den üblichen Kriterien. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen diesen 151 Genen und FADDdn existiert oder diese unterschiedliche Genexpression als sekundärer Effekt einer Deregulation von "master" Genen erfolgte, ist jedoch bislang unklar. Um dies zu untersuchen, wurden Gene ausgewählt, die eine abnormale Expression in FADDdn-T-Zellen zeigten und bei denen gleichzeitig viel über ihre Expressionsregulation bekannt war. Somit konnte die Deregulation der Expression zurückverfolgt werden und Hinweise auf die potentielle Deregulation der wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die diese Gene regulieren, gefunden werden.

#### 4.2. Deregulation der IL-2 mRNA Expression in FADD-T-Zellen

Ein Gen, das für T-Zellaktivierung und Proliferation wesentlich ist, ist IL-2. IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der von T-Zellen nach Aktivierung durch ein Mitogen oder Antigen selbst produziert wird. Nach dem Treffen der T-Zelle mit einem spezifischen Antigen

tritt die ruhende T-Zelle in die G1-Phase der Zellzyklus ein und beginnt die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors und auch das IL-2-Protein zu produzieren. Die Bindung des IL-2 an den IL-2-Rezeptor löst die Proliferation der T-Zelle aus.

Die Genexpressionsanalyse der stimulierten FADDdn-T-Zellen hat ergeben, dass die Expression der IL-2 mRNA 5x höher im Vergleich zu den stimulierten WT-Zellen war. Es ist bekannt, dass die IL-2-Transkription die gleichzeitige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), NF-AT (nuclear factor of activated T cells) und AP-1 (activator protein-1) benötigt (Serfling et al., 1995). Bisher wurde nur die NF- $\kappa$ B-Aktivierung von Newton et al. erforscht (Newton et al., 2001). In Kernextrakten von WT- und FADDdn-Zellen wurde die NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität mittels einer radioaktiv markierten Sonde spezifisch für NF- $\kappa$ B untersucht. Es konnte kein Unterschied in der NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität der FADDdn-und WT-Zellen festgestellt werden. Da die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor-Familie aus den Proteinen RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 besteht, konnte mittels Antikörpern spezifisch für Rel, RelA und NF- $\kappa$ B1 gezeigt werden, dass sich FADDdn- und WT-Mäuse hinsichtlich ihrer NF- $\kappa$ B-Komplexe nicht unterschieden.

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die erhöhte IL-2 mRNA in FADDdn-T-Zellen wurden auch NF-AT- und AP-1-Transkriptionsfaktoren, die auch die IL-2-Genexpression regulieren, analysiert (Chow et al., 1999). NF-ATc2 ist Transkriptionsfaktor, der in den Zellen des Immunsystems exprimiert wird und für die Expression vieler Lymphokingene unverzichtbar ist. NF-AT ist in unstimulierten Zellen im Cytosol lokalisiert. Durch Aktivierung der T-Zellen durch PMA/Ionomycin oder andere mitogene Stimuli, wird NF-AT dephosphoryliert und in den Kern transloziert, wo er an der Transkription verschiedener Gene mitwirkt (Crabtree and Olson, 2002; Masuda et al., 1998). Um den Einfluss der FADDdn-Expression auf die NF-AT-Aktivierung zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Lokalisation von NF-AT in WT- und FADDdn-T-Zellen ermittelt. Mit konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation die NF-AT-Translokation vom Cytosol in den Kern auch in FADDdn-Zellen normal erfolgte. Außerdem wurde die gleiche NF-AT-Aktivierung und CsA-abhängige Inhibierung der IL-2-Transkription beobachtet. FADDdn-Expression schien auch keinen Einfluss auf die NF-AT-Proteinproduktion und Bindungsaktivität zu nehmen. In Extrakten von stimulierten T-Zellen von FADDdn-Maus wurde mittels EMSA

ähnliche Bindungsaktivität wie in WT-Zellen gefunden. Es blieb also weiterhin unklar, weshalb die IL-2 mRNA so stark in FADDdn-T-Zellen exprimiert war.

Nachdem es sich gezeigt hatte, dass NF-kB und NF-AT nicht für die IL-2-mRNA Überexpression verantwortlich waren, stellte sich die Frage, ob sich die WT- und FADDdn-T-Zellen hinsichtlich ihrer AP-1-Aktivierung unterscheiden.

#### 4.3. Deregulation der AP-1 Transkriptionsfaktor in FADDdn-T-Zellen

Kernextrakte von WT- und FADDdn-T-Zellen wurden mittels EMSA untersucht und es wurde festgestellt, dass der AP-1-Transkriptionsfaktor sowohl in unstimulierten, als auch in stimulierten FADDdn-Zellen viel stärker aktiv ist. Der AP-1-Transkriptionsfaktor besteht aus Homo- und Heterodimeren der Jun- (JunB, JunD, c-Jun), Fos- (FosB, c-Fos, Fra1, Fra2), ATF2-, ATF3- (aktivierenden Transkriptionsfaktoren) oder MAF- (musculoapeneurotic fibrosarcoma) Protein-Familien. Daraufhin wurde untersucht, welche AP-1-Familienmitglieder für die erhöhte AP-1-Aktivität in FADDdn-T-Zellen verantwortlich sind.

Zu diesem Zweck wurden Kernextrakte aus unstimulierten WT- und FADDdn- gereinigten T-Zellen verwendet und mit TransAM Transcription factor Assay und Ribonuclease Protection Assay (RPA) analysiert. Es konnte keinen Unterschied in der Bindungsaktivität von c-Jun, FosB, c-Fos, Fra1, Fra2, JunB und JunD zwischen WT- und FADDdn-T-Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass entweder weitere AP-1-Mitglieder, die hier nicht untersucht worden sind, oder möglicherweise posttranskriptionelle Veränderungen für die erhöhte AP-1-Aktivität in FADDdn-T-Zellen verantwortlich sind. Außerdem könnte die Dimer-Zusammensetzung bestimmen, welche AP-1-Zielgene aktiviert werden sollen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass der c-Jun-Fra2-Komplex, aber nicht c-Jun-Fra1 oder c-Junc-Fos fähig ist, den Zellzyklusarrest in Fibroblasten zu inhibieren (Bakiri et al., 2002). Alle diese Ergebnisse lassen schliessen, dass die konstitutiv erhöhte AP-1-Aktivierung zu einer erhöhten IL-2-mRNA-Expression führt. Die Ursache für die gestörte Proliferation in FADDdn-T-Zellen blieb jedoch ungeklärt. Eine erhöhte AP-1-Aktivität in ruhenden FADDdn-T-Zellen könnte auch zu einer Deregulation der Expression von anderen AP-1abhängigen Genen beitragen, die bei der Proliferation eine Rolle spielen. In der Literatur wurde beschrieben, dass das AP-1-Mitglied JunB durch die Induktion von p16 einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten ausüben kann (Passegue and Wagner, 2000). Daraufhin wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um die Expression von p16 in T-Zellen von WT- und FADDdn-Mäusen zu untersuchen. Diese hat ergeben, dass die eingeschränkte Proliferation in FADDdn-T-Zellen nicht auf die Überexpression von p16 in FADDdn-Zellen zurück zu führen ist.

Die Reduzierung der Proliferation der FADDdn-T-Zellen kann durch ein Problem in der intrazellulären Signalübertragung oder durch einen Fehler beim Durchlaufen des Zellzyklus erfolgen. Newton et al. haben verschiedene intrazelluläre Signalwege untersucht, die zur Aktivierung der T-Zellen führen (Newton et al., 2001). Da sowohl die Aktivierung von p38und p42/p44-MAP-Kinasen, als auch die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und die NF-κB-Aktivierung nach Stimulation der FADDdn-Zellen normal waren, wurde der Zellzyklus der FADDdefizienten T-Zellen genauer untesucht. Zhang et al. berichteten, dass die FADD<sup>-/-</sup>-T-Zellen einen gestörten Zellzyklusdurchlauf aufweisen (Zhang et al., 2001). Sie beobachteten, dass die frisch isolierten, unstimulierten FADD<sup>-/-</sup>-T-Zellen sich nicht in der Ruhephase befinden, wie die unstimulierten WT-Zellen, sondern den Zellzyklus durchlaufen. Nach einer Stimulation kann nur eine kleine Fraktion dieser T-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus eintreten. Eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus von eukaryotischen Zellen spielt die Expression von zyklinabhängigen Kinasen (CDK) und deren Bindung zu den zugehörigen Zyklinen. Zhang et al. berichteten, dass verschiedene Zykline (Zyklin D2, D3, E, A, p21) und Zyklin-abhängige Kinasen (cdc2, cdk2, cdk6) für die defekte Proliferation in FADD<sup>-/-</sup>-T-Zellen verantwortlich sind. Baksh et al. zeigten, dass die Expressionsinhibierung der Zyklin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) durch den Transkriptionsfaktor NF-ATc2 auch die T-Zellproliferation blockieren kann (Baksh et al., 2002). Da die Aktivierung des NF-AT-Transkriptionsfaktors in FADDdn-T-Zellen normal war, wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt, dass die gestörte Proliferation in FADDdn-T-Zellen keine Korrelation mit CDK4-Expression aufweist. Auch in der Expression von anderen auf dem Chip vertretenen zellzyklusassoziierten Genen wurde kein deutlicher Unterschied beobachtet. Diese nicht übereinstimmenden Ergebnisse zwischen der FADDdn-Maus und der FADD-/--Maus könnten mit der unterschiedlichen Inhibierung der FADD-Funktionen erklärt werden.

# 4.4. Auswirkungen der SOCS-3 und Bcl-3 auf die Proliferation der T-Zellen

Nach Stimulation des T-Zellrezeptors treten die ruhenden Lymphozyten in den Zellzyklus ein und proliferieren. Dabei werden der Wachstumsfaktor IL-2 und die α-Kette des IL-2-Rezeptors synthesiert. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor wirkt als Proliferationssignal für die T-Zelle. Nur die Zellen, welche auf IL-2 reagieren, proliferieren. Dieser Prozess kann durch das SOCS-3-Protein inhibiert werden (Cohney et al., 1999). SOCS-3 kann an den IL-2-Rezeptor binden und dadurch die Aktivierung wichtiger Kinasen blockieren. Die Transkription bestimmter Gene, die für die Proliferation notwendig sind, wird somit inhibiert (Krebs and Hilton, 2001).

Eine normale IL-2-Produktion und Sekretion wurde in FADDdn-T-Zellen detektiert. Die Zugabe von IL-2 konnte den Proliferationsdefekt dieser Zellen nicht aufheben. Aufgrund der durch Oligonukleotid-Array-Analyse beobachteten Erhöhung der SOCS-3-Expression in unstimulierten und stimulierten FADDdn-T-Zellen, stellte sich die Frage, ob dieses Protein für die reduzierte Proliferation der FADDdn-Zellen verantwortlich ist.

Um sicherzustellen, dass die Überexpression von SOCS-3 tatsächlich zur Reduktion der T-Zellproliferation führen kann, wurde ein retrovirales System verwendet. Dabei wurde SOCS-3 mittels retroviraler Transkription überexprimiert und anschließend die Proliferation gemessen. Wie erwartet, führte die SOCS-3-Überexpression zu einem verminderten Wachstum der T-Zellen.

Wie die SOCS-3-Expression in FADDdn-Zellen reguliert wird, ist unklar. Unveröffentliche Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass T-Zellen von *bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine niedrige SOCS-3 mRNA-Expression nach LPS-Stimulation aufweisen. Bcl-3 ist ein wenig untersuchtes Protein, das als Transkriptionsfaktor wirken kann. Es gehört zur IkB-Familie, ist im Vergleich zu den anderen IkB-Mitgliedern im Nukleus lokalisiert und wird nach Stimulation nicht proteolytisch degradiert. Bcl-3 kann Heterokomplexe entweder mit p50 oder mit p52 bilden und so als Aktivator oder Repressor der Transkription wirken (Franzoso et al., 1997; Nolan et al., 1993). In manchen Formen der menschlichen Lymphomen ist Bcl-3 überexprimiert (Mathas et al., 2005). Außerdem spielt dieses Protein sowohl eine Rolle beim Zellzyklusdurchlauf (Westerheide et al., 2001), als auch beim T-Zellüberleben (Bauer et al.,

2006; Mitchell et al., 2001). Deswegen erschien es sinnvoll, seine Rolle in der T-Zellproliferation und T-Zellüberleben weiter zu untersuchen.

Die Oligonukleotid-Array-Analyse hat ergeben, dass die Bcl-3 mRNA sowohl in unstimulierten, als auch in PMA/Ionomycin-stimulierten FADDdn-Zellen überexprimiert wurde. Mittels retroviraler Transduktion konnte zusätzlich eine Inhibierung der T-Zellprolifertaion beobachtet werden. Es stellten sich daher zwei Fragen. Erstens, ob diese zwei Proteine, SOCS-3 und Bcl-3, zusammen kooperieren und zweitens, ob sie für die gestörte Proliferation der FADDdn-T-Zellen verantwortlich sind.

#### 4.5. Zusammenhang zwischen Bcl-3 und SOCS-3

Die Frage, ob Bcl-3 und SOCS-3 während T-Zellproliferation zusammen kooperieren, kann am besten durch Transduktion der SOCS-3<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Bcl3-Retrovirus beantwortet werden. Hat die Bcl-3-Überexpression die Proliferation durch SOCS-3 inhibiert, dann sollte es zu keiner Reduzierung der T-Zellproliferation in Abwesenheit von SOCS-3 (in SOCS-3<sup>-/-</sup>-Mäusen) kommen. Da die SOCS-3<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht lebensfähig sind, wurden SOCS-3<sup>+/-</sup>-Mäuse genommen. Die Zellen von WT- und SOCS-3<sup>+/-</sup>-Mäusen wurden mit Bcl-3-Retrovirus transduziert und 16 Stunden später wurde die Proliferation durch Thymidineinbau bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die T-Zellen von SOCS-3<sup>+/-</sup>- Mäusen eine bessere Proliferation nach Bcl-3-Transduktion im Vergleich zu den WT-Zellen aufweisen. Außerdem zeigten die Bcl-3 transduzierten WT-Zellen eine erhöhte SOCS-3-mRNA-Transkription. Diese Ergebnisse lassen ein hypothetisches Modell zu, in dem die erhöhte Expression von Bcl-3 zur Erhöhung der SOCS-3-Expression führt. Das könnte die Proliferationshemmung der Zellen erklären (Abb. 37).



Abb. 37 Hypothetisches Modell der Wirkung des FADDdn-Proteins auf T-Zellproliferation

Nach Stimulation des T-Zellrezeptors werden verschiedene Transkriptionfaktoren aktiviert, die zur Expression der IL-2 und zur Vervollständigung des IL-2-Rezeptors führen. Anschliessend wird durch die Bindung von IL-2 an den Rezeptor die Proliferation der Zelle ausgelöst. Gleichzeitig werden auch andere für die T-Zellproliferation verantwortliche Gene exprimiert. Im Fall von FADDdn-T-Zellen wurde eine Überexpression der Bcl-3- und SOCS-3- Gene beobachtet. Da Bcl-3 und SOCS-3 die T-Zellproliferation inhibieren können, ist es denkbar, dass ihre Überexpression für die gestörte Proliferation der FADDdn-T-Zellen verantwortlich ist.

## 4.6. Der Verlust von Bcl-3 und FADD bewirkt eine gestörte T-Zellproliferation

Die Hypothese, dass das Bcl-3-Protein eine wichtige Rolle bei der T-Zellproliferation von FADDdn-Zellen spielt, kann am besten *in vivo* mit Hilfe einer Maus, die einen Defekt, sowohl im FADD-, als auch im Bcl-3-Signalweg hat, bestätigt werden. Dafür wurde FADDdn- mit *bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus gekreuzt und die neu generierten FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäuse weiter untersucht. Eine Verbesserung der Proliferation der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen auf Grund des fehlenden Bcl-3-Proteins wurde nicht beobachtet. Entgegen der Erwartungen wurde sogar eine geringere Proliferation im Vergleich zu FADDdn-T-Zellen beobachtet. Der Bcl-3-Verlust verstärkt das in FADDdn-T-Zellen beobachtete Proliferationsproblem. Somit lieferte dieses Experiment einen Hinweis dafür, dass zwei T-Zellaktivierungswege existieren: einer, reguliert von Bcl-3 und einer, der über das FADD-Protein verläuft. Die Tatsache, dass der Proliferationsdefekt in FADDdn-Mäusen nicht so stark ausgeprägt ist wie bei FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen und dass die *bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäuse kein Proliferationsproblem aufweisen, lässt schließen, dass diese zwei

Signalwege komplementär funktionieren. FADD und Bcl-3 können ihre Funktionen bei der Proliferation der T-Zellen gegenseitig kompensieren.

# 4.7. Die Abwesenheit von FADD und BcI-3 beeinflußt nicht die Thymozytenentwicklung, verursacht jedoch eine Abnahme der T-Zellpopulation

Eine Analyse der T- und B-Zellpopulationen in der Milz von FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen machte deutlich, dass der Verlust von Bcl-3 und die Expression von dominant negativem FADD-Protein zu einer Reduktion der T-Zellpopulation (sowohl der CD4<sup>+</sup>, als auch der CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen) führte.

Die Größe der verschiedenen Zellpopulationen in den peripheren Organen (LKn und Milz) der Maus ist von der Thymozytenproduktion und von der Lebenszeit der ruhenden und der T-Lymphozyten abhängig. die aktivierten Aus diesem Grund wurde auch Thymozytenentwicklung mit Hilfe von anti-CD4- und anti-CD8-Antikörpern mittels Durchflußzytometrie untersucht. Es keine Unterschiede in konnten der Thymozytenentwicklung festgestellt werden. Diese Daten sprechen dafür, dass nicht ein Entwicklungsproblem, sondern das Überleben von T-Zellen wahrscheinlich für die reduzierte Anzahl der T-Lymphozyten in der Perypherie verantwortlich war.

## 4.8. Der Verlust von Bcl-3 und FADD führt zu einer erhöhten Apoptose

Die beobachtete Verminderung der Proliferation kann durch ein Proliferationsproblem oder durch ein gestörtes T-Zellüberleben erfolgen. Um dies zu untersuchen, wurde eine AnnexinV/PI-Färbung verwendet. Diese Methode erlaubt, tote (früh-, spätapoptotische oder nekrotische) von lebenden Zellen zu unterscheiden. Es stellte sich heraus, dass die T-Zellen mit defekten FADD- und Bcl-3-Signalübertragungswegen eine erhöhte Apoptose aufweisen.

Die molekularen Mechanismen, die zu diesem Überlebensproblem in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Mäusen führen, sind unklar. Nachdem es sich herausgestellt hat, dass FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen nach Stimulation sterben, konnte keine eindeutige Antwort gegeben werden, ob diese Zellen normal proliferieren können oder nicht. Um dies zu untersuchen wurde durch die Expression von Bcl-2-Protein in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen die Apoptose blockiert. Dabei wurde eine FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus mit einer vav-bcl-2-Maus gekreuzt und die T-Zellen von der neugenerierten FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl-2-Maus weiter untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die Überexpression des Bcl-2-Proteins, wie erwartet, den Überlebensdefekt der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen aufhob. Das Proliferationsproblem dagegen blieb unverändert. Diese Daten sprechen dafür, dass FADD- und Bcl-3-Signalwege nicht nur das T-Zellüberleben, sondern auch die Proliferation der primären T-Zellen regulieren können. Auch in anderen Publikationen wurde bereits eine ähnliche Reduktion der Proliferation beschrieben. So wurde beobachtet, dass T-Zellen ohne funktionelle Caspase-8 (Salmena and Hakem, 2005; Salmena et al., 2003) oder FLIP-Protein (Lens et al., 2002; Tai et al., 2004) eine gestörte T-Zellaktivierung aufweisen. Die molekularen Mechanismen dafür sind jedoch bis jetzt unklar.

### 4.9. Die Bedeutung von FADD/Caspase-8/FLIP-Signalweg für die T-Zellproliferation

Die Rolle von FADD, Caspase-8 und FLIP in der Fas-Rezeptor-induzierten Apoptose ist sehr gut untersucht. Stimulation des Fas-Rezeptors führt zu seiner Oligomerisierung und zur Rekrutierung des FADD-Proteins an den Rezeptor. Durch diese Rekrutierung wird Caspase-8 proteolytisch aktiviert. c-FLIP kann in Abhängigkeit von seiner Konzentration entweder eine inhibierende oder eine aktivierende Funktion bei diesem Prozess haben (siehe Einleitung). Die Rolle dieser Proteine bei der T-Zellproliferation ist dagegen nicht so gut charakterisiert.

Auf der Suche nach den möglichen Ursachen für die eingeschränkte Proliferation der FADDdn-T-Zellen, stellte sich die Frage, ob ähnlich der DISC-Formierung bei der Apoptose, diese drei Proteine während der T-Zellaktivierung ähnliche Funktion ausüben. Die Tatsache, dass Mäuse ohne FADD, Caspase-8 oder FLIP ähnliche Defekte haben und sehr früh an Problemen bei der Entwicklung der großen Gefäße sterben, lässt schließen, dass diese drei

Proteine noch während der Embryonalentwicklung kooperieren (Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 2000; Yeh et al., 1998). Mit Hilfe von Mäusen ohne funktionelles FADD, Caspase-8 oder FLIP konnte gezeigt werden, dass diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Zytokinoder Antigen-induzierten T-Zellproliferation spielen. Nguyen et al. berichteten, dass Mäuse ohne funktionellen Fas-Rezeptor oder TNFR1 eine normale Embryonalentwicklung und T-Zellproliferation haben (Nguyen et al., 2000). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass während der T-Zellaktivierung ein Signalkomplex, bestehend aus FADD, Caspase-8, FLIP und wahrschenlich einem Todesrezeptor, unterschiedlich von Fas oder TNFR1, gebildet wird und dass dieser Komplex eine wichtige Rolle bei der Proliferation der aktivierten T-Zellen spielt. Zusätzlich zu der Rolle von FLIP und Caspase-8 in der T-Zellproliferation wurde beobachtet, dass diese zwei Proteine auch eine Rolle für das Überleben von T-Zellen spielen. Es wurde ein erhöhter Zelltod sowohl in ruhenden, als auch in aktivierten cFLIP<sup>-/-</sup>-T-Zellen beobachtet (Chau et al., 2005). Ähnliches wurde auch in Caspase-8-defizienten-T-Zellen beobachtet (Salmena and Hakem, 2005). Außerdem konnten Chan et al. zeigen, dass der Verlust von FLIP zu einer Reduktion der peripheren T-Zellen führt.

In diesem Zusammenhang kann man von den Daten in dieser Arbeit schließen, dass die FADDdn/*bcl3*-/-T-Zellen ähnlich wie FLIP- und Caspase8-defiziente T-Zellen zusätzlich zu der gestörten Proliferation auch ein ausgeprägtes Überlebensdauerproblem aufweisen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde vermutet, dass parallel zum FADD-Caspase-8-FLIP-Komplex, auch ein Bcl-3-regulierter Signalweg existiert, der bei der T-Zellproliferation und beim Überleben eine Rolle spielt. Der Verlust des einen oder des anderen Proteins führt zu keinen so stark ausgeprägten Phänotypen hinsichtlich ihrer Proliferation und ihres Überlebens. Das gleichzeitige Ausfallen dieser zwei Wege führt dagegen zu sehr stark ausgeprägten Proliferations- und Überlebensproblemen, was schließen lässt, dass diese zwei Wege komplementär funktionieren.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl ein FADDals auch ein Bcl-3-abhängiger Signalweg existieren, die Zellaktivierung und Zelltod der T-Zellen der Maus komplementär regulieren können. Nach Durchführung der Oligonukleotid-Array-Analyse konnte eine Deregulation vieler Gene, inklusive IL-2, Bcl-3 und SOCS-3 festgestellt werden. Die beobachtete konstitutive Erhöhung des AP-1-Transkriptionfaktors könnte zur erhöhten IL-2- und Bcl-3-mRNA beigetragen haben (Clements et al., 1999; Rudd, 1999; Rebollo et al., 2000). Auch die Beteiligung der SOCS-3 bei der Reduzierung der T-Zellproliferation konnte durch Verwendung ein retrovirales System gezeigt werden. Zusätzlich konnte eine Verbindung zwischen Bcl-3 und SOCS-3 festgestellt werden. Die reduzierte Proliferation der FADDdn-T-Zellen schien über die Erhöhung der Bcl-3 und SOCS-3 zu erfolgen.

Mit Hilfe der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus konnte auch *in vivo* die Rolle von Bcl-3 in der T-Zellproliferation untersucht werden. Entgegen der Erwartungen, hat der Verlust von Bcl-3 in FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus zu keiner Verbesserung der Proliferation im Vergleich zu den FADDdn-T-Zellen geführt. Es wurde sogar eine niedrigere Proliferation gemessen. Da die Reduzierung der T-Zellproliferation ein Resultat des erhöhten Zelltodes sein könnte, wurde mit Hilfe von AnnexinV/PI-Färbung die Sterbensrate der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen bestimmt. Es wurde beobachtet, dass einen großen Teil von den FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen während der mitogenen Stimulation gestorben waren. Die transgene Ko-Erexpression des Bcl-2-Proteins (FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl-2) konnte den Zelltod verhindern, die gestörte T-Zellproliferation blieb dagegen unverändert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Bcl-3 eine Rolle sowohl in T-Zellproliferation, als auch in T-Zellüberleben spielt. Seine Fähigkeit Heterokomplexe entweder mit p50 oder mit p52 zu bilden und so als Aktivator oder Repressor der Transkription verschiedener Gene zu wirken, könnte seine Rolle bei der Proliferation und beim Überleben der T-Zellen erklären (Franzoso et al., 1997; Nolan et al., 1993).

Zukünftige Experimente, wie Analyse der MAP-Kinasen, der NF-κB-Aktivierung oder des Zellzyklus, können zeigen, ob auch andere Signalwege in FADDdn/*bcl3*-/-T-Zellen gestört sind. Das Wissen über die Regulation dieser Proteine kann eine Antwort auf die Frage geben, wie sie auf molekularer Ebene miteinander interagieren und wie durch Modifikation gleicher Proteine Zelltod oder Zellaktivierung hervorgerufen werden kann.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des intrazellulären Adaptorproteins FADD in der Entwicklung und Aktivierung der T-Zellen der Maus untersucht. Die Bedeutung des FADD-Proteins als Mediator der Todesrezeptor-induzierten Apoptose ist sehr gut charakterisiert. Nach Stimulation des Fas-Rezeptors durch Fas-Liganden kommt es zu seiner Oligomerisierung. Diese führt zur Oligomerisierung des Adaptorproteins FADD und dadurch zur Oligomerisierung von Pro-Caspase-8. Dabei wird der so genannte Tod-induzierende Signalkomplex, DISC (Death-Inducing Signaling Complex) gebildet, was zur Autoprozessierung und Aktivierung von Caspase-8 führt. Die aktivierte Caspase-8 spaltet widerum die Effektorcaspasen, was der Tod der Zelle verursacht.

Arbeiten in den letzten Jahren berichten, dass Komponenten dieses Signaltransduktionsweges auch nicht-apoptotische Funktionen ausüben können. So kann zum Beispiel die Inaktivierung des FADD-Proteins zu einer Störung der T-Zellproliferation führen. Die genauen Ursachen dafür sind bis jetzt unklar.

Die vorliegende Arbeit hat daher die Untersuchung dieses Signaltransduktionsweges zum Inhalt. Es wurde beobachtet, dass die Expression von FADDdn-Protein zur Deregulation einer Vielzahl von Genen führt. Die Analyse der Genexpression nach einer Behandlung mit PMA plus Ionomycin ergab eine veränderte Regulation von 151 Genen in FADDdn-T-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen. Auch die unbehandelten FADDdn-Zellen zeigten Unterschiede zu WT-Zellen, der Expression dieses Proteins noch während was mit der Thymozytenentwicklung erklärbar ist. Um auf die mögliche Ursache der gestörte Expression rückschließen zu können, wurden manche Gene genauer untersucht. Einer davon war IL-2. Zur Untersuchung des IL-2-Signaltransduktionswegs wurde die Aktivierung der für die IL-2-Expression verantwortlichen Transkriptionsfaktoren NF-κB, NF-AT und AP-1 analysiert. Da die NF-kB-Aktivierung bereits beschrieben worden war, wurden in der vorliegenden Arbeit nur die NF-AT und AP-1-Aktivierung untersucht. Es konnten keine Veränderungen in der NF-AT-Aktivierung in FADDdn-Zellen festgestellt werden. Bei AP-1-Transkriptionsfaktor dagegen konnte eine konstitutiv erhöhte Aktivierung noch in ruhenden FADDdn-Zellen beobachtet werden, was mit höchster Wahrscheinlichkeit die Ursache für die verstärkte IL-2mRNA-Expression in FADDdn-T-Zellen ist.

Auf der weiteren Suche nach der möglichen Ursachen für die gestörte T-Zellproliferation in FADDdn-T-Zellen, wurde die Rolle von Bcl-3 und SOCS-3, zwei Gene, deren Expression in FADDdn-Zellen auch abnormal ist, genauer charakterisiert. Mit Hilfe eines retroviralen Systems konnte festgestellt werden, dass diese zwei Proteine zur Reduktion der T-Zellproliferation führen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass die Bcl-3- und SOCS-3-mRNA in FADDdn-T-Zellen erhöht war, könnten die Proliferationshemmung diesen Zellen erklären.

In dem letzten Teil dieser Arbeit konnte die bedeutende Rolle von Bcl-3- und FADD-Proteinen für die T-Zellproliferation und das Überleben gezeigt werden. Durch Verwendung der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-Maus konnte demonstriert werden, dass der Verlust von Bcl-3 und die Expression von FADD dominant negativem Protein zu einer Störung der T-Zellfunktionen führen. Nach einer Behandlung mit PMA plus Ionomycin oder mit Concanavalin A, konnte eine erhöhte Apoptose der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen festgestellt werden. Auch die T-Zellproliferation wurde von fehlenden Funktionen der FADD- und Bcl-3-Proteine beeinträchtigt. Überaschenderweise wurde ein geringeres Wachstum der FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>-T-Zellen im Vergleich zu FADDdn-Zellen beobachtet. Eine Ko-Erexpression des Bcl-2-Proteins (FADDdn/*bcl3*<sup>-/-</sup>/vav-bcl2-Maus) konnte den Zelltod inhibieren, die gestörte Proliferation blieb jedoch unverändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl ein FADD- als auch ein Bcl-3-abhängiger Signalweg existieren, die Zellaktivierung und Zelltod der T-Zellen der Maus komplementär regulieren können.

#### DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Georg Häcker bedanken. Ich danke Ihm für die Möglichkeit, die er mir gegeben hat, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen. Seine wertvollen Ratschläge und die motivierende Unterstützung haben mir geholfen mein Wissen zu erweitern und mich weiter zu entwickeln. Seine persönliche Offenheit, die wissenschaftliche Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft waren eine große Unterstützung für mich.

Bei Herrn Prof. Dr. Gierl möchte ich mich bedanken für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anzufertigen.

Meinen Kollegen danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und für die ständige Hilfsbereitschaft. Ich danke ganz herzlich Juliane Vier, Dr. Susanne Kirschnek und Dr. Julia Scheffel, die nicht nur mit wervollen Ratschlägen zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, sondern auch in schlechten und in guten Zeiten für mich da waren und mich immer unterstüzt haben. Dr. Stefan Paschen danke ich für die spannenden Gespräche, die wertvollen Ratschläge und die aufmunternden Worte, die er immer für mich gefunden hat. Dr. Barbara Seiffert, Monika Gerhard und Astrid Grundbrecher danke ich für die tatkräftige Unterstützung am Anfang meiner Zeit im Labor und für die schönen Nachmittage und Abende außerhalb des Labors. Mein Dank gilt auch Stephanie Potthoff für die Unterstützung bei der Mauszucht.

Bei meiner Famillie und Freunden möchte ich mich herzlichst für das Verständnis, den Glauben und die Unterstützung bedanken. Besonders möchte ich meinem Ehemann Ventzeslav danken, dass er mir in allen Situationen unterstützend zur Seite stand und mich gestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe. Meinen kleinen Sohn Alexander möchte ich auch danken.

Sowie allen anderen, die mir geholfen haben.

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Die Struktur des menschlichen FADD-Gens	8
Abb. 2 Todesrezeptorvermittelte Apoptose	. 10
Abb. 3 Generierung der FADDdn transgenen Maus	. 12
Abb. 4 Die Rolle des FADD-Proteins in T-Zellen	. 13
Abb. 5 Schematischer Vergleich von Caspase-8, c-FLIP <sub>L</sub> und c-FLIP <sub>S</sub>	. 15
Abb. 6 Todesrezeptorsignaltransduktion in An- oder Abwesenheit von FLIP	. 16
Abb. 7 Die FLIP-abhängige Genexpression	. 17
Abb. 8 Regulierung des IL-2 Promotors	. 20
Abb. 9 Die Rolle von CIS/SOCS-Familie-Mitgliedern als negativen Regulatoren Cytokinsignalwegen	der . 21
Abb. 10 Klonierungsvektor für die Retrovirusproduktion	. 48
Abb. 11 Reduzierte Proliferation von FADDdn-T-Zellen nach Stimulation mit verschiede Stimuli	nen . 50
Abb. 12 Hierarchischer Cluster	. 53
Abb. 13 Erhöhte IL-2-mRNA-Expression in FADDdn-T-Zellen	. 54
Abb. 14 Normale IL-2-Proteinproduktion in FADDdn-T-Zellen	. 55
Abb. 15 Normale IL-2-mRNA-Induktion in Gegenwart des Caspase-Inhibitors z-VAD	. 56
Abb. 16 Calcium-abhängige Signaltransduktion in T-Zellen	. 57
Abb. 17 Erhöhte, aber CsA-sensitive IL-2-mRNA-Expression in FADDdn-T-Zellen	. 58
Abb. 18 Normale NF-AT-Aktivierung in FADDdn-T-Zellen	. 59

Abb. 19 Normale, CsA-sensitive NF-AT- Kerntranslokation in FADDdn-T-Zellen	60
Abb. 20 AP-1-Aktivierung in FADDdn-Zellen	61
Abb. 21 AP-1-mRNA und JunB-Proteinexpression in FADDdn-T-Zellen	63
Abb. 22 Aktivierung der einzelnen AP-1-Mitglieder	64
Abb. 23 Erhöhte Bcl-3 und SOCS-3 mRNA in FADDdn-T-Zellen	65
Abb. 24 GFP-Expression in T-Zellen	66
Abb. 25 SOCS-3 und Bcl-3 suprimieren die T-Zellproliferation	67
Abb. 26 Verstärkte SOCS-3 mRNA-Expression in Bcl-3-transduzierten Zellen	68
Abb. 27 Bessere Proliferation der Bcl-3-transduzierten SOCS-3 <sup>+/-</sup> -Zellen	69
Abb. 28 Relative Abnahme der T-Zellpopulation in FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> -Maus	70
Abb. 29 Abnahme der CD4- und CD8-T-Zellpopulationen in FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> -Maus	71
Abb. 30 Normale Entwicklung der Thymocytensubpopulationen in der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> -	Maus
Abb. 31 Reduzierte Proliferation der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> -T-Zellen	73
Abb. 32 Erhöhter Zelltod der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> -T-Zellen nach Stimulation	74
Abb. 33 FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> /vav-bcl2-T-Zellen sind vor Apoptose geschützt	75
Abb. 34 Bcl-2-ähnliche T-Zellentwicklung in der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> /vav-bcl2-Maus	76
Abb. 35 Abnahme der T-Zellpopulation in FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> /vav-bcl2-Maus	77
Abb. 36 Reduzierte Proliferation der FADDdn/bcl3 <sup>-/-</sup> /vav-bcl2-T-Zellen	78
Abb. 37 Hypothetisches Modell der Wirkung des FADDdn-Proteins auf T-Zellproliferati	on 86

#### LITERATURVERZEICHNIS

- 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**, 2231-5.
- Angel, P., and Karin, M. (1991): The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cellproliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 129-57.
- Arechiga, A. F., Bell, B. D., Solomon, J. C., Chu, I. H., Dubois, C. L., Hall, B. E., George, T. C., Coder, D. M., and Walsh, C. M. (2005): Cutting edge: FADD is not required for antigen receptor-mediated NF-kappaB activation. *J Immunol* 175, 7800-4.
- Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E. F., and Yaniv, M. (2002): Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol* 22, 4952-64.
- Baksh, S., Widlund, H. R., Frazer-Abel, A. A., Du, J., Fosmire, S., Fisher, D. E., DeCaprio, J. A., Modiano, J. F., and Burakoff, S. J. (2002): NFATc2-mediated repression of cyclindependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10, 1071-81.
- Bauer, A., Villunger, A., Labi, V., Fischer, S. F., Strasser, A., Wagner, H., Schmid, R. M., and Hacker, G. (2006): The NF-kappaB regulator Bcl-3 and the BH3-only proteins Bim and Puma control the death of activated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10979-84.
- Beisner, D. R., Chu, I. H., Arechiga, A. F., Hedrick, S. M., and Walsh, C. M. (2003): The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T cell activation and survival. *J Immunol* 171, 247-56.
- Blank, V., Kourilsky, P., and Israel, A. (1992): NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* 17, 135-40.
- 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, 7795-8.
- Budd, R. C. (2001): Activation-induced cell death. Curr Opin Immunol 13, 356-62.
- Budd, R. C. (2002): Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* **109**, 437-41.
- Caetano, M. S., Vieira-de-Abreu, A., Teixeira, L. K., Werneck, M. B., Barcinski, M. A., and Viola, J. P. (2002): NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *Faseb J* 16, 1940-2.
- Cain, K. (2003): Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev* **35**, 337-63.

- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002): c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* **21**, 3704-14.
- Chau, H., Wong, V., Chen, N. J., Huang, H. L., Lin, W. J., Mirtsos, C., Elford, A. R., Bonnard, M., Wakeham, A., You-Ten, A. I., Lemmers, B., Salmena, L., Pellegrini, M., Hakem, R., Mak, T. W., Ohashi, P., and Yeh, W. C. (2005): Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. *J Exp Med* 202, 405-13.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995): FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-12.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996): FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 4961-5.
- Chow, C. W., Rincon, M., and Davis, R. J. (1999): Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol Cell Biol* **19**, 2300-7.
- Clements, J. L., Boerth, N. J., Lee, J. R., and Koretzky, G. A. (1999): Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* **17**, 89-108.
- Cohney, S. J., Sanden, D., Cacalano, N. A., Yoshimura, A., Mui, A., Migone, T. S., and Johnston, J. A. (1999): SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol Cell Biol* 19, 4980-8.
- Crabtree, G. R., and Olson, E. N. (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79.
- Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (2002): MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**, 55-72.
- Eferl, R., and Wagner, E. F. (2003): AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859-68.
- Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. (1993): The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa Bmediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J* 12, 3893-901.
- Franzoso, G., Carlson, L., Scharton-Kersten, T., Shores, E. W., Epstein, S., Grinberg, A., Tran, T., Shacter, E., Leonardi, A., Anver, M., Love, P., Sher, A., and Siebenlist, U. (1997): Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity* 6, 479-90.

Frisch, S. (2004): Nuclear localization of FADD protein. *Cell Death Differ* **11**, 1361-2; author reply 1362-4.

Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770-6.

- Kabra, N. H., Kang, C., Hsing, L. C., Zhang, J., and Winoto, A. (2001): T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6307-12.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63.
- Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., and Tschopp, J. (2000): The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 10, 640-8.
- Kim, P. K., Dutra, A. S., Chandrasekharappa, S. C., and Puck, J. M. (1996): Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157, 5461-6.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-88.
- Krammer, P. H. (2000): CD95's deadly mission in the immune system. Nature 407, 789-95.
- Krebs, D. L., and Hilton, D. J. (2001): SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378-87.
- Kuwana, T., Smith, J. J., Muzio, M., Dixit, V., Newmeyer, D. D., and Kornbluth, S. (1998): Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273, 16589-94.
- Lens, S. M., Kataoka, T., Fortner, K. A., Tinel, A., Ferrero, I., MacDonald, R. H., Hahne, M., Beermann, F., Attinger, A., Orbea, H. A., Budd, R. C., and Tschopp, J. (2002): The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol Cell Biol* 22, 5419-33.
- Leonard, W. J., and O'Shea, J. J. (1998): Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293-322.
- 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.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-90.

- Mack, A., and Hacker, G. (2002): Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T cells. *Eur J Immunol* **32**, 1986-92.
- Masuda, E. S., Imamura, R., Amasaki, Y., Arai, K., and Arai, N. (1998): Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal* **10**, 599-611.
- Mathas, S., Johrens, K., Joos, S., Lietz, A., Hummel, F., Janz, M., Jundt, F.,
  Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Lichter, P., Stein, H., Scheidereit, C., and Dorken,
  B. (2005): Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in
  classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 106, 4287-93.
- Mitchell, T. C., Hildeman, D., Kedl, R. M., Teague, T. K., Schaefer, B. C., White, J., Zhu, Y., Kappler, J., and Marrack, P. (2001): Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat.Immunol* 2, 397-402.
- 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**, 706-18.
- Newton, K., Harris, A. W., and Strasser, A. (2000): FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *Embo J* **19**, 931-41.
- Newton, K., Kurts, C., Harris, A. W., and Strasser, A. (2001): Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells. *Curr Biol* **11**, 273-6.
- Newton, K., and Strasser, A. (2003): Caspases signal not only apoptosis but also antigeninduced activation in cells of the immune system. *Genes Dev* 17, 819-25.
- Nguyen, L. T., McKall-Faienza, K., Zakarian, A., Speiser, D. E., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (2000): TNF receptor 1 (TNFR1) and CD95 are not required for T cell deletion after virus infection but contribute to peptide-induced deletion under limited conditions. *Eur J Immunol* **30**, 683-8.
- Nolan, G. P., and Baltimore, D. (1992): The inhibitory ankyrin and activator Rel proteins. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 211-20.
- Nolan, G. P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H. C., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993): The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 13, 3557-66.
- O'Shea, J. J., Notarangelo, L. D., Johnston, J. A., and Candotti, F. (1997): Advances in the understanding of cytokine signal transduction: the role of Jaks and STATs in immunoregulation and the pathogenesis of immunodeficiency. *J Clin Immunol* **17**, 431-47.

- Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, C. G., Bath, M. L., Harris, A. W., and Adams, J. M. (1999): Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14943-8.
- Ohno, H., Takimoto, G., and McKeithan, T. W. (1990): The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* **60**, 991-7.
- Passegue, E., and Wagner, E. F. (2000): JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J* **19**, 2969-79.
- Rebollo, A., Dumoutier, L., Renauld, J. C., Zaballos, A., Ayllon, V., and Martinez, A. C. (2000): Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors. *Mol Cell Biol* 20, 3407-16.
- Rudd, C. E. (1999): Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. Cell 96, 5-8.
- Salmena, L., and Hakem, R. (2005): Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative immune disorder. *J Exp Med* **202**, 727-32.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P. Y., Berry, D. M., Tamblyn, 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, 883-95.
- 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**, 1541-8.
- 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 70kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* 164, 1236-42.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000): Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1123-36.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* **254**, 439-59.
- Serfling, E., Avots, A., and Neumann, M. (1995): The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim Biophys Acta* **1263**, 181-200.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002): AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6.
- Strasser, A., and Bouillet, P. (2003): The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunol Rev* **193**, 82-92.

- Strasser, A., and Newton, K. (1999): FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 533-7.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000): Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-45.
- Tai, T. S., Fang, L. W., and Lai, M. Z. (2004): c-FLICE inhibitory protein expression inhibits T-cell activation. *Cell Death Differ* **11**, 69-79.
- Thome, M., and Tschopp, J. (2001): Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* **1**, 50-8.
- Thompson, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Abbas, A. K., and Baltimore, D. (1999): Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity* 11, 763-70.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., and Wallach, D. (1998): Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-76.
- Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995): Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9, 2723-35.
- Walczak, H., and Krammer, P. H. (2000): The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66.
- Walczak, H., and Sprick, M. R. (2001): Biochemistry and function of the DISC. Trends Biochem Sci 26, 452-3.
- 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, 439-49.
- Westerheide, S. D., Mayo, M. W., Anest, V., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2001): The putative oncoprotein Bcl-3 induces cyclin D1 to stimulate G(1) transition. *Mol Cell Biol* **21**, 8428-36.
- Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (2000): Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12, 633-42.
- Yeh, W. C., Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V.,

and Mak, T. W. (1998): FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954-8.

- Yu, C. R., Mahdi, R. M., Ebong, S., Vistica, B. P., Gery, I., and Egwuagu, C. E. (2003): Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells. *J Biol Chem* 278, 29752-9.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998): Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**, 296-300.
- Zhang, J., Kabra, N. H., Cado, D., Kang, C., and Winoto, A. (2001): FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery. *J Biol Chem* **276**, 29815-8.
- 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**, 2756-63.
- Zhang, Q., Didonato, J. A., Karin, M., and McKeithan, T. W. (1994): BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Mol Cell Biol* 14, 3915-26.
- Zornig, M., Hueber, A. O., and Evan, G. (1998): p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. *Curr Biol* **8**, 467-70.

### PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil veröffentlicht:

Chaneva, S., Schneider, G., Siegmund, D., Wajant, H., Mages, J. and Hacker, G.,

Enhanced basal AP-1 activity and de-regulation of numerous genes in T cells transgenic for a dominant interfering mutant of FADD/MORT1. Eur J Immunol 2004. 34: 3006-3015.

Rangelova, S., Kirschnek, S., Strasser, A., Häcker, G.,

FADD and the NF-kappaB family member Bcl-3 regulate complementary pathways to control T-cell survival and proliferation. Immunology 2008 Jun 13